



HAL
open science

Étude des propriétés membranaires des vésicules lipidiques incorporant des triterpènes oxygénés bioactifs d'origine végétale : application à la cucurbitacine E et à l'érythrodiol

Lamice Habib

► **To cite this version:**

Lamice Habib. Étude des propriétés membranaires des vésicules lipidiques incorporant des triterpènes oxygénés bioactifs d'origine végétale : application à la cucurbitacine E et à l'érythrodiol. Sciences pharmaceutiques. Université Claude Bernard - Lyon I; École doctorale des Sciences et de Technologie (Beyrouth), 2014. Français. NNT : 2014LYO10022 . tel-01089395

HAL Id: tel-01089395

<https://theses.hal.science/tel-01089395>

Submitted on 1 Dec 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université Libanaise

École Doctorale
Sciences et Technologies



Université Claude-Bernard Lyon 1

THESE EN COTUTELLE

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD LYON 1

Ecole Doctorale de Chimie de Lyon

et

DE L'UNIVERSITE LIBANAISE

Ecole Doctorale des Sciences et Technologie

Spécialité : Génie Pharmacotechnique

Présentée et soutenue publiquement par

Lamice HABIB

Le 04 Février 2014

Etude des propriétés membranaires des vésicules lipidiques incorporant des triterpènes oxygénés bioactifs d'origine végétale : application à la cucurbitacine E et à l'érythrodiol

Devant le jury composé de :

Mme Zeinab Saad, Pr, Université Libanaise

M. Bernard Tinland, HDR, Université Aix Marseille

M. Digambara Patra, Dr, American University of Beirut

M. Hatem Fessi, Pr, Université Lyon 1

Mme Alia Jraij, Dr, Université Libanaise

Mme Hélène Greige, Pr, Université Libanaise

Mme Catherine Charcosset, HDR, Université Lyon 1

Mme Nathalie Khreich, Dr, Université Libanaise

Présidente

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examinatrice

Co-Directrice de thèse

Co-Directrice de thèse

Co-Encadrante de thèse

Equipe de Recherche des Molécules Bioactives (ER 28), Plateforme de Recherche et d'Analyse en Sciences de l'Environnement, Ecole Doctorale des Sciences et Technologie, Faculté des Sciences, Université Libanaise, Liban.

UMR-CNRS 5007, Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés, CPE, bâtiment 308G, 43 Boulevard du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

Remerciements

Ce travail est le fruit d'une riche contribution d'acteurs qui n'ont pas ménagé leurs efforts durant ces trois années pour me permettre d'atteindre ce résultat. Cet accomplissement, je le dois à vous tous et je vous en remercie grandement en ces premières lignes et je m'excuse par avance des oublis éventuels.

*A Madame la Doyenne de l'Ecole Doctorale des Sciences et Technologie, Pr. Zeinab Saad et
A Monsieur le Directeur de l'Ecole Doctorale de Chimie de Lyon, Pr. Jean-Marc Lancelin*

Je vous présente ma vive gratitude pour m'avoir donné la chance de m'inscrire en thèse de doctorat en co-tutelle entre les deux écoles doctorales afin d'obtenir le diplôme de doctorat. Je vous remercie Madame la Doyenne pour l'honneur que vous m'avez donné en acceptant de présider le jury de cette thèse.

A Pr. Hélène Greige

Je tiens à vous accorder ma reconnaissance toute particulière. Avec l'efficacité de votre supervision et votre rigueur scientifique, vous m'avez transmis la passion de la recherche scientifique. Grâce à vos mots pertinents que vous avez toujours trouvés pour me rassurer, me conseiller et me faire constamment profiter de votre expérience, j'ai pu apprécier votre dimension humaine et vos grandes qualités professionnelles. Ce travail n'aurait pas pu être ce qu'il est sans votre compétence, votre disponibilité et votre enthousiasme pour la recherche.

A Dr. Catherine Charcosset

Je vous adresse ma profonde et sincère gratitude pour m'avoir accompagné du premier jusqu'au dernier instant durant mes séjours en France. Tout au long de la période passée au laboratoire partenaire, ma motivation, ma force de travail et mes conduites réflexives sont restées intactes grâce à votre supervision perspicace et raisonnable. Votre attitude calme et responsable qui reflète votre rigueur scientifique reste pour moi un exemple.

A Dr. Alia Jraij et Dr. Nathalie Khreich

Je vous présente vivement mes chaleureux remerciements pour votre encadrement durant cette thèse. Je suis vraiment ravie d'avoir partagé vos connaissances à travers nos nombreuses discussions scientifiques. Votre soutien inconditionnel m'a été une source de motivation permanente. Je vous remercie pour votre aide, votre amitié et votre disponibilité que vous m'avez toujours témoignées.

A Pr. Hatem Fessi et Pr. Bassam Badran

Je tiens à vous exprimer ma gratitude de m'avoir accueilli au sein des Laboratoires que vous dirigez, le Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (Université Lyon 1) et la Plateforme de Recherche et d'Analyse en Sciences de l'Environnement (Université Libanaise) et de m'avoir permis de profiter d'excellentes conditions de travail. Je vous remercie également Monsieur Fessi pour l'honneur que vous m'avez donné en acceptant de participer au jury de cette thèse.

A Dr. Bernard Tinland et Dr. Digambara Patra

Je vous présente mes sincères remerciements pour l'intérêt que vous portez à ce travail de thèse en acceptant de le rapporter.

A Madame Agnès Piednoir

Je tiens à vous faire part de ma gratitude pour votre aide à réaliser les imageries par microscopie à force atomique à l'Institut Lumière Matière, Université Lyon 1. Un grand merci pour le temps que vous avez consacré pour la réussite de ce travail, pour votre gentillesse et votre disponibilité.

A Géraldine Agusti, Audrey Juban et Ahmad Bitar

Je vous adresse tous mes remerciements pour votre aide à la réalisation des imageries par microscopie électronique à transmission au Centre Technologique des Microstructures, Université Lyon 1.

A Dr. Chawki Saliba et Dr. Aida Habib

Je vous remercie de m'avoir donné la possibilité avec beaucoup de tolérance de travailler au sein du Laboratoire de Chimie Analytique, Université Libanaise et du département de Biochimie et Génétique moléculaire, American University of Beirut.

A Madame Nisrine Oueidat et Madame Souha Khoury

Je vous remercie sincèrement pour votre aide et vos conseils techniques dans les expériences de chromatographie liquide à haute performance et spectroscopie de fluorescence, pour votre amitié et votre présence attentive.

A mes chers amis

Lamis Karaki, Nathalie Esber, Layal El Rayes, Emil Obeid, merci pour les beaux moments que nous avons passés ensemble à Lyon et à Paris et les formidables voyages que nous avons organisés ensemble. Que de beaux souvenirs de ces moments inoubliables!
Nathalie Medawar, l'amie fidèle pour toujours, merci pour ton aide et ton soutien inestimables.

A toute la famille du LAGEP et les personnes que j'ai eues la chance de côtoyer

Je vous remercie énormément d'avoir rendu mon séjour agréable au laboratoire.

A mes Parents, ma sœur et mes frères

Je vous remercie de tout cœur pour votre générosité illimitée, pour votre soutien moral et sans faille. Vous étiez présents et toujours à mes côtés dans les moments critiques et dans tout ce que j'ai pu souffrir et obtenir. Je vous adresse toute mon affection pour avoir accepté avec beaucoup de tolérance toutes mes sautes d'humeur. C'est une chance exceptionnelle de vous avoir dans ma vie.

A l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF) et le Conseil National de la Recherche Scientifique (CNRSL)

Je tiens à vous remercier profondément pour l'aide financière durant ma thèse.

Ce travail a bénéficié d'un financement apporté par *le programme CEDRE, le CNRS Libanais (référence 08-02-11) et l'Ecole Doctorale des Sciences et Technologie à l'Université Libanaise* : Ils sont infiniment remerciés.

Bien d'autres sont à citer, mais leur modestie admettra une pensée reconnaissante qui sera en permanence inscrite au travers des lignes composant l'ensemble de ce manuscrit.

Table des matières

Remerciements.....	2
Table des matières.....	6
Liste des figures.....	12
Liste des tableaux.....	18
Liste d'abréviations.....	19
Liste des symboles.....	20
Résumé.....	21
Abstract.....	22
Introduction générale.....	23
PARTIE 1 : BIBLIOGRAPHIE.....	27
1 Chapitre 1 : Introduction aux triterpènes tétra- et pentacycliques.....	28
1.1 Les terpènes.....	28
1.2 Les triterpènes.....	29
1.3 Biosynthèse des triterpènes.....	29
1.3.1 Biosynthèse des cucurbitacines.....	32
1.3.2 Biosynthèse de l'érythrodiol.....	33
1.4 Les cucurbitacines.....	35
1.4.1 Structures.....	35
1.4.2 Propriétés physicochimiques.....	37
1.4.3 Fonctions biologiques des cucurbitacines.....	37
1.4.4 Pharmacocinétique des cucurbitacines.....	38
1.4.4.1 Distribution des cucurbitacines.....	38
1.4.4.2 Métabolisme des cucurbitacines.....	39

1.4.4.3	Excrétion des cucurbitacines	40
1.4.5	Encapsulation des cucurbitacines	40
1.4.5.1	Formes d'encapsulation des cucurbitacines	40
1.4.5.2	Activité anticancéreuse des cucurbitacines encapsulées	43
1.5	L'érythrodiol	47
1.5.1	Propriétés physicochimiques de l'érythrodiol	48
1.5.2	Fonctions biologiques de l'érythrodiol	48
1.5.3	Pharmacocinétique	49
1.5.4	Encapsulation de l'érythrodiol dans des nanoparticules	49
2	Chapitre 2 : Les Liposomes	50
2.1	Introduction	50
2.2	Classification des liposomes	51
2.3	Développement des liposomes	52
2.4	Composition des liposomes	53
2.4.1	Les phospholipides	53
2.4.1.1	Température de transition de phase d'un phospholipide	56
2.4.1.2	Dynamique moléculaire : mouvements des phospholipides	57
2.4.2	Les stéroïdes	58
2.5	Stabilité des liposomes	59
2.5.1	Aggrégation des liposomes	59
2.5.2	Instabilité chimique	60
2.5.2.1	Les réactions d'oxydation	60
2.5.2.2	Les réactions d'hydrolyse	60
2.5.3	La lyophilisation	61
2.6	Méthodes de préparation des liposomes	62

2.6.1	Les méthodes de dispersion mécanique des phospholipides	62
2.6.1.1	Hydratation du film lipidique	62
2.6.1.2	Sonication	63
2.6.1.3	Extrusion.....	65
2.6.1.4	Presse de French (French pressure cell)	66
2.6.1.5	Microfluidisation	66
2.6.2	Les méthodes d'élimination du solvant organique	67
2.6.2.1	Evaporation en phase inverse	67
2.6.2.2	Injection de solvant organique.....	71
2.6.3	Les méthodes d'élimination d'un détergent.....	73
2.6.4	Les méthodes utilisant des liposomes préformés : La congélation-décongélation (Freeze-thaw method)	75
2.7	Incorporation de substances dans les liposomes.....	75
2.7.1	Mécanismes et modes d'incorporation de molécules dans les liposomes	76
2.7.2	Efficacité d'encapsulation (pourcentage ou taux d'encapsulation)	78
2.8	Utilisation des liposomes comme modèle membranaire	79
3	Chapitre 3 : Interaction des triterpènes avec les membranes lipidiques	81
3.1	Effet des triterpènes sur la fluidité membranaire	81
3.2	Effet des triterpènes sur la perméabilité membranaire	87
3.3	Effet des triterpènes sur le comportement thermique de la bicouche lipidique : Localisation au niveau membranaire.....	90
3.4	Caractérisation morphologique des liposomes	96
PARTIE 2 : PARTIE EXPERIMENTALE		101
4	Chapitre 4 : Objectif et stratégie expérimentale	102
4.1	Objectif	102

4.2	Stratégie expérimentale.....	102
4.2.1	Choix du système.....	102
4.2.2	Les LUV : préparation et utilité dans les études de perméabilité membranaire ...	103
4.2.3	Les MLV : préparation et utilité dans la détermination de la localisation au niveau membranaire	103
4.2.4	Préparation de liposomes par la méthode d'injection d'éthanol.....	104
4.2.5	Détermination du taux d'incorporation de la Cuc E et de l'érythrodiol dans les liposomes	104
4.2.6	Caractérisation structurale et morphologique des liposomes.....	105
4.3	Schémas récapitulatifs	105
5	Chapitre 5 : Matériels et méthodes	108
5.1	Produits chimiques.....	108
5.2	Préparation des liposomes.....	108
5.2.1	Préparation des MLV par la méthode d'hydratation du film lipidique.....	108
5.2.2	La méthode d'évaporation en phase inverse	109
5.2.2.1	Préparation des LUV	109
5.2.2.2	Extrusion des LUV	111
5.2.2.3	Préparation des LUV encapsulant la SRB en absence et en présence de Cuc E	111
5.2.3	Préparation des liposomes par la méthode d'injection d'éthanol en absence et en présence de l'érythrodiol.....	112
5.3	Caractérisation des liposomes.....	112
5.3.1	Détermination du taux d'incorporation de la Cuc E et de l'érythrodiol dans les liposomes par HPLC	112
5.3.2	Dosage de phospholipides.....	114

5.3.3	Détermination des paramètres thermotropiques de la bicouche lipidique par calorimétrie différentielle à balayage (DSC : Differential Scanning Calorimetry)	115
5.3.4	Mesure de taille par diffusion dynamique de la lumière (DLS : Dynamic Light Scattering)	116
5.3.5	Détermination du potentiel zêta	116
5.3.6	Observation morphologique par microscopie électronique à transmission (TEM : Transmission Electron Microscopy)	116
5.3.7	Observation et mesures des dimensions des vésicules par microscopie à force atomique (AFM : Atomic Force Microscopy)	117
5.3.8	Etude de la perméabilité des liposomes par spectroscopie de fluorescence	118
5.3.8.1	Préparation des suspensions liposomiales pour les mesures de fluorescence	118
5.3.8.2	Mesures de fluorescence par spectroscopie de fluorescence	118
PARTIE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION		119
6	Chapitre 6 : Résultats et Discussion	120
6.1	Détermination du taux d'incorporation de la Cuc E et de l'érythrodiol dans les liposomes par HPLC	120
6.2	Détermination des paramètres calorimétriques de la bicouche lipidique en absence et en présence de la Cuc E ou de l'érythrodiol par DSC	124
6.3	Détermination de la taille et du potentiel zêta des liposomes en absence et en présence de la Cuc E et de l'érythrodiol par DLS	131
6.3.1	Distribution de taille des populations liposomiales	131
6.3.2	Taille des liposomes	134
6.3.3	Indice de polydispersité (Pdl)	138
6.3.4	Potentiel zêta	138
6.4	Observation morphologique des liposomes par TEM	139
6.4.1	LUV témoins (lots 1 et 4), LUV avec Cuc E (lots 2 et 3) et LUV avec érythrodiol (lots 5 et 6)	139
		10

6.4.2	Liposomes préparés par injection d'éthanol (Lots 9, 10, 11, 12 et 13).....	142
6.5	Observation morphologique et mesure des dimensions des vésicules liposomiales en absence et en présence de la Cuc E et de l'érythrodiol par AFM	143
6.5.1	LUV témoins (lot 1) et LUV avec Cuc E (lots 2 et 3)	144
6.5.2	LUV témoins (Lot 4) et LUV avec érythrodiol (lots 5 et 6).....	155
6.6	Etude de la perméabilité membranaire en absence et en présence de la Cuc E – Cinétique de libération de la SRB	167
	Conclusion et perspectives.....	172
	Références.....	176
	Annexe	205

Liste des figures

Figure 1 : Structure de l'isoprène, unité de constitution des terpènes	28
Figure 2 : Oxydation du squalène et génération de l'oxyde de squalène.....	30
Figure 3 : Orientation vers la synthèse des stéroïdes et des autres triterpènes en fonction de la conformation adoptée par le 2,3 époxysqualène.....	31
Figure 4 : Conversion du 2,3-époxysqualène en cucurbita-5,24-diènoI, précurseur des cucurbitacines, catalysée par la cucurbitadiènoI synthétase	32
Figure 5 : Schéma représentatif de la biosynthèse de l'érythrodiol et de l'acide oléanolique.....	34
Figure 6 : Structure chimique générale des cucurbitacines	36
Figure 7 : Structure chimique de la cucurbitacine E.....	36
Figure 8 : Synthèse des copolymères blocs, PEO-b-PCL (A) et PEO-b-PBCL (B).....	41
Figure 9 : Synthèse du copolymère bloc, PEO-b-PChCL.....	42
Figure 10 : Structure chimique du PEO-b-3PCL.....	42
Figure 11 : Structures chimiques du PLGA et de la cucurbitacine I conjugué au PLGA.....	43
Figure 12 : Structure chimique de l'érythrodiol et des acides oléanolique et maslinique	47
Figure 13 : Structure d'un liposome	50
Figure 14 : Les différentes classes de liposomes selon la taille et le nombre de lamelles.....	52
Figure 15 : Structure d'un phospholipide	54
Figure 16 : Les différents états d'une bicouche phospholipidique en fonction de la température	56
Figure 17 : Représentation schématique de la dynamique des lipides au sein des membranes....	57
Figure 18 : (A) Structure du cholestérol, (B) Positionnement du cholestérol entre les phospholipides d'une monocouche lipidique.....	59
Figure 19 : Préparation des liposomes par la méthode d'hydratation du film lipidique.....	63
Figure 20 : Préparation des liposomes unilamellaires par sonication.....	65
Figure 21 : Formation de liposomes unilamellaires par extrusion des MLV	66
Figure 22 : Préparation de liposomes larges unilamellaires (LUV) par la méthode d'évaporation en phase inverse	68
Figure 23 : Schéma représentatif du processus de formation de liposomes par scRPE (a-d) et par IscRPE (e-g). (a) Mélange uniforme de phospholipides, éthanol et CO ₂ , (b) émulsion eau/CO ₂ ,	

(c) émulsion CO ₂ /eau, (d) dispersion liposomiale, (e) mélange inhomogène de phospholipides et eau, (f) émulsion CO ₂ /eau, (g) dispersion liposomiale.....	71
Figure 24 : Préparation des liposomes par injection de solvant organique.....	72
Figure 25 : Préparation des liposomes par la méthode d'élimination du détergent.....	74
Figure 26 : Localisation d'un principe actif dans un liposome en fonction de sa nature chimique	76
Figure 27 : Structure générale des triterpènes pentacycliques monoalcooliques : le lupéol, le taraxérol et l'α-amyrine	83
Figure 28 : Structures de différents oxystérols : 25-hydroxycholestérol, 27-hydroxycholestérol, 7β-hydroxycholestérol et 7-ketocholestérol.....	85
Figure 29 : Positionnement des oxystérols au niveau de la membrane lipidique, en fonction de la position du substituant oxygéné.....	87
Figure 30 : Structure chimique générale des saponines de l'acide oléanolique	88
Figure 31 : Paramètres thermodynamiques caractéristiques d'une courbe thermique par DSC, relative à une bicouche lipidique	91
Figure 32 : Images obtenues par microscopie électronique à transmission pour des liposomes PEG-ylés encapsulant l'acide oléanolique. (A) : formulation sans le Tween-80 et (B) : formulation avec le Tween-80	99
Figure 33 : (A et C) : Images en 3D et (B et D) : Images en 2D, obtenues par microscopie à force atomique pour des liposomes PEG-ylés encapsulant l'acide oléanolique. (A et B) : formulation sans le Tween-80, (C et D) : formulation avec le Tween-80	100
Figure 34 : Les différents types de liposomes préparés et leurs intérêts	106
Figure 35 : Techniques de caractérisation des liposomes.....	107
Figure 36 : Courbe d'étalonnage utilisée pour le dosage des phospholipides	121
Figure 37 : Courbe d'étalonnage utilisée pour le dosage de la Cuc E.....	121
Figure 38 : Courbe d'étalonnage utilisée pour le dosage de l'érythrodiol.....	123
Figure 39 : Les thermogrammes obtenus par DSC pour les MLV témoins (DPPC:Cuc E 100:0) et les MLV avec Cuc E (DPPC:Cuc E 100:7, 100:12 et 100:24)	125
Figure 40 : Les thermogrammes obtenus pour les MLV témoins (DPPC:Cuc E 100:0) et les MLV avec érythrodiol (DPPC:érythrodiol 100:10, 100:17 et 100:34).....	126

Figure 41 : Distribution de taille, (A) : lot 1 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/5/0), (B) : lot 2 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/3,8/1,2) et (C) : lot 3 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/3/2) (a, b et c sont trois préparations de chaque lot).....	132
Figure 42 : Distribution de taille, (A) : lot 4 (phospholipides/Cho/érythrodiol 5,75/5/0), (B) : lot 5 (phospholipides/Cho/érythrodiol 5,75/4,5/0,5) et (C) : lot 6 (phospholipides/Cho/érythrodiol 5,75/3,8/1,2) (a, b et c sont trois préparations de chaque lot).	133
Figure 43 : Distribution de taille des liposomes préparés par injection d'éthanol, (A) : lot 9 (phospholipides/érythrodiol 100/0), (B) : lot 10 (phospholipides/érythrodiol 100/0,75), (C) : lot 11 (phospholipides/érythrodiol 100/1,5), (D) : lot 12 (phospholipides/érythrodiol 100/3) et (E) : lot 13 (phospholipides/érythrodiol 100/7), (a,b et c sont trois préparations de chaque lot).	134
Figure 44 : Images obtenues par TEM, (A et B) : lot 1 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/5/0), (C) : lot 2 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/3,8/1,2) et (D) : lot 3 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/3/2).	140
Figure 45 : Images obtenues par TEM, (A et B) : lot 4 (phospholipides/Cho/érythrodiol 5,75/5/0), (C et D) : lot 5 (phospholipides/Cho/érythrodiol 5,75/4,5/0,5) et (E et F) : lot 6 (phospholipides/Cho/érythrodiol 5,75/3,8/1,2).	141
Figure 46 : Images obtenues par TEM des liposomes préparés par injection d'éthanol. (A) : lot 9 (phospholipides/érythrodiol 100/0), (B) : lot 10 (phospholipides/érythrodiol 100/0,75), (C) : lot 11 (phospholipides/érythrodiol 100/1,5), (D) : lot 12 (phospholipides/érythrodiol 100/3) et (E) : lot 13 (phospholipides/érythrodiol 100/7).	143
Figure 47 : Images bidimensionnelles obtenues par AFM montrant des vésicules, (A) : lot 1 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/5/0), (B) : lot 2 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/3,8/1,2) et (C) : lot 3 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/3/2), enregistrées en mode contact sur une région de 5µm x 5µm.	145
Figure 48 : Images bidimensionnelles obtenues par AFM montrant des vésicules, (A) : lot 1 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/5/0), (B) : lot 2 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/3,8/1,2) et (C) : lot 3 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/3/2), enregistrées en mode contact sur une région de 5µm x 5µm.	146
Figure 49 : (A) : Mesure de la taille d'une vésicule (barre au milieu de la vésicule) et (B) : estimation de sa valeur sur le profil obtenu.	147

Figure 50 : Images bidimensionnelles obtenues par AFM montrant des vésicules, (A) : lot 1 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/5/0), (B) : lot 2 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/3,8/1,2) et (C) : lot 3 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/3/2) enregistrées en mode contact sur une région de 5µm x 5µm.....	148
Figure 51 : (A) : Mesure de la hauteur d'une vésicule (barre au milieu de la vésicule) et (B) : estimation de sa valeur sur le profil obtenu.	149
Figure 52 : Images tridimensionnelles obtenues par AFM de 3 régions différentes (A, B et C) du mica qui montrent des liposomes du lot 1 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/5/0) enregistrées en mode contact, sur une région de 5µm x 5µm.....	151
Figure 53 : Images tridimensionnelles obtenues par AFM de 3 régions différentes (A, B et C) du mica qui montrent des liposomes du lot 2 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/3,8/1,2) enregistrées en mode contact, sur une région de 5µm x 5µm.	152
Figure 54 : Images tridimensionnelles obtenues par AFM de 3 régions différentes (A, B et C) du mica qui montrent des liposomes du lot 3 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/3/2) enregistrées en mode contact, sur une région de 5µm x 5µm.....	153
Figure 55 : Modèle schématique d'un liposome adsorbé sur une surface de mica.....	154
Figure 56 : Images bidimensionnelles obtenues par AFM, des liposomes témoins (lot 4) (phospholipides/Cho/érythrodiol 5,75/5/0). Les 2 images sont prises sur une région de 5 µm x 5 µm et après environ 10 min d'imagerie. Les figures A et B sont relatives à la même zone du mica balayée deux fois de suite. L'échelle de couleur à droite de l'image correspond à la hauteur des vésicules en nm (la hauteur diminue de haut en bas).....	156
Figure 57 : Images bidimensionnelles obtenues par AFM des liposomes témoins (lot 4) (phospholipides/Cho/érythrodiol 5,75/5/0). Les 3 images sont prises sur une région de 5 µm x 5 µm et après environ 30 min d'imagerie. Les figures A, B et C sont relatives à la même zone balayée 3 fois de suite. L'échelle de couleur à droite de l'image correspond à la hauteur des vésicules en nm (la hauteur diminue de haut en bas).....	157
Figure 58 : Images bidimensionnelles obtenues par AFM des liposomes du lot 5 (phospholipides/Cho/érythrodiol 5,75/4,5/0,5). Deux zones différentes (A et B) de la surface du mica sont montrées. Les 2 images A et B, sont enregistrées sur une région de 5 µm x 5 µm et sont prises après respectivement 5 et 15 min d'imagerie. L'échelle de couleur à droite de l'image correspond à la hauteur des vésicules en nm (la hauteur diminue de haut en bas).....	159

Figure 59 : Images bidimensionnelles obtenues par AFM des liposomes du lot 5 (phospholipides/Cho/érythrodiol 5,75/4,5/0,5). Deux zones différentes (A et B) de la surface du mica sont montrées. Les 2 images A et B sont enregistrées sur une région de 5 µm x 5 µm et sont prises après respectivement 30 et 90 min environ d'imagerie. L'échelle de couleur à droite de l'image correspond à la hauteur des vésicules en nm (la hauteur diminue de haut en bas)..... 160

Figure 60 : Images bidimensionnelles obtenues par AFM des liposomes du lot 6 (phospholipides/Cho/érythrodiol 5,75/3,8/1,2). Les figures A et B sont relatives à la même zone du mica balayée deux fois de suite. Les 2 images sont prises sur une région de 5 µm x 5 µm et au début de l'imagerie. L'échelle de couleur à droite de l'image correspond à la hauteur des vésicules en nm (la hauteur diminue de haut en bas)..... 161

Figure 61 : Images bidimensionnelles obtenues par AFM des liposomes du lot 6 (phospholipides/Cho/érythrodiol 5,75/3,8/1,2). Les 2 images sont prises sur une région de 5 µm x 5 µm et après environ 45 min d'imagerie. Les figures A et B sont relatives à la même zone du mica balayée deux fois de suite. L'échelle de couleur à droite de l'image correspond à la hauteur des vésicules en nm (la hauteur diminue de haut en bas). 162

Figure 62 : Images bidimensionnelles obtenues par AFM des liposomes du lot 6 (phospholipides/Cho/érythrodiol 5,75/3,8/1,2). A et B sont deux zones différentes de la surface du mica. Les 2 images A et B sont enregistrées sur une région de 5 µm x 5 µm et sont prises après respectivement 60 et 75 min environ d'imagerie. L'échelle de couleur à droite de l'image correspond à la hauteur des vésicules en nm (la hauteur diminue de haut en bas)..... 163

Figure 63 : Images bidimensionnelles obtenues par AFM du lot supplémentaire de liposomes avec érythrodiol (phospholipides/Cho/érythrodiol 5,75/3/2). Deux zones différentes A et B de la surface sont représentées et sont prises après respectivement 20 et 40 min d'imagerie. Les 2 images sont enregistrées sur une région de 5 µm x 5 µm. L'échelle de couleur à droite de l'image correspond à la hauteur des vésicules en nm (la hauteur diminue de haut en bas)..... 164

Figure 64 : Images bidimensionnelles obtenues par AFM, (A) : lot 4 (phospholipides/Cho/érythrodiol 5,75/5/0), (B) : lot 5 (phospholipides/Cho/érythrodiol 5,75/4,5/0,5) et (C) : lot 6 (phospholipides/Cho/érythrodiol 5,75/3,8/1,2). Les 3 images sont enregistrées sur une région de 5 µm x 5 µm. L'échelle de couleur à droite de l'image correspond à la hauteur des vésicules en nm (la hauteur diminue de haut en bas)..... 165

Figure 65 : Images tridimensionnelles obtenues par AFM, (A) : lot 4 (phospholipides/Cho/érythrodiol 5,75/5/0), (B) : lot 5 (phospholipides/Cho/érythrodiol 5,75/4,5/0,5) et (C) : lot 6 (phospholipides/Cho/érythrodiol 5,75/3,8/1,2). Les 3 images sont enregistrées sur une région de 5 μm x 5 μm . L'échelle de couleur à droite de l'image correspond à la hauteur des vésicules en nm (la hauteur diminue de haut en bas)..... 166

Figure 66 : Variation de la fluorescence en fonction du temps des suspensions liposomiales du lot 7 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/5/0) et du lot 8 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/3,8/1,2) à 4°C. F_t est la fluorescence intrinsèque de la suspension au temps t, F_0 est la fluorescence initiale mesurée au temps t_0 et F_{max} est la fluorescence maximale obtenue en présence du détergent non ionique, le Triton X-100 (1%). 168

Figure 67 : Variation de la fluorescence en fonction du temps des suspensions liposomiales du lot 7 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/5/0) et du lot 8 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/3,8/1,2) à 37°C. F_t est la fluorescence intrinsèque de la suspension au temps t, F_0 est la fluorescence initiale mesurée au temps t_0 et F_{max} est la fluorescence maximale obtenue en présence du détergent non ionique, le Triton X-100 (1%). 169

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les différents types de vecteurs utilisés pour encapsuler les cucurbitacines et améliorer leur performance dans l'organisme.	46
Tableau 2 : Certains phospholipides et lipides utilisés dans la formulation des liposomes	55
Tableau 3 : Modifications apportées au niveau des paramètres thermodynamiques d'une bicouche de phosphatidylcholine après incorporation de différentes molécules triterpéniques et stéroïdes avec différents rapports molaires.	92
Tableau 4 : La composition des MLV préparées sans et avec la Cuc E et l'érythrodiol.	109
Tableau 5 : Les différents lots de LUV préparés sans et avec Cuc E ou érythrodiol et les rapports molaires respectifs utilisés.	110
Tableau 6 : Taux d'incorporation de l'érythrodiol dans les liposomes préparés par injection d'éthanol. Les valeurs représentées sont les moyennes de 3 dosages répétés.	123
Tableau 7 : Les paramètres calorimétriques déterminés par DSC pour les MLV formés de DPPC:Cuc E 100:0, 100:7, 100:12 et 100:24. Les valeurs sont exprimées par la moyenne de toutes les mesures réalisées \pm écart-type (SD).	128
Tableau 8 : Les paramètres calorimétriques déterminés par DSC pour les MLV formés de DPPC:érythrodiol 100:0, 100:10, 100:17 et 100:34. Les valeurs sont exprimées par la moyenne de toutes les mesures réalisées \pm écart-type (SD).	129
Tableau 9 : Les valeurs de diamètre moyen, de PdI et de potentiel zêta obtenues par DLS pour les lots de LUV 1, 2 et 3. Les valeurs sont exprimées par la moyenne de toutes les mesures (réalisées pour les trois préparations de chaque lot) \pm SD.	135
Tableau 10 : Les valeurs de diamètre moyen, de PdI et de potentiel zêta obtenues par DLS pour les lots de LUV 4, 5 et 6. Les valeurs sont exprimées par la moyenne de toutes les mesures (réalisées pour les trois préparations de chaque lot) \pm SD.	135
Tableau 11 : Les valeurs de diamètre, de PdI et de potentiel zêta obtenues par DLS pour les lots 9, 10, 11, 12 et 13 de liposomes préparés par injection d'éthanol sans et avec érythrodiol. Les valeurs sont exprimées par la moyenne de toutes les mesures (réalisées pour les trois préparations de chaque lot) \pm SD.	137

Liste d'abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
AFM	Atomic Force Microscopy
Cho	Cholestérol
Cuc D	Cucurbitacine D
Cuc E	Cucurbitacine E
CYP	Cytochrome P450
DLS	Dynamic Light scattering
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholine
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DOPC	Dioléylphosphatidylcholine
DPH	1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine
DPPE	Dipalmitoylphosphatidyléthanolamine
DPPG	Dipalmitoylphosphatidylglycérol
DSC	Differential Scanning Calorimetry
EPC	Egg Phosphatidylcholine
GUV	Giant Unilamellar Vesicles
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
JAK 2	Janus kinase 2
LUV	Large Unilamellar Vesicles
MLV	Multilamellar Vesicles
MVV	Multivesicular Vesicles
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NPs	Nanoparticles
PdI	Polydispersity Index
PEG	Polyéthylène Glycol
PEO-b-PCL	Poly(éthylène oxyde)-bloc-poly(ϵ -caprolactone)
PEO-b-PBCL	Poly(éthylène oxyde)-bloc-poly(α -benzylcarboxylate- ϵ -caprolactone)
PEO-b-PChCL	Poly(éthylène oxyde)-bloc-poly(α -cholestéryl carboxylate- ϵ -caprolactone)
PEO-b-3PCL	Poly(éthylène oxyde)-bloc-trois poly(ϵ -caprolactone)
SLNs	Solid Lipid Nanoparticles
SRB	Sulforhodamine B
STAT 3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
SUV	Small Unilamellar Vesicles
TEM	Transmission Electron Microscopy
TMA-DPH	1-(4-triméthyl-ammoniumphényl)-6-phényl-1,3,5-hexatriène

Liste des symboles

F_0	Fluorescence initiale mesurée au temps t_0
F_{\max}	Fluorescence maximale
F_t	Fluorescence mesurée au temps t
HCl	Acide Chlorhydrique
K_m	Constante de Michaelis-Menten
NaCl	Chlorure de Sodium
T_m	Melting Temperature
T_p	Pre-Transition Temperature
V_{\max}	Vitesse maximale
Δ^{23}	Double liaison entre C-23 et C-24
ΔH_m	Melting Enthalpy
ΔH_p	Pre-Transition Enthalpy
$\Delta T_{1/2}$	Width at half height of the transition Peak

Résumé

La cucurbitacine E et l'érythrodiol sont des triterpènes naturels oxygénés ayant respectivement un squelette tétra et pentacyclique. Ils sont reconnus pour leurs diverses propriétés biologiques. Dans ce travail de thèse, nous étudions leur interaction avec les membranes des vésicules lipidiques dans le but de mieux comprendre leur pharmacodynamie. Nous avons préparé des liposomes en absence et en présence de la cucurbitacine E et de l'érythrodiol par les techniques d'évaporation en phase inverse suivie d'une extrusion, d'hydratation du film lipidique et d'injection d'éthanol. Les caractéristiques physicochimiques des vésicules lipidiques incorporant ou non la molécule triterpénique ont été étudiées par des techniques adéquates. Les analyses de la cucurbitacine E et de l'érythrodiol par la chromatographie liquide à haute performance ont montré que leurs taux d'incorporation dans les liposomes sont élevés. Les mesures de taille obtenues par la diffusion dynamique de la lumière ont démontré que les liposomes incorporant les triterpènes présentent une taille moyenne inférieure à celle des liposomes témoins. Les images obtenues par la microscopie électronique à transmission ont confirmé la formation de vésicules sphériques. Les mesures des dimensions des vésicules observées par la microscopie à force atomique (AFM), ont révélé que les liposomes incorporant la cucurbitacine E sont plus hauts et résistent mieux à la force exercée par la pointe AFM que les liposomes témoins. Par ailleurs, les liposomes incorporant l'érythrodiol sont plus fragiles que les liposomes témoins et ont tendance à éclater en bicouches lipidiques à la surface du support. Les courbes thermiques obtenues par la calorimétrie différentielle à balayage ont permis de conclure que la cucurbitacine E est localisée à l'interface polaire-apolaire de la membrane liposomiale alors que l'érythrodiol s'insère entre les chaînes acyles des phospholipides et aboutit à la formation des domaines hétérogènes au niveau de la membrane. La cinétique de libération de la sulforhodamine B, mesurée par la spectroscopie de fluorescence, a révélé que la membrane liposomiale devient, en présence de la cucurbitacine E, plus perméable à la sulforhodamine B incorporée dans la phase aqueuse interne. L'ensemble des résultats suggère que la cucurbitacine E et l'érythrodiol interagissent avec la membrane lipidique et affectent ses propriétés physico-chimiques. Leur effet sur la membrane ne semble pas être similaire. Des études ultérieures impliquant d'autres triterpènes sont envisagées pour identifier le (s) motif (s) structural (aux) et les paramètres physico-chimiques régissant leur interaction et localisation membranaire.

Mots clés : Cucurbitacine E, érythrodiol, liposomes, calorimétrie différentielle à balayage, diffusion dynamique de la lumière, microscopie à force atomique, microscopie électronique à transmission, spectroscopie de fluorescence.

Abstract

Cucurbitacin E and erythrodiol are natural oxygenated triterpenes having respectively, a tetra and pentacyclic skeleton. They are known for their numerous biological properties. In this thesis, we studied their interaction with the membranes of lipid vesicles to better understand their pharmacodynamics. We have prepared liposomes in the absence and presence of cucurbitacin E and erythrodiol using the reverse phase evaporation technique followed by extrusion, the hydration of lipid film and the ethanol injection techniques. The physicochemical characteristics of lipid vesicles incorporating or not the triterpenic molecules were investigated by appropriate techniques. The determination of cucurbitacin E and erythrodiol in the vesicles by high performance liquid chromatography showed high incorporation efficiencies of both triterpenes. Size measurements obtained by dynamic light scattering showed that liposomes incorporating triterpenes were smaller than empty liposomes. The images obtained by transmission electron microscopy confirmed the formation of spherical vesicles. Measurements of vesicles dimensions by atomic force microscopy (AFM) demonstrated that liposomes incorporating cucurbitacin E were higher and more resistant to the force exerted by the AFM tip than the blank liposomes. Liposomes incorporating erythrodiol were more fragile and tend to break up into lipid bilayers on the mica surface. Results obtained by differential scanning calorimetry suggested that cucurbitacin E is localized at the polar-apolar interface of the liposomal membrane while erythrodiol is inserted between the acyl chains of the phospholipids leading to the formation of heterogeneous lipid domains. The release kinetics of the sulforhodamin B encapsulated into the aqueous phase and measured by fluorescence spectroscopy revealed that the liposomal membrane becomes in the presence of cucurbitacin E, more permeable to this probe. The overall results suggest that cucurbitacin E and erythrodiol affect differently the lipid membrane. Further studies including other triterpenes may be conducted in order to identify the structural moieties and/or the physico-chemical parameters of the triterpenes that may govern their interaction and their membrane localization.

Keywords: Cucurbitacin E, erythrodiol, liposomes, differential scanning calorimetry, dynamic light scattering, atomic force microscopy, transmission electron microscopy, fluorescence spectroscopy.

Introduction générale

Les triterpènes sont des métabolites issus de la cyclisation du 2,3 époxysqualène, auxquels nous sommes exposés quotidiennement par la nourriture. Ils sont ubiquitairement distribués dans le règne végétal. Ils se caractérisent par un large spectre d'activités biologiques notamment anti-inflammatoire, anti-hépatotoxique, antivirale et anticancéreuse.

De nos jours, les industries pharmaceutiques intensifient leur recherche sur le développement des traitements de maladies comme le cancer et le SIDA. Dans cet objectif, de nombreuses études ont porté sur la pharmacodynamie des triterpènes. L'effet antiprolifératif et apoptotique des acides oléanolique et ursolique dans divers cancers comme la leucémie, les cancers hépatique et de l'œsophage, et de la cucurbitacine B dans les cancers du colon et du pancréas est bien démontré (Patlolla and Rao 2012). Par ailleurs, des triterpénoïdes de type lanostane ont démontré une inhibition de l'activité de la protéase VIH-1 (Sato et al. 2009) et l'acide oléanolique inhibe la réplication du virus dans les cellules lymphocytes H9 (Kashiwada et al. 1998, Wu et al. 2004).

Différents mécanismes moléculaires sont impliqués dans l'action des triterpènes naturels : une inhibition des enzymes, une activation ou inhibition des voies de signalisation et une activation de la transcription de certains gènes. Dans ce manuscrit de thèse, nous nous intéressons à l'effet des triterpènes au niveau membranaire.

Les cucurbitacines sont des molécules triterpéniques tétracycliques, ayant fait l'objet de plus de 160 études entre 1960 et jusqu'à présent. Une soixantaine d'études ont porté sur leur isolation à partir de plantes, leur caractérisation structurale, leur biosynthèse et leurs activités biologiques en particulier leur cytotoxicité. Le nombre de publications a évolué intensivement à partir de l'année 2000 et ceci est dû à la recherche des mécanismes moléculaires impliqués dans leurs activités biologiques. Par ailleurs, ayant une faible solubilité aqueuse et une cytotoxicité non spécifique, des recherches ont été menées pour trouver des systèmes d'encapsulation capables de contourner ces limitations.

L'érythrodiol est un triterpène pentacyclique, précurseur de la synthèse des acides oléanolique et maslinique. L'intérêt porté à l'érythrodiol est reporté depuis 2004, lorsque son action

vasorelaxante est démontrée. Son rôle bénéfique au niveau cardiovasculaire a été discuté ultérieurement dans de nombreuses études (Allouche et al. 2010, Martin et al. 2012, Perona et al. 2005).

La cucurbitacine E et l'érythrodiol sont des molécules triterpéniques, qui ressemblent structurellement au cholestérol qui est un constituant des membranes biologiques chez les mammifères et un modulateur des propriétés membranaires. Leur rôle au niveau membranaire n'a jamais été étudié.

Ce travail de thèse a été réalisé dans les Laboratoires de Pharmacocinétique et de Pharmaceutique (Faculté des Sciences-Section II, Université Libanaise) et à la Plateforme de Recherche et d'Analyse en Sciences de l'Environnement (Ecole Doctorale des Sciences et Technologie, Université Libanaise) et le Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (Université Claude Bernard Lyon1). Il a principalement porté sur l'étude de l'interaction de la cucurbitacine E et de l'érythrodiol avec la membrane lipidique en utilisant les liposomes comme modèle membranaire.

Au cours de ce travail, nous avons préparé différents types de liposomes en absence et en présence de la cucurbitacine E et de l'érythrodiol. Différentes techniques calorimétriques, analytiques, spectroscopiques et microscopiques ont été utilisées afin d'étudier leur effet sur les propriétés membranaires comme la fluidité, la perméabilité, la morphologie et la structure de la membrane liposomiale.

Ce manuscrit s'organise en trois parties :

La première partie dédiée à une synthèse bibliographique est divisée en trois chapitres. Le chapitre 1 porte sur les triterpènes, en particulier la cucurbitacine E et l'érythrodiol. Leurs voies de biosynthèse, leurs propriétés biologiques et physicochimiques, leur pharmacocinétique et leurs systèmes d'encapsulation sont présentés. Le chapitre 2 porte sur les liposomes, leurs propriétés, leurs méthodes de préparation et leur utilisation comme modèle membranaire. Le chapitre 3 de cette partie est une revue bibliographique sur les études qui ont abordé l'effet des triterpènes et stéroïdes sur les caractéristiques de la membrane telles que la fluidité, la perméabilité, la morphologie...). Les techniques de caractérisation utilisées pour étudier les interactions triterpènes-membranes sont également décrites.

La deuxième partie de ce manuscrit est divisée en deux chapitres 4 et 5. Dans le chapitre 4, nous exposons la stratégie expérimentale suivie pour étudier les effets de la cucurbitacine E et de l'érythrodiol sur les propriétés des membranes lipidiques, et dans le chapitre 5 nous décrivons les matériels et méthodes employés.

Le chapitre 5 présente les méthodes utilisées pour préparer les liposomes, en particulier les méthodes d'hydratation du film lipidique, d'évaporation en phase inverse, d'extrusion et d'injection d'éthanol. Nous présentons également le travail expérimental que nous avons mené en se servant des techniques analytiques, spectroscopiques, microscopiques et calorimétriques pour étudier les propriétés des membranes liposomiales.

La troisième partie de ce manuscrit est constituée du chapitre 6 dans lequel nous présentons nos résultats et nous les discutons. Ce manuscrit s'achève par une conclusion générale et des perspectives pour la suite de ce travail. Les articles issus de cette thèse sont inclus en annexe à la fin de ce manuscrit :

Habib, L., Khreich, N., Jraij, A., Abbas, S., Magdalou, J., Charcosset, C., Greige-Gerges, H., 2013. Preparation and characterization of liposomes incorporating cucurbitacin E, a natural cytotoxic triterpene. *International Journal of Pharmaceutics* 448, 313-319.

Habib, L., Jraij, A., Khreich, N., Fessi, H., Charcosset, C., Greige Gerges, H., 2014. Morphological and physicochemical characterization of liposomes loading cucurbitacin E, an anti-proliferative natural tetracyclic triterpene. *Chemistry and Physics of Lipids* 177, 64-70.

Un troisième article sera soumis prochainement.

Une publication à laquelle nous avons contribué durant cette thèse est également incluse :

Abbas, S., Vincourt, J.-B., Habib, L., Netter, P., Greige-Gerges, H., Magdalou, J., 2013. The cucurbitacins E, D and I: investigation of their cytotoxicity toward human chondrosarcoma SW 1353 cell line and their biotransformation in man liver. *Toxicology Letters* 216, 189-199.

Cette publication porte sur les voies du métabolisme des cucurbitacines. Nous utilisons les résultats issus de cette étude et nous les analysons en parallèle avec nos résultats. Des perspectives de travaux seront élaborées.

PARTIE 1 : BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 1 : Introduction aux triterpènes tétra- et pentacycliques

1.1 Les terpènes

Les terpènes forment une famille très large et variée de composés naturels d'origine végétale et animale. Ce sont des métabolites secondaires reconnus pour leurs effets bénéfiques dans l'alimentation humaine. Ils sont formés de l'assemblage d'unités de cinq carbones appelées unités isopréniques (C₅)_n (figure 1) (Degenhardt et al. 2009).

Figure 1 enlevée : Structure de l'isoprène, unité de constitution des terpènes

Les terpènes sont classés en fonction du nombre d'unités isopréniques qui les constituent. Ainsi les monoterpènes sont formés de deux unités isopréniques (10 atomes de carbone) et les sesquiterpènes sont formés de trois isoprènes (15 atomes de carbone). L'association de quatre isoprènes fournit les diterpènes (20 atomes de carbone) et celle de cinq isoprènes fournit les sesterpènes (25 atomes de carbone). Les triterpènes sont obtenus de l'assemblage de six unités isopréniques (30 atomes de carbone). L'assemblage de huit isoprènes conduit aux tetraterpènes. Enfin, les polyterpènes sont constitués de plus de cent isoprènes.

Dans notre vie quotidienne, nous rencontrons de multiples et divers terpènes, comme les mono- et sesquiterpènes des huiles essentielles qui contribuent à l'arôme des plantes, les triterpènes qui

sont inclus dans les plantes et chez l'animal, les caroténoïdes tetraterpéniques qui sont abondants dans la nourriture et les polyterpènes dont le plus important est le latex, utilisé dans la fabrication du caoutchouc (Patocka 2003). Presque tous les terpènes démontrent des activités biologiques chez l'animal et jouent un rôle important dans la médecine humaine.

Dans notre travail, nous nous sommes intéressées à deux triterpènes naturels, dont l'un est tétracyclique, la cucurbitacine E et l'autre est pentacyclique, l'érythrodiol.

1.2 Les triterpènes

Les triterpènes sont un groupe très diversifié de produits d'origine naturelle largement présent chez les plantes (Vincken et al. 2007). Au moins, 4000 composés triterpéniques avec des squelettes hydrocarbonés différents sont connus (Patocka 2003). Ils existent souvent chez les plantes sous forme de saponines qui comprennent les aglycones, triterpènes hydrophobes appelés sapogénines et un ou plusieurs résidu(s) de sucre hydrophiles (Sawai and Saito 2011).

Ces composés sont classés en triterpènes tétracycliques (cucurbitacines, dammaranes, lanostanes) ou pentacycliques (oléananes, ursanes, lupanes) (Hill and Connolly 2012).

1.3 Biosynthèse des triterpènes

Les triterpènes sont des dérivés du squalène. Ils sont issus de la cyclisation du 2,3 époxy-squalène (figure 2) catalysée par l'oxydosqualène cyclase (Sawai and Saito 2011). La diversité moléculaire de cet enzyme permet la synthèse de plus de 100 squelettes variés de triterpènes chez les plantes (Xu et al. 2004). Les différences majeures entre ces différents squelettes sont d'ordre stéréochimique.

Figure 2 enlevée : Oxydation du squalène et génération de l'oxyde de squalène

L'orientation de la synthèse vers les stéroïdes ou vers les autres triterpènes dépend de la conformation initiale adoptée par l'oxydosqualène sur la surface de l'enzyme (figure 3). L'oxydosqualène cyclase stabilise la conformation adoptée par l'oxydosqualène. Au cours de la cyclisation, un cation se forme ; ce cation peut ensuite subir des déplacements qui aboutissent à la formation des différents squelettes tétra- et pentacycliques caractérisant le groupe des composés triterpéniques (Wendt et al. 2000).

La cyclisation de l'oxydosqualène est initiée par l'ouverture de l'époxyde suite à une attaque d'un électrophile provenant de l'enzyme sur l'époxyde. Par la suite, les doubles liaisons s'additionnent les unes aux autres pour former l'intermédiaire cationique.

En effet, si l'oxydosqualène est dans une conformation chaise-bateau-chaise-bateau, la cyclisation conduit à un cation protostéryl précurseur des cucurbitacines (triterpènes tétracycliques) et des stéroïdes (lanostanes et cycloartanes) (figure 3). Par contre, si l'oxydosqualène adopte la conformation chaise-chaise-chaise-bateau, la cyclisation aboutit à un autre cation appelé dammarényl qui le plus souvent se réarrange en formant un cycle supplémentaire donnant naissance aux triterpènes pentacycliques de type oléanane, ursane, lupane,....etc (figure 3).

Figure 3 enlevée : Orientation vers la synthèse des stéroïdes et des autres triterpènes en fonction de la conformation adoptée par le 2,3 époxyqualène
(*Hamimed 2009*)

isomères, les cucurbitacines J et K (Dirr et al. 1986, Gry et al. 2006, Schabort and Teijema 1968).

La déacétylation catalysée par les acétyltransférases. Cette réaction convertit la cucurbitacine B en D, la cucurbitacine E en I et la cucurbitacine A en N (Gry et al. 2006, Schwartz et al. 1964).

L'hydrolyse des glycosides de cucurbitacines chez les plantes est catalysée par la β -glycosidase elastérase (Schwartz et al. 1964).

D'autres formes de cucurbitacines sont également produites suite à des réactions de déshydrogénation, d'hydroxylation et d'isomérisation (Gry et al. 2006).

1.3.2 Biosynthèse de l'érythrodiol

Le schéma de biosynthèse des oléananes est déjà décrit dans la figure 3. Brièvement, la biosynthèse de l'acide oléanolique et l'érythrodiol se produit à partir du 2,3-oxydosqualène. Le 2,3-oxydosqualène est cyclisé par des oxydosqualène cyclases spécifiques y compris la β -amyrine synthétase donnant lieu à la formation de la β -amyrine, un produit de structure de base triterpénique pentacyclique de type oléanane. Ensuite, la β -amyrine est oxydée au niveau C-28 par le CYP716A12, entraînant la biosynthèse de l'érythrodiol qui subit deux oxydations successives conduisant à la formation de l'acide oléanolique (figure 5) (Fukushima et al. 2011, Pollier and Goossens 2012).

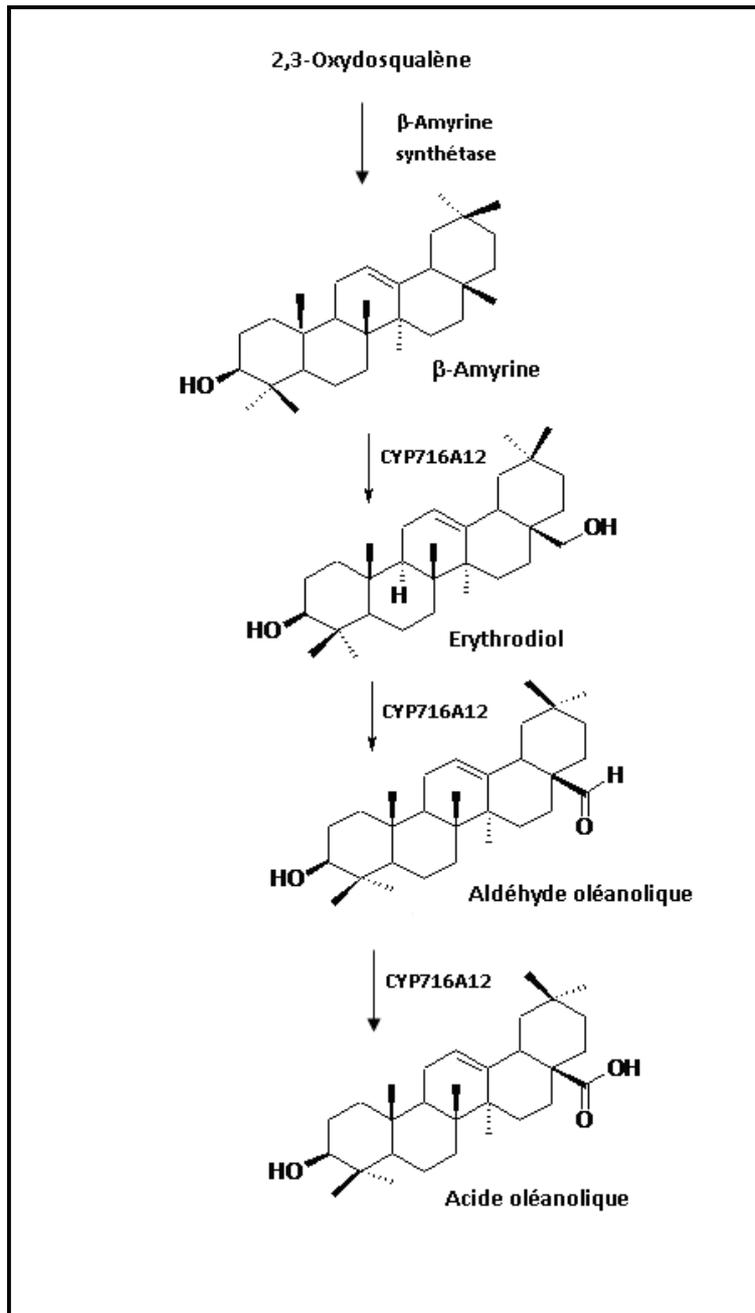


Figure 5 : Schéma représentatif de la biosynthèse de l'érythrodiol et de l'acide oléanolique
(Fukushima et al. 2011)

1.4 Les cucurbitacines

Appartenant aux groupes des triterpènes tétracycliques, les cucurbitacines sont des métabolites secondaires dont les *Cucurbitacées* sont la source la plus connue (Chen et al. 2005). Néanmoins, elles ne sont pas limitées à l'espèce des *Cucurbitacées*, elles sont présentes également dans les familles de plantes des *Brassicacées*, *Scrophulariacées*, *Begoniacées*, *Elaeocarpacees*, *Datiscacées*, *Desfontainiacées*, *Polemoniacees*, *Primulacées*, *Rubiacees*, *Scrophulariacées*, *Sterculiacées*, *Rosacées* et *Thymelaeacées*. Elles sont généralement réparties dans toute la plante mais particulièrement localisées dans les racines et le suc de fruits. Elles peuvent être présentes sous forme glycosylée ou libre. Le sucre peut être attaché au noyau terpénique ou à la chaîne latérale aliphatique (Chen et al. 2005).

Les cucurbitacines sont caractérisées par leur amertume qui permet aux plantes de se défendre contre les herbivores.

De nombreux travaux sur l'isolement de ces principes actifs ont été menés avec succès. C'est ainsi qu'une vingtaine de ces substances ont été isolées et identifiées par les lettres de l'alphabet : cucurbitacines A, B, C, D, E, I, J, K, Q... (Chen et al. 2005).

1.4.1 Structures

Les cucurbitacines ont une structure très oxygénée (figure 6). Leur squelette est caractérisé par le noyau cucurbitane tétracyclique nommé, le 19-(10→9β)-abeo-10α-lanost-5-ène aussi connu sous le nom de 9β-méthyl-19-norlanosta-5-ène (Chen et al. 2005).

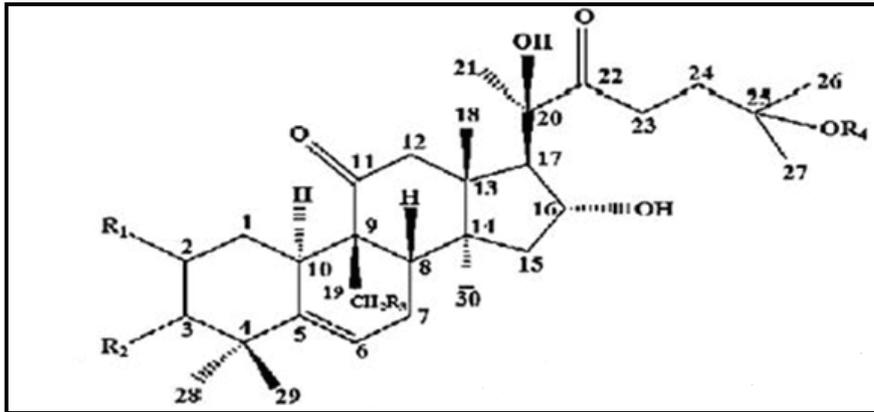


Figure 6 : Structure chimique générale des cucurbitacines
(Chen et al. 2005)

Les divers types de cucurbitacines diffèrent entre eux par la présence ou non d'une double liaison entre C-1 et C-2 et entre C-23 et C-24, l'hydroxylation en C-2, -3, -19, -24, la présence d'une fonction cétone en C-3 et l'acétylation du groupe hydroxyl en C-25 (Saade et al. 2009). La cucurbitacine E (Cuc E) (figure 7) est parmi les cucurbitacines les plus étudiées. Elle est caractérisée par la présence d'une double liaison entre C-1 et C-2 et entre C-23 et C-24, d'une fonction acétyle en C-25 et une fonction cétone en C-22.

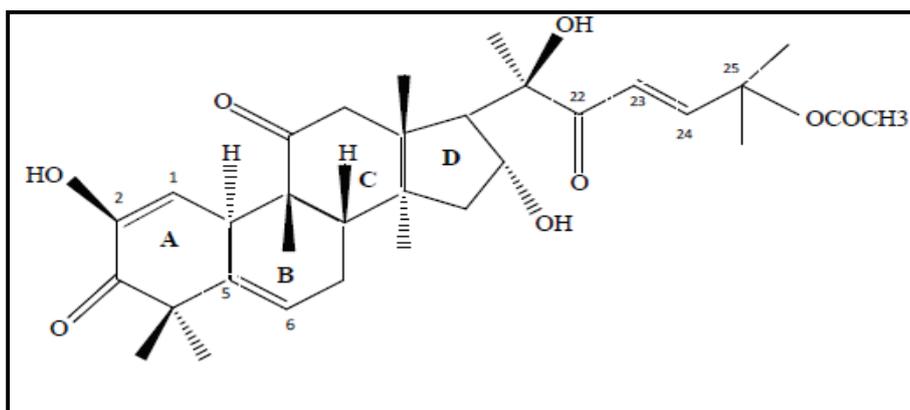


Figure 7 : Structure chimique de la cucurbitacine E
(Chen et al. 2005)

1.4.2 Propriétés physicochimiques

Les cucurbitacines sont très peu solubles dans l'eau (Martin et al. 2002) mais sont très solubles dans les solvants organiques comme le chloroforme, le méthanol et l'éthanol (Gry et al. 2006).

Les glucosides de cucurbitacine, comme la cucurbitacine E-glucoside, sont peu stables à température ambiante (25°C) et à pH basique. La concentration de la cucurbitacine E-glucoside est réduite de 92% après 2 mois de stockage à température ambiante. Elle est plus stable à 4°C et à -20°C et à pH acide (pH 5,13) (Martin et al. 2002).

La Cuc E, possède un point de fusion autour de 230°C, un point d'ébullition autour de 712°C à 760 mmHg et un poids moléculaire de 556,7 g/mol.

1.4.3 Fonctions biologiques des cucurbitacines

Les cucurbitacines sont principalement connues par leur effet antiprolifératif envers les cellules cancéreuses du colon, du sein, de poumons, de la prostate, du système nerveux central, du nasopharynx, de leucémie humaine et du cartilage osseux (Abbas et al. 2013, Chen et al. 2005, Duncan et al. 1996, Jayaprakasam et al. 2003, Militao et al. 2012). Elles agissent en inhibant la voie JAK2, protéine responsable de la survie et de la prolifération cellulaire, et/ou la voie STAT3, protéine régulatrice de plusieurs fonctions biologiques comme la prolifération, la différenciation, la transcription et l'apoptose (Blaskovich et al. 2003, Chen et al. 2005, Sun et al. 2010). Elles agissent aussi par apoptose (fragmentation de l'ADN) dont l'une des conséquences est la destruction de la membrane plasmique (Militao et al. 2012). Plusieurs études ont montré que les cucurbitacines présentent un effet synergique quand elles sont combinées à une autre thérapie anticancéreuse (Chang et al. 2012, Lee et al. 2011, Liu et al. 2010).

La Cuc E a été largement étudiée pour ses propriétés anticancéreuses. En effet, il a été démontré qu'elle inhibe la prolifération de nombreuses cellules cancéreuses, comme les cellules M5076 du cancer ovarien (Sadzuka et al. 2010), les cellules U937 de la leucémie humaine (Nakashima et al. 2010), les cellules PANC-1 du cancer pancréatique (Sun et al. 2010) et les cellules SW 1353 du chondrosarcome humain (Abbas et al. 2013). Elle provoque une altération du réarrangement de

l'actine et de la vimentine dans les cellules du carcinome de la prostate (Duncan et al. 1996). En outre, Nakashima et al. (2010) ont démontré que la Cuc E agit comme un agent cytotoxique en inhibant la phosphorylation de la cofiline. Cette dernière est une protéine qui permet la régulation de la dépolymérisation des filaments d'actine. L'activité de la cofiline est réprimée suite à sa phosphorylation, ce qui explique l'effet de la Cuc E sur la dépolymérisation de l'actine (Nakashima et al. 2010).

De plus, il a été démontré que les cucurbitacines possèdent des activités anti-inflammatoires (Peters et al. 1997, Recio et al. 2004), anti-hépatotoxiques (Agil et al. 1999), antioxydantes (Tannin-spitz et al. 2007), anti-virales (Wu et al. 2004), immuno-modulatrices (Attard et al. 2005), analgésiques (Peters et al. 1997) et antipyrétiques (Delporte et al. 2002). Elles agissent comme antagonistes des récepteurs des ecdystéroïdes, ce qui peut servir à entraver les invertébrés phytophages (Dinan et al. 1997).

La Cuc E a montré une activité inhibitrice des deux enzymes cyclooxygénase 1 et cyclooxygénase 2 mais avec plus de sélectivité vis-à-vis de la cyclooxygénase 2 (Abdelwahab et al. 2011). Elle inhibe le développement de l'œdème induit par le carraghénane dans la patte de l'animal (Peters et al. 1999, Siqueira et al. 2007). Elle inhibe l'influx cellulaire des leucocytes dans la cavité pleurale et par la suite diminue le taux des leucotriènes B4 dans l'exsudat pleural (Peters et al. 1999, Siqueira et al. 2007).

Dans une autre étude, il a été mis en évidence que l'effet anti-inflammatoire de la Cuc E est dû à l'inhibition de la production de l'oxyde nitrique par les macrophages d'une manière dose dépendante et par l'inhibition de la cyclooxygénase (Abdelwahab et al. 2011).

1.4.4 Pharmacocinétique des cucurbitacines

1.4.4.1 Distribution des cucurbitacines

Il n'y a pas dans la littérature de données concernant l'absorption ou la résorption des cucurbitacines. Dans le plasma humain, Greige-Gerges et al. (2007) ont montré que les cucurbitacines B, D et E se lient à l'albumine humaine et produisent des réarrangements dans sa

structure entraînant une augmentation de l'affinité de la bilirubine et de l'ibuprofène à cette protéine (Greige-Gerges et al. 2007a, Greige-Gerges et al. 2007b).

1.4.4.2 Métabolisme des cucurbitacines

Une étude réalisée par Saade et al. (2009) a porté sur le métabolisme de la Cuc E dans le plasma humain et a montré que cette molécule subit dans le plasma une déacétylation enzymatique mettant probablement en jeu la paraoxonase. Selon les auteurs, la liaison de la Cuc E à l'albumine la protège de l'hydrolyse (Saade et al. 2009).

La biotransformation des cucurbitacines I, D et E dans le foie humain a été récemment examinée par Abbas et al. (2013). Les résultats obtenus ont révélé que l'hydroxylation des trois cucurbitacines est négligeable. La Cuc E est rapidement hydrolysée par les microsomes du foie humain en cucurbitacine I (Abbas et al. 2013).

Les tests de glucuroconjugaison ont montré que l'activité de l'UDP-glucuronosyl transférase des microsomes du foie humain est très faible en comparaison avec des substrats marqueurs et diffère d'une cucurbitacine à une autre.

Les valeurs de la constante cinétique K_m de la réaction de glucuroconjugaison ont montré que les microsomes du foie humain ont plus d'affinité pour la Cuc E que pour les autres formes de cucurbitacines. Le rapport V_{max}/K_m est le plus élevé pour la Cuc E, le plus faible pour la cucurbitacine D et intermédiaire pour la cucurbitacine I. Ceci signifie que l'efficacité de l'enzyme UDP-glucuronosyltransférase augmente avec l'hydrophobicité des cucurbitacines. En effet, la présence d'une double liaison entre C1 et C2 dans les cucurbitacines I et E et l'acétylation du C25 de la Cuc E augmentent leur hydrophobicité (Bartalis and Halaweish 2005, 2011).

De plus, les cucurbitacines I, D et E sont sulfonoconjuguées dans le cytosol du foie humain par les sulfotransférases.

1.4.4.3 Excrétion des cucurbitacines

La vitesse d'élimination des cucurbitacines chez l'animal n'a jamais été abordée jusqu'à présent.

1.4.5 Encapsulation des cucurbitacines

La faible solubilité aqueuse des cucurbitacines et leur toxicité non spécifique ont toujours été des obstacles à leur développement clinique. Leur encapsulation dans des nanoparticules permettrait de contrôler leur libération dans la circulation systémique, de limiter leur arrivée aux sites non spécifiques, et de favoriser le ciblage des sites tumoraux (Molavi et al. 2008, Mahmud et al. 2009).

1.4.5.1 Formes d'encapsulation des cucurbitacines

Des micelles polymériques formées de poly(éthylène oxyde)-bloc-poly(ϵ -caprolactone) (PEO-b-PCL) (figure 8A) et poly(éthylène oxyde)-bloc-poly(α -benzylcarboxylate- ϵ -caprolactone) (PEO-b-PBCL) (figure 8B) ont été préparées pour encapsuler les cucurbitacines B et I afin d'améliorer leur solubilisation (Molavi et al. 2008). Les résultats obtenus ont montré que la solubilité aqueuse des ces deux molécules sous forme micellaire augmente et elle est maximale avec les micelles de PEO-b-PBCL (Molavi et al. 2008).

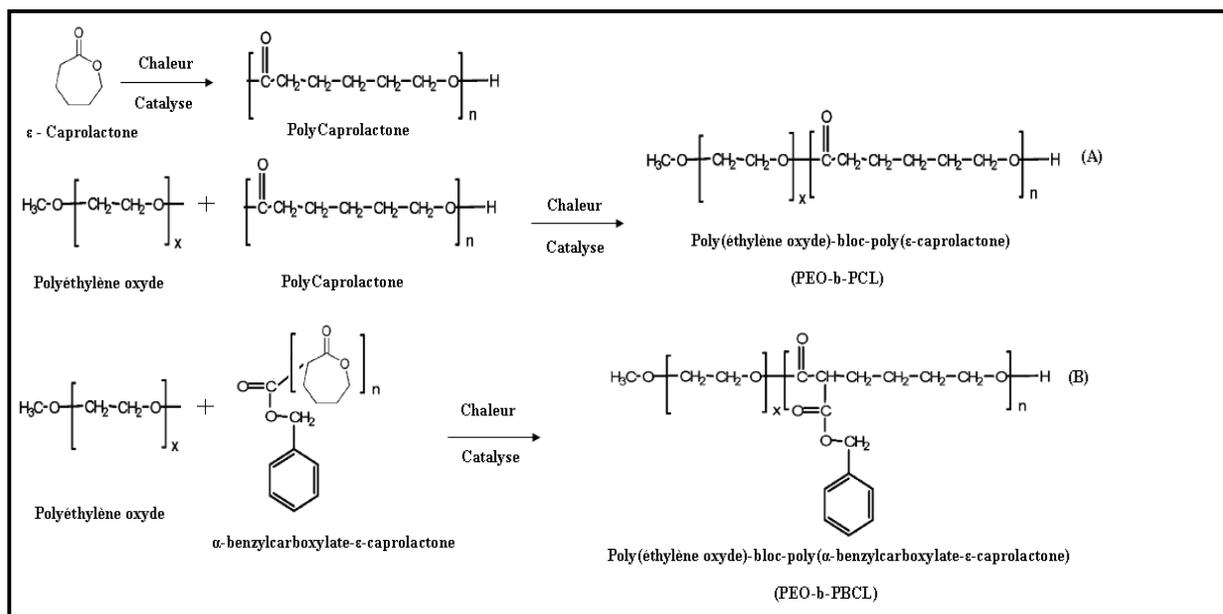


Figure 8 : Synthèse des copolymères blocs, PEO-b-PCL (A) et PEO-b-PBCL (B)
(Molavi et al. 2008)

Une troisième formulation de micelles polymériques formée de poly(éthylène oxyde)-bloc-poly(α -cholestéryl carboxylate- ϵ -caprolactone) (PEO-b-PChCL) (figure 9) a été développée par la même équipe (Mahmud et al. 2009). L'efficacité d'encapsulation a été comparée avec celle des micelles de PEO-b-PCL (figure 8A) et PEO-b-PBCL (figure 8B). Les résultats obtenus ont montré que l'efficacité d'encapsulation de la cucurbitacine I est égale à $64,7 \pm 3\%$, $81,6 \pm 1,9\%$ et $87,2 \pm 3\%$ pour PEO-b-PCL, PEO-b-PBCL et PEO-b-PChCL respectivement (Mahmud et al. 2009). En effet, le paramètre Flory-Huggins (χ_{sc}), indicateur du degré de compatibilité chimique entre la structure micellaire polymérique et la cucurbitacine I et qui reflète l'interaction entre les deux est déterminé. Il a été trouvé que ce paramètre est le plus faible pour PEO-b-PChCL et le plus élevé pour PEO-b-PCL. Il est intermédiaire pour PEO-b-PBCL. Ceci signifie que PEO-b-PChCL est la formulation polymérique la plus compatible chimiquement avec la cucurbitacine I (Mahmud et al. 2009). Avec un sac de dialyse, les auteurs ont prouvé que la vitesse de libération était identique pour PEO-b-PChCL et PEO-b-PCL et plus lente avec la structure la plus visqueuse, PEO-b-PBCL (Mahmud et al. 2009).

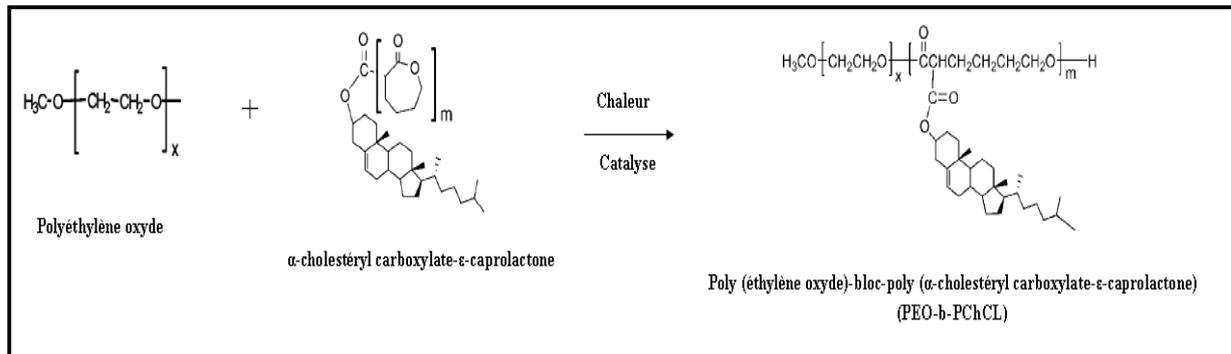


Figure 9 : Synthèse du copolymère bloc, PEO-b-PChCL
(Mahmud et al. 2009)

En outre, Patel et al. (2010) ont montré que la solubilisation de la cucurbitacine B et I est améliorée quand elles sont encapsulées dans des micelles formées de copolymère multibloc ayant trois poly(ϵ -caprolactone) de même longueur connectés à une terminaison de poly(éthylène oxyde) et désigné par PEO-b-3PCL (figure 10). Les valeurs du paramètre Flory-Huggins (χ_{sc}) obtenues sont plus faibles avec PEO-b-3PCL que PEO-b-PCL, ce qui signifie que l'interaction des deux cucurbitacines avec PEO-b-3PCL est plus forte qu'avec PEO-b-PCL. C'est ainsi qu'un copolymère multi-hydrophobique peut augmenter l'incorporation d'un principe actif hydrophobe ayant multiples groupes donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène (Patel et al. 2010).

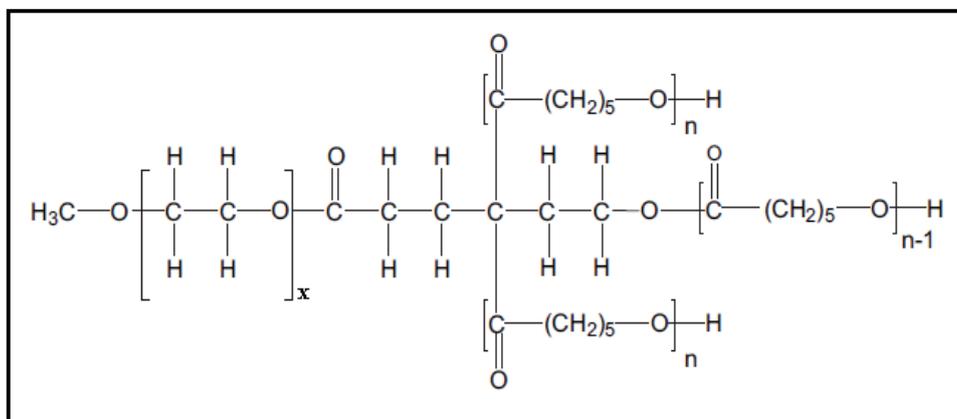


Figure 10 : Structure chimique du PEO-b-3PCL
(Patel et al. 2010)

Par ailleurs, Molavi et al. (2009) ont développé des nanoparticules d'acide poly(D,L-lactique-co-glycolique) (PLGA-NPs) (figure 11) contenant la cucurbitacine I.

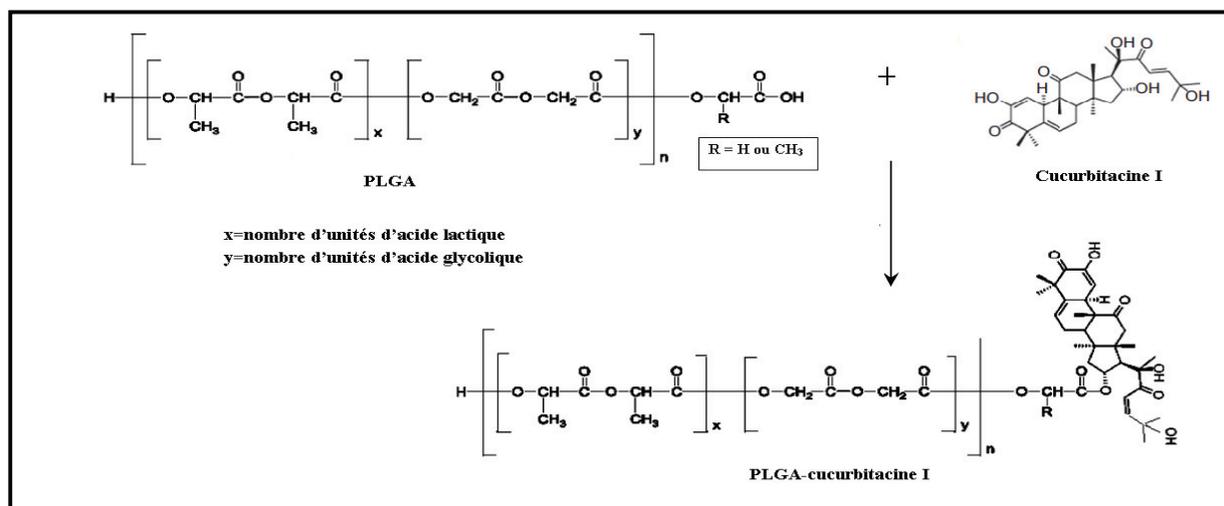


Figure 11 : Structures chimiques du PLGA et de la cucurbitacine I conjugué au PLGA (Molavi et al. 2009)

1.4.5.2 Activité anticancéreuse des cucurbitacines encapsulées

L'activité anticancéreuse des cucurbitacines B et I, libres et encapsulées dans des micelles polymériques a été évaluée envers les cellules B16.F10 de mélanome *in vitro et in vivo* chez la souris (Molavi et al. 2008). Encapsulées dans les micelles polymériques formées de PEO-b-PCL et PEO-b-PBCL (figure 7), les cucurbitacines B et I ont montré *in vitro*, une activité antiproliférative de la lignée cellulaire B16.F10 du mélanome, comparable à celle de la forme libre. Les deux cucurbitacines, sous formes libre ou micellaire, bloquent l'activation du STAT3 en réduisant l'expression de sa forme phosphorylée (p-STAT3) (Molavi et al. 2008). La cucurbitacine I, libre ou sous forme micellaire (PEO-b-PBCL), injectée dans le site tumoral, inhibe la croissance de la tumeur du mélanome B16.F10 chez la souris (Molavi et al. 2008). La cucurbitacine I sous forme micellaire administrée par voie intra-tumorale montre une rétention

plus élevée dans le site tumoral et une diffusion plus faible aux autres organes en comparaison avec la cucurbitacine I libre. Ce qui conduit à une toxicité systémique plus faible (Molavi et al. 2008).

Egalement, la forme de la cucurbitacine I encapsulée dans les PLGA-NPs (PLGA-cucurbitacine I) (figure 10) a démontré une activité cytotoxique envers les cellules B16.F10 du mélanome chez la souris plus importante que celle de la cucurbitacine I libre (Molavi et al. 2009) et ceci a été accompagné par une répression plus efficace de la forme encapsulée sur l'expression du STAT3 (Molavi et al. 2009). Le profil de libération de la cucurbitacine I est étudié sur une durée d'un mois avec un sac de dialyse et a montré une libération brusque de 30% de la cucurbitacine I pendant les deux premiers jours, suivie d'une libération ralentie formant un plateau durant les 21 jours qui suivent. Le taux cumulatif de la cucurbitacine I libérée sur une période de 34 jours est de 86%.

De plus, il a été démontré que cette formulation peut être efficacement impliquée dans une immunothérapie du cancer où une prolifération des cellules T à des niveaux élevés est obtenue en comparaison avec des nanoparticules vides et/ou la cucurbitacine I libre (Molavi et al. 2009).

Une étude réalisée par Wang et al. (2010) a montré que l'incorporation de la cucurbitacine B dans des nanoparticules lipidiques solides (Solid Lipid Nanoparticles, SLNs) formées de Compritol 888 ATO (matrice lipidique), aboutit à une augmentation de son activité cytotoxique envers les cellules HepG2 du carcinome humain du foie. L'activité cytotoxique est accentuée avec des SLN galactosylées. De plus, suite à une administration intraveineuse chez le rat, les auteurs ont démontré que l'efficacité de ciblage de la cucurbitacine B dans les SLNs galactosylées (63,6%) est 2,5 fois supérieure à celle de la cucurbitacine B dans les SLNs conventionnelles (25,3%) et de la cucurbitacine B libre (23,8%) (Wang et al. 2010). Toutefois, un profil de libération similaire de la cucurbitacine B à partir des SLNs conventionnelles ou glycosylées a été démontré in vitro dans un sac de dialyse (Wang et al. 2010).

Récemment, Hu et al. (2013) ont préparé des nanoparticules (SLNs) formées de lécithines de soja pour incorporer la cucurbitacine B. L'activité cytotoxique de la cucurbitacine B libre et de sa forme encapsulée envers les cellules HepG2 du foie a été comparée. Les valeurs IC_{50} sont plus faibles pour la forme encapsulée, ce qui signifie que l'encapsulation améliore l'efficacité

thérapeutique (Hu et al. 2013). L'analyse quantitative de la cucurbitacine B intracellulaire a révélé que l'absorption de la forme encapsulée par les cellules HepG2 est 3 fois supérieure à celle de la forme libre (Hu et al. 2012).

L'activité anti-tumorale des cucurbitacine B libre et encapsulée a été étudiée *in vivo* envers les cellules H₂₂ de l'hépatome chez la souris. Pour une même concentration injectée par voie intraveineuse, le pourcentage d'inhibition de la croissance tumorale était meilleur pour la forme encapsulée. De plus, l'efficacité de ciblage vers le foie de la cucurbitacine B sous forme encapsulée est 2 fois supérieure à celle de la forme libre (Hu et al. 2013).

Utilisant le sac de dialyse, le profil de libération de la cucurbitacine B à partir de cette formule a montré que la libération de la cucurbitacine B est rapide durant les deux premières heures (33,4%), suggérant une incorporation à la surface des nanoparticules. La libération est ensuite ralentie et atteint 69,5% après 72h (Hu et al. 2013).

Le tableau 1 regroupe les différents systèmes d'encapsulation des cucurbitacines publiés jusqu'à présent et les avantages de ces systèmes comparés à la forme libre non encapsulée d'une cucurbitacine.

Tableau 1 : Les différents types de vecteurs utilisés pour encapsuler les cucurbitacines et améliorer leur performance dans l'organisme.

Cucurbitacines	Type de vecteur	Composition	Principaux avantages apportés par rapport à la forme libre	Référence
Cucurbitacines B et I	Micelles polymériques	Polymères : PEO-b-PCL PEO-b-PBCL	-Solubilisation améliorée - Ciblage amélioré	Molavi et al. 2008
Cucurbitacine I	Micelles polymériques	Polymères : PEO-b-PCL PEO-b-PBCL PEO-b-PChCL	-Efficacité d'encapsulation la plus élevée avec PEO-b-PChCL -PEO-b-PChCL est la plus compatible chimiquement avec la cucurbitacine I	Mahmud et al. 2009
Cucurbitacines B et I	Micelles polymériques	Polymères : PEO-b-3PCL	-Solubilisation améliorée -Interaction avec PEO-b-3PCL est plus forte qu'avec PEO-b-PCL	Patel et al. 2010
Cucurbitacine I	Nanoparticules	Polymères : PLGA	-Activité anticancéreuse améliorée - Inhibition de la voie STAT3 améliorée -Vitesse de libération contrôlée	Molavi et al. 2009
Cucurbitacine B	Nanoparticules lipides solides	Matrice lipidique : Compritol 888 ATO	-Activité anticancéreuse améliorée (cytotoxicité) - L'ajout d'un ligand galactosyl sur les nanoparticules améliore le ciblage	Wang et al. 2010
Cucurbitacine B	Nanoparticules lipides solides	Lécithines de Soja	-Activités anticancéreuse et anti-tumorale améliorées -L'efficacité de ciblage est augmentée -La vitesse de libération est plus contrôlée	Hu et al. 2013

1.5 L'érythrodiol

L'érythrodiol (figure 12), est un alcool triterpénique pentacyclique du groupe des oléananes. C'est un constituant de l'olive et de l'huile d'olive (Albi et al. 1986, Perez-Camino and Cert 1999).

L'érythrodiol est le précurseur de l'acide oléanolique et de l'acide maslinique (figure 12) (Stiti et al. 2007). Ce dernier est l'isomère de l'acide oléanolique avec un groupe hydroxyl en C2. Ces deux composés sont des acides triterpéniques pentacycliques qui ont été largement utilisés pour des fins médicinales dans divers pays asiatiques (Setzer WC and Setzer MC 2003, Ovesna et al. 2004).

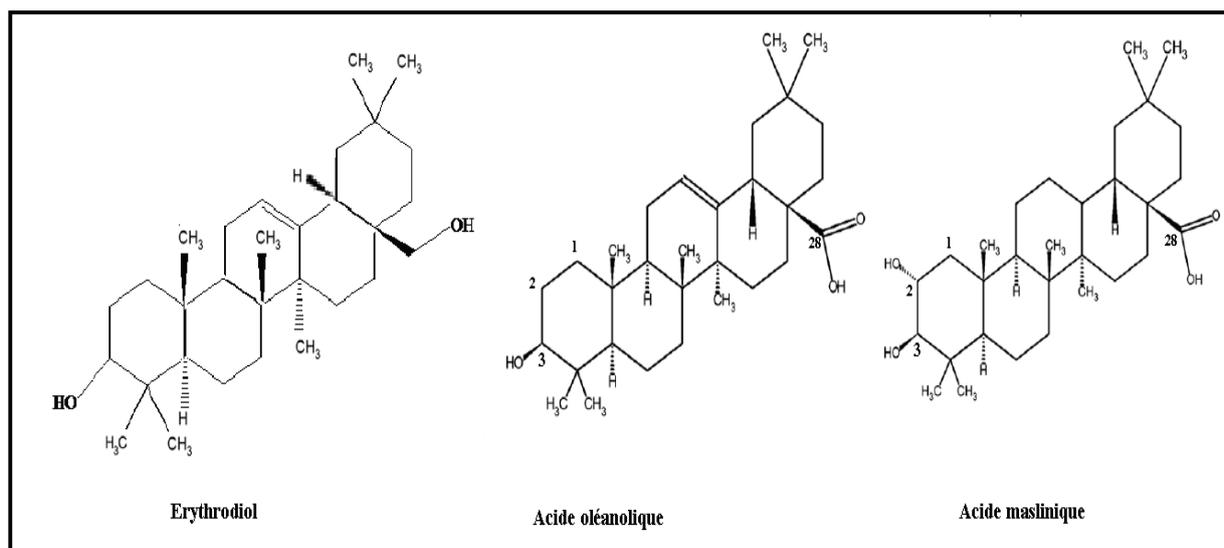


Figure 12 : Structure chimique de l'érythrodiol et des acides oléanolique et maslinique
(Juan et al. 2008, Prades et al. 2011)

1.5.1 Propriétés physicochimiques de l'érythrodiol

L'érythrodiol possède un point de fusion autour de 230°C. Il est de faible volatilité et possède un poids moléculaire égal à 442,72 g/mol.

1.5.2 Fonctions biologiques de l'érythrodiol

Nishino et al. (1988) ont démontré que l'érythrodiol possède une activité inhibitrice des promoteurs de tumeur (Nishino et al. 1988) et montre des effets supprimeurs remarquables de la formation de tumeur de peau chez la souris (Nishino et al. 1988).

Selon Yang et al. (2009), l'érythrodiol montre une cytotoxicité élevée envers les lignées cellulaires HO-8910 et SMMC-7721 avec des IC₅₀ égales à 25,4±0,3 et 31,6±0,5 µg/ml respectivement (Yang et al. 2009).

D'après Juan et al. (2008), l'érythrodiol montre une activité antiproliférative et apoptotique envers les cellules HT-29 de l'adénocarcinome du colon humain (Juan et al. 2008).

Au niveau cardiovasculaire, l'érythrodiol est capable de produire une relaxation des contractions induites par la phényléphrine dans les anneaux aortiques des rats, d'une façon concentration dépendante (Rodríguez -Rodríguez et al. 2004). Il agit via un blocage de la libération du NO et une inhibition de la voie de cyclooxygénase (Rodríguez-Rodríguez et al. 2004). En outre, des activités antioxydantes et antithrombotiques de l'érythrodiol ont été signalées (Allouche et al. 2010).

Manez et al. (1997) ont révélé que l'érythrodiol agit en réduisant l'activité de la myéloperoxydase et est actif en cas d'un œdème dermique chronique. Il réduit la prolifération cellulaire causée par une application topicale répétée du 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (Manez et al. 1997).

1.5.3 Pharmacocinétique

La biotransformation de l'érythrodiol n'est pas étudiée jusqu'à présent chez l'animal. Par contre, celle de l'acide oléanolique a été le sujet de certaines études. En effet, une étude a montré que l'acide oléanolique est un composé faiblement absorbé chez le rat. Son absorption in vivo est assurée par diffusion passive. Il est rapidement métabolisé en présence des microsomes hépatiques des rats et du NADPH pour donner les hydroxyl- et dihydroxyl-acide oléanolique comme métabolites. L'excrétion urinaire est très faible quelque soit l'administration par voie intraveineuse ou orale (Jeong et al. 2007).

1.5.4 Encapsulation de l'érythrodiol dans des nanoparticules

Aucune étude jusqu'à présent n'a porté sur l'encapsulation de l'érythrodiol. Par contre, l'acide oléanolique et ses isomères, l'acide maslinique et l'acide ursolique ont été incorporés dans des liposomes dans le but d'étudier leurs effets sur la stabilité et les propriétés structurales et physicochimiques de la membrane lipidique (Han et al. 1997, Gao et al. 2012, Prades et al. 2011). Cette partie sera décrite plus tard dans le chapitre 3 : Interaction des triterpènes avec les membranes lipidiques.

Chapitre 2 : Les Liposomes

2.1 Introduction

La première description des systèmes phospholipidiques comme modèles membranaires, a été publiée par Alec Bangham et ses collègues dans les années 1960 (Bangham et al. 1965). Ces systèmes ont été ensuite nommés « liposomes ». Le terme « liposome » est dérivé de deux mots d'origine grecque, « lipos » qui signifie gras et «soma» qui signifie corps. Les liposomes (figure 13) sont définis comme des vésicules sphériques avec une taille allant de 20 nm à quelques micromètres. Ils sont constitués d'une ou plusieurs bicouches phospholipidiques entourant des compartiments aqueux, où les groupes de têtes polaires sont orientés vers les phases aqueuses intérieures et extérieures (Bangham et al. 1965, Sessa and Weissman 1968).

Figure 13 enlevée : Structure d'un liposome

Les liposomes ont été principalement utilisés comme modèles de membranes artificielles imitant les membranes phospholipidiques pour l'étude des mécanismes de transport et de diffusion à

travers la membrane (Bangham et al. 1965, Bangham et al. 1967) et des caractéristiques physico-chimiques de la membrane dans des conditions différentes de température et de pH (Sessa and Weissman 1968).

2.2 Classification des liposomes

La classification des liposomes est principalement basée sur des critères structuraux : leur taille et leur lamellarité (nombre de bicouches) (Rongen et al. 1997, Shaheen et al. 2006, Lorin et al. 2004) (figure 14).

On distingue alors les *liposomes unilamellaires* qui sont formés d'une seule lamelle ou bicouche concentrique enfermant un compartiment aqueux et les *liposomes multilamellaires* qui ont une structure d'oignon et sont formés de plusieurs lamelles ou bicouches concentriques séparées par des couches de compartiments aqueux.

Parmi les unilamellaires, on peut différencier les vésicules de petite taille «*small unilamellar vesicles, SUV*» de taille allant de 20 jusqu'à 100 nm, les vésicules de grande taille «*large unilamellar vesicles, LUV*» dont la taille varie de 100 à 1000 nm et les vésicules géantes «*giant unilamellar vesicles, GUV*» dont la taille est généralement supérieure à 1000 nm.

Les vésicules multilamellaires «*multilamellar vesicles, MLV*» comptent plusieurs bicouches concentriques et font environ de 1 μm jusqu'à 10 μm de diamètre alors que les vésicules multivésiculaires «*multivesicular vesicles, MVV*» sont formées de plusieurs bicouches non concentriques emprisonnées dans une vésicule plus grosse.

Figure 14 enlevée : Les différentes classes de liposomes selon la taille et le nombre de lamelles

2.3 Développement des liposomes

Dans les années 1970, plusieurs études ont établi le concept que les liposomes peuvent encapsuler des substances et être utilisés comme systèmes de transport (Gregoriadis et al. 1971, Gegoriadis 1973, Rahman et al. 1974). D'autres études, ont montré que les liposomes peuvent changer la distribution in vivo des médicaments encapsulés (Kimelberg et al. 1976, Juliano and Stamp 1978). En parallèle, des méthodes ont été développées pour permettre la préparation de larges liposomes unilamellaires (LUV) avec des améliorations de l'efficacité d'encapsulation et de l'homogénéité (Szoka and Papahadjopoulos 1978). La production des LUV par extrusion des vésicules multilamellaires (MLV) à travers des membranes de polycarbonate avec des pores de dimensions de 100 nm ou moins a été un progrès très important (Olson 1979).

Dans les années 1980 et 1990, des progrès dans la formulation des liposomes ont été obtenus afin de prolonger leur durée de vie dans la circulation sanguine. On distingue ainsi les liposomes furtifs ayant une barrière stérique créée tout autour de la bicouche lipidique le plus souvent par des polymères hydrophiles comme le polyéthylène glycol (PEG) couplés par des liaisons covalentes aux phospholipides membranaires (Lasic et al. 1991, Torchilin et al. 1994). Les

immunoliposomes qui portent à leur surface des anticorps spécifiques de cibles antigéniques et pouvant être furtifs aussi (Sullivan et al. 1986, Huwyler et al. 1996), se fixent spécifiquement à la surface des cellules cibles (cellules tumorales par exemple) (Park et al. 1997).

Parallèlement, les LUV ont été utilisés comme modèle membranaire pour étudier l'effet de certaines molécules ayant un intérêt biologique, pharmacologique ou thérapeutique (Ding et al. 2005, Domenech et al. 2009, Trombetta et al. 2001) ou de certains facteurs comme la taille et la composition des liposomes (Lu et al. 2012, Shimanouchi et al. 2009) sur la perméabilité de la membrane biologique. Ils sont utilisés aussi pour étudier l'effet de certaines molécules bioactives sur la morphologie et les propriétés surfaciques des membranes lipidiques (Anabousi et al. 2005).

Une approche robotique pour la construction d'un modèle cellulaire artificiel au niveau moléculaire a été récemment proposée (Nomura et al. 2013). Ce modèle est basé sur les liposomes géants dont la membrane est connue comme le modèle le plus simple de membrane de cellules vivantes (Walde et al. 2010). Le système ainsi nommé « robotique moléculaire », est constitué d'un liposome géant (GUV) encapsulant un gène pour permettre la synthèse des protéines membranaires, d'une formule moléculaire artificielle à base d'ADN utilisée pour attacher les liposomes à la membrane des cellules vivantes et de molécules peptidiques membranaires et artificielles qui entrent dans les processus de reconnaissance de surface et de signalisation cellulaire (Nomura et al. 2013).

2.4 Composition des liposomes

La matière première qui constitue les liposomes est en général un ou plusieurs types de phospholipides. Le cholestérol entre souvent dans la composition des liposomes.

2.4.1 Les phospholipides

Etant les constituants majeurs de la membrane biologique, les glycérophospholipides (figure 15) sont généralement les phospholipides qui forment les liposomes. Les glycérophospholipides sont soit d'origine naturelle (lécithines de soja ou de jaune d'œuf) soit d'origine synthétique (phosphatidylcholine, phosphatidylsérine, phosphatidylglycérol et phosphatidyléthanolamine)

possédant deux chaînes hydrocarbonées généralement de 14 à 18 atomes de carbone (Weinstein and Leserman 1984). Ils sont formés à partir du glycérol, dont deux fonctions alcools sont estérifiés par des acides gras constituant la zone hydrophobe (queue apolaire) de la molécule de phospholipide. La troisième fonction alcool porte un groupement polaire qui constitue la zone hydrophile (tête polaire) de la molécule de phospholipide. Ce sont donc des molécules amphiphiles.

Des sphingolipides comme les sphingomyélines peuvent entrer aussi dans la composition des liposomes.

Figure 15 enlevée : Structure d'un phospholipide

Il existe une grande variété de phospholipides. Ils diffèrent entre eux par la longueur de la chaîne hydrocarbonée des acides gras, par la charge de leur tête polaire et par le degré de saturation des chaînes lipidiques, la position d'un acide gras sur le C-1 (Lorin et al. 2004). Le tableau 2 regroupe certains phospholipides et lipides utilisés dans la formulation des liposomes.

Tableau 2 : Certains phospholipides et lipides utilisés dans la formulation des liposomes (Immordino et al. 2006, Shashi et al. 2012).

Phospholipides	Abréviation	Carbone:saturation	Charge
Dimyristoylphosphatidylcholine	DMPC	14:0	0
Dipalmitoylphosphatidylcholine	DPPC	16:0	0
Distéaroylphosphatidylcholine	DSPC	18:0	0
Dioleoylphosphatidylcholine	DOPC	18:1	0
Dimyristoylphosphatidyléthanolamine	DMPE	14:0	0
Dipalmitoylphosphatidyléthanolamine	DPPE	16:0	0
Distéaroylphosphatidyléthanolamine	DSPE	18:0	0
Dioleoylphosphatidyléthanolamine	DOPE	18:1	0
Dimyristoylphosphatidylglycérol	DMPG	14:0	-1
Dipalmitoylphosphatidylglycérol	DPPG	16:0	-1
Distéaroylphosphatidylglycérol	DSPG	18:0	-1
Dioleoylphosphatidylglycérol	DOPG	18:1	-1
Dipalmitoylphosphatidylsérine	DPPS	16:0	-1
Stéarylamine (lipide)	SA	18:0	+1
di-Oleoyloxytriméthylamonio propane (lipide)	DOTAP	18:1	+1
Phosphatidylcholine de jaune d'œuf	EPC		0
Phosphatidylcholine de soja	SPC		0

Les caractéristiques de la bicouche lipidique dépendent du type de(s) phospholipide(s) qui la constitue(nt). Les phospholipides d'origine naturelle existent sous différents degrés de pureté. Leur utilisation est limitée par des problèmes d'instabilité chimique (oxydation). En revanche, les phospholipides synthétisés sont de grande pureté et plus stables chimiquement. Ces derniers forment des bicouches lipidiques plus rigides et éventuellement moins perméables (Sahoo and Labhasetwar 2003, Weinstein and Leserman 1984).

2.4.1.1 Température de transition de phase d'un phospholipide

Un phospholipide est caractérisé par la température de transition de phase (T_m : melting temperature). Elle correspond au passage des phospholipides d'un état solide ordonné à un état fluide désordonné (Lipowsky and Sackmann 1995, Weinstein and Leserman 1984).

En effet, à une température inférieure à T_m , les chaînes hydrocarbonées sont étirées au maximum et sont parallèles les unes aux autres, la bicouche est alors à l'état gel ou phase $L_{\beta'}$. Pour une température supérieure à T_m , la mobilité moléculaire augmente et les phospholipides passent à l'état fluide ou phase L_{α} , où les chaînes hydrocarbonées ne sont plus étirées (figure 16). Lors de leur transition de la phase gel à la phase fluide, les phospholipides passent par une phase intermédiaire dite $P_{\beta'}$ (figure 16).

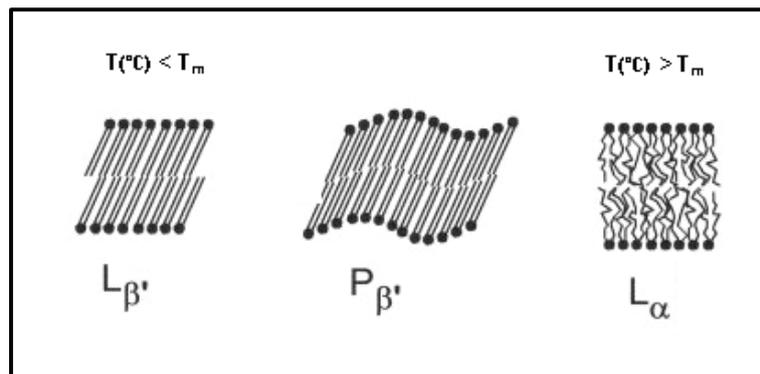


Figure 16 : Les différents états d'une bicouche phospholipidique en fonction de la température (Potamitis et al. 2011)

La température de transition de phase dépend de la longueur des chaînes lipidiques et de leur degré de saturation. Plus la chaîne hydrocarbonée est longue et saturée, plus T_m est élevée. Inversement, T_m diminue quand la chaîne est plus courte et le nombre d'insaturation augmente (Lorin et al. 2004).

La température de transition de phase est un facteur crucial à prendre en considération lors de la préparation des liposomes. La formation des liposomes a lieu quand la température est supérieure à la température de transition de phase du phospholipide utilisé. Dans le cas où plusieurs phospholipides sont utilisés, la température doit être supérieure à T_m du phospholipide la plus élevée (Lorin et al. 2004).

2.4.1.2 Dynamique moléculaire : mouvements des phospholipides

Les molécules de phospholipides peuvent diffuser librement dans la bicouche (Bertrand et al. 2000, Radtchenko et al. 2000).

Au cours de la transition de phase des phospholipides, ces derniers sont animés d'un mouvement appelé diffusion latérale (figure 17). En effet, une élévation de la température entraîne une mobilité des chaînes hydrocarbonées des phospholipides et favorise le passage de l'état ordonné à l'état désordonné. Par ailleurs, les liaisons C-C sont animées de mouvements rotationnels, elles oscillent parallèlement à leur axe principal (Bertrand et al. 2000).

Les mouvements de flip-flop (figure 17) peuvent intervenir aussi au sein de la bicouche. Au cours de ces mouvements, les phospholipides passent d'une monocouche à l'autre (Radtchenko et al. 2000).

Figure 17 enlevée : Représentation schématique de la dynamique des lipides au sein des membranes

2.4.2 Les stéroïdes

Le stérol qui entre le plus souvent dans la constitution des liposomes est le cholestérol (figure 18A). L'effet du cholestérol sur les propriétés membranaires a fait l'objet de plusieurs études (De Gier et al. 1968, Huang et al. 1999, Kucerka et al. 2008, Yeagle 1985).

Le cholestérol possède une structure cyclique, plane et rigide (figure 18A). Il s'intercale parallèlement aux molécules de phospholipides au sein d'une monocouche en dirigeant son groupement hydroxyl polaire vers les têtes phosphates polaires et sa partie apolaire (noyau tétracyclique et chaîne hydrocarbonée) vers les chaînes hydrophobes des phospholipides (figure 18B).

A l'état gel (au dessous de T_m), le cholestérol, à de faibles concentrations, tend à augmenter le désordre des phospholipides, particulièrement au niveau des chaînes hydrocarbonées et par conséquent possède un effet fluidifiant. Cependant, à une concentration de 30%, une phase liquide ordonnée est révélée, dans laquelle les chaînes hydrocarbonées ont une conformation plus ordonnée (Kyrikou et al. 2004). D'autre part, à l'état fluide (au dessus de T_m), le cholestérol exerce un effet condensant ; il rassemble fermement les phospholipides et la membrane devient moins fluide et moins perméable aux molécules hydrophiles et aux ions (Mills et al. 2009). Il est alors un modulateur de la fluidité de la membrane cellulaire.

Figure 18 enlevée : (A) Structure du cholestérol, (B) Positionnement du cholestérol entre les phospholipides d'une monocouche lipidique

2.5 Stabilité des liposomes

Une suspension de liposomes pourrait être sujette à des problèmes d'instabilité physique en relation avec la conservation de la taille des liposomes, et chimique reliée à la conservation de la structure et de la composition moléculaire des constituants (Chrai et al. 2002). Les principaux problèmes d'instabilité des liposomes et leurs solutions sont abordés ci-dessous :

2.5.1 Aggrégation des liposomes

Le contact entre les liposomes aboutit à leur coalescence et à la formation de vésicules plus grandes nommées agrégats. L'inclusion dans une bicouche lipidique de phospholipides chargés négativement comme le phosphatidylglycérol ou de lipides chargés positivement comme le stéarylamine, confère une charge de surface aux vésicules réduisant le phénomène d'agrégation grâce aux répulsions électrostatiques entre les parois (Weinstein and Leserman 1984). De plus, la fixation de polymères comme le polyéthylène glycol (PEG) à la surface des liposomes empêche les contacts intervésiculaires par répulsion stérique (Edwards et al. 1997).

2.5.2 Instabilité chimique

Lorsque les liposomes sont présents dans une solution aqueuse, l'intégrité de la bicouche lipidique peut être altérée suite à des dégradations chimiques comme des réactions d'oxydation et d'hydrolyse des phospholipides (Sharma et al. 1997).

2.5.2.1 Les réactions d'oxydation

L'oxydation des phospholipides a lieu suite à une exposition à la lumière ou en présence d'oxygène, au niveau des chaînes hydrocarbonées. C'est une réaction radicalaire qui aboutit à un clivage de la chaîne hydrocarbonée et dans le cas de deux doubles liaisons adjacentes, elle aboutit à la formation de peroxydes cycliques. Ce sont plutôt les phospholipides insaturés qui subissent l'oxydation (Kemps and Crommelin 1988). Les lipides polyinsaturés sont les plus susceptibles de subir une dégradation par oxydation (Kemps and Crommelin 1988). Cependant, les chaînes saturées peuvent s'oxyder mais à haute température (Crommelin and van Brommel 1984).

Les réactions d'oxydation des phospholipides peuvent être minimisées en stockant les liposomes à basse température (4°C), à l'abri de l'air et de la lumière. En outre, l'utilisation d'antioxydants comme le butylhydroxytoluène (BHT) protège les phospholipides contre l'oxydation (Crommelin and van Brommel 1984).

2.5.2.2 Les réactions d'hydrolyse

Les liaisons esters présentes dans un phospholipide peuvent subir une hydrolyse dans les dispersions aqueuses. Les carboxyles esters s'hydrolysent plus rapidement que les phosphates esters (Kemps and Crommelin 1988). Ainsi, après hydrolyse, un et/ou deux acides gras libres sont produits et un lysophospholipide. Ce dernier peut par la suite s'hydrolyser au niveau de la liaison phosphate ester pour donner l'acide glycérophosphorique. La vitesse d'hydrolyse est pH-dépendante. En effet, elle est minimale à un pH neutre (6,5) et elle augmente à des pH acide et basique (Grit et al. 1989). En outre, la vitesse d'hydrolyse est influencée par la température. Elle est plus lente à de faibles températures (4°C) (Grit et al. 1989).

Par ailleurs, l'hydrolyse des phospholipides a lieu *in vivo*. Elle est catalysée par les phospholipases, particulièrement la phospholipase A₂ (PLA₂). La PLA₂ hydrolyse un phospholipide au niveau de la liaison carboxyl ester en C-2 du glycérol, donnant ainsi un 1-acyllysophospholipide et un acide gras libre (Berg et al. 2001, Six and Dennis 2000).

2.5.3 La lyophilisation

Pour résoudre les problèmes d'instabilité des liposomes en milieu aqueux, certains auteurs ont proposé la lyophilisation (Wolkers et al. 2004) en présence de quantités adéquates de cryoprotecteurs comme des carbohydrates (glucose, lactose, tréhalose et mannitol) ou des polyalcools comme le glycérol (Stark et al. 2010, Nounou et al. 2005). En effet, les cryoprotecteurs interagissent avec les phospholipides via des liaisons hydrogènes entre les groupements hydroxyles des sucres et les groupements phosphates des phospholipides et stabilisent la membrane en remplaçant l'eau qui est éliminée par sublimation (Stevens and Lee 2003). De plus, ils forment une matrice amorphe entre les vésicules durant la congélation empêchant ainsi la fusion des vésicules et la formation de cristaux qui aboutit à la libération de la molécule encapsulée (Stevens and Lee 2003).

La lyophilisation des liposomes multilamellaires encapsulant le 5-fluorouracil, un agent antinéoplasique hydrophile, en présence du saccharose comme cryoprotecteur n'a pas montré un effet sur la taille des liposomes. En revanche, en absence de saccharose, la taille de ces liposomes a augmenté significativement. Une légère diminution de l'efficacité d'encapsulation a été observée après lyophilisation en présence du saccharose où la rétention du 5-fluorouracil a été supérieure à 80%. En absence du saccharose, la rétention du 5-fluorouracil était plus faible (Glavas-Dodov et al. 2005).

Ghanbarzadeh et al. (2013) ont étudié l'effet de la lyophilisation sur la stabilité physicochimique des liposomes multilamellaires contenant le sirolimus, un antibiotique hydrophobe à 4°C et à 25°C. Ils ont démontré que l'efficacité d'encapsulation du sirolimus augmente après lyophilisation avec ou sans dextrose, utilisé comme cryoprotecteur. Par ailleurs, elle est la plus élevée en présence du dextrose. La taille des liposomes en suspension a augmenté significativement après 6 mois, ainsi que celle des liposomes lyophilisés en absence du dextrose.

Alors que les liposomes lyophilisés en présence du dextrose conservent la même taille après 6 mois (Ghanbarzadeh et al. 2013).

2.6 Méthodes de préparation des liposomes

Les méthodes de préparation des liposomes impliquent en général deux étapes principales : le séchage du lipide par évaporation du solvant organique et la dispersion du lipide dans un milieu aqueux. Les méthodes de préparation des liposomes se divisent en quatre grands groupes (Akbarzadeh et al. 2013, Dua et al. 2012, Wagner and Vorauer-Uhl 2010):

1. Les méthodes de dispersion mécanique des phospholipides
2. Les méthodes d'élimination du solvant organique
3. Les méthodes d'élimination du détergent
4. Les méthodes basées sur la transformation de liposomes préformés

2.6.1 Les méthodes de dispersion mécanique des phospholipides

Ce groupe comprend la méthode d'hydratation du film lipidique décrite par Bangham en 1965, qui donne des MLV et des méthodes de réduction de taille des MLV par traitement mécanique. Ces méthodes sont l'extrusion, la sonication, la presse de French et la microfluidisation.

2.6.1.1 Hydratation du film lipidique

L'hydratation du film lipidique (figure 19) est la méthode la plus utilisée pour la préparation des MLV. Cette méthode implique tout d'abord la dissolution des phospholipides dans un solvant organique ou dans un mélange de solvants organiques qui est le plus souvent le chloroforme : méthanol (2:1). Le solvant organique est ensuite évaporé ce qui aboutit à la formation d'un film lipidique sur la paroi du ballon. Ce film lipidique est hydraté par l'ajout d'un tampon aqueux; la dispersion ainsi formée est vortexée pour une durée de quelques minutes. L'étape d'hydratation est réalisée à une température supérieure à la température de transition (T_m) du phospholipide

utilisé ou à la T_m la plus élevée si un mélange de phospholipides est utilisé. C'est une méthode très simple et rapide pour la préparation des MLV et une grande variété de substances peut être incorporée. Le composé à incorporer est ajouté selon sa solubilité, soit dans la phase aqueuse, soit avec le mélange de phospholipides à dissoudre dans le solvant organique. En revanche, cette méthode possède certains inconvénients. En effet, le volume interne des liposomes formés est petit et la distribution de taille des vésicules est très hétérogène (Bangham et al. 1965).

Figure 19 enlevée : Préparation des liposomes par la méthode d'hydratation du film lipidique

2.6.1.2 Sonication

La sonication est la méthode la plus largement utilisée pour l'obtention des SUV dont la taille est comprise entre 20 et 50 nm (figure 20). Pour réduire la taille des MLV, ces derniers subissent une sonication en utilisant soit un bain à ultrasons soit une sonde à ultrasons (Kiyoshi et al. 1992, Pereira-Lachataignerais et al. 2006).

Sonication par sonde à ultrasons : La sonde d'un sonicateur est directement plongée dans la dispersion de liposomes. L'apport d'énergie dans la dispersion de liposomes est très élevé ce qui

provoque un chauffage du milieu. Par conséquent, le ballon qui contient la préparation de liposomes doit être plongé dans un bain de glace (Akbarzadeh et al. 2013, Dua et al. 2012).

Sonication dans un bain à ultrasons : Cette méthode est conseillée parce que la température peut être contrôlée et la dispersion liposomiale est davantage protégée par rapport à l'utilisation de la sonde. Le ballon contenant la dispersion liposomiale est directement plongé dans un bain à ultrasons ayant à une température supérieure à la T_m du phospholipide (Akbarzadeh et al. 2013, Dua et al. 2012).

Plusieurs inconvénients sont liés à la sonication. Tout d'abord, les liposomes formés ont un petit volume interne et par conséquent l'efficacité d'encapsulation est plus faible. Par exemple, l'efficacité d'encapsulation de molécules hydrophiles comme le sulfate ferreux est plus faible après sonication des MLV préparés par la méthode d'hydratation du film lipidique (Xia and Xu 2005) ainsi que celle du salidroside (Fan et al. 2007). En outre, une possible dégradation des liposomes sous l'action des ultrasons peut avoir lieu. En effet, Xia and Xu (2005) ont démontré que l'efficacité d'encapsulation du sulfate ferreux diminue en augmentant la force de sonication et que ceci est dû à la destruction des liposomes sous l'action d'une forte sonication (Xia and Xu 2005).

Dans le cas de la sonication par une sonde à ultrasons, le milieu peut être contaminé par le métal de la sonde (titanium).

Figure 20 enlevée : Préparation des liposomes unilamellaires par sonication

2.6.1.3 Extrusion

L'extrusion est réalisée en utilisant des membranes de polycarbonate avec des pores de dimensions bien définies. La suspension liposomiale de MLV passe à travers ces filtres sous atmosphère d'azote et sous pression modérée (100-250 psi) à une température supérieure à la T_m des phospholipides (Jousma et al. 1987). Les liposomes obtenus possèdent alors une taille qui est proche de celle de la membrane utilisée et la distribution de taille est assez homogène. Cette technique permet une homogénéisation des suspensions de MLV qui peuvent être filtrées successivement à travers des membranes de dimension de pores décroissante. Le mécanisme de réduction de taille par cette méthode implique la rupture et le réarrangement spontané des vésicules lors du passage à travers la membrane de polycarbonate. Il en résulte des vésicules plus petites et unilamellaires (figure 21) (Lesieur et al. 1991). De tels dispositifs permettent d'obtenir des LUV et sont disponibles sur le marché sous le nom commercial « LUVET » pour Large Unilamellar Vesicles by Extrusion Techniques » ou EXTRUDER.

Berger et al. (2001) ont démontré que la taille des liposomes ainsi que l'efficacité d'encapsulation de la calcéine, marqueur fluorescent hydrophile, varient d'un dispositif d'extrusion à l'autre. Par ailleurs, l'efficacité d'encapsulation de la calcéine est plus petite quand la taille des liposomes extrudés est plus petite. Elle ne dépasse pas 50% (Berger et al. 2001). L'extrusion des MLV contenant la dexaméthasone, molécule hydrophobe fournit des liposomes plus petits. L'efficacité d'encapsulation de la dexaméthasone diminue de 50% environ après extrusion (Bhardwaj and Burgess 2010).

Figure 21 enlevée : Formation de liposomes unilamellaires par extrusion des MLV

2.6.1.4 Presse de French (French pressure cell)

Hamilton et al. (1980) ont décrit l'extrusion des liposomes à travers une presse de French. Les MLV placés dans une cellule de French dont la capacité est de 40 ml sont rapidement extrudés à l'aide d'un piston sous très haute pression (20 000 psi) à travers un petit orifice. Cette méthode implique des pressions plus élevées que celles utilisées avec les membranes de polycarbonate (Hamilton et al. 1980). C'est une méthode simple et rapide. En effet, aucune dégradation de phospholipides n'est détectée après 10 passages consécutifs à travers la cellule sous haute pression (20 000 psi) en absence d'une atmosphère d'azote qui est nécessaire lors de la sonication. La limite d'obtention de volumes relativement importants (> 50 ml) est le principal inconvénient de cette méthode (Hamilton et al. 1980).

2.6.1.5 Microfluidisation

La microfluidisation est une autre méthode utilisée pour homogénéiser les MLV. Une suspension de MLV est poussée à haute pression (10 000 psi) à travers un filtre ayant des pores de 5 µm de diamètre (microfluidiseur). La suspension se sépare alors en deux flux qui se rejoignent dans une chambre d'interaction où les vésicules entrent en contact à grande vitesse pour former des vésicules de taille plus petite (Mayhew et al. 1984, Jahn et al. 2007). Les liposomes formés sont unilamellaires. La taille des liposomes diminue en augmentant le nombre de passages à travers le microfluidiseur et en augmentant la pression (Mayhew et al. 1984, Thompson and Singh 2006)

ainsi que la polydispersité de la suspension liposomiale (Vemuri et al. 1990). Les liposomes obtenus après plusieurs passages ont un diamètre inférieur à 100 nm (Mayhew et al. 1984, Thompson and Singh 2006). Selon Mayhew et al. (1984), ces liposomes sont caractérisés par une efficacité d'encapsulation élevée pour les molécules hydrophiles comme la cytosine arabinoside qui est encapsulée à 75% (Mayhew et al. 1984).

2.6.2 Les méthodes d'élimination du solvant organique

2.6.2.1 Evaporation en phase inverse

Cette méthode constitue un progrès dans la préparation des liposomes puisqu'elle a permis l'obtention de liposomes unilamellaires avec une grande cavité aqueuse (LUV ou REV pour Reverse phase Evaporation Vesicles) (Szoka et Papahadjopoulos 1978).

L'évaporation en phase inverse (figure 22) est basée sur la formation de micelles inverses après sonication d'un mélange de la phase aqueuse qui contient les molécules hydrophiles à encapsuler et de la phase organique dans laquelle les molécules amphiphiles de phospholipides sont solubilisées (figure 22-1, 22-2 et 22-3). Le solvant organique le plus utilisé est l'isopropyl éther ou un mélange isopropyl éther / chloroforme (1/1). Une élimination lente du solvant organique par évaporation sous pression réduite favorise le rapprochement de ces micelles inverses et ensuite la formation d'un gel (figure 22-4). Au cours de cette étape, les micelles inverses formées de monocouches de phospholipides entourant des compartiments aqueux, s'agrègent pour former un réseau compact gélifié. Au cours de l'étape suivante, la pression est réduite davantage afin de favoriser l'évaporation totale de l'éther. Ceci entraîne la rupture de la phase gel (figure 22-5) et le rapprochement des monocouches pour former les liposomes (figure 22-6) (Szoka et Papahadjopoulos, 1978).

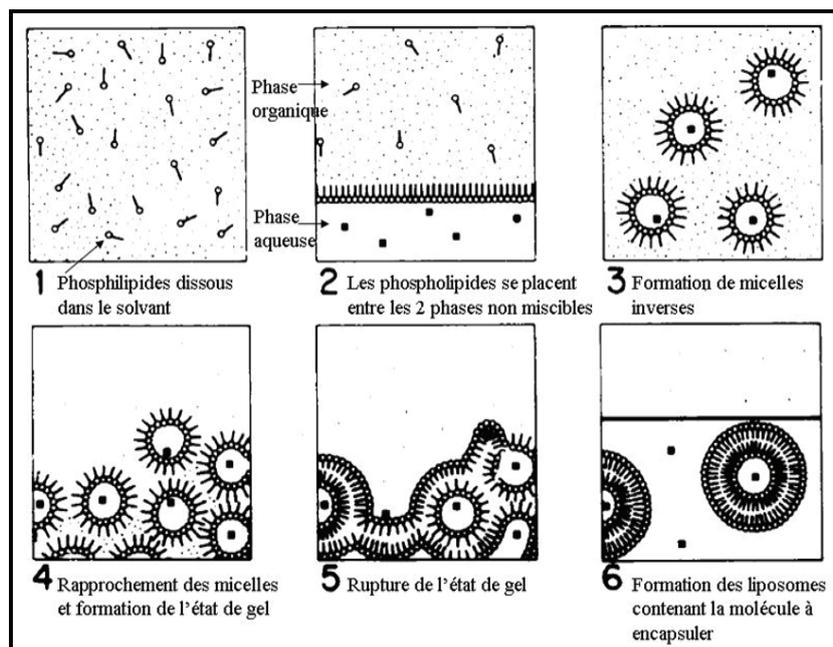


Figure 22 : Préparation de liposomes larges unilamellaires (LUV) par la méthode d'évaporation en phase inverse
(Szoka et Papahadjopoulos 1978)

Les liposomes ainsi préparés sont caractérisés par une efficacité d'encapsulation relativement élevée pour les molécules hydrophiles comme le sucrose (65%), la carboxyfluorescéine (57%) et la ferritine (54%) (Szoka et Papahadjopoulos, 1978), de la ciprofloxacine (>73%) (Hosny 2010). Ils permettent l'encapsulation des macromolécules comme la cytosine arabinoside (60%), 25S ARN (40%) (Szoka et Papahadjopoulos, 1978) et un polyplexe polyéthylèneimine/oligonucléotide (>80%) (Ko and Bickel 2012) et de protéines comme l'insuline (30%) (Niu et al. 2011).

De plus, le volume aqueux encapsulé par les LUV préparés par cette méthode (14 $\mu\text{l}/\text{mg}$) est 4 fois supérieur à celui des MLV préparés par la méthode d'hydratation du film lipidique (4 $\mu\text{l}/\text{mg}$) et 30 fois supérieur à celui des SUV obtenus par sonication (0,5 $\mu\text{l}/\text{mg}$) (Szoka et Papahadjopoulos, 1978) et ayant la même composition en phospholipides (phosphatidylglycérol/phosphatidylcholine/cholestérol, 1/4/5 rapport molaire).

L'inconvénient principal de cette technique est le contact des molécules à encapsuler avec le solvant organique et leur exposition, même pour une courte durée à la sonication. Ces conditions

peuvent causer la rupture des brins d'ADN et la dénaturation des protéines quand cette technique est utilisée pour l'encapsulation des macromolécules (Szoka et Papahadjopoulos 1978).

Une alternative à la méthode d'évaporation en phase inverse a été développée par Otake et ses collaborateurs en 2001. C'est la méthode supercritique d'évaporation en phase inverse (scRPE : supercritical Reverse Phase Evaporation) (figure 23). Cette méthode se base sur l'utilisation d'un fluide supercritique, le dioxyde de carbone (CO₂), à la place du solvant organique (Otake et al. 2001).

Cette méthode consiste à introduire les phospholipides et l'éthanol utilisé comme co-solvant organique dans une cellule (cellule verticale de volume total 50 cm³). Le CO₂ est introduit et la pression expérimentale est fixée (200 bars). La cellule est portée à une température supérieure à la T_m du phospholipide. Ensuite, une solution aqueuse est lentement introduite dans la cellule (figure 23a), pour former une émulsion eau dans CO₂ (eau/ CO₂) (figure 23b) qui donne une phase uniforme de couleur blanche laiteuse. Le mélange est agité pendant 20 à 30 minutes avec un agitateur magnétique. Une addition supplémentaire de la phase aqueuse forme une phase d'eau trouble au fond de la cellule, qui est due à la formation d'une émulsion CO₂ dans l'eau (CO₂/eau) (figure 23c). Une fois que la quantité d'eau souhaitée a été injectée, le CO₂ est libéré. Une dispersion liposomiale homogène (figure 23d) se forme durant la dépressurisation. Selon cette méthode, les liposomes formés sont des LUV dont la taille est comprise entre 0,1 et 1,2 µm (Imura et al. 2002, Imura et al. 2003, Otake et al. 2001).

Cette méthode a été utilisée pour encapsuler des composés hydrophobes (cholestérol) et des composés hydrophiles (glucose). Les composés hydrophobes sont ajoutés dans la cellule avec les phospholipides avant la dissolution. A l'inverse, les composés hydrophiles sont injectés dans la cellule avec la solution aqueuse.

Des efficacités d'encapsulation de 40% et 25% ont été obtenues, pour l'encapsulation du glucose par des DOPC-liposomes et DPPC-liposomes respectivement. Elles sont 5 fois supérieures à l'encapsulation du glucose par des DOPC-MLV et DPPC-MLV préparés par la méthode de Bangham (Imura et al. 2003, Otake et al. 2001). Des liposomes formés de lécithine de soja ont une efficacité d'encapsulation du glucose jusqu'à 27% (Shuhua et al. 2012). L'efficacité d'encapsulation du cholestérol obtenue par les DPPC-LUV est de 63% (Otake et al. 2001).

Des liposomes unilamellaires préparés par cette méthode, ont été étudiés pour leur efficacité d'encapsulation de l'albumine bovine en comparaison avec des MLV préparés par la méthode de Bangham (Aburai et al. 2011). Les résultats obtenus ont montré que l'efficacité d'encapsulation de l'albumine par les LUV est égale à 20% contre 5% par les MLV. Une modification de ces liposomes par des lipopeptides et du PEG améliore l'encapsulation de l'albumine. En effet, elle arrive à 73% par les LUV contre 32% par les MLV.

Les LUV modifiés sont plus stables que les MLV modifiés. En effet, une libération complète de l'albumine a été observée après 48h pour les MLV alors que les LUV retiennent 90% de leur contenu en albumine après 48h (Aburai et al. 2011).

L'efficacité d'encapsulation du metronidazole, un antibiotique de nature hydrophile par des liposomes préparés récemment par cette méthode arrive jusqu'à 48% environ (Shuhua et al. 2013).

Ensuite, Otake et al. (2006) ont mis au point une autre technique basée sur le procédé scRPE et appelé procédé amélioré de l'évaporation supercritique en phase inverse ou IsCRPE pour Improved supercritical Reverse Phase Evaporation (figure 23). Il s'agit d'une méthode sans solvant organique. Cette méthode consiste à introduire les phospholipides et la solution aqueuse dans la cellule (cellule horizontale de volume 200 cm³) (figure 23e). Ensuite, le CO₂ est introduit et la cellule est progressivement amenée à la pression de 200 bars. À cette étape une émulsion CO₂/eau se forme (figure 23f). La cellule est portée à une température supérieure à T_m du phospholipide ou à T_m la plus élevée si un mélange de phospholipides est utilisé. La cellule est mise sous agitation magnétique pendant 40 minutes puis soumise à une série de dépressurisation. Ces dépressurisations conduisent à la formation de la dispersion liposomiale (figure 23g) (Otake et al. 2006).

Comparativement à la méthode scRPE, les liposomes formés par la méthode IsCRPE sont plus stables en termes de taille et de rétention de molécules encapsulées (1 mois à température ambiante) et leur efficacité d'encapsulation pour le glucose est supérieure avec DMPC- et DSPC-liposomes (15% contre <10% et 26% contre 15% respectivement). Elle est égale à 36% pour DOPC-liposomes et 25% pour DPPC-liposomes (Otake et al. 2006).

L'évaporation supercritique en phase inverse est une technique très avantageuse puisqu'elle évite l'utilisation des solvants organiques nuisibles à l'environnement et à la santé humaine. En outre, elle est rapide (formation des liposomes dans 30 à 40 minutes en une seule étape) et permet une encapsulation élevée de molécules hydrophiles et hydrophobes.

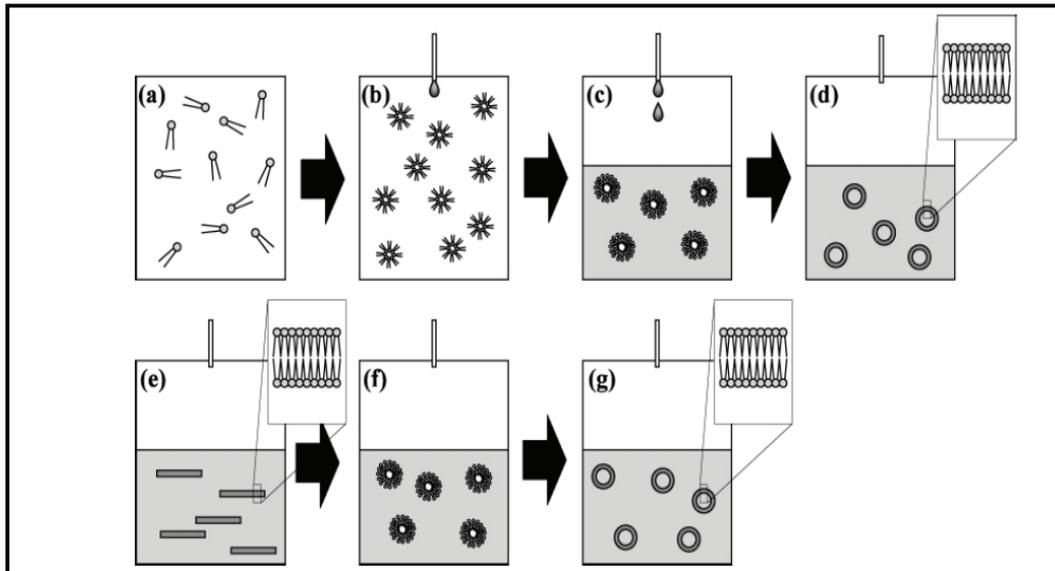


Figure 23 : Schéma représentatif du processus de formation de liposomes par scRPE (a-d) et par IscRPE (e-g). (a) Mélange uniforme de phospholipides, éthanol et CO₂, (b) émulsion eau/CO₂, (c) émulsion CO₂/eau, (d) dispersion liposomiale, (e) mélange inhomogène de phospholipides et eau, (f) émulsion CO₂/eau, (g) dispersion liposomiale.
(Otake et al. 2006)

2.6.2.2 Injection de solvant organique

Cette méthode consiste à dissoudre les phospholipides dans une solution de solvant organique (éthanol, ether,...) puis d'injecter cette solution à l'aide d'une seringue dans une solution aqueuse soumise à une agitation magnétique (figure 24). Les liposomes sont immédiatement formés (Hong et al. 2008, Song et al. 2011, Yang et al. 2012).

Le principal avantage de cette technique est sa rapidité et sa simplicité. Cependant, cette méthode présente plusieurs limites, en particulier la population liposomiale obtenue possède un intervalle

de taille compris en général entre 30 et 250 nm. Dans le cas de l'éthanol, son élimination totale est difficile parce qu'il se forme un mélange azéotropique avec l'eau. De plus, cette méthode ne peut pas être appliquée sur des molécules qui sont instables en présence d'éthanol (Jaafar-Maalej et al. 2010).

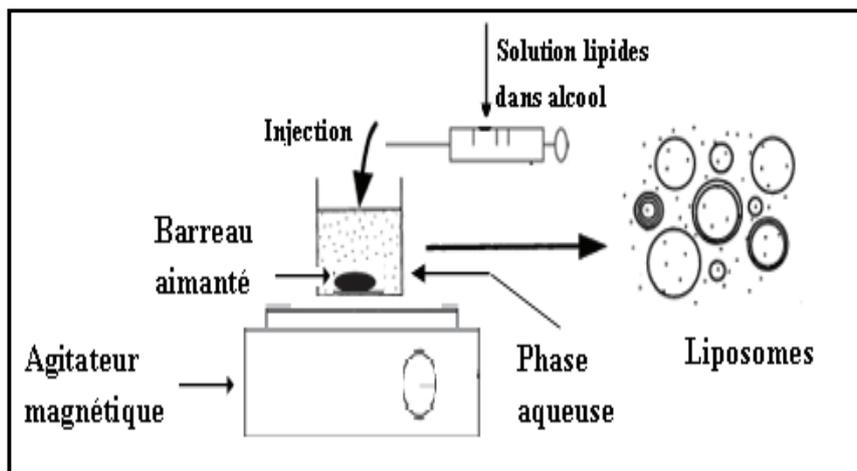


Figure 24 : Préparation des liposomes par injection de solvant organique
(Gentine et al. 2012)

Plusieurs paramètres affectent les caractéristiques des liposomes formés. La concentration des lipides dans la phase organique est le principal paramètre qui influence l'efficacité d'encapsulation et la taille des liposomes (Kremer et al. 1977). De plus, il a été démontré par Jaafar-Maalej et al. (2010) que la vitesse d'agitation de la phase aqueuse et le rapport en volume solvant/eau ont un effet sur la taille des liposomes formés. En revanche, la vitesse d'injection de la solution organique (Song et al. 2011) et le contenu en cholestérol n'affecte pas la taille des liposomes (Jaafar-Maalej et al. 2010).

L'efficacité d'encapsulation d'une molécule hydrophile, la cytosine arabinoside et d'une molécule hydrophobe, la beclométhasone dipropionate varient entre 3 et 16% et entre 87 et 100% respectivement. Elles sont affectées par la concentration en phospholipides (Lécithine

d'œuf), par le contenu en cholestérol et par le rapport en volume solvant/eau (Jaafar-Maalej et al. 2010).

L'efficacité d'encapsulation du célastrol, une molécule de faible solubilité aqueuse, peut atteindre 98% dans des liposomes de formulation optimale de phospholipides de soja, de cholestérol et de Tween-80, préparés par la méthode d'injection d'éthanol (Song et al. 2011).

Dans le but de contrôler le diamètre des liposomes formés par cette méthode et d'éviter la grande variabilité de taille, Gentine et al. (2012) ont testé plusieurs solvants ayant une structure similaire à l'éthanol pour le remplacer. Ces solvants sont : n-butanol, t-butanol, éthyle acétate, isopropanol et n-propanol. Les populations liposomiales formées en utilisant ces solvants sont polydisperses à l'exception de l'isopropanol. En outre, les valeurs du potentiel zêta des liposomes formés avec l'isopropanol sont très proches de celles obtenues avec l'éthanol. Les auteurs ont remplacé alors l'éthanol par l'isopropanol (Gentine et al. 2012).

Trois formulations de lipides qui diffèrent par la charge (anionique, cationique et neutre) et deux autres qui diffèrent par le degré de saturation des chaînes hydrocarbonées (saturée et insaturée) ont été préparées pour étudier l'effet de la nature et de la concentration des phospholipide(s) sur la taille et la distribution de taille des liposomes. Les résultats obtenus ont montré que la taille des liposomes n'est pas affectée par ces deux paramètres en comparaison avec l'injection d'éthanol. En revanche, la nature de la phase aqueuse choisie influence la taille des liposomes (Gentine et al. 2012).

Selon cette méthode, le diamètre peut être contrôlé en variant les deux paramètres cinétiques : la vitesse d'agitation de la phase aqueuse et le débit d'injection de la solution de lipides dans l'isopropanol (Gentine et al. 2012). Les liposomes obtenus par cette méthode sont unilamellaires et plus petits que ceux obtenus par l'injection d'éthanol classique.

2.6.3 Les méthodes d'élimination d'un détergent

Cette méthode est basée sur la dispersion de micelles mixtes. Ainsi, les phospholipides sont solubilisés dans un milieu aqueux en présence d'un détergent comme le Triton X-100 (Levy et al. 1990), l'octyl glucoside (Jiskoot et al. 1986) et le cholate de sodium (Purwaningsih and

Schubert, 2004). Il en résulte une formation de micelles mixtes (figure 25). L'élimination du détergent du milieu enrichit progressivement les micelles en phospholipides favorisant leur conversion en liposomes unilamellaires de taille comprise entre 100 et 200 nm (Jiskoot et al. 1986), et parfois inférieure à 100 nm (Purwaningsih and Schubert, 2004). La taille des liposomes dépend de la nature chimique et de la concentration des phospholipides et du détergent utilisés (Wagner and Vorauer-Uhl 2010).

La dialyse est parmi les techniques les plus utilisées pour l'élimination du détergent. Elle est très efficace pour la production de liposomes unilamellaires en grandes quantités et ayant une distribution de taille bien définie. Cependant elle présente certains inconvénients. En effet, une grande quantité de tampon (4-8 L) est nécessaire pour éliminer complètement le détergent et pour laver finement le dialyseur. Ce qui fait que les substances à incorporer dans ces liposomes doivent avoir un caractère hydrophile (Purwaningsih and Schubert, 2004). En outre, des protéines ont été incorporées dans la bicouche lipidique des liposomes préparés par cette méthode. Leur taux d'incorporation varie entre 75 et 100% en fonction du détergent utilisé (Parmar et al. 1999).

D'autres techniques sont utilisées pour l'élimination du détergent, comme la chromatographie d'exclusion stérique sur un gel Sephadex G50 (Abeywardena et al. 1983), la chromatographie d'adsorption sur des résines hydrophobes (Madani et al. 2011).

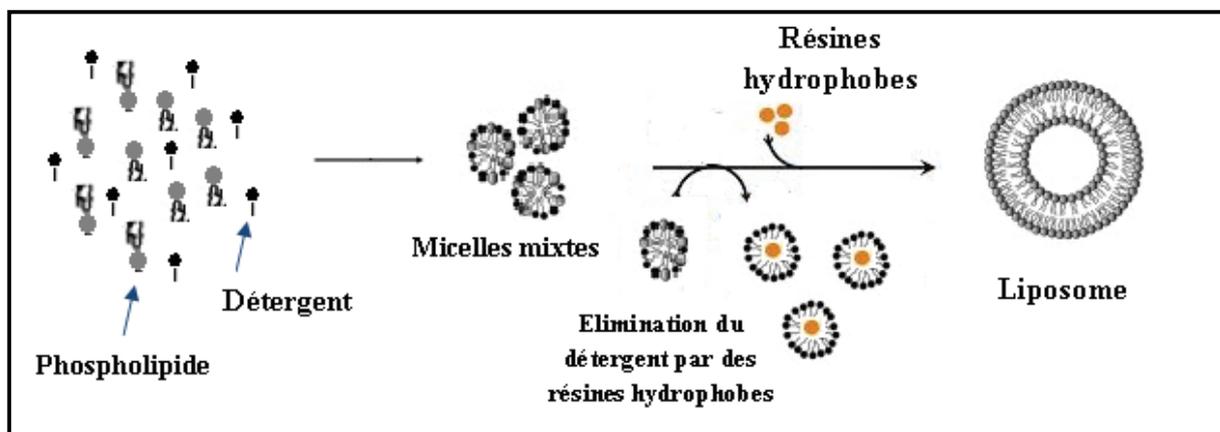


Figure 25 : Préparation des liposomes par la méthode d'élimination du détergent
(Figure modifiée de Schmidt et al. 2010)

2.6.4 Les méthodes utilisant des liposomes préformés : La congélation-décongélation (Freeze-thaw method)

Cette méthode est souvent appliquée sur les liposomes de type MLV pour les homogénéiser. Une suspension de MLV subit successivement une congélation dans l'azote liquide suivie d'une décongélation dans l'eau chaude (Sriwongsitanont and Ueno 2011, Traikia et al. 2000). Cette procédure aboutit à la rupture des MLV et à la formation d'une population homogène de vésicules larges unilamellaires dont le diamètre est inférieur à 150 nm (Traikia et al. 2000, MacDonald et al. 1994). Des cycles de congélation suivie de décongélation appliqués sur des SUV provoquent leur fusion en vésicules unilamellaires plus larges (Oku and MacDonald 1983, Traikia et al. 2000).

En augmentant le nombre de cycles, la taille et la lamellarité des MLV diminuent davantage alors que le volume aqueux augmente et par la suite l'efficacité d'encapsulation des molécules hydrophiles augmente (Sriwongsitanont and Ueno 2011, Traikia et al. 2000). En effet, il a été démontré que l'encapsulation de molécules hydrophiles comme le salidroside (Fan et al. 2007), la polymyxine E sulfate (Wang et al. 2009) et le sulfate ferreux (Xia and Xu, 2005) est améliorée après congélation-décongélation des liposomes déjà préparés.

Dans nos travaux expérimentaux décrits dans la suite de ce manuscrit, nous avons utilisé pour la préparation des liposomes, l'évaporation en phase inverse suivie d'une extrusion pour l'obtention des liposomes LUV, l'hydratation du film lipidique suivie ou non d'une sonication pour l'obtention des liposomes SUV et MLV respectivement, et la méthode d'injection d'éthanol.

2.7 Incorporation de substances dans les liposomes

Les liposomes sont principalement utilisés comme transporteurs de substances actives. La localisation de la molécule à encapsuler dans la vésicule liposomiale dépend de sa nature chimique (figure 26). Ainsi les molécules fortement lipophiles sont piégées dans la bicouche lipidique, par contre les molécules fortement hydrophiles sont localisées exclusivement dans le compartiment aqueux, et finalement les molécules de nature chimique intermédiaire, qui se

distribuent aisément entre les phases lipidiques et aqueuses, sont localisées à la fois dans la bicouche et le cœur aqueux des liposomes (Gulati et al. 1998).

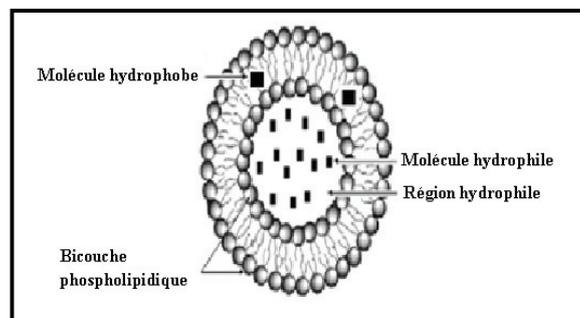


Figure 26 : Localisation d'un principe actif dans un liposome en fonction de sa nature chimique

2.7.1 Mécanismes et modes d'incorporation de molécules dans les liposomes

L'encapsulation et le partitionnement (partitioning) sont les mécanismes d'introduction de molécules dans les liposomes (Chrai et al. 2002).

- Encapsulation : ce terme est utilisé pour les molécules solubles dans l'eau. C'est une simple hydratation du lipide par une solution aqueuse dans laquelle est dissoute la molécule à encapsuler. Le liposome ainsi formé emprisonne passivement la molécule dissoute dans le compartiment aqueux interne ou dans les espaces aqueux interlamellaires.
- Partitionnement (partitioning) : ce mécanisme est mis en jeu pour les molécules caractérisées par un coefficient de partition élevé (partition coefficient $\text{Log } P_{w/o}$) entre la phase aqueuse (water, w) et la phase organique (organic phase, o) (Juliano and Stamp 1979). Ces molécules sont dissoutes dans la phase organique avec les phospholipides. Le solvant organique est ensuite éliminé après addition de la phase aqueuse. En effet, les chaînes hydrocarbonées des phospholipides fournissent un environnement solubilisant pour la molécule hydrophobe qui se localise alors dans l'espace intrabouche.

L'introduction de substances dans les liposomes peut être réalisée suivant deux modes : encapsulation passive et encapsulation active (Akbarzadeh et al. 2013, Shashi et al. 2012).

- Encapsulation passive : l'introduction de la substance dans le liposome a lieu pendant le processus de formation des liposomes. Ce mode d'encapsulation est possible pour les molécules lipophiles et hydrophiles qui sont respectivement ajoutées avec les phospholipides dans la phase organique ou en hydratant le film lipidique.

A titre d'exemple, l'amphotericine B, le taxol et l'annamycine sont des principes actifs hydrophobes qui peuvent être directement introduits dans les liposomes au cours de leur formation ; la quantité d'absorption et de rétention est contrôlée par les interactions principes actifs-lipides. L'efficacité d'encapsulation de telles molécules peut souvent atteindre 100%, mais elle dépend de la solubilité de la molécule dans la membrane liposomiale (Akbarzadeh et al. 2013).

L'efficacité d'encapsulation des molécules hydrosolubles est limitée par le volume aqueux des liposomes et par la solubilité de la molécule (Akbarzadeh et al. 2013).

- Encapsulation active : Elle consiste à introduire la molécule dans les liposomes préformés.

Les molécules non chargées et suffisamment lipophiles diffusent à travers la bicouche lipidique. Par ailleurs, les molécules hydrosolubles et ayant des fonctions protonisables comme les acides faibles et les bases faibles peuvent être encapsulées activement en employant le gradient de pH (Mayer et al. 1993) qui peut aboutir à une efficacité d'encapsulation de 100% (Arcadio and Cullis 1995). De telles substances peuvent être ajoutées à l'état non chargé dans la phase aqueuse pour pénétrer dans les liposomes à travers les bicouches lipidiques. La formation d'un gradient de pH permet d'obtenir un pH intraliposomal acide dans le cas des bases faibles et basique dans le cas des acides faibles et de conserver un pH extraliposomal neutre. Ainsi, toute substance non ionisée diffuse à travers la membrane puis s'ionise à un pH acide ou basique et est alors piégée dans la cavité aqueuse.

La doxorubicine est l'exemple d'une base faible qui a été encapsulée activement par l'intermédiaire d'un gradient de sulfate d'ammonium (Drummond et al. 1999) où la

doxorubicine non ionisée traverse la bicouche liposomiale, s'ionise en milieu acide et précipite avec les anions sulfates pour former un gel stable à l'intérieur du liposome.

2.7.2 Efficacité d'encapsulation (pourcentage ou taux d'encapsulation)

La substance encapsulée dans les liposomes est généralement un principe actif mais il peut s'agir également d'autres molécules. Par exemple, pour des études de stabilité ou de marquage, on trouve des fluorophores qui sont encapsulés dans le compartiment aqueux des liposomes comme la calcéine (Ding et al. 2005), la sulforhodamine B (Khreich et al. 2008) et la carboxyfluoréine (Rex and Schwarz 1998, Gentine et al. 2012).

Pour déterminer le taux d'encapsulation d'un principe actif dans les liposomes, il faut tout d'abord séparer les liposomes des molécules non encapsulées. Différentes méthodes sont utilisées pour la séparation des liposomes et des molécules libres. Le plus souvent, ce sont des méthodes physiques de séparation comme la centrifugation où les molécules libres de faible poids moléculaire restent dans le surnageant (Bridson et al. 2006, Varona et al. 2011), la chromatographie de filtration sur gel où les liposomes de grande taille sont élués en premier et les molécules de petite taille sont retenues dans les pores du gel (Niu et al. 2011, Yang et al. 2012) et la dialyse (Wen et al. 2010).

Le pourcentage d'encapsulation est en général calculé suite à la séparation du marqueur non encapsulé, en utilisant l'équation (1) (Kunastitchai et al. 2006):

$$\frac{\text{Quantité totale de molécules dans la suspension liposomiale} - \text{Quantité de molécules libres}}{\text{Quantité totale de molécules dans la suspension liposomiale}} \times 100 \quad (1)$$

Quand la quantité de molécule encapsulée est rapportée à la quantité de phospholipides qui constituent les liposomes, le taux d'encapsulation est exprimé en g/mol ou g/mg de phospholipides (Shashi et al. 2012).

2.8 Utilisation des liposomes comme modèle membranaire

Les liposomes sont largement utilisés pour l'étude des propriétés membranaires. Il serait possible de comprendre l'effet de certains paramètres sur la perméabilité et la stabilité des membranes liposomiales, tels que la composition, la température et le pH. En effet, la structure du phospholipide et le contenu en cholestérol affecte la perméabilité des liposomes. La libération d'une molécule encapsulée est diminuée quand le pourcentage molaire du cholestérol augmente et avec des phospholipides de chaînes hydrocarbonées plus longues (Anderson and Omri 2004, Lu et al. 2012).

En outre, une élévation de la température rend la membrane liposomiale plus perméable à la calcéine (Lu et al. 2012). De plus, des liposomes formés de lécithine de soja sont moins stables à température ambiante qu'à 4°C. Leur densité optique augmente indiquant leur fusion et la formation d'agrégats (Moh'd Atrouse 2002).

Les immunoliposomes encapsulant la sulforhodamine B préparés par Khreich et al. (2008) ont montré une stabilité dans un intervalle de pH 4-8,5 (Khreich et al. 2008). Pullmanova et al. (2012) ont démontré que la complexation de l'ADN aux liposomes cationiques est affectée par la force ionique du milieu. En effet, une force ionique élevée réduit la fraction de l'ADN liée au complexe (Pullmanova et al. 2012).

Par ailleurs, les liposomes constituent de bons modèles pour étudier ce qui se déroule au niveau membranaire lors de différents processus tels que l'exocytose (Cans et al. 2003), l'endocytose (Duzgunes and Nir, 1999), la fusion des membranes (Martin and Ruyschaert, 2000) et l'interaction des protéines avec la membrane qui est cruciale pour la régulation des fonctions biologiques (Hofer et al. 2010).

Certains auteurs ont relié l'activité biologique exercée par certaines molécules à leur interaction avec la membrane biologique et ceci dans le but de fournir une base moléculaire qui peut expliquer les mécanismes d'action de ces molécules. Ainsi l'interaction de diverses molécules bioactives avec la membrane biologique a été étudiée en utilisant les liposomes comme modèles mimétiques de la membrane (Hou et al. 2013, Matos et al. 2012, Potamitis et al. 2011). Des informations diverses portant sur la perméabilité, la fluidité et la structure des liposomes ont été

fournies (Castangia et al. 2013, Cong et al. 2009, Han et al. 1997, Prades et al. 2011, Subczynski et al. 2010, Zhao and Feng 2005).

Dans le chapitre suivant, nous détaillons les effets de différentes molécules triterpéniques sur les propriétés physicochimiques des membranes lipidiques. Les différentes techniques de caractérisation des bicouches lipidiques utilisées pour étudier ces effets seront aussi présentées.

Chapitre 3 : Interaction des triterpènes avec les membranes lipidiques

Les triterpènes tétra- et pentacycliques possèdent une similarité structurale avec le cholestérol. Ils sont donc de bons candidats pour interagir avec la membrane biologique. De ce fait, il est probable que de telles interactions pourront moduler les propriétés structurales, physicochimiques et biologiques des membranes.

Plusieurs modèles membranaires ont été établis pour étudier le rôle de molécules bioactives au niveau membranaire tel que les monocouches lipidiques (Laing et al. 2009, Micieli et al. 2011) et les bicouches lipidiques (Castangia et al. 2013, Prades et al. 2011). Pour ce même objectif, des modèles cellulaires sont également utilisés comme les cellules Caco-2 (Kulkarni et al. 2002) et les érythrocytes (Ciolkowski et al. 2011, Rojas-Aguirre et al. 2012).

Dans ce chapitre, nous présentons un résumé des travaux de la littérature sur l'interaction des triterpènes avec les liposomes et leurs effets sur la fluidité, la perméabilité, la structure et le comportement thermique des bicouches lipidiques. Nous parlons aussi des techniques de caractérisation des bicouches lipidiques qui peuvent servir à étudier les différents effets exercés par une molécule au niveau membranaire.

3.1 Effet des triterpènes sur la fluidité membranaire

L'effet de certains composés triterpéniques sur la fluidité de la membrane liposomiale a été étudié en mesurant la polarisation de la fluorescence du 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH), molécule hydrophobe qui s'intègre au sein de la bicouche lipidique (Han et al. 1997) et/ou du 1-(4-triméthyl-ammoniumphényl)-6-phényl-1,3,5-hexatriène (TMA-DPH), molécule amphipatique qui se localise à l'interface hydrophile de la bicouche (Rodriguez et al. 1997). Le DPH et le TMA-DPH sont des molécules qui présentent une forte augmentation de la fluorescence après intercalation dans la membrane. Elles sont utilisées comme des sondes pour étudier la fluidité et l'ordre des lipides (Caudron et al. 2007, Zolse et al. 1990). Le Laurdan est aussi une sonde

fluorescente hydrophobe qui s'incorporee au sein de la membrane. Sa fluorescence est sensible à la polarité de son environnement dans la bicouche (Harris et al. 2002).

Han et al. (1997) ont démontré que l'acide oléanolique et l'acide ursolique n'influencent pas significativement les valeurs de la polarisation de fluorescence du DPH à des températures inférieures à T_m . Ce qui signifie qu'ils n'exercent pas dans la phase gel un effet fluidifiant de la membrane liposomiale formée de DPPC, contrairement au cholestérol qui augmente la flexibilité des chaînes acyles dans la phase gel. D'autre part, l'addition de ces composés a augmenté les valeurs de la polarisation de fluorescence du DPH dans la phase cristal liquide. Ce qui signifie que ces composés diminuent la fluidité de la membrane liposomiale dans la phase cristal liquide, et ceci d'une manière similaire vue leur similarité structurale. Toutefois, leur effet est moins important que celui du cholestérol. En effet, la queue hydrophobe du cholestérol s'intercale mieux entre les phospholipides de la bicouche lipidique ce qui induit une modulation plus efficace de la fluidité. La présence du noyau multicyclique rigide des acides oléanolique et ursolique et du cholestérol, restreint les mouvements de flexion des chaînes acyles dans la phase cristal liquide et réduit la fluidité (Han et al. 1997).

Trois autres triterpènes pentacycliques, l' α -amyrine, le lupéol et le taraxérol (figure 27) ont été étudié par Rodriguez et al. (1997) pour leur effet sur la fluidité des bicouches lipidiques formées de DPPC, en comparaison avec le cholestérol.

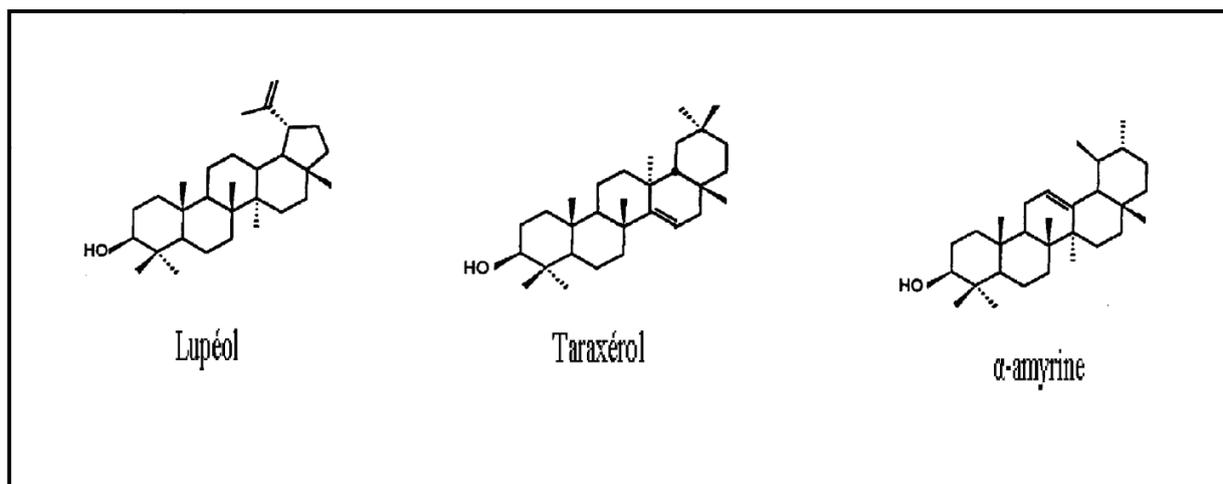


Figure 27 : Structure générale des triterpènes pentacycliques monoalcooliques : le lupéol, le taraxérol et l' α -amyryne (Rodriguez et al. 1997)

Le taux d'incorporation des trois molécules triterpéniques dans les liposomes multilamellaires formés de DPPC, a été déterminé par chromatographie sur couche mince. Les résultats obtenus ont montré que l' α -amyryne a été incorporé à des taux aussi élevés que le cholestérol (50 mol%), alors que le lupéol et le taraxérol ont été incorporés à des taux relativement faibles, 12 et 5 mol% respectivement (Rodriguez et al. 1997).

Les auteurs ont démontré qu'au dessous de T_m (phase gel), le cholestérol produit une faible diminution de l'anisotropie de fluorescence de DPH et TMA-DPH. Ce qui signifie qu'il favorise le désordre des phospholipides dans la phase gel. En comparaison avec le cholestérol, l' α -amyryne produit une diminution plus importante de l'anisotropie des deux sondes. Le lupéol exerce le même effet que l' α -amyryne mais d'une façon moins importante. Alors que le taraxérol n'affecte pas l'anisotropie de fluorescence du DPH mais diminue celle du TMA-DPH.

Au dessus de T_m (phase cristal liquide), le cholestérol produit une forte augmentation de l'anisotropie de fluorescence de DPH et TMA-DPH. Ce qui signifie qu'il réduit la fluidité de la bicouche dans cette phase en favorisant l'ordre des chaînes lipidiques. En comparaison avec le cholestérol, l' α -amyryne produit une augmentation moins importante des valeurs de l'anisotropie des deux sondes fluorescentes. Le lupéol exerce le même effet que l' α -amyryne dans cette phase

mais aussi d'une façon plus faible. Le taraxérol n'affecte pas les valeurs de l'anisotropie du DPH ni du TMA-DPH.

Le rôle que joue l' α -amyrine dans la modulation de la fluidité membranaire en comparaison avec le cholestérol, est expliqué par les différences structurales qu'elle présente avec le cholestérol. En effet, l'absence de la chaîne latérale, les dimensions moléculaires et l'arrangement des noyaux cycliques, introduisent des espaces vides profondément dans la bicouche rendant les chaînes acyles des phospholipides plus libres. Tous ces facteurs rendent l' α -amyrine moins efficace que le cholestérol à produire l'effet condensant de la bicouche dans la phase cristalline. D'autre part, l'absence de la planéité du squelette pentacyclique rigide et de la chaîne latérale chez l' α -amyrine, peut être responsable de sa supériorité au cholestérol d'augmenter le désordre dans la phase gel (Rodriguez et al. 1997).

Le comportement du lupéol et du taraxérol, sont expliqués par leurs faibles taux d'incorporation dans les liposomes. De plus, leurs conformations structurales non planes et irrégulières défavorisent les interactions van der Waals avec les chaînes acyles des phospholipides et justifient leur effet d'augmenter le désordre dans la phase gel en comparaison avec le cholestérol (Rodriguez et al. 1997).

Les oxystérols sont des molécules endogènes produits par oxydation enzymatique du cholestérol au niveau de la chaîne aliphatique latérale ou par oxydation non enzymatique au niveau du noyau stéroïde tétracyclique. Ils sont donc des dérivés du cholestérol contenant un second atome oxygène sous forme d'un carbonyle, hydroxyle ou époxy (Bjorkhem and Diczfalusy 2002).

L'effet de différents oxystérols modifiés au niveau de la chaîne latérale comme le 25-hydroxycholestérol et le 27-hydroxycholestérol (figure 28) et au niveau du noyau stéroïde comme le 7 β -hydroxycholestérol et le 7-ketocholestérol (figure 28) sur les propriétés biophysiques des modèles membranaires ont été étudiées en comparaison avec le cholestérol (Massey and Pownall 2005 et 2006). Les polarisations de fluorescence du DPH et du laurdan ont été mesurées pour déterminer les changements induits par les oxystérols sur les propriétés membranaires (Massey and Pownall 2005 et 2006).

Figure 28 enlevée : Structures de différents oxystérols : 25-hydroxycholestérol, 27-hydroxycholestérol, 7 β -hydroxycholestérol et 7-ketocholestérol

Les mesures de fluorescence ont montré qu'au dessous de T_m , l'addition du cholestérol induit une diminution des valeurs de la polarisation du DPH, indiquant une diminution de l'ordre des phospholipides dans la phase gel. L'ordre des lipides a été réduit aussi avec les oxystérols examinés, 7-ketocholestérol, 7 β -hydroxycholestérol, 25-hydroxycholestérol et 27-hydroxycholestérol. La diminution de la polarisation du DPH est plus importante avec le 7 β -hydroxycholestérol qu'avec les autres oxystérols dont l'effet est presque similaire au cholestérol.

Au dessus de T_m , l'augmentation de la polarisation du DPH en présence du cholestérol, révèle une augmentation de l'ordre des lipides dans la phase cristal liquide. Tous les oxystérols examinés ont augmenté considérablement l'ordre des chaînes acyles. L'augmentation est plus importante avec le 25-hydroxycholestérol et 27-hydroxycholestérol et le 7 ketocholestérol qu'avec le 7 β -hydroxycholestérol.

Selon la composition de la bicouche lipidique, l'effet du 7-ketocholestérol sur la fluidité membranaire est similaire ou parfois plus faible que le cholestérol. Par exemple, il est identique au cholestérol dans les bicouches formées de DPPC ou de DMPC alors qu'il est plus faible dans les bicouches formées de DOPC et de sphingomyéline.

L'addition du cholestérol a augmenté les valeurs de la polarisation du laurdan au dessous et au dessus de T_m . Cette élévation est associée à une diminution de la polarité de la bicouche. Un tel profil a été aussi observé avec le 25-hydroxycholestérol, 27-hydroxycholestérol et 7-ketocholestérol. Alors que le 7 β -hydroxycholestérol réduit la polarisation du laurdan au dessous de T_m .

De plus, la capacité d'un stérol à former des domaines de lipides ordonnés a été évaluée en testant la capacité d'un détergent, le Triton X-100, à solubiliser ces domaines de phospholipides. Les membranes lipidiques qui résistent à la solubilisation par le détergent sont appelées, membranes résistantes aux détergents ou « DRM : Detergent Resistant Membranes ». Il a été trouvé que les bicouches contenant le 7 β -hydroxycholestérol ne forment pas de DRM. La substitution du cholestérol par le 7-ketocholestérol réduit la formation de DRM. La formation de DRM dans les bicouches contenant le 25-hydroxycholestérol ou le 27-hydroxycholestérol a été similaire à celle dans les bicouches contenant le cholestérol. Ceci démontre clairement que l'effet est dû principalement à la structure des oxystérols.

Il a été suggéré qu'en fonction de la position du substituant oxygéné, les oxystérols se positionnent différemment au sein de la membrane (Olkkonen and Hynynen 2009) induisant ainsi des effets distincts sur l'ordre et la fluidité de la bicouche lipidique. Lorsque l'hydroxyl est localisé sur la chaîne latérale des oxystérols, ces derniers possèdent des groupes polaires sur les deux extrémités, ce qui favorise une orientation horizontale à la surface de la membrane (figure 29). Par contre les oxystérols ayant leur substitution oxygénée au niveau du noyau stérol, ont tendance à adopter une orientation inclinée en positionnant les deux fonctions polaires près de l'interface (figure 29) (Olkkonen and Hynynen 2009).

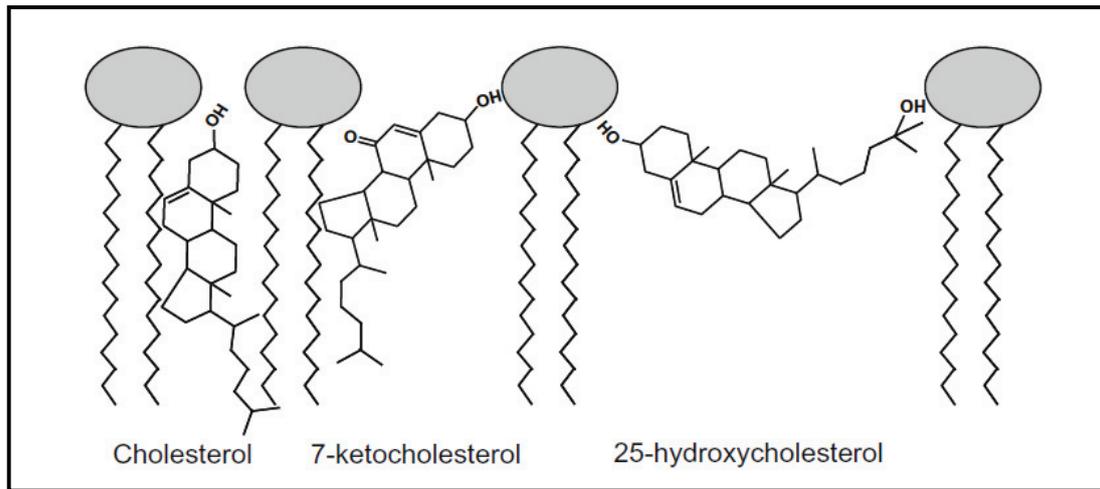


Figure 29 : Positionnement des oxystérols au niveau de la membrane lipidique, en fonction de la position du substituant oxygéné (Olkkonen and Hynynen 2009)

3.2 Effet des triterpènes sur la perméabilité membranaire

La perméabilité de la membrane lipidique est évaluée par l'étude cinétique de la libération d'un fluorophore encapsulé dans les liposomes (Düzgünes et al. 2010, Lu et al. 2012, Shimanouchi et al. 2009). La sulforhodamine B (Düzgünes et al. 2010, Khreich et al. 2008), la calcéine (Ding et al. 2005, Shimanouchi et al. 2009) et la carboxyfluorésceine (Rex and Schwarz 1998) sont les fluorophores les plus couramment utilisés. Encapsulés à haute concentration dans le compartiment aqueux des liposomes, ces fluorophores subissent le phénomène « d'auto-quenching » et par la suite leur fluorescence est minimale (Düzgünes et al. 2010, Lu et al. 2012, Shimanouchi et al. 2009). Suite à leur libération à partir des liposomes, ces fluorophores deviennent moins concentrés et leur fluorescence augmente. Elle est maximale après la lyse totale de la membrane liposomiale aboutissant à la libération de tout le contenu encapsulé (Siebert et al. 1993, Singh et al. 2000). La perméabilité des membranes liposomiales est évaluée en calculant le pourcentage du fluorophore libéré en fonction du temps, en utilisant l'équation (2) (Han et al. 1997, Lu et al. 2012) :

$$\text{pourcentage de libération} = \frac{F_t - F_0}{F_{max} - F_0} \times 100\% \quad (2)$$

Où F_t est l'intensité de fluorescence au temps t , F_0 est l'intensité de fluorescence initiale du fluorophore et F_{max} est l'intensité de fluorescence maximale qui représente une libération complète du fluorophore encapsulé, elle est déterminée suite à une solubilisation des vésicules avec un détergent comme le Triton X-100 (Han et al. 1997, Lu et al. 2012).

Il a été démontré par Han et al. (1997) que la présence de l'acide oléanolique et l'acide ursolique dans les liposomes unilamellaires formés de DPPC et encapsulant la calcéine, diminue considérablement la libération de la calcéine dans le milieu. Ce qui signifie que ces deux acides triterpéniques exercent un effet stabilisant de la membrane liposomiale (Han et al. 1997).

Hu et al. (1996) ont étudié la capacité d'une série de glucuronides de l'acide oléanolique à interagir avec les membranes des SUV formés de phosphatidylcholine d'œuf avec ou sans le cholestérol. Ces saponines triterpéniques sont réparties en 4 groupes. Elles diffèrent entre elles par la nature chimique du résidu sucré au niveau C-3 et par la présence ou non d'un résidu glycosyl au niveau C-28 (figure 30). La perméabilité de la membrane a été évaluée en étudiant la libération de la calcéine à 25°C à partir des SUV (Hu et al. 1996).

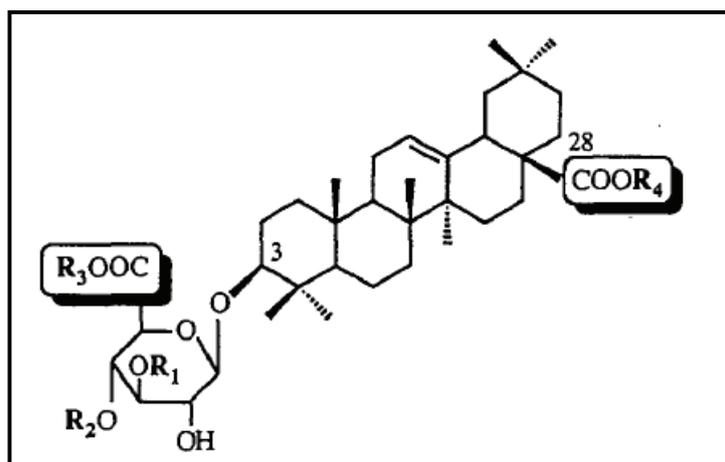


Figure 30 : Structure chimique générale des saponines de l'acide oléanolique (Hu et al. 1996)

Les saponines du premier groupe sont glycosylées sur un seul site (C-3) avec le carboxyle de l'acide glucuronique sous forme non esterifiée. Elles n'induisent pas de changement de la perméabilité membranaire en absence de cholestérol. Alors que les saponines du deuxième groupe dont leur acide glucuronique connecté au C-3 est esterifié par un groupe alkyle, se lient sur la membrane et peuvent la perméabiliser en absence de cholestérol. Ceci implique que l'hydrophobicité du glycoside au C-3 est responsable de l'activité des saponines à affecter la perméabilité membranaire.

Les saponines du troisième groupe sont glycosylées aux deux sites C-3 et C-28 et le groupe carboxyle de l'acide glucuronique au C-3 est libre. Ces molécules se lient à la membrane en quantité plus grande que celles du deuxième groupe. Elles peuvent aussi perméabiliser la membrane lipidique en absence de cholestérol mais leur activité est plus faible. Ceci renforce le rôle de l'esterification du groupe carboxyle au C-3 dans la perméabilisation de la membrane et implique que la glycosylation au C-28 est bénéfique pour la liaison des saponines sur la bicouche phospholipidique.

Les saponines du quatrième groupe sont glycosylées aux 2 sites C-3 et C-28 et le groupe carboxyle de l'acide glucuronique au C-3 est esterifié par un groupe alkyle. Ces molécules possèdent l'activité la plus importante de perméabilisation de la membrane en absence du cholestérol.

En présence du cholestérol, les saponines du premier groupe induisent un changement important de la perméabilité membranaire. En revanche, l'activité des saponines des trois autres groupes est réduite. Il a été suggéré que les mécanismes d'action de ces saponines dans la perméabilisation de la membrane sont différents. Les saponines du premier groupe impliquent dans leur mécanisme d'action, l'interaction avec le cholestérol alors que les trois autres groupes sont supposés interagir avec la membrane comme des détergents non spécifiques (Hu et al. 1996).

Des glycosides triterpéniques, les ginsénosides constituants essentiels du Ginseng, ont été examinés pour leur effet antibactérien par Sung and Lee (2008). Il a été démontré que les ginsénosides exercent des activités antibactériennes contre des bactéries Gram-négatif et Gram-positif. Le mécanisme d'action semble lié à une perturbation de la bicouche lipidique parce que

les ginsénosides ont été capables d'accélérer à 25°C la cinétique de libération de la calcéine à partir des vésicules lipidiques de type LUV formés de phosphatidylcholine et de phosphatidylglycérol. L'effet est démontré dose-dépendant (Sung and Lee 2008). Par ailleurs, la combinaison des ginsénosides avec la kanamycine ou la céfatoxime a montré un effet synergique contre les *Staphylococcus aureus* méthicilline-résistants. Ceci signifie que l'interaction des ginsénosides avec la membrane facilite la pénétration de ces antibiotiques dans la cellule suite à un effet de perméabilisation (Sung and Lee 2008).

3.3 Effet des triterpènes sur le comportement thermique de la bicouche lipidique : Localisation au niveau membranaire

La calorimétrie différentielle à balayage (DSC, Differential Scanning Calorimetry) est un outil pour étudier le comportement thermique des bicouches lipidiques. Elle permet la mesure des paramètres thermodynamiques de la pré-transition et de la transition de phase des phospholipides. Ces paramètres sont les températures de pré-transition et de transition, T_p et T_m , respectivement, et les quantités d'énergie absorbées au cours de la pré-transition et de la transition, ΔH_p et ΔH_m , respectivement (figure 31) (Demetzos 2008).

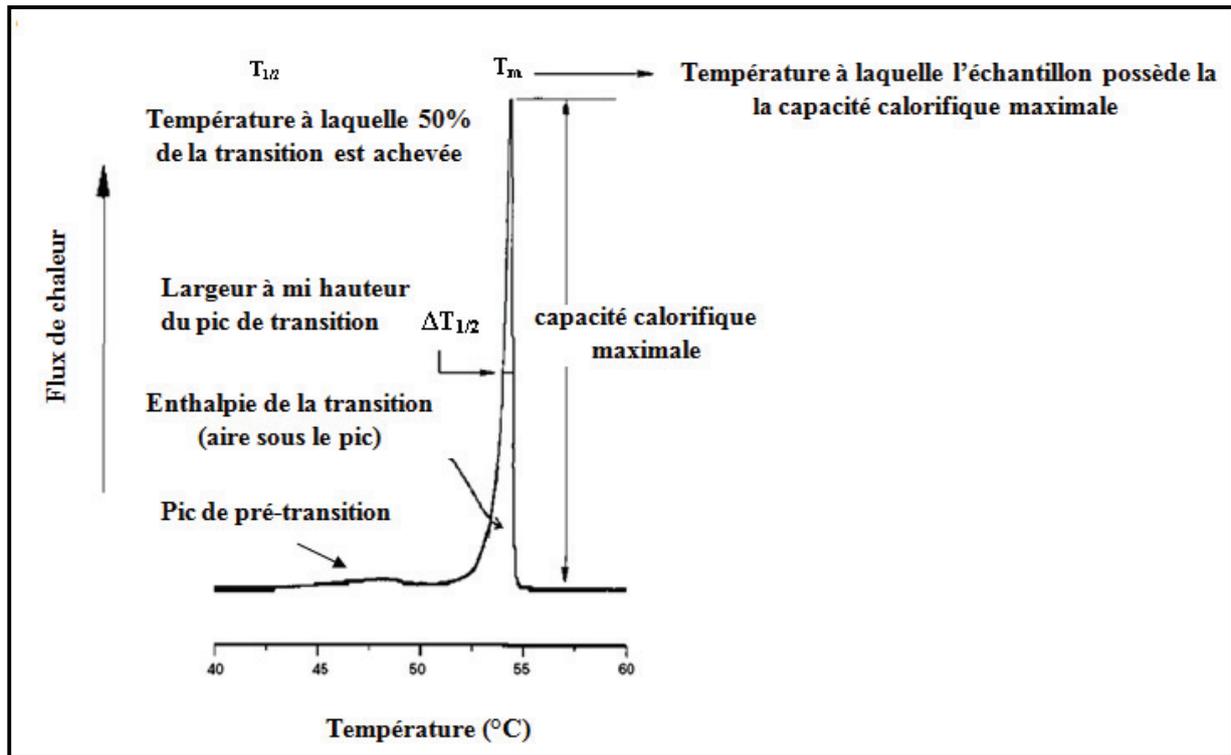
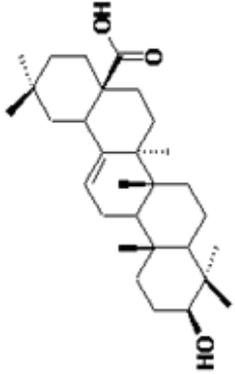
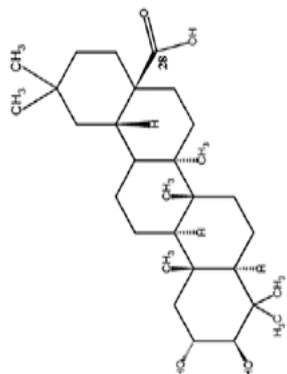


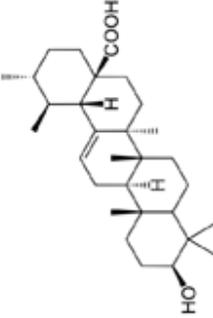
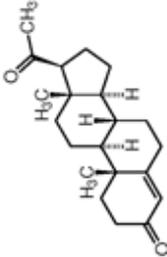
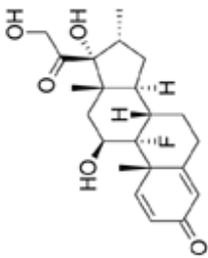
Figure 31 : Paramètres thermodynamiques caractéristiques d'une courbe thermique par DSC, relative à une bicouche lipidique (Demetzos 2008)

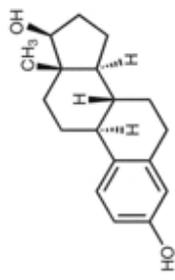
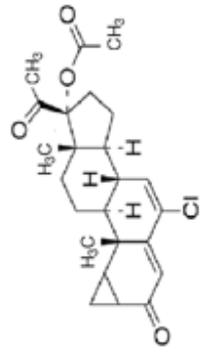
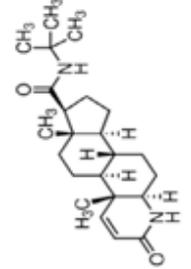
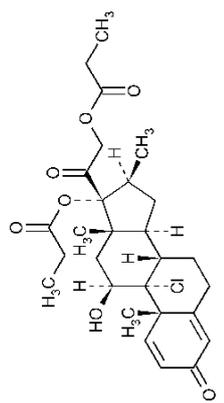
En outre, cette technique permet d'étudier l'effet de l'incorporation d'une molécule sur les propriétés thermotropiques d'une bicouche lipidique. Cette molécule peut interagir avec la partie lipophile de la bicouche (chaînes hydrocarbonées) aboutissant à un changement au niveau de T_m et ΔH_m , et/ou avec la partie polaire des phospholipides conduisant à la disparition et/ou au déplacement du pic de prétransition (Demetzos 2008).

L'effet de différentes molécules triterpéniques sur les liposomes formés de phosphatidylcholine a été étudié par DSC (tableau 3) (Bhardwaj and Burgess 2010, Biruss et al. 2007, Elhissi et al. 2006, Korkomaz and Severcan 2005, Prades et al. 2011).

Tableau 3 : Modifications apportées au niveau des paramètres thermodynamiques d'une bicouche de phosphatidylcholine après incorporation de différentes molécules triterpéniques et stéroïdes avec différents rapports molaires.

Molécule	Structure	phospholipide/ molécule	Pic de pré- transition	Aspect du pic de transition	T _m	ΔH _m
Acide océanolique		100/1, 50/1, 25/1	Il est très élargi, l'enthalpie de pré- transition diminue jusqu'à devenir presque négligeable	avec 25/1, un sommet supplémentaire apparaît	Non affectée	Non affectée
Acide maslinique		10/1, 5/1, 2,5/1, 1,6/1	Il disparaît	Il est bien élargi et un sommet supplémentaire apparaît	Non affectée	Diminue avec 2,5/1, 1,6/1
		50/1, 25/1 2,5/1	Il est très élargi, l'enthalpie de pré- transition est presque négligeable	Il est bien élargi et un sommet supplémentaire apparaît	Presque non affectée	Diminue légèrement
			Il disparaît	Il est bien élargi et un sommet supplémentaire apparaît	Presque non affectée	Diminue

Molécule	Structure	phospholipide/ molécule	Pic de pré- transition	Aspect du pic de transition	T _m	ΔH _m
Acide ursolique		25/1, 5/1, 2,5/1	Il est très élargi, l'enthalpie diminue jusqu'à devenir presque négligeable	Il est élargi, un sommet supplémentaire apparaît avec 25/1, 5/1 Il est fractionné en deux sommets avec 2,5/1	Presque non affectée	Légèrement affectée
Progestérone		1,6/1 100/3, 100/6, 100/12, 100/24	Il disparaît Il disparaît	Il est fractionné en deux sommets Il est élargi et un sommet supplémentaire apparaît avec 100/6 et 100/12	Presque non affectée Diminue	Diminue
Dexaméthasone		100/20	Il disparaît	Il est élargi et un sommet supplémentaire apparaît avec DPPC et DMPC et il est fractionné en deux sommets avec DSPC	Non affectée	Diminue

Molécule	Structure	phospholipide/ molécule	Pic de pré- transition	Aspect du pic de transition	T _m	ΔH _m
17-β-estradiol,		100/0,5	Il est déplacé vers la gauche et l'enthalpie diminue	Il est élargi	Diminue	Diminue
Cyprotérone acétate		100/0,5	Il est déplacé vers la gauche et l'enthalpie diminue	Il est élargi	Diminue	Diminue
Finastéride		100/0,5	Il est déplacé vers la gauche et l'enthalpie diminue	Il est élargi	Diminue	Diminue
Beclométhasone dipropionate		100/1, 100/2,5, 100/5	Il disparaît à partir de 100/2,5	Il est élargi	Légèrement affectée avec 100/1 et 100/2,5 et diminue avec 100/5	Légèrement affectée avec 100/1 et 100/2,5 et augmente avec 100/5

Il a été observé qu'en présence des acides oléanolique, maslinique, et ursolique (Prades et al. 2011) et de la beclométhasone dipropionate (Elhissi et al. 2006), le pic de prétransition s'élargit et l'enthalpie de pré-transition diminue de manière concentration-dépendante jusqu'à la disparition du pic. La dexaméthasone (Bhardwaj and Burgess 2010) et la progestérone (Korkomaz and Severcan 2005) produisent la disparition du pic de pré-transition. Le 17- β -estradiol, la cyprotérone acétate et le finastéride ont déplacé le pic de pré-transition vers des valeurs plus basses (Biruss et al. 2007). Ceci indique que ces molécules interagissent avec les têtes polaires des phospholipides via leurs groupements oxygénés.

La température de transition (T_m) n'est pas affectée significativement par les acides oléanolique, maslinique, et ursolique (Prades et al. 2011) ni par la dexaméthasone (Bhardwaj and Burgess 2010). En revanche, elle est diminuée en présence des hormones stéroïdes 17- β -estradiol, cyprotérone acétate et finastéride (Biruss et al. 2007), de la progestérone (Korkomaz and Severcan 2005) et de la beclométhasone dipropionate (5%) (Elhissi et al. 2006).

Quant à l'enthalpie de transition ΔH_m , elle n'est pas affectée significativement par l'acide oléanolique, l'acide maslinique et l'acide ursolique (Prades et al. 2011). Elle est diminuée en présence de la dexaméthasone (Bhardwaj and Burgess 2010), des hormones stéroïdes 17- β -estradiol, cyprotérone acétate et finastéride (Biruss et al. 2007). Elle est augmentée en présence de la beclométhasone dipropionate (5%) (Elhissi et al. 2006).

Les changements induits par ces molécules au niveau des paramètres thermodynamiques (T_m et ΔH_m) des chaînes acyles des phospholipides, impliquent leur localisation au niveau membranaire. Les acides oléanolique, maslinique et ursolique sont localisés à proximité des têtes polaires des phospholipides à l'interface de la bicouche lipidique (Prades et al. 2011). Alors que les molécules de progestérone (Korkomaz and Severcan 2005) et de 17- β -estradiol, cyprotérone acétate et finastéride (Biruss et al. 2007) interagissent avec le cœur lipophile de la bicouche. Elles s'insèrent au sein de la bicouche perturbant ainsi les fortes interactions hydrophobes entre les molécules de lipides. La dexaméthasone (Bhardwaj and Burgess 2010) et la beclométhasone dipropionate (Elhissi et al. 2006) s'incorporent aussi dans la bicouche lipidique.

En outre, l'aspect du pic de transition en présence d'une molécule peut être modifié. En effet, il est élargi en présence de toutes les molécules citées ci-dessus. De plus, à des concentrations

élevées des acides oléanolique, maslinique et ursolique (4% et 20%) (Prades et al. 2011), de la progestérone (6% et 12%) (Korkomaz and Severcan 2005), de la dexaméthasone (20%) (Bhardwaj and Burgess 2010) et de la beclométhasone dipropionate (5%) (Elhissi et al. 2006), un sommet supplémentaire apparaît sur le pic de transition. Un fractionnement du pic de transition en deux pics en présence de concentrations plus élevées en acides oléanolique, maslinique et ursolique (40% et 62,5%) (Prades et al. 2011) et de la dexaméthasone (20%) (Bhardwaj and Burgess 2010) a été observé. Cet aspect des pics est caractéristique d'un mélange non homogène de phospholipides et de ces triterpènes, indiquant une séparation de phase et une formation des domaines riches et d'autres pauvres en molécules triterpéniques.

3.4 Caractérisation morphologique des liposomes

Les techniques microscopiques couramment utilisées pour l'imagerie des liposomes sont la microscopie électronique et la microscopie à force atomique.

En microscopie électronique, on distingue la microscopie électronique à transmission qui utilise les électrons transmis pour former une image de l'échantillon et la microscopie électronique à balayage qui utilise les électrons rétrodiffusés et les électrons secondaires émis par l'échantillon (Herrera and Sakulchaichaoen 2009).

L'utilisation de la microscopie électronique à transmission permet de recueillir des informations sur la taille des particules, la forme et le nombre de lamelles qui apparaissent comme des couches de surface (Henry 2005, Herrera and Sakulchaichaoen 2009). L'observation de la morphologie des liposomes et l'identification de leur structure uni ou multilamellaire par cette technique est très connue dans la littérature (Chetanachan et al. 2008, Jain and Shastri 2012, Zasadzinski 1986).

Il a été démontré et observé par microscopie électronique à coloration négative que l'activité hémolytique des saponines est causée par leur intercalation dans la membrane plasmique des érythrocytes formant ainsi des creux d'approximativement 80 Å dans la membrane (Hu et al. 1996).

La microscopie électronique à balayage fournit des informations concernant la morphologie d'un échantillon de liposomes et leur degré d'agrégation (Bibi et al. 2011, De Rosa et al. 2008, Janga et al. 2012, Mukherjee et al. 2009). Cependant, cette technique présente certaines limites pour la caractérisation des liposomes. En effet, elle ne permet pas d'observer la structure interne des liposomes. De plus, il est difficile parfois de différencier clairement les liposomes du milieu environnant. Ce problème est davantage prononcé lorsque les liposomes étudiés ont tendance à adhérer les uns aux autres en formant des agrégats (Herrera and Sakulchaicharoen 2009).

L'inconvénient majeur de ces deux techniques, est lié aux artefacts de l'observation et donc de la certitude d'une image d'être représentative des liposomes d'un échantillon.

La microscopie à force atomique est utilisée pour visualiser la morphologie des liposomes en complémentarité à la TEM et pour étudier les propriétés physiques des bicouches lipidiques (Anabousi et al. 2005, Stimac et al. 2012). C'est une technique prometteuse parce qu'elle a le potentiel d'imager avec une résolution nanométrique, à température ambiante et dans l'eau, conditions nécessaires à l'imagerie des bicouches lipidiques supportées (Mao et al. 2004, Milhiet et al. 2011).

La taille et la hauteur des liposomes peuvent être déterminées par cette technique. Néanmoins, le comportement élastique de l'échantillon peut diminuer la précision des mesures. Lorsque les liposomes sont visualisés par la microscopie à force atomique, le rapport largeur/hauteur mesuré est généralement supérieur à 1. Ceci est dû aux caractéristiques de la pointe et l'aplatissement des liposomes qui s'élargissent quand ils sont adsorbés à la surface (Mao et al. 2004).

De nombreuses études ont illustré l'utilité et l'efficacité de la microscopie à force atomique à observer les liposomes et à caractériser les interactions entre les membranes lipidiques et les principes actifs encapsulés, bien qu'un degré élevé de propagation des liposomes sur le substrat soit généralement observé en raison de leur nature fluide.

A titre d'exemple, Bakowsky et al. (2008) ont observé par la microscopie à force atomique la morphologie des vésicules lipidiques PEGylées qui apparaissent sphériques avec une surface légèrement rugueuse en comparaison aux vésicules non PEGylées. Une coalescence des vésicules non PEGylées est observée en surface alors que celles PEGylées conservent leur forme arrondie et aucun étalement ou fusion n'est observé en surface (Bakowsky et al. 2008).

De plus, il a été démontré que les immunoliposomes qui sont développés pour assurer un ciblage actif des principes actifs, peuvent être observés par la microscopie à force atomique afin d'évaluer la conjugaison du ligand à la surface des liposomes. Les différentes morphologies de surface en fonction de la stratégie de couplage ont été visualisées par cette technique (Bendas et al. 1999). Anabousi et al. (2005) ont étudié par la microscopie à force atomique, l'effet d'une protéine, la transferrine ajoutée par couplage covalent à la surface des liposomes, sur la taille des liposomes. Ils ont démontré qu'en présence de la transferrine, la taille des liposomes augmente de 5 à 15% (Anabousi et al. 2005).

La rigidité des liposomes est l'un des facteurs affectant la durée de vie du liposome dans la circulation sanguine (Drummond et al. 1999). L'effet de plusieurs facteurs tels que le type de phospholipide, la quantité de cholestérol, la taille des liposomes et l'addition de charges positives sur la rigidité des liposomes a été discuté par Nakano et al. (2008). La rigidité (r) est calculée en divisant la hauteur (h) par le diamètre (d) des liposomes ($r=h/d$) qui sont déterminés par la microscopie à force atomique (Nakano et al. 2008). En outre, Ramachandran et al. (2006) ont étudié l'effet de l'encapsulation de la cisplatine, agent cytotoxique sur la rigidité des liposomes. Il a été obtenu que l'encapsulation de la cisplatine dans les liposomes résulte en une augmentation significative de leur rigidité en comparaison avec les liposomes sans cisplatine (Ramachandran et al. 2006).

Gao et al. (2012) ont préparés des liposomes formés de phosphatidylcholine de soja et du cholestérol, et PEG-ylés à la surface. Ces liposomes encapsulent un triterpène, l'acide oléanolique. Des observations morphologiques et des mesures de taille de ces liposomes ont été réalisés par la microscopie électronique à transmission et la microscopie à force atomique (Gao et al. 2012).

Les images obtenues par la microscopie électronique à transmission ont montré la formation de vésicules sphériques de diamètre moyen 100 nm. Une structure de bicouche apparaît clairement tout autour de ces vésicules. Les liposomes contenant un tensioactif, le Tween-80 montrent moins de particules adhérentes les unes aux autres en comparaison avec ceux ne contenant pas le Tween-80 (figure 32) (Gao et al. 2012).

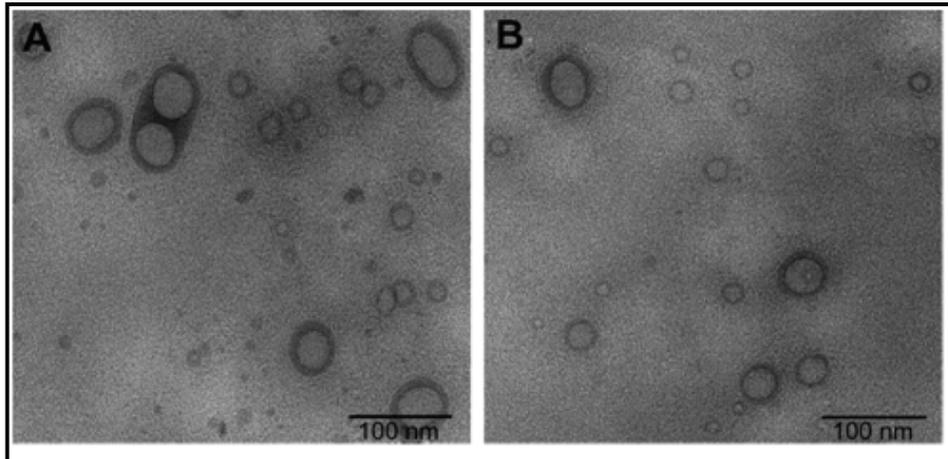


Figure 32 : Images obtenues par microscopie électronique à transmission pour des liposomes PEG-ylés encapsulant l'acide oléanolique. (A) : formulation sans le Tween-80 et (B) : formulation avec le Tween-80
(Gao *et al.* 2012)

Les images obtenues par la microscopie à force atomique ont montré que cette formulation de liposomes PEG-ylés contenant l'acide oléanolique possède un diamètre moyen autour de 168 nm en absence du tensioactif, Tween-80. De plus, il a été observé sur les images quelques particules qui s'adhèrent les unes aux autres et d'autres qui forment des agrégats (figures 33A et 33B). Des liposomes ayant des formes relativement aplaties apparaissent aussi, ce qui est probablement le résultat d'une déformation au cours du balayage de la surface. En revanche, les images des liposomes préparés en présence du Tween-80, montrent des vésicules de diamètre moyen autour de 110 nm et il apparaît que la formation d'agrégats est beaucoup moins fréquente pour ces liposomes (figures 33C et 33D) (Gao *et al.* 2012).

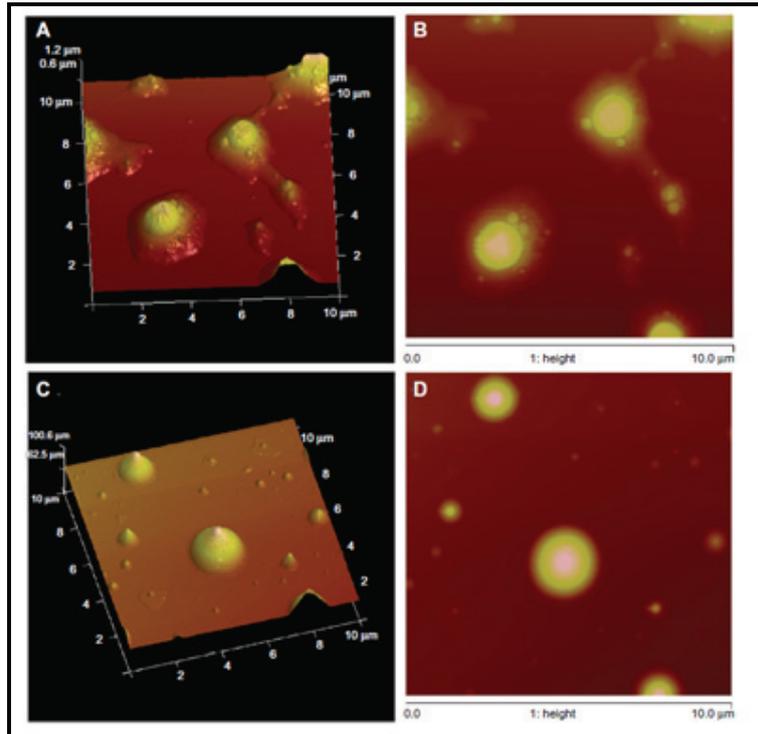


Figure 33 : (A et C) : Images en 3D et (B et D) : Images en 2D, obtenues par microscopie à force atomique pour des liposomes PEG-ylés encapsulant l'acide oléanolique. (A et B) : formulation sans le Tween-80, (C et D) : formulation avec le Tween-80
(Gao et al. 2012)

PARTIE 2 : PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre 4 : Objectif et stratégie expérimentale

4.1 Objectif

Molécules d'intérêt pharmacologique avec des structures proches de celle du cholestérol, la Cuc E et l'érythrodiol pourraient être de bons candidats pour interagir avec la membrane biologique. Cette interaction pourrait contribuer à la pharmacodynamie de ces molécules.

Nous nous intéressons dans ce projet de thèse, à étudier l'interaction de deux molécules triterpéniques, la Cuc E et l'érythrodiol avec la membrane phospholipidique. Les propriétés physicochimiques et structurales de la membrane phospholipidique sont déterminées en absence et en présence de ces molécules.

4.2 Stratégie expérimentale

Dans cette étude, différents types de liposomes sont préparés et différents paramètres caractéristiques de la membrane sont étudiés.

4.2.1 Choix du système

Selon l'objectif visé, nous avons défini le type de liposomes.

Les LUV préparés par la méthode d'évaporation en phase inverse sont considérés comme le modèle membranaire le plus adéquat pour étudier l'effet d'une molécule sur la perméabilité membranaire. En effet, leur large cavité aqueuse permet une encapsulation élevée de molécule fluorescente (Ding et al. 2005, Khreich et al. 2008, Szoka et Papahadjopoulos 1978).

Les MLV peuvent être spontanément formés à partir d'un seul type de phospholipide et leur préparation est rapide et simple par la méthode d'hydratation du film lipidique (Bangham et al. 1965). Ce type de liposomes est le plus communément utilisé pour les études calorimétriques par DSC (par exemple : Biruss et al. 2007, El Maghraby et al. 2005, Korkmaz and Severcan 2005, Prades et al. 2011). En effet, il est préférable de travailler avec un seul type de phospholipide de

grande pureté pour lequel les paramètres thermodynamiques de transition et de pré-transition sont connus. L'intérêt est de déterminer les effets d'une molécule sur les paramètres thermotropiques de la bicouche lipidique.

4.2.2 Les LUV : préparation et utilité dans les études de perméabilité membranaire

Pour préparer des LUV, nous avons utilisé la méthode d'évaporation en phase inverse établie par Szoka et Papahadjopoulos en 1978. Les constituants choisis pour former les LUV sont en majorité le DPPC et le cholestérol. En effet, le DPPC est le constituant le plus communément utilisé dans la formulation des liposomes. Le cholestérol est bien connu pour son rôle stabilisant de la membrane et comme modulateur de la fluidité membranaire. Le DPPG et le DPPE sont aussi ajoutés dans la constitution des liposomes. Le DPPG confère des charges négatives aux membranes lipidiques qui permettent une répulsion entre vésicules inhibant ainsi leur agrégation et améliorant leur stabilité. Dans la formulation de nos liposomes, la Cuc E et l'érythrodiol sont ajoutés au dépend du cholestérol.

Pour l'étude de l'effet de la Cuc E sur la perméabilité membranaire, la SRB est le fluorophore choisi pour être encapsulé dans la cavité aqueuse des LUV. Lors de son incorporation dans la cavité aqueuse à concentrations élevées, son signal fluorescent est minimal en raison du phénomène d'autoquenching. Le suivi de l'évolution de la fluorescence en fonction du temps permet d'évaluer le changement de la perméabilité membranaire en présence ou non de Cuc E. Nous avons choisi d'étudier la perméabilité à deux températures, 4°C (température de stockage) et 37°C (température corporelle).

4.2.3 Les MLV : préparation et utilité dans la détermination de la localisation au niveau membranaire

Pour préparer les MLV, nous avons utilisé une méthode simple et rapide, l'hydratation du film lipidique (Bangham et al. 1965). Le phospholipide utilisé est le DPPC qui est un phospholipide

modèle pour les études calorimétriques de bicouches lipidiques dont les paramètres thermodynamiques sont bien connus dans la littérature (par exemple : Biruss et al. 2007, El Maghraby et al. 2005, Prades et al. 2011). Les MLV sont préparés en absence et en présence de différentes concentrations de Cuc E et d'érythrodiol.

La détermination des paramètres thermodynamiques des bicouches de DPPC en absence et en présence de la Cuc E et de l'érythrodiol par DSC, permet de révéler des éventuels effets exercés par ces deux molécules sur la pré-transition et la transition. Ces effets impliquent une localisation de ces deux molécules au niveau membranaire (El Maghraby et al. 2005). Ces molécules peuvent être soit localisées à l'interface polaire-apolaire de la bicouche, soit insérées profondément dans la membrane en créant des domaines riches et d'autres pauvres en ces molécules.

4.2.4 Préparation de liposomes par la méthode d'injection d'éthanol

Méthode de préparation simple et rapide, en une seule étape, la méthode d'injection d'éthanol pour la préparation des liposomes est également transposable à grande échelle (Wagner and Vorauer-Uhl, 2010). La lécithine d'œuf est le phospholipide que nous avons choisi pour la fabrication des liposomes par cette méthode. Elle contient en majorité de la phosphatidylcholine qui est un constituant principal de la membrane biologique. De plus, il a été démontré par Jaafar-Maalej et al. (2010) que ce type de phospholipide permet d'obtenir des populations homogènes de liposomes par injection d'éthanol.

4.2.5 Détermination du taux d'incorporation de la Cuc E et de l'érythrodiol dans les liposomes

Deux méthodes de dosages HPLC de la Cuc E et de l'érythrodiol ont été mises au point et utilisées pour déterminer le taux d'incorporation de la Cuc E et de l'érythrodiol dans les liposomes. Par ailleurs, le taux de phospholipides a été déterminé par la méthode de Bartlett (Bartlett et al. 1959), ce qui a permis de calculer le taux d'incorporation par mole de phospholipides.

4.2.6 Caractérisation structurale et morphologique des liposomes

Afin de déterminer l'effet de la Cuc E et de l'érythrodiol sur l'arrangement des phospholipides et sur l'homogénéité des populations liposomiales, nous avons utilisé la diffusion dynamique de la lumière. Cette technique permet de déterminer la taille des liposomes et l'indice de polydispersité (PDI) (Tscharnuter 2000). Ce deuxième paramètre reflète la distribution de taille des liposomes et leur homogénéité. Par ailleurs, des mesures de potentiel zêta sont effectuées pour déterminer les charges membranaires en absence et en présence des molécules (Hunter et al. 2001).

Pour confirmer la formation des liposomes, il est nécessaire d'utiliser une technique qui permet d'observer morphologiquement les vésicules. Nous avons choisi, la microscopie électronique à transmission par coloration négative. Cette technique est communément utilisée pour l'imagerie des suspensions liposomiales puisqu'elle permet d'observer la forme des vésicules et le nombre de lamelles qui les constituent (Egerdie and Singer 1982, Herrera and Sakulchaicharoen 2009).

De plus, nous avons utilisé la microscopie à force atomique qui est aussi un outil pour observer la morphologie des liposomes. Cette technique permet de mesurer les dimensions des liposomes, la taille et la hauteur (Anabousi et al. 2005, Nakano et al. 2008). La détermination de la hauteur par cette technique, permet d'évaluer le comportement des vésicules liposomiales sur une surface. Ces dernières peuvent être de hauteur élevée, et donc peu ou non étalées sur la surface. Elles peuvent être de faible hauteur, donc aplaties, comme elles peuvent être éclatées en bicouches de hauteur de 5 nm qui s'étalent sur la surface (Reviakine and Brisson 2000). Les deux derniers phénomènes reflètent une fragilisation des liposomes.

4.3 Schémas récapitulatifs

Les figures 34 et 35 représentent un récapitulatif de la stratégie expérimentale suivie dans notre étude.

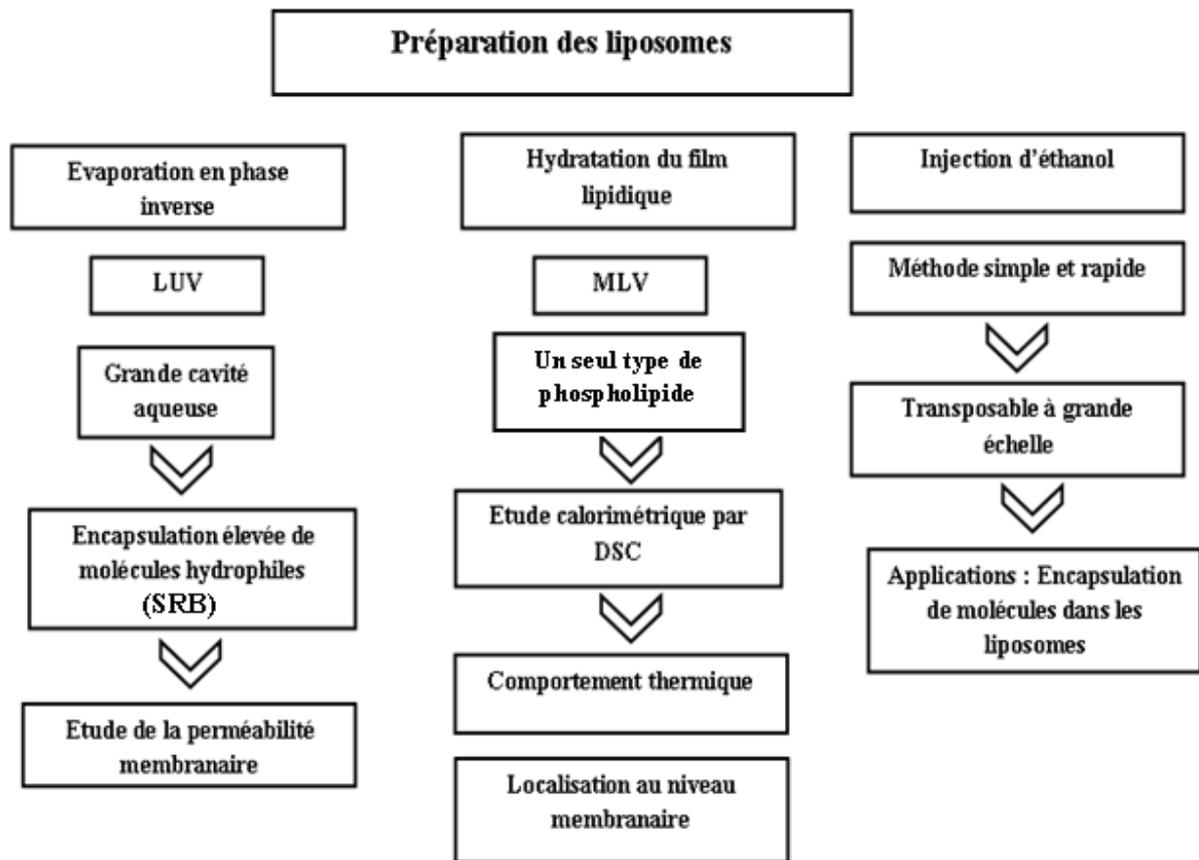


Figure 34 : Les différents types de liposomes préparés et leurs intérêts

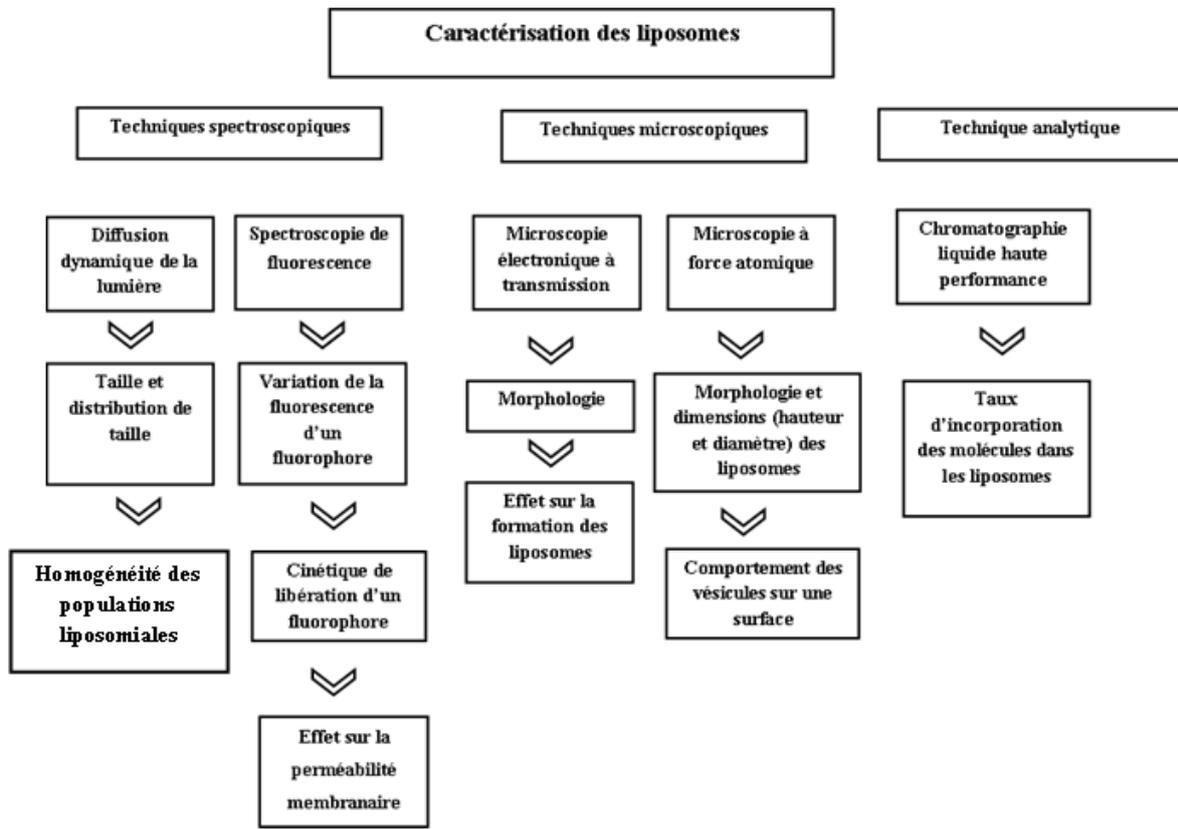


Figure 35 : Techniques de caractérisation des liposomes

Chapitre 5 : Matériels et méthodes

5.1 Produits chimiques

L'érythrodiol (pureté 97%) et les cucurbitacines E (Cuc E) et D (Cuc D) (pureté 97%) sont fournis par Extrasynthèse, Genay, France. Le dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) est fourni par Sigma-Aldrich, France et par Lipoid AG, Steinhausen-Suisse. Le dipalmitoylphosphatidyléthanolamine (DPPE) est obtenu de Fluka Chemical, Suisse et de Lipoid AG, Steinhausen, Suisse. Le dipalmitoylphosphatidylglycérol (DPPG) est obtenu de chez Avanti Polar Lipids, USA et de chez Lipoid AG, Steinhausen, Suisse. Le phospholipide E80 (83% EPC) est obtenu de chez Lipoid AG, Steinhausen, Suisse. Le cholestérol (pureté 99%) (Cho), l'acide phosphotungstique, le silicotungstate de sodium, l'acétate d'uranyle, le cyclooctadiène, le Triton X-100, la sulforhodamine B (SRB), le chlorure de sodium (NaCl), le gel sephadex G25 et les solvants organiques : le diméthylsulfoxyde (DMSO), le chloroforme, le méthanol, le diéthylether et l'acétonitrile sont fournis par Sigma-Aldrich, France. L'acide sulfurique est fourni par ACROS organics, New Jersey, USA. Le molybdate d'ammonium, le peroxyde d'hydrogène et le dihydrogénophosphate de potassium sont fournis par Sigma-Aldrich, Allemagne. L'acide chlorhydrique et la base trizma (pureté 99,9%) sont fournis par Fluka, Chine et par Sigma-Aldrich, France. L'acide 4-Amino-3-hydroxyl-1-naphtalène sulfonique est fourni par Fluka, Inde.

5.2 Préparation des liposomes

5.2.1 Préparation des MLV par la méthode d'hydratation du film lipidique

Les MLV sont préparés par la méthode d'hydratation du film lipidique décrite par Bangham et al. (1965). La poudre de DPPC (50 mg) est dissoute dans un mélange de chloroforme/méthanol (2/1 v/v) (7 ml). Le mélange de solvants organiques est évaporé par un évaporateur rotatif (BÜCHI Rotavapor R-124) à 55°C en formant un film lipidique sur les parois du ballon. Le film lipidique est ensuite hydraté par 2 ml de tampon Tris-HCl (0,1 M pH 7,4). La concentration

lipidique devient approximativement égale à 25 mg/ml. La suspension liposomiale obtenue est alternativement agitée par vortex pendant 5 min et chauffée dans un bain-marie à 55°C pendant 5 min. Ce cycle est répété 3 fois. Ce lot de liposomes formés uniquement de DPPC, est dit « lot témoin ».

Le même protocole est utilisé pour préparer trois lots de MLV avec différentes quantités de Cuc E. La Cuc E est mélangée avec le DPPC dans le solvant organique avec les rapports molaires DPPC:Cuc E 100:7, 100:12 et 100:24 (tableau 4).

Trois autres lots de MLV sont préparés avec différentes quantités d'érythrodiol. Ce dernier est aussi ajouté à la phase organique avec les rapports molaires DPPC:érythrodiol 100:10, 100:17 et 100:34 (tableau 4). Un nouveau lot témoin est préparé pour l'étude avec l'érythrodiol.

Tableau 4 : La composition des MLV préparées sans et avec la Cuc E et l'érythrodiol.

MLV	DPPC:Cuc E (rapport molaire)	DPPC:érythrodiol (rapport molaire)
DPPC:triterpène	100:0	100:0
DPPC:triterpène	100:7	100:10
DPPC:triterpène	100:12	100:17
DPPC:triterpène	100:24	100:34

5.2.2 La méthode d'évaporation en phase inverse

5.2.2.1 Préparation des LUV

50 µmol d'un mélange de phospholipides DPPC/DPPG/DPPE/Cho, dont le rapport molaire est 5/0,5/0,25/5 sont dissous dans 5 ml d'un mélange de solvants organiques : chloroforme/diéthyl ether/méthanol (6/6/1 v/v/v) (Khreich et al. 2008). La solution a subit ensuite une sonication (Sonicator Starsonic35) durant 1 minute à 60°C sous flux d'azote pour éviter l'oxydation des phospholipides. Au cours de cette étape, un tampon Tris-HCl (0,1 M pH 7,4) (0,75 ml) est

ajouté, suivi d'une sonication durant 6 minutes à 60°C sous un flux d'azote. Les solvants organiques sont éliminés par évaporation à 45°C en utilisant un évaporateur rotatif. Dans une dernière étape, le tampon Tris-HCl (0,1 M pH 7,4) (1,5 ml) est ajouté et le mélange subit une sonication durant 5 minutes à 60°C sous un flux d'azote. Ce lot de liposomes est nommé lot de LUV témoins ou lot 1.

En utilisant le même protocole, deux lots de LUV avec Cuc E sont préparés. 3 et 5 mg de Cuc E sont ajoutés aux dépens du cholestérol et les rapports molaires DPPC/DPPG/DPPE/Cho/Cuc E respectifs sont 5/0,5/0,25/3,8/1,2 (lot 2) et 5/0,5/0,25/3/2 (lot 3) (tableau 5).

Un nouveau lot de LUV témoins identique au lot 1 est préparé (lot 4), ainsi que deux lots de LUV en présence de l'érythrodiol où 1 et 2,5 mg d'érythrodiol sont ajoutés au dépend du cholestérol. Les rapports molaires DPPC/DPPG/DPPE/Cho/érythrodiol respectifs sont 5/0,5/0,25/4,5/0,5 (lot 5) et 5/0,5/0,25/3,8/1,2 (lot 6) (tableau 5).

Chaque lot de LUV est préparé 3 fois. Tous les lots préparés ont ensuite subit une extrusion afin d'homogénéiser les suspensions liposomiales obtenues.

Tableau 5 : Les différents lots de LUV préparés sans et avec Cuc E ou érythrodiol et les rapports molaires respectifs utilisés.

Lots de LUV	DPPC/DPPG/DPPE/Cho/Cuc E (rapport molaire)	DPPC/DPPG/DPPE/Cho/érythrodiol (rapport molaire)
Lot 1	5/0,5/0,25/5/0	
Lot 2	5/0,5/0,25/3,8/1,2	
Lot 3	5/0,5/0,25/3/2	
Lot 4		5/0,5/0,25/5/0
Lot 5		5/0,5/0,25/4,5/0,5
Lot 6		5/0,5/0,25/3,8/1,2

5.2.2.2 Extrusion des LUV

Les suspensions liposomiales des lots de LUV préparés sont incubées dans un bain-marie à 60°C pendant 35 min. Elles sont ensuite extrudées à travers des membranes de polycarbonate en utilisant un mini-extruder (Avanti Polar Lipids, Suisse). Ainsi, les liposomes sont forcés à passer à travers les membranes de polycarbonate (Avanti Polar Lipids, Suisse) ayant des pores de dimension décroissante (10 fois à travers une membrane de 1 µm suivis par 10 fois à travers une membrane de 0,4 µm). La solution obtenue après extrusion est ensuite ultracentrifugée à 50000 g pendant 30 min à 4°C. Le culot obtenu est suspendu dans un tampon Tris-HCl (0,1 M pH 7,4) (2 ml). La suspension liposomiale ainsi obtenue est utilisée pour des mesures de taille et de potentiel zêta et des observations microscopiques par TEM et AFM.

La suspension liposomiale obtenue après extrusion et le surnageant obtenu après ultracentrifugation sont utilisés pour les analyses par HPLC et pour le dosage des phospholipides.

5.2.2.3 Préparation des LUV encapsulant la SRB en absence et en présence de Cuc E

Deux nouveaux lots de LUV de même composition que les lots 1 et 2 sont préparés en présence de la SRB et sont nommés respectivement lots 7 et 8.

La phase aqueuse ajoutée lors de la préparation des LUV est une solution de SRB (150 mM, 83,85 mg/ml) préparée dans un tampon Tris-HCl (0,1 M pH 7,4). Les suspensions liposomiales obtenues sont de couleur violet foncé. La solution obtenue après extrusion est ensuite centrifugée à 18000 g pendant 50 min à 4°C. Le culot obtenu est suspendu dans un tampon Tris-HCl (0,1 M pH 7,4) contenant NaCl (150 mM) pour maintenir l'osmolarité du milieu. Afin de contrôler la perméabilité des liposomes, les liposomes encapsulant la SRB sont séparés des molécules libres de phospholipides, de cholestérol, de Cuc E et de SRB par chromatographie à tamassage moléculaire en utilisant une colonne Sephadex G25. Les éluats contenant les liposomes encapsulant la SRB sont ensuite ultracentrifugés à 50000 g pendant 30 min à 4°C pour éliminer l'excès du tampon utilisé pour l'élution. Enfin, le culot est resuspendu dans 2 ml de tampon

Tris-HCl (0,1 M pH 7,4) contenant NaCl (150 mM) et conservé à 4°C à l'abri de la lumière. Les lots 7 et 8 sont préparés 3 fois.

Les suspensions liposomiales ainsi obtenues sont utilisées pour des mesures de fluorescence dans l'étude de la perméabilité membranaire.

5.2.3 Préparation des liposomes par la méthode d'injection d'éthanol en absence et en présence de l'érythrodiol

Des liposomes sont préparés par la méthode d'injection d'éthanol d'après le protocole décrit par Jaafar-Maalej et al. (2010) avec quelques modifications. 250 mg de phospholipide E80 (83% EPC) sont dissous dans 5 ml d'éthanol. La solution éthanolique de phospholipides (50 mg/ml) est injectée à l'aide d'une seringue en verre (fournie par Fortuna optima, GmbH-Allemagne) dans un volume de 10 ml d'eau ultrapure. La vitesse d'injection est égale à 1 ml/min et est contrôlée par une pompe automatique (KdScientific, USA). Au cours de l'injection, le milieu est mis sous agitation magnétique. La vitesse d'agitation est de 400 rpm. Enfin, l'éthanol est éliminé à l'aide d'un évaporateur rotatif à 43°C. Ce lot de liposomes est dit liposomes témoins et est nommé lot 9.

Le même protocole expérimental est utilisé pour la préparation des liposomes avec l'érythrodiol ajouté dans la solution éthanolique de phospholipides. Les rapports molaires phospholipide E80/érythrodiol sont 100/0,75 (lot 10), 100/1,5 (lot 11), 100/3 (lot 12) et 100/7 (lot 13). Chaque lot est préparé trois fois.

5.3 Caractérisation des liposomes

5.3.1 Détermination du taux d'incorporation de la Cuc E et de l'érythrodiol dans les liposomes par HPLC

Le taux d'incorporation de la Cuc E dans les liposomes est déterminé par analyse HPLC des échantillons en se basant sur la méthode décrite précédemment par Saade et al. (2009). Ainsi, des

aliquots sont prélevés à partir des suspensions liposomiales pour déterminer la concentration totale de Cuc E ($[Cuc E]_{total}$). Des aliquots sont prélevés du surnageant obtenu par ultracentrifugation des suspensions liposomiales à 50000 g pendant 30 min et à 4°C pour déterminer la concentration de Cuc E libre ($[Cuc E]_{libre}$).

Les solutions mères de la Cuc E (1 mg/ml) et de son étalon interne, la Cuc D (1 mg/ml) sont préparées dans du DMSO.

Pour la préparation de la gamme étalon, des aliquots prélevés de la solution mère de Cuc E sont dilués dans l'eau ultrapure afin d'obtenir une gamme de solutions de concentrations finales de Cuc E allant de 10 à 100 µg/ml. Une solution fille de Cuc D est préparée à partir de la solution mère (1 mg/ml) dans l'eau ultrapure pour obtenir une concentration de 100 µg/ml.

Ensuite, 100 µl de chaque solution de la gamme étalon ou des suspensions liposomiales ou du surnageant sont ajoutés à 25 µl de Cuc D (100 µg/ml) et à 200 µl de méthanol.

Pour la détermination du taux d'incorporation de l'érythrodiol dans les liposomes, une méthode de dosage est mise au point. La concentration totale d'érythrodiol ($[érythrodiol]_{total}$) est déterminée dans les suspensions liposomiales diluées 10 fois dans du méthanol, et la concentration de l'érythrodiol libre ($[érythrodiol]_{libre}$) est déterminée dans le surnageant obtenu par ultracentrifugation des suspensions liposomiales à 50000 g pendant 30 min et à 4°C. La solution mère d'érythrodiol (2 mg/ml) et celle de son étalon interne, le cyclooctadiène (1 mg/ml) sont préparées dans du DMSO.

Pour préparer la gamme étalon de dosage de l'érythrodiol, des aliquots prélevés de la solution mère de l'érythrodiol sont dilués dans l'eau ultrapure afin d'obtenir une gamme de solutions de concentrations finales d'érythrodiol allant de 10 à 100 µg/ml. Une solution fille de cyclooctadiène (100 µg/ml) est préparée à partir de la solution mère (1 mg/ml) dans du méthanol. Ensuite, 100 µl de chaque solution de la gamme ou des suspensions liposomiales ou du surnageant sont ajoutés à 100 µl de cyclooctadiène (100 µg/ml) et à 200 µl de méthanol.

Avant analyse par HPLC, les échantillons ont subi une sonication pendant 30 min à la température ambiante pour garantir la solubilisation complète des liposomes et la libération de leur contenu en Cuc E ou en érythrodiol. Cette étape est suivie d'une centrifugation à 15 000 rpm

pendant 15 min à 4°C. 50 µl sont prélevés du surnageant et 20 µl sont analysés par HPLC en utilisant une colonne analytique (C18, 5 µm, 150×4,6 mm (BDS, Thermo, UK)).

Pour le dosage de la Cuc E, la phase mobile est un mélange d'eau, de méthanol et d'acétonitrile (40/35/25). Le débit est de 1 ml/min et la détection est à une longueur d'onde de 230 nm. Pour le dosage de l'érythrodiol, la phase mobile est un mélange de méthanol et d'eau (90/10). Le débit est de 1 ml/min et la détection est à une longueur d'onde de 210 nm. Le dosage de la Cuc E et de l'érythrodiol dans le surnageant et dans la suspension liposomiale est répété trois fois pour chaque lot. Leur taux d'incorporation est calculé en utilisant l'équation (3) :

$$\frac{[\text{triterpène}]_{\text{total}} - [\text{triterpène}]_{\text{libre}}}{[\text{triterpène}]_{\text{total}}} \times 100 \quad (3)$$

5.3.2 Dosage de phospholipides

La concentration en phospholipides des liposomes, est déterminée en utilisant la méthode de Bartlett (Bartlett 1959). Cette méthode se base sur le principe de dégradation des molécules organiques par chauffage intense en présence de l'acide sulfurique. L'oxydation du phosphate organique en phosphate inorganique est favorisée par la présence du peroxyde d'hydrogène. L'addition de molybdate d'ammonium complexe le phosphate inorganique en un complexe phosphomolybdique qui est réduit en un composé bleu par l'aminonaphtylsulfonate.

Une solution mère de dihydrogénophosphate de potassium de concentration 3,2 µmol/ml est préparée dans de l'eau ultrapure. Des aliquots sont prélevés à partir de la solution mère et dilués dans de l'eau ultrapure afin d'obtenir une gamme de solutions de dihydrogénophosphate de potassium de concentrations allant de 0,064 à 0,384 µmol/ml.

Le dosage des phospholipides est réalisé pour les suspensions liposomiales de LUV contenant la Cuc E et des suspensions liposomiales contenant l'érythrodiol préparés par injection d'éthanol avant ultracentrifugation et pour les surnageants respectifs obtenus après ultracentrifugation. Des dilutions de 10 fois dans du Tris-HCl (0,1 M pH 7,4) sont faites pour les suspensions liposomiales contenant la Cuc E et leurs surnageants. Des dilutions de 100 et 10 fois dans le

même tampon sont faites respectivement pour les suspensions liposomiales contenant l'érythrodiol et leurs surnageants.

500 μ l de chaque échantillon ont été prélevés et mélangés avec l'acide sulfurique 5 M (400 μ l) et l'ensemble est chauffé pendant une heure à 180°C. Après refroidissement à température ambiante, le peroxyde d'hydrogène 10% (100 μ l) est ajouté pour permettre l'oxydation du phosphate organique en phosphate inorganique et le mélange est chauffé à 180°C pendant 30 min jusqu'à l'obtention d'une solution claire. Après refroidissement à température ambiante, le molybdate d'ammonium (4,6 ml) est ajouté et le tube est agité vigoureusement par vortex. Dans une dernière étape, l'acide 4-Amino-3-hydroxyl-1-naphtalène sulfonique (200 μ l) est ajouté. Après agitation sur un vortex, l'ensemble est mis dans un bain-marie bouillant pendant 15 min. Après refroidissement à température ambiante, l'absorbance de chaque tube est mesurée à 815 nm. Chaque tube est préparé trois fois.

5.3.3 Détermination des paramètres thermotropiques de la bicouche lipidique par calorimétrie différentielle à balayage (DSC : Differential Scanning Calorimetry)

Les mesures de DSC sont réalisées avec un appareil de DSC (série Q200, TA instruments). Un creuset d'aluminium vide fermé hermétiquement, est utilisé comme référence. Une suspension liposomiale de MLV (10 μ l) est placée dans un creuset en aluminium qui est ensuite scellé hermétiquement. L'analyse est réalisée entre 20 et 50°C avec une vitesse de balayage de 5°C/min. L'échantillon est équilibré à 20°C au début. Chaque échantillon est analysé au moins 10 fois jusqu'à l'obtention de thermogrammes identiques et reproductibles. L'appareil DSC est équipé avec un logiciel (TA instrument analysis) qui fournit les données calorimétriques. Les paramètres thermotropiques mesurés sont : la température de transition T_m , l'enthalpie de transition ΔH_m , $\Delta T_{1/2}$ qui est la largeur à mi-hauteur du pic principal de transition, la température de pré-transition T_p et l'enthalpie de pré-transition ΔH_p .

5.3.4 Mesure de taille par diffusion dynamique de la lumière (DLS : Dynamic Light Scattering)

La diffusion dynamique de la lumière est utilisée pour déterminer la taille et la distribution de taille des liposomes. L'appareil utilisé est un Malvern Zetasizer Nano-series (Malvern Instruments Zen 600, Malvern, UK) équipé d'un logiciel DTS (nano). Des dilutions de 10 fois dans du tampon Tris-HCl (0,1 M pH 7,4) sont faites sur des aliquots prélevés à partir des suspensions liposomiales obtenues après solubilisation des culots des lots 1, 2, 3, 4, 5 et 6 et des suspensions liposomiales des lots 9, 10, 11, 12 et 13. Des mesures du diamètre moyen (nm) de ces aliquots sont répétées 6 fois à 25°C. L'indice de polydispersité (Pdl) est également déterminé. Les résultats sont exprimés par la moyenne des 6 mesures \pm écart type.

5.3.5 Détermination du potentiel zêta

Le potentiel zêta est déterminé en utilisant le même appareil Malvern Zetasizer Nano-series et est calculé en se basant sur la théorie de la mobilité électrophorétique (Hunter et al. 2001). Les mesures sont faites 3 fois, sur des aliquots prélevés à partir des suspensions liposomiales obtenues après solubilisation des culots des lots 1, 2, 3, 4, 5 et 6 et des suspensions liposomiales des lots 9, 10, 11, 12 et 13. Tous ces aliquots sont dilués 10 fois avec du tampon Tris-HCl (0,1 M pH 7,4). Les résultats sont représentés comme étant la moyenne des 3 mesures \pm écart-type.

5.3.6 Observation morphologique par microscopie électronique à transmission (TEM : Transmission Electron Microscopy)

Après dilution au $1/10^{\text{ème}}$ des suspensions liposomiales obtenues après solubilisation des culots des lots 1, 2, 3, 4, 5 et 6 et des suspensions liposomiales des lots 9, 10, 11, 12 et 13 avec du tampon Tris-HCl (0,1 M pH 7,4), une goutte est déposée sur une grille de cuivre 200 mesh formvar. Après 2 minutes, l'excès de liquide est éliminé à l'aide d'un papier filtre. L'application d'une solution de contrastant qui est l'acide phosphotungstique 2% (w/w) pour l'imagerie des lots 1, 2, 3, 4, 5 et 6 et le silicotungstate de sodium 1% pour les lots 9, 10, 11, 12 et 13, aboutit à

l'apparition d'une coloration négative après 1 minute. La grille est séchée à température ambiante et ensuite observée au microscope électronique à transmission (Philips CM120; Eindhoven, Netherlands). Les images sont prises à une accélération de 80 kV.

5.3.7 Observation et mesures des dimensions des vésicules par microscopie à force atomique (AFM : Atomic Force Microscopy)

100 µl de la suspension liposomiale obtenue après solubilisation du culot des lots 1, 2 et 3 sont déposés sur une surface de mica fraîchement clivée pour obtenir une surface propre et homogène. Après 30 min d'incubation à température ambiante, la surface est rincée 3 fois avec de l'eau ultrapure afin d'éliminer les vésicules non adsorbées. Toutes les images sont prises dans l'eau ultrapure avec le mode contact en utilisant une pointe « biolever Olympus » de raideur 0,006 N/m. La fréquence de balayage est de 1 Hz correspondant à une vitesse de 10 µm/s. Les images sont enregistrées avec des dimensions de 5 µm x 5 µm et un angle de balayage de 90° avec un appareil AFM (Multimode Nanoscope, Bruker). Les images sont analysées avec le logiciel WSxM (Nanotec Electrónica S.L.).

Des modifications ont été apportées à la procédure ci-dessus, pour l'imagerie des LUV sans et avec érythrodiol (lots 4, 5 et 6). Le substrat est tout d'abord traité avec une solution de chlorure de nickel (10 mM) afin de compenser les charges négatives du mica et améliorer l'adsorption des liposomes chargés négativement parce que nous n'avons pas obtenu une adsorption de vésicules sur le mica conventionnel. Ainsi, 100 µl de la solution de chlorure de nickel (10 mM) ont été déposés sur la surface de mica fraîchement clivée. Après 10 min d'incubation à température ambiante, la surface est rincée 3 fois avec l'eau ultrapure pour éliminer l'excès de la solution. Ensuite, la suspension liposomiale (100 µl) est déposée sur le mica modifié. Après 30 min d'incubation à température ambiante, la surface est rincée 3 fois avec de l'eau ultrapure afin d'éliminer les vésicules non fixées. Toutes les images sont prises dans l'eau ultrapure avec le mode contact en utilisant une pointe « biolever Olympus » de raideur 0,006 N/m. La fréquence de balayage est de 2 Hz correspondant à une vitesse de 20 µm/s. Les images sont enregistrées avec des dimensions de 5 µm x 5 µm et un angle de balayage de 90° avec le même appareil AFM que précédemment. Les images obtenues sont analysées avec le logiciel Nanoscope V613r1.

5.3.8 Etude de la perméabilité des liposomes par spectroscopie de fluorescence

La perméabilité des LUV est étudiée en mesurant le signal fluorescent résultant de la libération de la SRB en fonction du temps. Une augmentation de la fluorescence reflète une augmentation de la perméabilité de la membrane liposomiale.

5.3.8.1 Préparation des suspensions liposomiales pour les mesures de fluorescence

Les suspensions de liposomes encapsulant la SRB (lots 7 et 8) sont diluées de façon à avoir une absorbance égale à 1, à une longueur d'onde de 532 nm correspondante à la longueur d'onde maximale d'absorbance de la SRB encapsulée. A partir des suspensions diluées, des aliquots sont prélevés et dilués 300 fois dans du tampon Tris-HCl (0,1 M pH 7,4) contenant NaCl (150 mM). Pour obtenir la fluorescence maximale, les liposomes sont solubilisés complètement par un détergent non ionique, le Triton X-100 (1%) qui est solubilisé dans le même tampon de dilution. Le signal de fluorescence est mesuré toutes les 24 heures, à 4°C et à 37°C.

5.3.8.2 Mesures de fluorescence par spectroscopie de fluorescence

Les mesures de fluorescence sont réalisées en utilisant un spectrofluorimètre (Thermo Spectronic, Aminco Bowman Series 2, USA) équipé avec le logiciel AB2. Le signal de fluorescence a été mesuré à une longueur d'onde d'excitation de 535 nm et à une longueur d'onde d'émission de 590 nm. Le spectre d'émission est enregistré dans l'intervalle 550-650 nm. Les résultats sont exprimés par la variation en fonction du temps du rapport $(F_t - F_0)/F_{max}$ où F_t est la fluorescence intrinsèque de la suspension au temps t , F_0 est la fluorescence initiale mesurée au temps t_0 et F_{max} est la fluorescence maximale obtenue en présence du détergent non ionique, le Triton X-100 (1%).

PARTIE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 6 : Résultats et Discussion

Dans ce chapitre, nous présentons les résultats obtenus de ce travail de thèse et nous les discutons en regard à la littérature. Nous commençons tout d'abord par la présentation du taux d'incorporation de la Cuc E et de l'érythrodiol dans les différents types de liposomes préparés. Nous présentons ensuite les résultats de l'analyse calorimétrique des MLV par DSC suivis de ceux des mesures de taille et de potentiel zêta par DLS pour les LUV et les liposomes préparés par injection d'éthanol. Les images obtenues par TEM et AFM et les résultats issus des mesures des dimensions des liposomes sont par la suite exposés. Nous terminons ce chapitre par les résultats de l'étude de la perméabilité membranaire des LUV en présence de la Cuc E.

6.1 Détermination du taux d'incorporation de la Cuc E et de l'érythrodiol dans les liposomes par HPLC

Afin de calculer le taux d'incorporation de la Cuc E et de l'érythrodiol par mole de phospholipides, nous avons réalisé le dosage de phospholipides en utilisant la méthode de Bartlett (Bartlett et al. 1959). La concentration des phospholipides est déterminée dans la suspension liposomiale ainsi que dans le surnageant obtenu après ultracentrifugation. La courbe utilisée pour le calcul de la concentration de phospholipides et son équation sont représentées dans la figure 36.

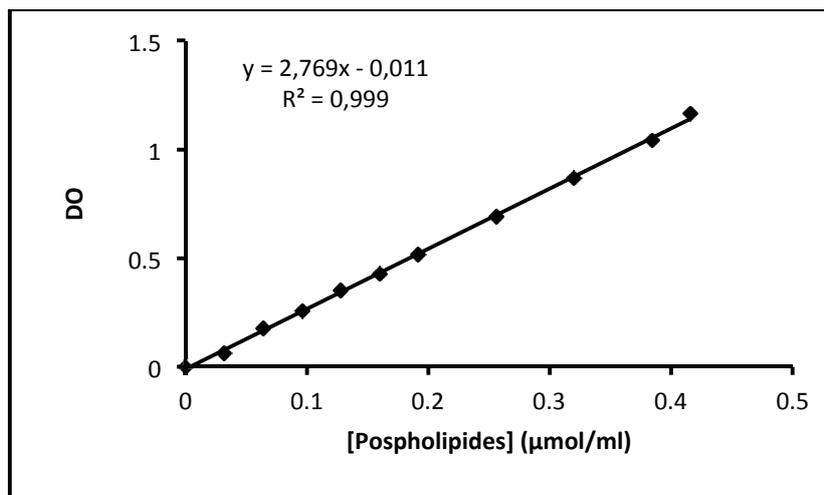


Figure 36 : Courbe d'étalonnage utilisée pour le dosage des phospholipides

Le taux d'incorporation de la Cuc E dans le lot 2 de LUV (DPPC/DPPG/DPPE/Cho/Cuc E 5/0,5/0,25/3,8/1,2) est déterminé par HPLC. La concentration totale de la Cuc E est déterminée dans la suspension liposomiale et la concentration de la Cuc E libre est déterminée dans le surnageant obtenu après ultracentrifugation. La droite d'étalonnage et son équation utilisée pour le calcul des concentrations de la Cuc E, sont représentées dans la figure 37.

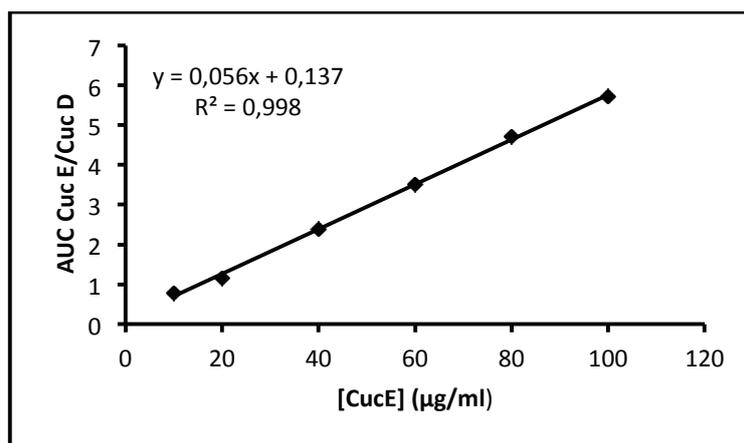


Figure 37 : Courbe d'étalonnage utilisée pour le dosage de la Cuc E

Les temps de rétention de la Cuc E et de la Cuc D utilisée comme étalon interne sont respectivement $13,12 \pm 0,16$ et $5,46 \pm 0,031$ min. Le taux d'incorporation de la Cuc E dans les liposomes est calculé d'après l'équation (3) : $\frac{[triterpène]_{total} - [triterpène]_{libre}}{[triterpène]_{total}} \times 100$. Il est égal à $85 \pm 3\%$.

Les résultats du dosage de phospholipides ont révélé que le surnageant en est dépourvu. La concentration de la Cuc E incorporée dans les liposomes est calculée par mole de phospholipides et est égale à $0,17$ mol/mol de phospholipides.

Les concentrations totale et libre de la Cuc E dans les suspensions liposomiales de MLV (DPPC:Cuc E 100:7, 100:12 et 100:24) et dans les surnageants, sont calculées en utilisant la courbe d'étalonnage de la figure 37. Le taux d'incorporation de la Cuc E dans les MLV est calculé. Il est supérieur à 98% pour les trois lots.

Pour déterminer le taux d'incorporation de l'érythrodiol dans les liposomes préparés par injection d'éthanol (lots 10, 11, 12 et 13), une méthode de dosage HPLC a été mise au point. Les temps de rétention de l'érythrodiol et de son étalon interne le cyclooctadiène sont de $8,43 \pm 0,07$ et $3,65 \pm 0,014$ min respectivement.

Les concentrations totale et libre de l'érythrodiol sont déterminées dans les suspensions liposomiales et dans les surnageants obtenus après l'ultracentrifugation en utilisant la courbe d'étalonnage donnée dans la figure 38.

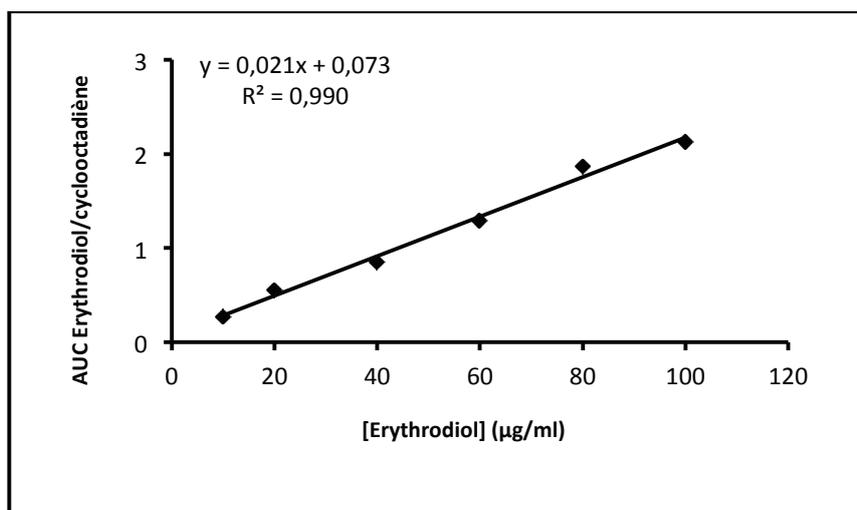


Figure 38 : Courbe d'étalonnage utilisée pour le dosage de l'érythrodiol

Le taux d'incorporation de l'érythrodiol est également déterminé (tableau 6). Il est également exprimé par mole de phospholipides (tableau 6).

Tableau 6 : Taux d'incorporation de l'érythrodiol dans les liposomes préparés par injection d'éthanol. Les valeurs représentées sont les moyennes de 3 dosages répétés.

Lot de liposome (phospholipide E80/érythrodiol)	Taux d'incorporation (%) ± SD	Taux d'incorporation (mol/mol phospholipides)±SD
Lot 10 (100/0,75)	97 ± 2 %	8,3x10 ⁻³ ±0,0007
Lot 11 (100/1,5)	96 ± 2 %	10,3x10 ⁻³ ±0,0008
Lot 12 (100/3)	93 ± 3 %	13,2x10 ⁻³ ±0,0017
Lot 13 (100/7)	97 ± 1 %	49,9x10 ⁻³ ±0,0024

Ces résultats de dosage révèlent que la Cuc E et l'érythrodiol sont hautement incorporés dans les liposomes. Des taux d'incorporation élevés dans les liposomes ont été récemment décrits pour des molécules ayant des structures similaires comme la beclométhasone, un glucocorticoïde tétracyclique hautement oxygéné (>87% et peut arriver jusqu'à 100%) (Jaafar-Maalej et al. 2010) et la spironolactone, un antagoniste de l'aldostérone, pentacyclique et hautement oxygéné (93%) (Laouini et al. 2011).

La Cuc E et l'érythrodiol sont des molécules ayant une structure amphiphilique. Leur taux d'incorporation élevé peut être dû à leur interaction à la fois avec les têtes polaires des phospholipides via leurs fonctions oxygénées et avec les chaînes acyles des phospholipides de la bicouche via leur structure cyclique hydrophobe. Ceci explique également le fait que l'érythrodiol est davantage incorporé dans les liposomes en augmentant sa quantité ajoutée. En effet, le taux d'incorporation de l'érythrodiol par mole de phospholipides augmente de manière concentration-dépendante (tableau 6). Des mesures calorimétriques ont donc été réalisées afin d'étudier l'interaction de ces deux molécules avec la bicouche et de confirmer leur positionnement au niveau de la vésicule liposomiale.

6.2 Détermination des paramètres calorimétriques de la bicouche lipidique en absence et en présence de la Cuc E ou de l'érythrodiol par DSC

La DSC est une technique très employée pour étudier l'interaction de molécules avec les bicouches lipidiques de vésicules liposomiales (Demetzos et al. 2008, Elhissi et al. 2006). Ceci implique la mesure des changements qu'une molécule produit dans les transitions de phases des bicouches lipidiques quand elle est incluse dans la structure des liposomes (Elhissi et al. 2006).

La figure 39 montre les courbes thermiques obtenues pour les MLV témoins et les MLV contenant la Cuc E avec les rapports molaires, DPPC:Cuc E 100:7, 100:12 et 100:24. La figure 40 montre les courbes thermiques obtenues pour les MLV témoins et les MLV contenant l'érythrodiol avec les rapports molaires, DPPC:érythrodiol 100:10, 100:17 et 100:34.

Deux témoins ont été préparés, l'un pour l'étude avec la Cuc E et l'autre pour celle avec l'érythrodiol.

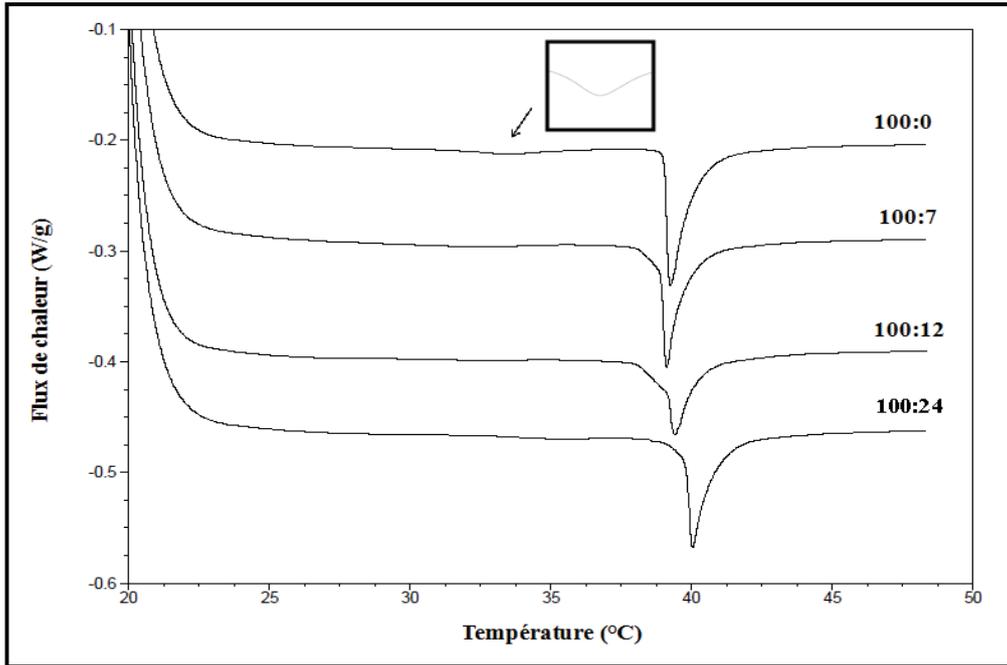


Figure 39 : Les thermogrammes obtenus par DSC pour les MLV témoins (DPPC:Cuc E 100:0) et les MLV avec Cuc E (DPPC:Cuc E 100:7, 100:12 et 100:24)

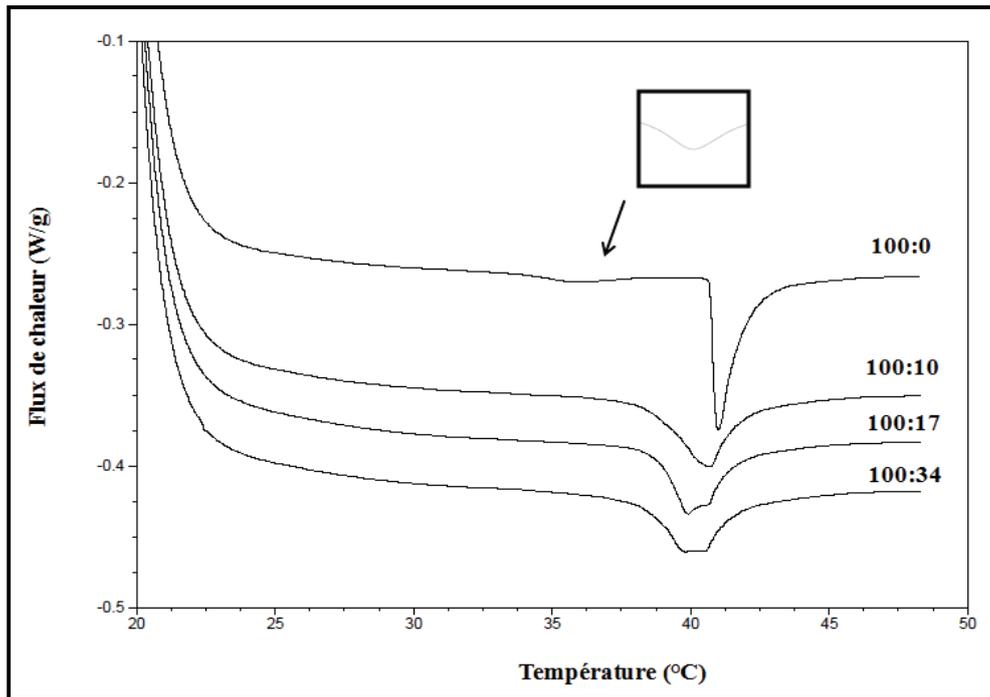


Figure 40 : Les thermogrammes obtenus pour les MLV témoins (DPPC:Cuc E 100:0) et les MLV avec érythrodiol (DPPC:érythrodiol 100:10, 100:17 et 100:34)

Les résultats obtenus avec les deux préparations témoins sont identiques. En effet, les thermogrammes des MLV témoins formés uniquement de DPPC (figures 39 et 40) montrent deux pics. Un petit et large pic de faible enthalpie correspondant à la phase de pré-transition est obtenu à 35°C (figure 39) et à 36°C (figure 40). Un long pic, intense et aigu correspondant à la phase de transition est obtenu à 40°C (figure 39) et à 40,5°C (figure 40). Au dessous de la température de pré-transition (T_p), la bicouche lipidique est en phase gel lamellaire ($L_{\beta'}$). Au dessus de la température de transition (T_m), la phase fluide lamellaire apparaît (L_{α}). Un état intermédiaire de la bicouche lipidique ($P_{\beta'}$) est observé dans l'intervalle de température entre T_p et T_m (Demetzos et al. 2008, Katsaras et al. 2000).

Nous observons sur les courbes thermiques des MLV en présence de la Cuc E et de l'érythrodiol que le pic de la pré-transition disparaît. La pré-transition de la phase gel ($L_{\beta'}$) à la phase intermédiaire ($P_{\beta'}$) est principalement liée à la région polaire des bicouches de phosphatidylcholine. Elle est associée à une interaction avec les têtes polaires ou à un

changement dans leur orientation (Heimburg 2000), ce qui implique une interaction de ces deux triterpènes avec les têtes polaires des phospholipides. Des études précédentes ont montré la disparition de la pré-transition avec des molécules stéroïdiennes comme la dexaméthasone (Bhardwaj and Burgess 2010), la progestérone (Korkomaz and Severcan 2005) et la beclométhasone dipropionate (Elhissi et al. 2006) et avec des triterpènes comme les acides oléanolique, maslinique et ursolique (Prades et al. 2011).

La phase de transition de la bicouche lipidique à la phase fluide est reliée aux chaînes acyles des phospholipides et elle est principalement utilisée pour détecter l'interaction entre les chaînes acyles et les substances exogènes. Le changement des paramètres calorimétriques de transition reflète les propriétés physicochimiques des phospholipides. Leur changement est attribué à l'incorporation des molécules exogènes à l'intérieur hydrophobe de la bicouche phospholipidique (Cong et al. 2009, McMullen and McElhaney 1995). Ces paramètres sont surtout T_m , ΔH_m et $\Delta T_{1/2}$. $\Delta T_{1/2}$ est égale à la largeur à mi-hauteur du pic de transition. Elle est un indice de la coopérativité de la transition des chaînes acyles des phospholipides. Plus le pic est étroit, $\Delta T_{1/2}$ est plus petite et la coopérativité est plus élevée (Cong et al. 2009, Barenholz et al. 2011).

Les tableaux 7 et 8 regroupent les valeurs des paramètres calorimétriques des MLV sans et avec Cuc E et sans et avec érythrodiol, respectivement. Les valeurs de la température de pré-transition et de transition des liposomes témoins sont en accord avec la littérature. Les liposomes préparés par Biruss et al. (2007), ont montré une T_p égale à $35,93 \pm 0,48^\circ\text{C}$ et T_m égale à $41,54 \pm 0,03^\circ\text{C}$. Zhao and Feng (2005) ont obtenu en analysant les liposomes formés de DPPC par DSC une T_p égale à 36°C et une T_m égale à 41°C . El Maghraby et al. (2005) ont montré des valeurs de T_p et T_m égale à $35,58 \pm 0,35^\circ\text{C}$ et $41,43 \pm 0,028^\circ\text{C}$, respectivement et $\Delta T_{1/2}$ du pic de transition égale à $0,7242 \pm 0,0030^\circ\text{C}$.

Tableau 7 : Les paramètres calorimétriques déterminés par DSC pour les MLV formés de DPPC:Cuc E 100:0, 100:7, 100:12 et 100:24. Les valeurs sont exprimées par la moyenne de toutes les mesures réalisées \pm écart-type (SD).

DPPC:Cuc E	T_p (°C)\pmSD	ΔH_p (J/mol)\pmSD	T_m (°C)\pmSD	ΔH_m (J/mol)\pmSD	$\Delta T_{1/2}$ (°C)\pmSD
100:0	35,5 \pm 0,9	46,24 \pm 13,94	40,05 \pm 0,5	950 \pm 70	0,73 \pm 0,05
100:7			39,2 \pm 0,02	761 \pm 17	0,65 \pm 0,08
100:12			39,43 \pm 0,05	621 \pm 45	0,75 \pm 0,06
100:24			40,06 \pm 0,07	780 \pm 50	0,68 \pm 0,08

En présence de la Cuc E (100:7, 100:12 et 100:24), T_m qui correspond au maximum du pic de transition, est généralement non affectée par la Cuc E (figure 39 et tableau 7). Mais l'aspect du pic est modifié en présence de la Cuc E pour tous les rapports molaires utilisés et notamment avec DPPC:Cuc E 100:12. Il est élargi et devient déformé au début de sa formation alors qu'il a un aspect droit avec le témoin. Ces données suggèrent que la Cuc E ne pénètre pas dans la partie hydrophobe de la bicouche.

En outre, avec DPPC:Cuc E 100:7, $\Delta T_{1/2}$ diminue en comparaison avec le témoin (tableau 7), mais cette diminution n'est pas concentration-dépendante (tableau 7). Ceci suppose que d'une part, la quantité ajoutée de la Cuc E ne s'incorpore pas éventuellement de façon continue dans la vésicule et d'autre part, une quantité supplémentaire ajoutée de Cuc E n'exerce pas un effet additionnel sur les chaînes acyles (Barenholz et al. 2011, Biltonen 1990).

Tableau 8 : Les paramètres calorimétriques déterminés par DSC pour les MLV formés de DPPC:érythrodiol 100:0, 100:10, 100:17 et 100:34. Les valeurs sont exprimées par la moyenne de toutes les mesures réalisées \pm écart-type (SD).

DPPC:érythrodiol	$T_p(^{\circ}\text{C})\pm\text{SD}$	$\Delta H_p(\text{J/mol})\pm\text{SD}$	T_{m1} ($^{\circ}\text{C})\pm\text{SD}$	T_{m2} ($^{\circ}\text{C})\pm\text{SD}$	$\Delta H_m(\text{J/mol})$ $\pm\text{SD}$
100:0	36 \pm 1	57,8 \pm 23,9	40,83 \pm 0,58		1130 \pm 82
100:10			40,29 \pm 0,50		719 \pm 56
100:17			40,71 \pm 0,04	39,92 \pm 0,07	678 \pm 32
100:34			40,53 \pm 0,06	39,85 \pm 0,08	757 \pm 90

En présence de l'érythrodiol (100:10, 100:17 et 100:34), nous observons une variation beaucoup plus prononcée de la forme du pic de transition en comparaison avec la Cuc E. Il est très élargi et d'hauteur plus petite. A des concentrations élevées d'érythrodiol 17 et 34%, le pic de transition est divisé en deux sommets (T_{m1} et T_{m2}) (figure 40 et tableau 8). Deux transitions ont lieu : une première transition à la température T_{m1} proche de T_m des MLV témoins et une seconde transition à la température T_{m2} inférieure à T_{m1} . Ceci reflète une pénétration de l'érythrodiol au sein de la bicouche perturbant ainsi la transition des chaînes acyles qui ne subissent pas alors la transition à la même température.

L'élargissement du pic de transition révèle une augmentation de l'asymétrie de la bicouche et la division du pic de transition en deux sommets montre une séparation de phase au niveau de la bicouche (Barenholz et al. 2011, Koukoulitsa et al. 2011).

Par ailleurs, l'enthalpie totale de transition diminue en présence de la Cuc E (tableau 7) et surtout en présence de l'érythrodiol (tableau 8), ce qui indique une interaction des deux molécules avec les chaînes hydrophobes de la bicouche. La Cuc E et l'érythrodiol peuvent entrer en compétition avec le cholestérol pour se localiser au niveau des vésicules liposomiales. Ceci entraîne une augmentation des espaces libres entre les chaînes acyles qui aboutit à l'augmentation de leur mobilité et par la suite à la diminution de l'enthalpie de leur transition (Barenholz et al. 2011).

Il a été démontré que la transition de phase des bicouches de phosphatidylcholine est affectée par des stéroïdes comme la progestérone (Korkomaz and Severcan 2005), la dexaméthasone

(Bhardwaj and Burgess 2010), la beclométhasone dipropionate (Elhissi et al. 2006), le 17- β -estradiol, la cyprotérone acétate et le finastéride (Biruss et al. 2007) et des molécules triterpéniques pentacycliques comme les acides oléanolique, maslinique et ursolique (Prades et al. 2011).

La progestérone, le 17- β -estradiol, la cyprotérone acétate et le finastéride ayant une structure tétracyclique avec des fonctions oxygénées de part et d'autre du noyau stéroïde, peuvent s'incorporer dans la bicouche lipidique et perturber les interactions hydrophobes entre les molécules de lipides (Biruss et al. 2007, Korkomaz and Severcan 2005).

En outre, la dexaméthasone et la beclométhasone dipropionate, de structure aussi tétracyclique mais plus oxygénée que les molécules précédentes, peuvent également s'insérer entre les chaînes acyles des phospholipides, et former des domaines hétérogènes (Bhardwaj and Burgess 2010, Elhissi et al. 2006).

La Cuc E, qui est un triterpène tétracyclique hautement oxygéné, est structuralement plus proche de la dexaméthasone et de la beclométhasone dipropionate, qui sont également des molécules hautement oxygénées. Cependant, le comportement thermique des bicouches lipidiques en présence de Cuc E n'est pas tout à fait similaire. La beclométhasone dipropionate induit la formation de domaines séparés, à un pourcentage molaire (5%) inférieur à la moitié de celui de la Cuc E (12%). De plus, la Cuc E à un taux de 24%, n'exerce pas des effets supplémentaires au contraire de la dexaméthasone (20%). Ceci suggère que la Cuc E se localise principalement à l'interface polaire-apolaire de la bicouche, elle interagit avec la partie hydrophobe des phospholipides mais sans s'insérer profondément dans la bicouche.

Par ailleurs, les acides oléanolique, maslinique et ursolique sont des triterpènes pentacycliques avec des fonctions oxygénées de part et d'autre du noyau cyclique. Il a été prouvé que ces triterpènes se localisent à l'interface polaire-apolaire de la bicouche (Prades et al. 2011). Nous pouvons estimer que l'érythrodiol qui est pentacyclique avec deux fonctions oxygénées de part et d'autre, ressemble structuralement à ces triterpènes. Mais, l'effet de l'érythrodiol sur la ΔH_m et surtout sur l'aspect du pic même au pourcentage molaire le plus petit (10%) et l'induction de la séparation de phase à partir de 17% qui est inférieur à la moitié de celui de l'acide ursolique (40%), suggère leur insertion entre les chaînes des phospholipides et leur distribution de façon

hétérogène formant des zones de phospholipides riches et d'autres pauvres en érythrodiol et aboutissant à deux transitions de phases.

6.3 Détermination de la taille et du potentiel zêta des liposomes en absence et en présence de la Cuc E et de l'érythrodiol par DLS

Afin d'examiner l'effet de l'incorporation de la Cuc E ou de l'érythrodiol sur la structure des liposomes et l'arrangement des phospholipides, nous avons utilisé la DLS qui permet de déterminer le diamètre moyen d'une population liposomiale et l'indice de polydispersité (PDI) qui reflète son homogénéité. Des mesures de potentiel zêta qui indique la charge de surface ont été également réalisées en utilisant cette technique.

Les mesures de taille et de potentiel zêta ont été réalisées pour les lots de LUV sans et avec Cuc E (lots 1, 2 et 3), pour les LUV sans et avec érythrodiol (lots 4, 5 et 6) et pour les liposomes préparés par injection d'éthanol (lots 9, 10,11, 12 et 13).

6.3.1 Distribution de taille des populations liposomiales

Chaque lot de LUV et de liposomes préparés par injection d'éthanol a été préparé 3 fois (a, b et c). La distribution de taille a été déterminée pour chaque préparation. Les figures 41, 42 et 43 montrent la reproductibilité de la distribution de taille des trois préparations (a, b et c) des LUV sans et avec Cuc E, sans et avec érythrodiol et des liposomes préparés par injection d'éthanol, respectivement.

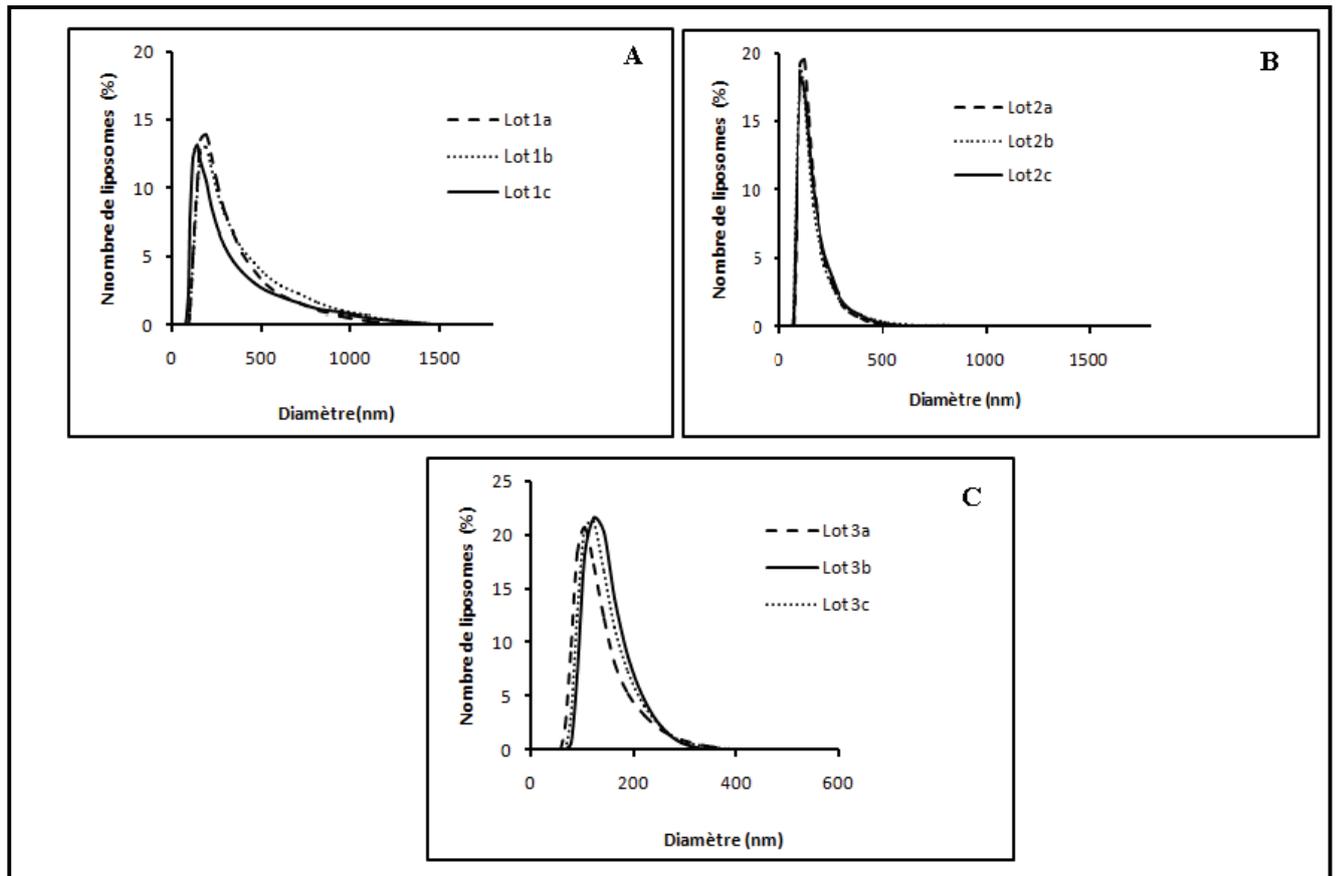


Figure 41 : Distribution de taille, (A) : lot 1 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/5/0), (B) : lot 2 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/3,8/1,2) et (C) : lot 3 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/3/2) (a, b et c sont trois préparations de chaque lot).

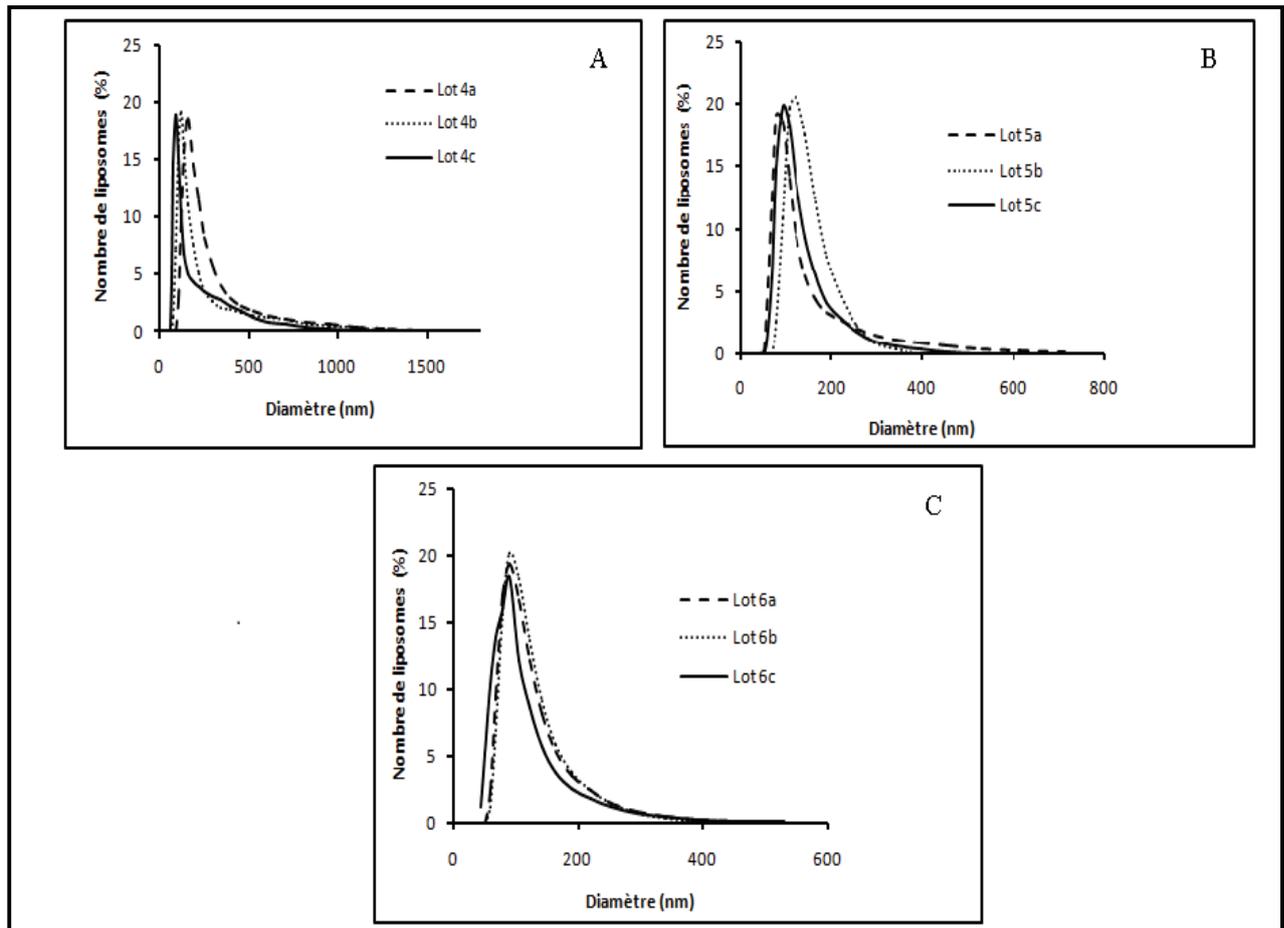


Figure 42 : Distribution de taille, (A) : lot 4 (phospholipides/Cho/érythrodiol 5,75/5/0), (B) : lot 5 (phospholipides/Cho/érythrodiol 5,75/4,5/0,5) et (C) : lot 6 (phospholipides/Cho/érythrodiol 5,75/3,8/1,2) (a, b et c sont trois préparations de chaque lot).

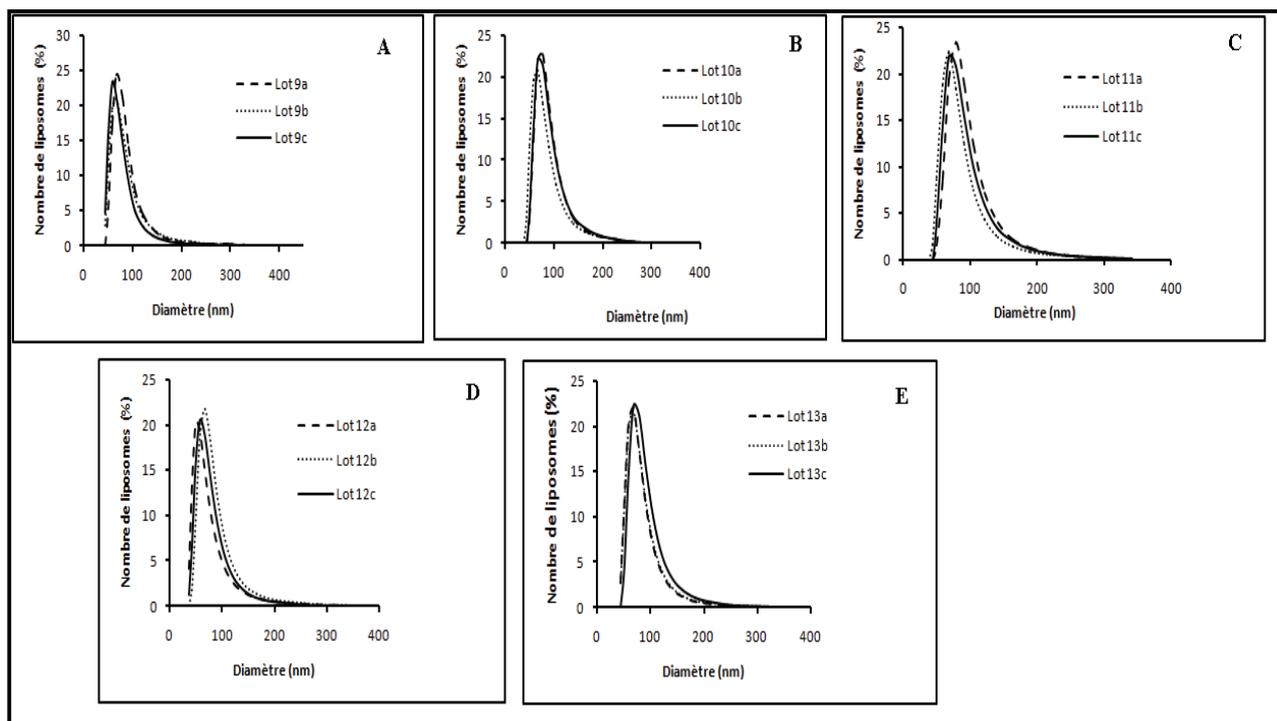


Figure 43 : Distribution de taille des liposomes préparés par injection d'éthanol, (A) : lot 9 (phospholipides/érythrodiol 100/0), (B) : lot 10 (phospholipides/érythrodiol 100/0,75), (C) : lot 11 (phospholipides/érythrodiol 100/1,5), (D) : lot 12 (phospholipides/érythrodiol 100/3) et (E) : lot 13 (phospholipides/érythrodiol 100/7), (a,b et c sont trois préparations de chaque lot).

Les trois préparations (a, b et c) de chaque lot de liposomes montrent une bonne reproductibilité de distribution de taille.

6.3.2 Taille des liposomes

LUV sans Cuc E (lot 1) et avec Cuc E (lots 2 et 3)

Les mesures de taille ont révélé que les LUV témoins (lot 1) possèdent un diamètre moyen autour de 404 ± 29 nm (tableau 9) qui est proche de la dimension de la dernière membrane à travers laquelle les liposomes ont été extrudés. Toutefois, les LUV avec Cuc E (lots 2 et 3) sont plus petits. Leurs diamètres moyens sont de 225 ± 6 et 177 ± 2 nm (tableau 9). La taille de liposomes diminue en présence de la Cuc E de manière concentration-dépendante.

Tableau 9 : Les valeurs de diamètre moyen, de PDI et de potentiel zêta obtenues par DLS pour les lots de LUV 1, 2 et 3. Les valeurs sont exprimées par la moyenne de toutes les mesures (réalisées pour les trois préparations de chaque lot) \pm SD.

Lots de LUV	Phospholipides/Cho/Cuc E	Diamètre (nm) \pm SD	PDI \pm SD	Potentiel zêta (mV) \pm SD
lot 1	5,75/5/0	404 \pm 29	0,26 \pm 0,05	-14,1 \pm 0,1
lot 2	5,75/3,8/1,2	225 \pm 6	0,22 \pm 0,03	-15,4 \pm 0,4
lot 3	5,75/3/2	177 \pm 2	0,18 \pm 0,02	-19,1 \pm 0,5

LUV sans érythrodiol (lot 4) et avec érythrodiol (lots 5 et 6)

Les mesures de taille obtenues pour ces lots ont révélé que les LUV témoins (lot 4) présentent un diamètre moyen égal à 364 \pm 17 nm. Ce diamètre est très proche de celui de la dernière membrane à travers laquelle les liposomes ont été extrudés. Cependant, les LUV avec érythrodiol sont plus petits et ont un diamètre moyen égal à 213 \pm 42 et 186 \pm 7 nm respectivement pour les lots 5 et 6 (tableau 10).

Tableau 10 : Les valeurs de diamètre moyen, de PDI et de potentiel zêta obtenues par DLS pour les lots de LUV 4, 5 et 6. Les valeurs sont exprimées par la moyenne de toutes les mesures (réalisées pour les trois préparations de chaque lot) \pm SD.

Lots de LUV	Phospholipides/Cho/érythrodiol	Diamètre (nm) \pm SD	PDI \pm SD	Potentiel zêta (mV) \pm SD
lot 4	5,75/5/0	364 \pm 17	0,23 \pm 0,04	-14,9 \pm 0,8
lot 5	5,75/4,5/0,5	213 \pm 42	0,22 \pm 0,10	-14,7 \pm 0,7
lot 6	5,75/3,8/1,2	186 \pm 7	0,19 \pm 0,01	-16,4 \pm 0,8

L'incorporation de la Cuc E et de l'érythrodiol dans les liposomes de type LUV préparés par évaporation en phase inverse suivie d'extrusion, provoque une diminution de la taille des liposomes. Berger et al. (2001) ont démontré que la taille des liposomes obtenus après extrusion dépend de plusieurs facteurs comme les dimensions des pores de la membrane, le type du dispositif d'extrusion, la composition des liposomes en phospholipides et leur concentration

(Berger et al. 2001). Les liposomes témoins (lots 1 et 4) et les liposomes avec Cuc E (lots 2 et 3) ou avec érythrodiol (lots 5 et 6) ont la même composition et concentration en phospholipides. Ce qui implique que la modification de la taille est due à la présence de la Cuc E ou de l'érythrodiol.

D'autre part, la variation de la taille entre les deux lots de liposomes témoins, lots 1 (404 nm) et 4 (364 nm) peut être due à l'utilisation de deux dispositifs d'extrusion mais qui sont de même type (mini-extruder Avanti Polar lipids). Le mécanisme de réduction de la taille des liposomes implique généralement la rupture des vésicules et le réarrangement spontané des phospholipides après passage à travers la membrane aboutissant à la formation de liposomes de taille plus petite.

Certaines études ont montré que l'incorporation d'autres terpènes dans les liposomes produit une modification de leur taille. Il a été démontré que l'incorporation des diterpènes comme les labdanes (Matsingou et al. 2005) dans des liposomes de type SUV, formés de lécithines d'œuf et de DPPG et préparés par la méthode d'hydratation du film lipidique suivie d'une sonication, réduit la taille des liposomes. De même, l'incorporation des monoterpènes comme certaines huiles essentielles dans les liposomes de type MLV formés de DPPC (Detoni et al. 2009), de type MLV ou SUV formés de phosphatidylcholine de soja hydrogénée et de cholestérol (Sinico et al. 2005, Valenti et al. 2001), de type MLV formés de lécithine de soja hydrogénée (Yoshida et al. 2010) et préparés par la méthode d'hydratation du film lipidique suivie d'une sonication pour obtenir les SUV, réduit la taille des liposomes. D'autres monoterpènes comme le cinéole, le citral et le limonène produisent une augmentation de la taille des liposomes formés de phosphatidylcholine de soja insaturée et préparés par hydratation du film lipidique suivie d'une extrusion (Dragicevic-Curic et al. 2009). D'autre part, il a été démontré que les hormones stéroïdes, 17- β -estradiol, cyprotérone acétate et finastéride produisent une augmentation de la taille des liposomes unilamellaires formés de DPPC et préparés par hydratation du film lipidique suivie de 10 cycles de congélation-décongélation et ensuite de 3 cycles d'extrusion. Dans ce dernier cas, il a été suggéré que l'augmentation de la taille est due à la formation des agrégats après l'extrusion (Biruss et al. 2007).

Dans notre étude, nous estimons que l'interaction de la Cuc E et de l'érythrodiol avec les têtes polaires des phospholipides empêchent l'assemblage et l'arrangement des phospholipides en vésicules plus grandes.

Liposomes préparés par injection d'éthanol (lots 9, 10, 11, 12 et 13)

Nous avons préparé des liposomes par la méthode d'injection d'éthanol parce qu'elle est plus rapide et plus simple que l'évaporation en phase inverse. Elle permet la production de grandes quantités de liposomes, ce qui est avantageux si une production à large échelle sera envisagée. Nous avons utilisé la lécithine d'œuf (Lipoïde E80) comme matrice phospholipidique et différentes quantités d'érythrodiol ont été ajoutées. Les rapports molaires sont : phospholipide/érythrodiol 100/0 (lot 9), 100/0,75 (lot 10), 100/1,5 (lot 11), 100/3 (lot 12) et 100/7 (lot 13).

Le diamètre moyen obtenu pour le témoin et pour les liposomes avec les différents rapports molaires d'érythrodiol est proche de 140 nm, ce qui signifie que l'érythrodiol n'a pas d'effet sur la taille des liposomes préparés par injection d'éthanol même à un pourcentage molaire de 7% (lot 13) (tableau 11).

Tableau 11 : Les valeurs de diamètre, de PDI et de potentiel zêta obtenues par DLS pour les lots 9, 10, 11, 12 et 13 de liposomes préparés par injection d'éthanol sans et avec érythrodiol. Les valeurs sont exprimées par la moyenne de toutes les mesures (réalisées pour les trois préparations de chaque lot)±SD.

Lot de liposomes	Lipoïde E80/érythrodiol	Diamètre (nm)±SD	PDI±SD	Potentiel zêta (mV)±SD
Lot 9	100/0	147±5	0,180±0,003	-20,2±0,6
Lot 10	100/0,75	141±2	0,17±0,01	-23,3±1,7
Lot 11	100/1,5	143±1	0,17±0,01	-20,9±1,3
Lot 12	100/3	141±1	0,16±0,01	-20,4±0,3
Lot 13	100/7	138±2	0,19±0,01	-19,6±1,4

Nous remarquons ainsi que l'incorporation de l'érythrodiol affecte la taille des liposomes unilamellaires mais n'exerce aucun effet sur la taille des liposomes multilamellaires obtenus par injection d'éthanol.

6.3.3 Indice de polydispersité (PDI)

Les valeurs de PDI obtenues pour tous les lots de liposomes préparés sont proches de 0,2 (voir tableau 9 pour les lots 1, 2 et 3, tableau 10 pour les lots 4, 5 et 6 et tableau 11 pour les lots 9, 10, 11, 12 et 13), ce qui indique que toutes les populations liposomiales préparées sont homogènes et monodisperses. En effet, l'extrusion est un processus bien connu pour diminuer la taille des liposomes et obtenir des populations plus homogènes (Berger et al. 2001, Verma et al. 2003). Il a été démontré que l'injection d'éthanol permet d'obtenir des liposomes ayant une distribution homogène avec un PDI égal ou inférieur à 0,2 (Maitani et al. 2001).

6.3.4 Potentiel zêta

Les mesures du potentiel zêta ont montré qu'il n'existe pas de différence de charge membranaire entre les liposomes incorporant ou non la Cuc E ou l'érythrodiol. Les valeurs obtenues pour tous les lots de liposomes témoins, avec Cuc E et avec érythrodiol sont comprises entre -15 mV et -20 mV (tableaux 9, 10, 11). Ceci indique que l'incorporation de la Cuc E ou de l'érythrodiol n'affecte pas la charge de surface de la membrane lipidique.

Le potentiel zêta peut fournir des informations sur le type d'association de la molécule avec les vésicules liposomiales même si la molécule est incorporée dans la partie apolaire de la bicouche lipidique ou reste à la surface des vésicules (Laouini et al. 2011). Ceci suggère que l'interaction de la Cuc E et de l'érythrodiol avec les liposomes ne se fait pas via des interactions électrostatiques avec les charges négatives des groupements phosphates des phospholipides. Elle est produite via des liaisons hydrogène avec le groupement hydroxyle du cholestérol au C3 ou les groupements hydroxyles du glycérol. Par ailleurs, les valeurs négatives du potentiel zêta obtenues pour tous les types de liposomes, permettent de prédire une stabilité des liposomes relativement bonne. En effet, un potentiel zêta négatif et inférieur à -20 mV, est suffisant pour prévenir la coalescence des vésicules (Laouini et al. 2011).

6.4 Observation morphologique des liposomes par TEM

6.4.1 LUV témoins (lots 1 et 4), LUV avec Cuc E (lots 2 et 3) et LUV avec érythrodiol (lots 5 et 6)

La morphologie des liposomes témoins (lots 1 et 4), avec Cuc E (lots 2 et 3) et avec érythrodiol (lots 5 et 6), a été observée au microscope électronique à transmission, par coloration négative. Nous avons réalisé des essais préliminaires avec le silicotungstate de sodium (1%), l'acide phosphotungstique (2%) et l'acétate d'uranyle (2%). Nous avons choisi l'acide phosphotungstique (2%) qui a donné les images les plus nettes.

La formulation de nos liposomes LUV est identique à celle utilisée par Khreich et al. (2008). C'est la première fois que les liposomes ayant cette formule ont été observés.

Les images obtenues pour les différents lots de liposomes révèlent la présence de vésicules de taille nanométrique conformément aux résultats de taille obtenus par DLS (figures 44 et 45). Ces images confirment la formation et la présence de vésicules sphériques unilamellaires avec un large espace interne.

La figure 44A montre une population homogène de vésicules du lot 1. Des vésicules du lot de liposomes témoins (lot 1) et des lots de liposomes avec Cuc E (lots 2 et 3) sont présentées respectivement dans les figures 44B, 44C et 44D.

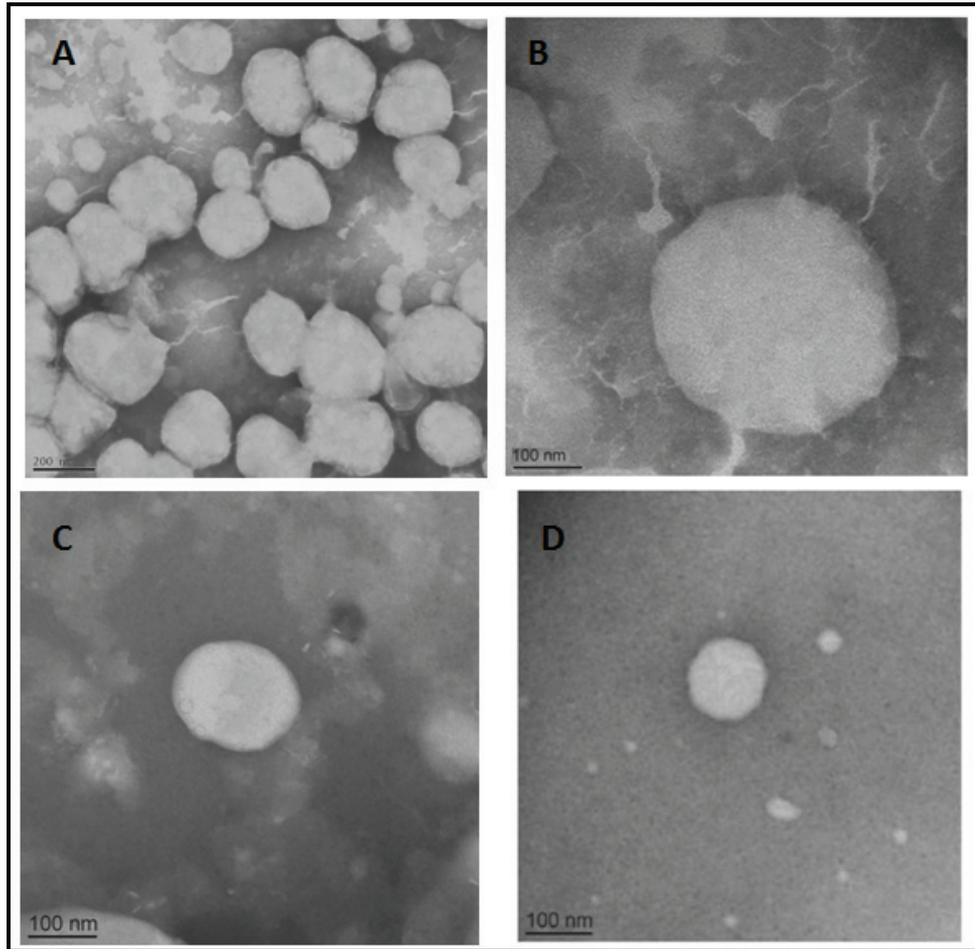


Figure 44 : Images obtenues par TEM, (A et B) : lot 1 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/5/0), (C) : lot 2 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/3,8/1,2) et (D) : lot 3 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/3/2).

Des vésicules du lot de liposomes témoins (lot 4) et des lots de liposomes avec érythrodiol (lots 5 et 6) sont observées respectivement dans les figures 45A et B, 45C et D et 45E et F.

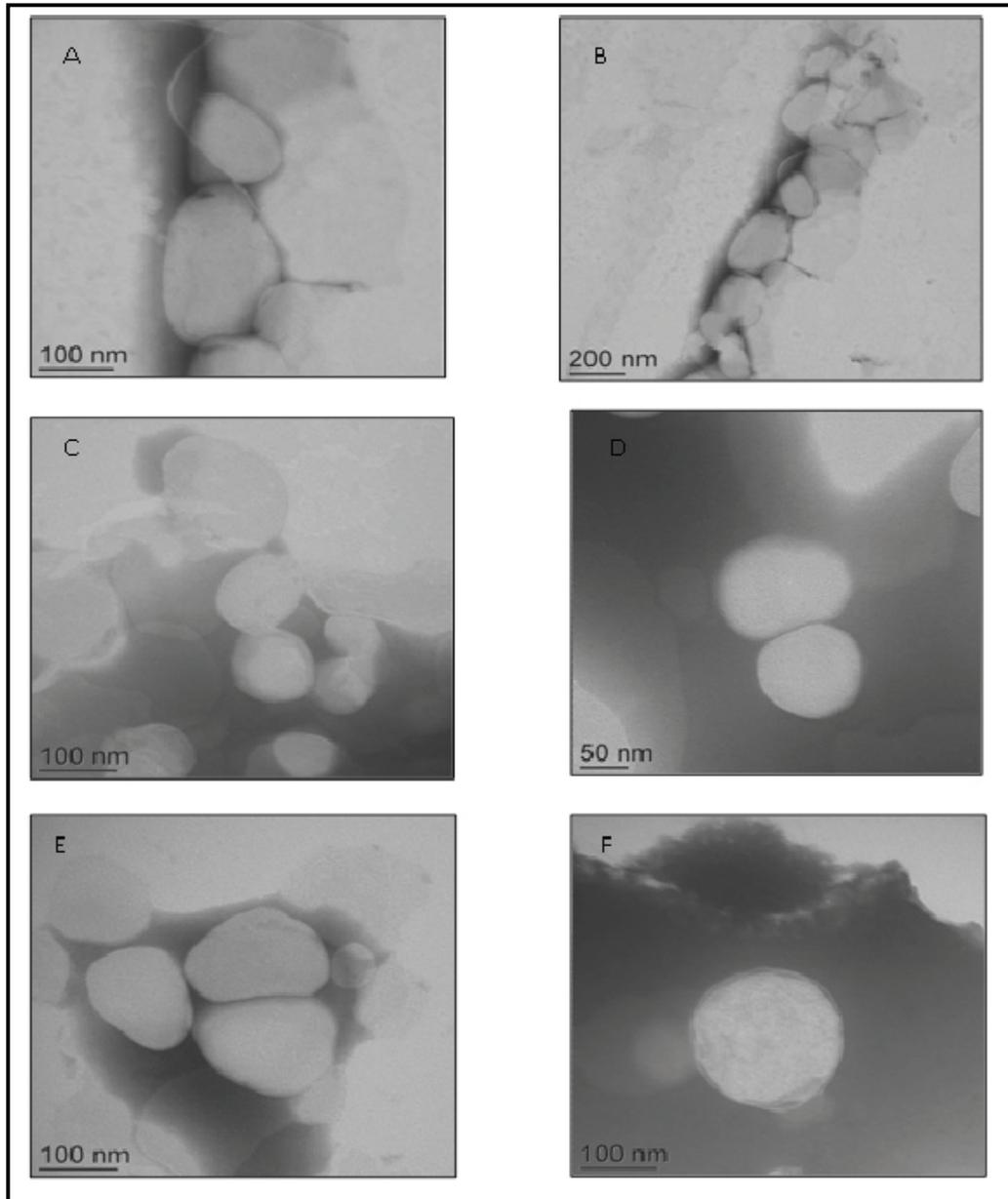


Figure 45 : Images obtenues par TEM, (A et B) : lot 4 (phospholipides/Cho/érythrodiol 5,75/5/0), (C et D) : lot 5 (phospholipides/Cho/érythrodiol 5,75/4,5/0,5) et (E et F) : lot 6 (phospholipides/Cho/érythrodiol 5,75/3,8/1,2).

6.4.2 Liposomes préparés par injection d'éthanol (Lots 9, 10, 11, 12 et 13)

Les liposomes préparés par injection d'éthanol en absence et en présence de l'érythrodiol (lots 9, 10, 11, 12 et 13) ont été également observés au microscope électronique à transmission par coloration négative en utilisant le silicotungstate de sodium (1%) comme contrastant. Nous n'avons pas essayé d'autres contrastants pour visualiser ce type de liposomes. Les images obtenues avec le silicotungstate de sodium (1%) étaient claires.

La figure 46 représente les images obtenues pour ces différents lots de liposomes. Ces images montrent des vésicules avec multicouches. Ceci signifie que les liposomes formés par injection d'éthanol et en utilisant le phospholipide E 80 sont multilamellaires ou plutôt oligolamellaires de taille de l'ordre de nanomètre. De point de vue morphologique, il n'y a pas de différence observée entre les liposomes témoins et ceux avec érythrodiol (figure 46).

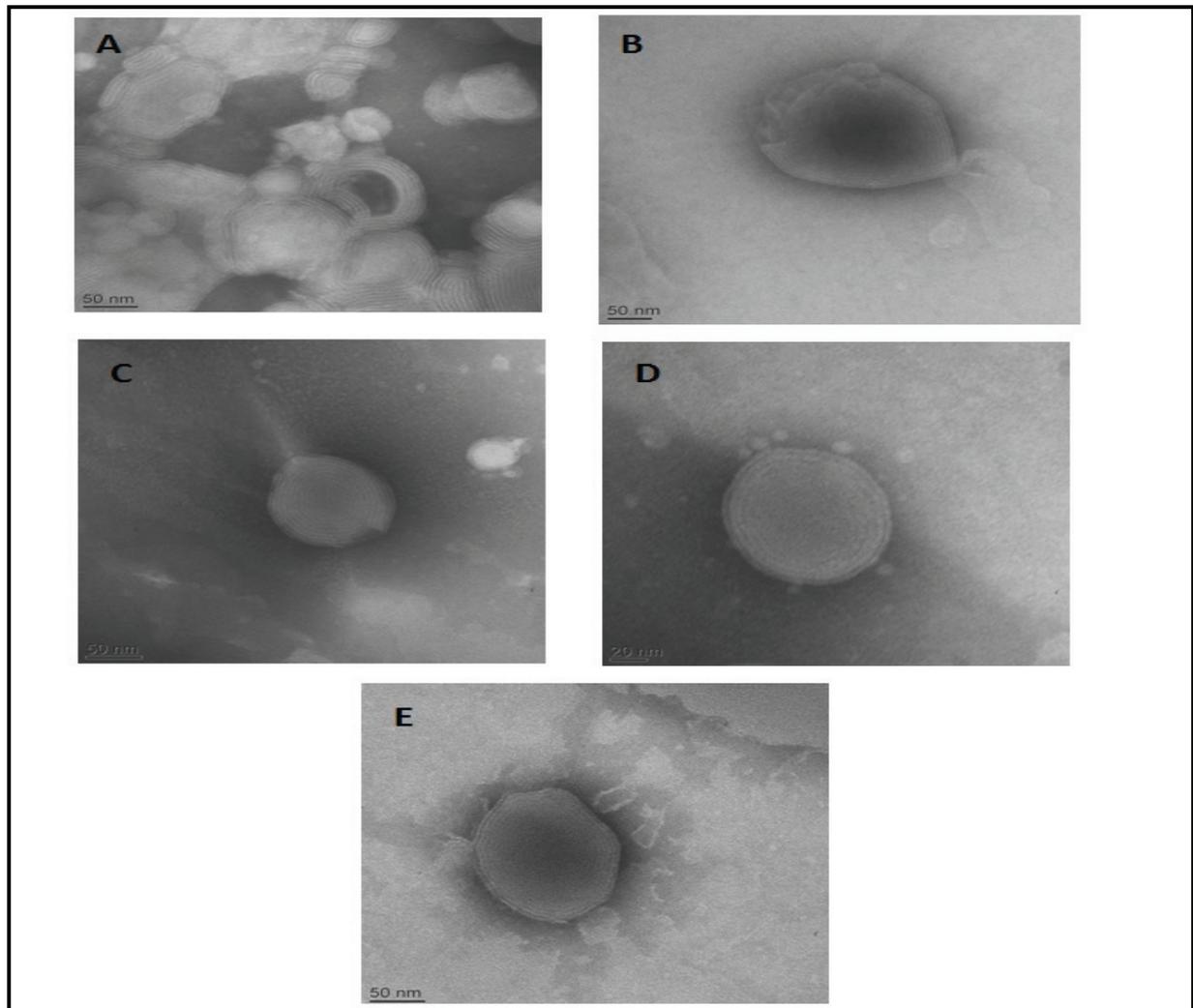


Figure 46 : Images obtenues par TEM des liposomes préparés par injection d'éthanol. (A) : lot 9 (phospholipides/érythrodiol 100/0), (B) : lot 10 (phospholipides/érythrodiol 100/0,75), (C) : lot 11 (phospholipides/érythrodiol 100/1,5), (D) : lot 12 (phospholipides/érythrodiol 100/3) et (E) : lot 13 (phospholipides/érythrodiol 100/7).

6.5 Observation morphologique et mesure des dimensions des vésicules liposomiales en absence et en présence de la Cuc E et de l'érythrodiol par AFM

L'AFM est une technique largement employée pour l'étude des propriétés structurales des bicouches lipidiques supportées (Dekkiche et al. 2010, Dufrene and Lee 2000). C'est une

technique d'imagerie utilisée pour visualiser et caractériser morphologiquement des liposomes fixés sur une surface (Anabousi et al. 2005, Bakowsky et al. 2008, Gao et al. 2012, Stimac et al. 2012). Elle fournit des informations topographiques à haute résolution sans la nécessité de sécher l'échantillon (Milhiet et al. 2011). Elle permet d'étudier l'interaction des molécules bioactives avec les bicouches lipidiques et l'effet de cette interaction sur l'organisation membranaire (Berquand et al. 2005, Domenech et al. 2009). L'AFM permet aussi de mesurer à l'échelle nanométrique les dimensions des liposomes, telles que le diamètre et la hauteur (Anabousi et al. 2005, Nakano et al. 2008).

Nous avons utilisé l'AFM, pour examiner l'effet de la Cuc E et de l'érythrodiol sur la morphologie et les dimensions des liposomes unilamellaires constitués d'un mélange de phospholipides et de cholestérol. Ainsi les LUV témoins (lots 1 et 4), les LUV avec Cuc E (lots 2 et 3) et les LUV avec érythrodiol (lots 5 et 6) ont été imagés par AFM.

La surface de chaque échantillon déposé sur du mica a été balayée par une pointe très souple spécifique pour les échantillons biologiques, « biolever Olympus » de raideur 0,006 N/m, en utilisant le mode contact. Plusieurs zones de la surface ont été imagées et toutes les observations ont eu lieu dans l'eau ultrapure et après 30 min d'incubation des vésicules à température ambiante sur le mica.

6.5.1 LUV témoins (lot 1) et LUV avec Cuc E (lots 2 et 3)

Les liposomes ont été déposés sur une surface de mica chargée négativement. L'adsorption des vésicules des lots 1, 2 et 3 a été réalisée sans aucune difficulté. Dès la première incubation, nous avons observé pour les trois lots, des vésicules de forme sphérique, de taille et de hauteur variables sans l'apparition de bicouches lipidiques ni au début de l'imagerie ni au fur et à mesure du balayage. Ce qui signifie que les vésicules ne s'éclatent pas sur la surface suite à leur adsorption sur le mica. Elles sont distantes les unes des autres et les distances qui les séparent sont presque stables (figures 47 et 48).

La figure 47 montre des images bidimensionnelles obtenues pour des liposomes témoins (47A) et avec Cuc E (47B et 47C pour les lots 2 et 3 respectivement).

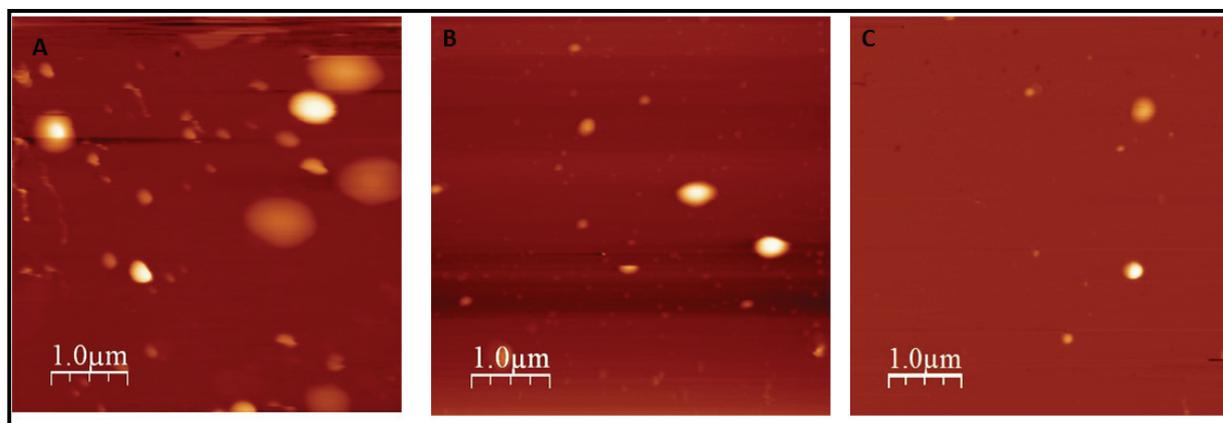


Figure 47 : Images bidimensionnelles obtenues par AFM montrant des vésicules, (A) : lot 1 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/5/0), (B) : lot 2 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/3,8/1,2) et (C) : lot 3 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/3/2), enregistrées en mode contact sur une région de $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$.

Les images de la figure 47, révèlent la présence de vésicules de forme sphérique, leurs surfaces sont lisses et ne présentent pas des trous ou des fissures (figure 47). Des vésicules de dimensions variables sont observées pour les trois lots.

Au cours de l'imagerie, les vésicules apparaissent généralement intactes et stables. Elles restent à la surface, gardent leur forme sphérique et ne s'éclatent pas. La figure 48 est l'une des images enregistrées et qui reflètent cet aspect. Cette figure montre de nouvelles zones imagées du mica pour les lots 1 (48A), 2 (48B) et 3 (48C).

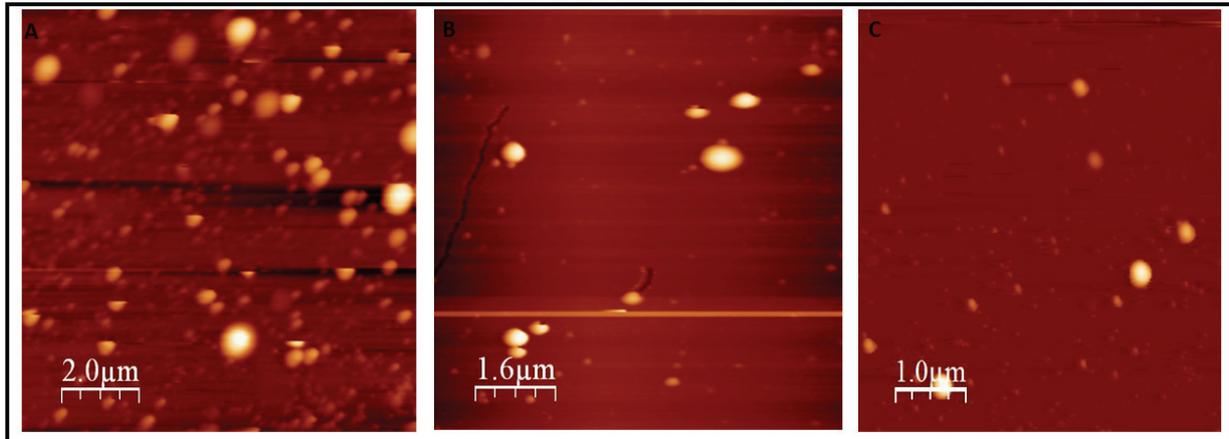


Figure 48 : Images bidimensionnelles obtenues par AFM montrant des vésicules, (A) : lot 1 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/5/0), (B) : lot 2 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/3,8/1,2) et (C) : lot 3 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/3/2), enregistrées en mode contact sur une région de $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$.

Selon l'échelle de couleur qui reflète la hauteur des vésicules, celles qui sont lumineuses sont les plus hautes et celles qui sont sombres sont plus basses. Nous remarquons que les vésicules de grande taille et de faible hauteur sont plus fréquentes dans le lot 1 que dans les deux autres lots (figures 47 et 48).

Effet de la Cuc E sur la taille des liposomes

Nous avons utilisé le logiciel WSxM pour déterminer la taille des liposomes. La taille est considérée comme étant le diamètre de la vésicule supposée sphérique. Dans la figure 49, nous représentons un schéma descriptif qui montre la mesure de la taille d'une vésicule déterminée d'après son profil obtenu par le logiciel.

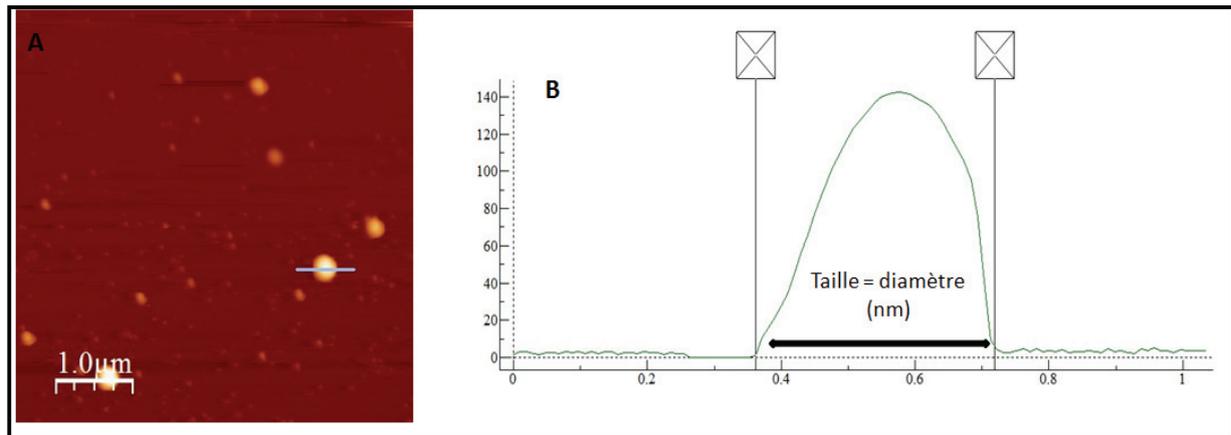


Figure 49 : (A) : Mesure de la taille d'une vésicule (barre au milieu de la vésicule) et (B) : estimation de sa valeur sur le profil obtenu.

La taille de la plupart des vésicules observées sur les différentes zones balayées et imagées a été mesurée. Les vésicules de plus grandes tailles sont beaucoup plus fréquentes dans le lot 1 qui est le lot des liposomes témoins que dans les lots 2 et 3 qui contiennent la Cuc E.

Les images de la figure 50, représentent de nouvelles zones de la surface du mica pour les lots 1 (figure 50A), 2 (figure 50B) et 3 (figure 50C), qui montrent une différence de taille entre les vésicules des trois lots. Selon ces images, nous constatons que la taille des vésicules liposomiales diminue quand la quantité de Cuc E augmente.

Les mesures de taille obtenues ont révélé un diamètre variable entre 345 et 900 nm pour les liposomes du lot 1, entre 215 et 500 nm pour ceux du lot 2 et entre 140 et 350 nm pour ceux du lot 3.

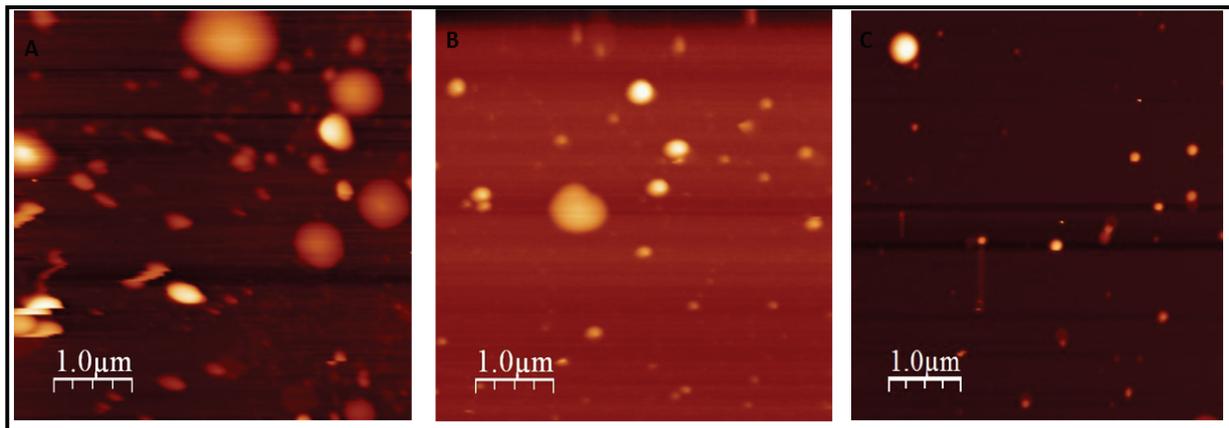


Figure 50 : Images bidimensionnelles obtenues par AFM montrant des vésicules, (A) : lot 1 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/5/0), (B) : lot 2 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/3,8/1,2) et (C) : lot 3 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/3/2) enregistrées en mode contact sur une région de $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$.

Les valeurs des diamètres de vésicules obtenues par AFM sont plus grandes et plus hétérogènes que celles obtenues par DLS où 404, 225 et 177 nm sont les diamètres moyens obtenus pour les lots 1, 2 et 3, respectivement (tableau 9). Il a été rapporté que les valeurs du diamètre obtenues par AFM sont toujours plus grandes que celles obtenues par DLS (Anabousi et al. 2005, Mao et al. 2004). Ceci est dû aux déformations que subissent les vésicules sous l'action de la force exercée par la pointe en mode contact. Malgré ces surestimations du diamètre, les images des figures 47 et 50 et les mesures de taille réalisées par AFM avec le logiciel WSxM, confirment les résultats obtenus par DLS, que la taille diminue en présence de la Cuc E et que cette diminution est concentration-dépendante.

Nous rappelons que la Cuc E est ajoutée au dépend du cholestérol. Il serait possible que cette diminution de taille soit due à la diminution de la quantité de cholestérol. Il a été déjà démontré que l'augmentation du contenu en cholestérol pourrait induire une augmentation de la taille (Liang et al. 2004, Liu et al. 2000, Tseng et al. 2007). Liang et al. (2004) ont démontré par DLS, que la taille des liposomes formés de lécithines d'œuf et de cholestérol, a augmenté de 40 à 140 nm avec un pourcentage molaire du cholestérol variant de 0 à 40%. Tandis qu'une taille constante autour de 40 à 60 nm a été observée dans les mesures AFM indépendamment des différents ratios lécithines d'œuf/cholestérol (Liang et al. 2004). Dans notre étude, la variation de

la quantité de cholestérol n'a pas été assez élevée pour expliquer le changement de taille des LUV. En effet, le pourcentage molaire du cholestérol était de 46,5%, 36% et 28%, respectivement pour les lots 1, 2 et 3. De plus, les résultats obtenus par DSC suggèrent que la Cuc E ne pénètre pas dans la bicouche lipidique contrairement au cholestérol qui s'intercale entre les chaînes des phospholipides. Ceci prouve que la Cuc E induit une modification de taille par un mécanisme qui n'est pas le même que celui du cholestérol.

Effet de la Cuc E sur la hauteur des liposomes

Un autre paramètre que nous avons obtenu à partir des figures AFM est la hauteur des vésicules. La hauteur d'un liposome représente sa longueur perpendiculaire à la surface du mica. Elle permet de décrire le comportement des vésicules sur une surface. La figure 51 montre le schéma représentatif de la mesure de la hauteur.

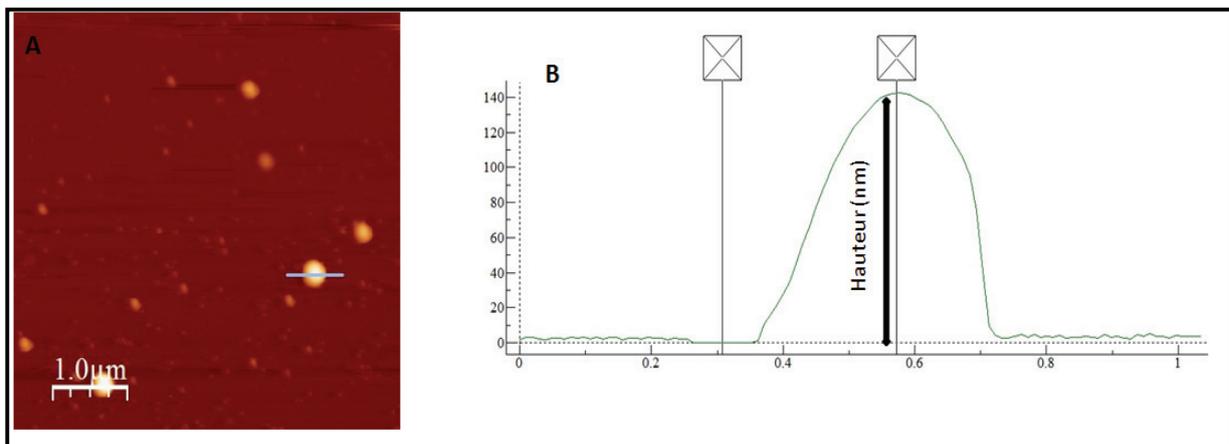


Figure 51 : (A) : Mesure de la hauteur d'une vésicule (barre au milieu de la vésicule) et (B) : estimation de sa valeur sur le profil obtenu.

Par ailleurs, pour déterminer la hauteur des particules souples par AFM, il faut prendre en considération, les interactions entre la pointe et l'échantillon ainsi que celles entre la pointe et le substrat (Muller and Engel, 1997). Ramirez-Aguilar and Rowlen (1998) ont montré que la hauteur observée par AFM est une approximation du diamètre des vésicules sphériques mesuré par TEM (Ramirez-Aguilar and Rowlen 1998). Les résultats obtenus par AFM et TEM pour le lot 1, reflètent cet aspect. En effet, les diamètres obtenus par les images TEM des vésicules du lot 1 varient entre 150 et 250 nm et leurs hauteurs mesurées par AFM varient entre 50 et 170 nm.

Il a été rapporté dans différentes études que la valeur de la hauteur des liposomes obtenue en imageant avec le mode intermittent (tapping mode) représente 40 à 50% du diamètre des liposomes en solution (Kumar and Hoh 2000, Reviakine and Brisson 2000, Shibata-Seki et al. 1996). Nous avons réalisé quelques observations en utilisant le mode intermittent pour le lot 1, lot des liposomes témoins. Nous avons obtenu une hauteur relativement constante de 220 nm. Ceci est en accord avec les résultats obtenus par DLS où le diamètre moyen des liposomes témoins est égal à 404 nm. Avec le mode intermittent, les liposomes, qui sont des objets souples, ont éclaté après environ 15 min d'imagerie. C'est pour cette raison que nous avons utilisé pour la suite, le mode contact et nous avons observé des vésicules stables.

Différentes régions de la surface du mica, sur laquelle sont adsorbés les liposomes, ont été observées et la hauteur des vésicules observées a été mesurée. Les figures 52, 53 et 54 représentent des images tridimensionnelles pour différentes régions du mica pour les trois lots de LUV, 1, 2 et 3 respectivement.

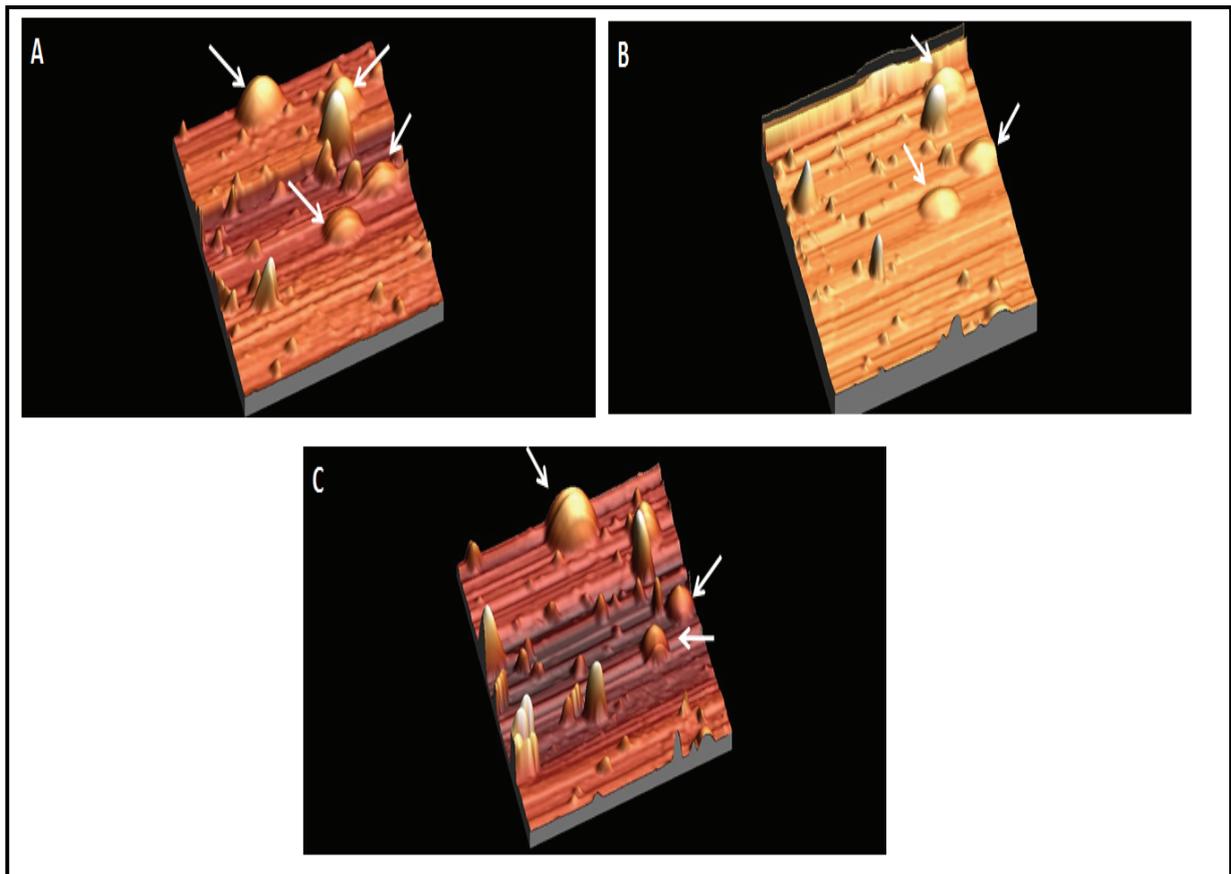


Figure 52 : Images tridimensionnelles obtenues par AFM de 3 régions différentes (A, B et C) du mica qui montrent des liposomes du lot 1 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/5/0) enregistrées en mode contact, sur une région de $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$.

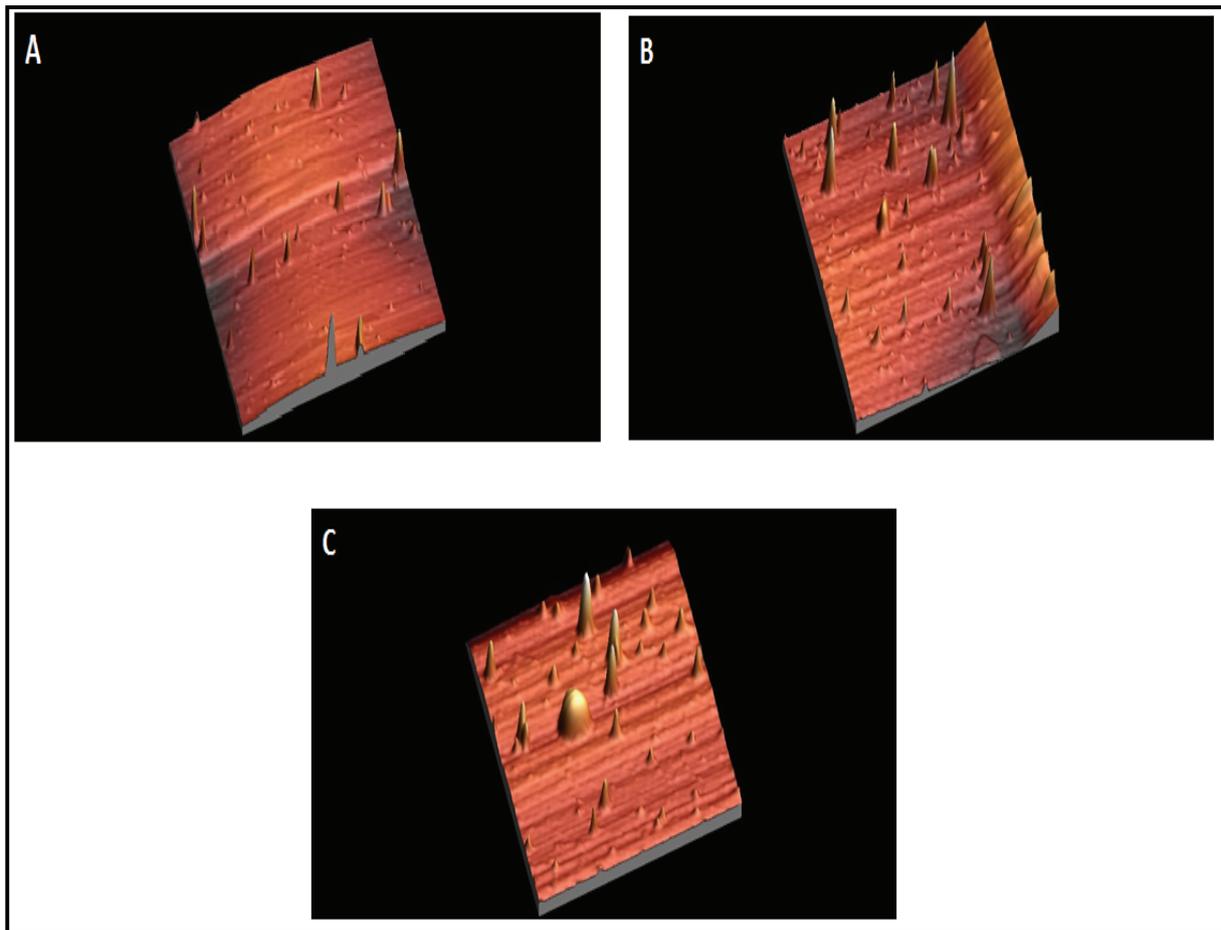


Figure 53 : Images tridimensionnelles obtenues par AFM de 3 régions différentes (A, B et C) du mica qui montrent des liposomes du lot 2 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/3,8/1,2) enregistrées en mode contact, sur une région de $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$.

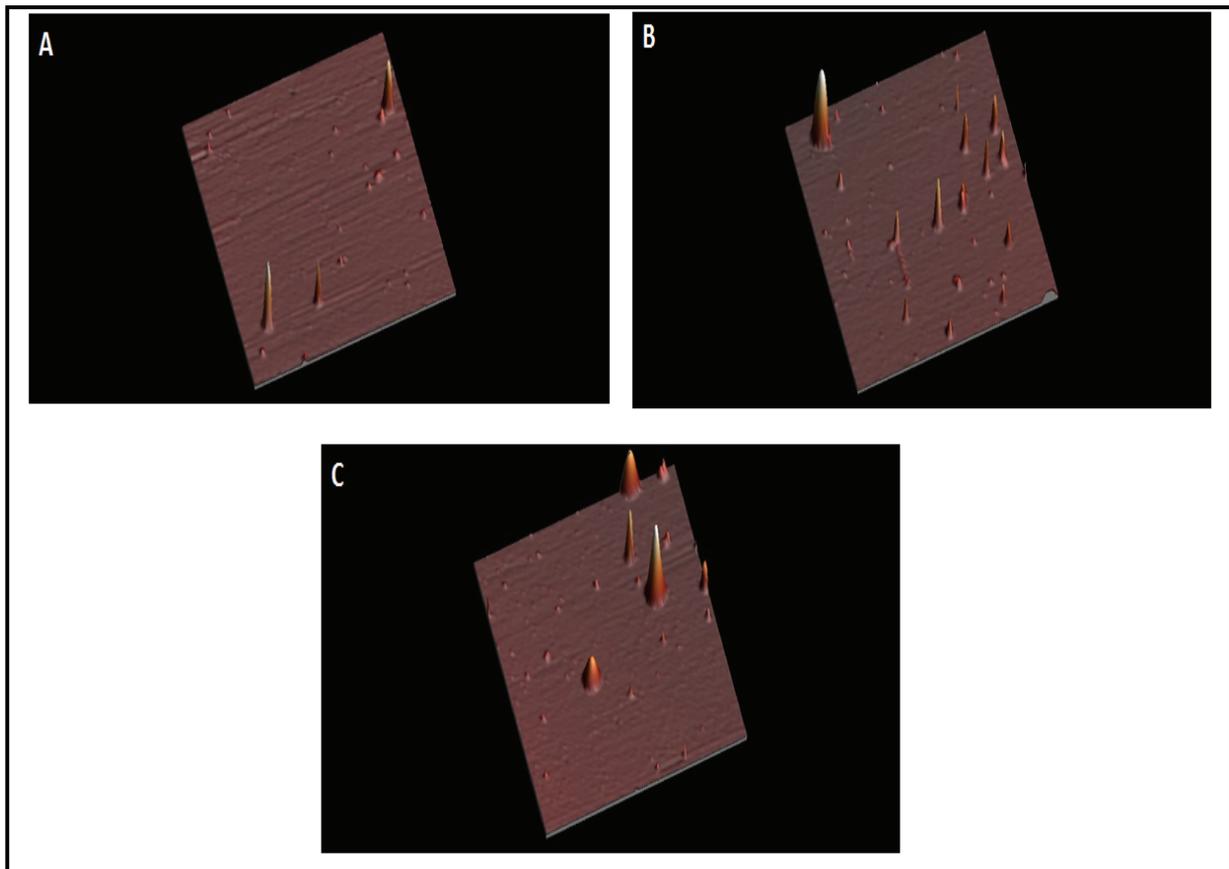


Figure 54 : Images tridimensionnelles obtenues par AFM de 3 régions différentes (A, B et C) du mica qui montrent des liposomes du lot 3 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/3/2) enregistrées en mode contact, sur une région de $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$.

Dans la figure 52, des liposomes aplatis dont la hauteur n'excède pas 30 à 40 nm (flèches blanches) et qui s'étendent sur la surface du mica sont observés dans le lot 1, dans les différentes régions (A, B et C). D'autres liposomes qui ne sont pas aplatis et dont la hauteur s'élève de la surface du mica sont observés aussi dans les figures 52A, 52B et 52C. Alors que pour les lots 2 et 3, les figures 53 et 54 montrent des liposomes avec des formes coniques pointues et bien dressées sur la surface dans les différentes régions imagées (A, B et C).

L'augmentation de la hauteur des liposomes en présence de la Cuc E est claire (figures 53 et 54). En effet, la mesure réalisée sur l'ensemble des vésicules observées a révélé que la hauteur des liposomes témoins varie entre 50 et 170 nm et celle des liposomes avec Cuc E varie entre 100 et 250 nm. Les vésicules les plus hautes sont plus fréquentes dans le lot 3 que dans le lot 2.

Cependant, comme pour la taille, nous constatons la présence de vésicules avec différentes hauteurs pour les lots 1, 2 et 3 (figures 52, 53, 54). Reviakine et Brisson (2000) ont décrit également que la hauteur des vésicules adsorbées sur le substrat varie. Les hauteurs faibles dans le mode contact sont habituellement résultantes des vésicules adsorbées qui se déplacent durant le balayage (Mao et al. 2004). En outre, les liposomes sont des objets souples et mous qui sont sévèrement comprimés par la pointe. Les liposomes du lot 1 semblent être plus sensibles à l'effet de la pointe que les liposomes contenant la Cuc E.

Kojko Nakano et al. (2008) supposent dans leur interprétation de la hauteur, qu'une vésicule rigide n'est pas comprimée par la pointe. Une telle vésicule possède ainsi une hauteur élevée et reste sur la surface du substrat avec son diamètre réel. Alors que si elle est moins rigide ou fragile, elle s'aplatit sous l'action de la pointe lors du balayage de la surface, sa hauteur est plus faible et sa taille est élargie (figure 55).

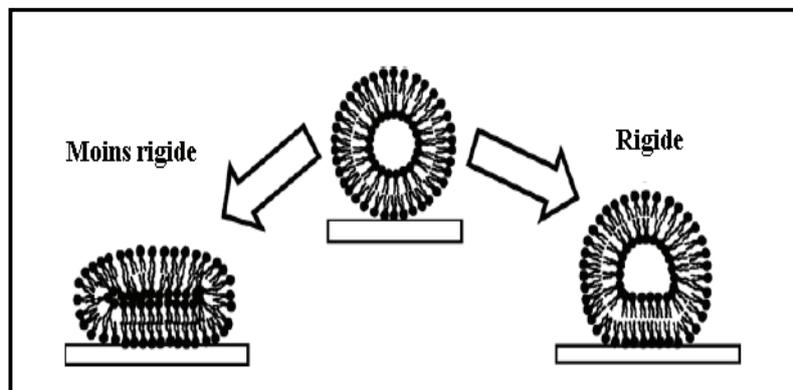


Figure 55 : Modèle schématique d'un liposome adsorbé sur une surface de mica
(Nakano et al. 2008)

En se basant sur cette interprétation, le rapport Hauteur/Diamètre reflète la rigidité de la particule. Sur le plan pharmacologique, il a été rapporté que la rigidité affecte la stabilité des liposomes et leur durée de vie dans la circulation systémique. Les liposomes rigides ont tendance à être plus stables dans la circulation et à avoir une longue durée de vie (Drummond et al. 1999).

Dans l'étude réalisée par Nakano et al. (2008), la rigidité (R) a été évaluée par le rapport entre la hauteur (H) des liposomes mesurée par AFM et leur diamètre mesuré par DLS ($R=H/D$). Conformément à leur modèle de calcul, nous avons obtenu des valeurs des rapports H/D égales à $0,21\pm 0,016$, $0,42\pm 0,024$ et $0,60\pm 0,028$ pour les lots 1, 2 et 3 respectivement. Le calcul a été effectué pour presque toutes les vésicules observées sur les images enregistrées pour chaque lot de liposomes, puis en calculant la moyenne de toutes les valeurs H/D obtenues.

6.5.2 LUV témoins (Lot 4) et LUV avec érythrodiol (lots 5 et 6)

Les lots de LUV préparés en absence et en présence de l'érythrodiol (lots 4, 5 et 6) ont été également imagés et analysés par AFM. L'adsorption des vésicules a été réalisée sur une surface de mica modifié par des ions Ni^{2+} . Pour les trois lots, nous avons observé des vésicules présentes sur la surface simultanément avec des bicouches lipidiques.

Les images des différents lots ont été analysées avec le logiciel Nanoscope V613r1. Les vésicules dont la couleur est dans la marge rose sont les plus hautes et celles dont la couleur est dans la marge verte sont les plus basses.

LUV témoins (lot 4)

Nous avons observé sur les images obtenues pour différentes zones du mica des vésicules intactes qui se tiennent bien sur la surface après deux balayages (flèches noires sur la figure 56A) et trois balayages (flèches noires sur la figure 57). Certaines vésicules possèdent une hauteur qui s'élève bien de la surface du mica et qui varie entre 60 et 120 nm (flèches noires sur les figures 56A et 57). D'autres vésicules sont aplaties et ont une hauteur de 30 nm environ (flèche noire marquée par une étoile sur la figure 56A).

Nous avons observé aussi des bicouches lipidiques de hauteur de 5 à 6 nm, qui sont des vésicules éclatées (flèches blanches sur les figures 56 et 57). Des patches de bicouches sont formés par la fusion de bicouches lipidiques voisines (flèche blanche sur la figure 56B).

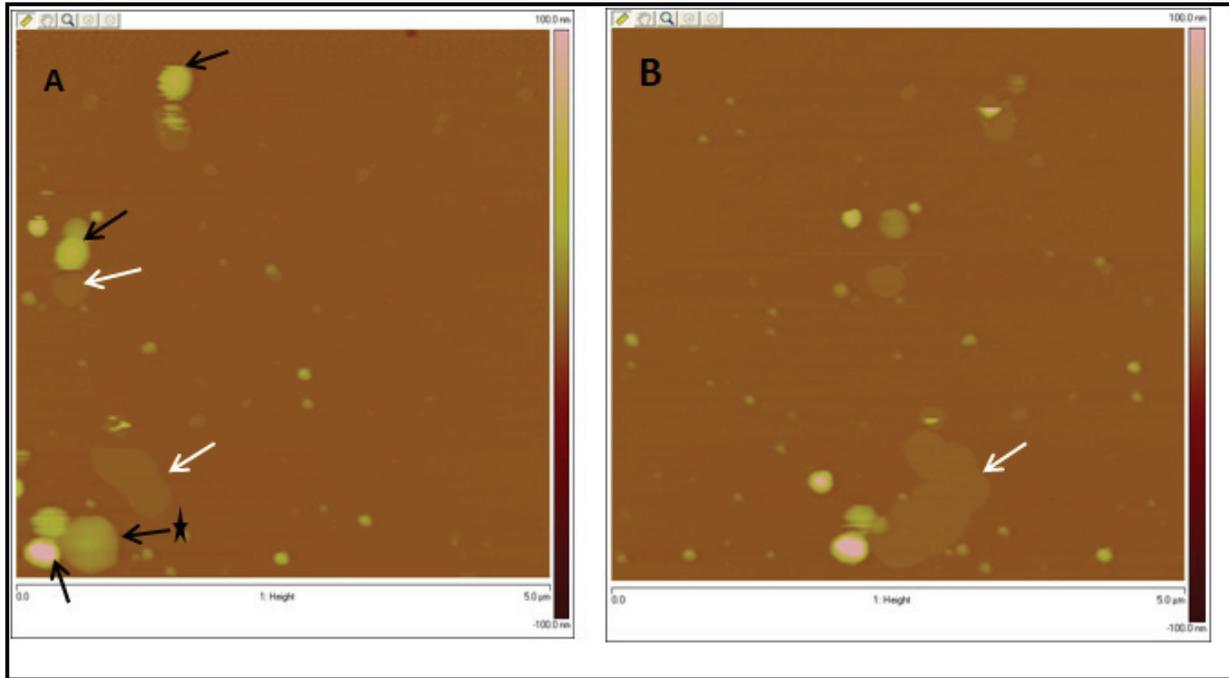


Figure 56 : Images bidimensionnelles obtenues par AFM, des liposomes témoins (lot 4) (phospholipides/Cho/érythrodiol 5,75/5/0). Les 2 images sont prises sur une région de 5 μm x 5 μm et après environ 10 min d'imagerie. Les figures A et B sont relatives à la même zone du mica balayée deux fois de suite. L'échelle de couleur à droite de l'image correspond à la hauteur des vésicules en nm (la hauteur diminue de haut en bas).

La zone de l'image 56B est la même que celle de l'image 56A mais avec un décalage de quelques microns, pour essayer de centrer les vésicules et le patch (les vésicules qui n'apparaissent pas sur l'image 56B sont alors déplacées par la pointe).

Dans la figure 56A, la flèche noire marquée par une étoile indique une vésicule aplatie de hauteur approximative de 26 nm et de diamètre approximatif de 600 nm. Nous avons remarqué que la vésicule ayant ces dimensions a tendance à éclater en bicouche au cours du balayage par la pointe et à fusionner avec des bicouches qui lui sont proches en formant un patch plus grand de hauteur de 5 nm (flèche blanche sur la figure 56B).

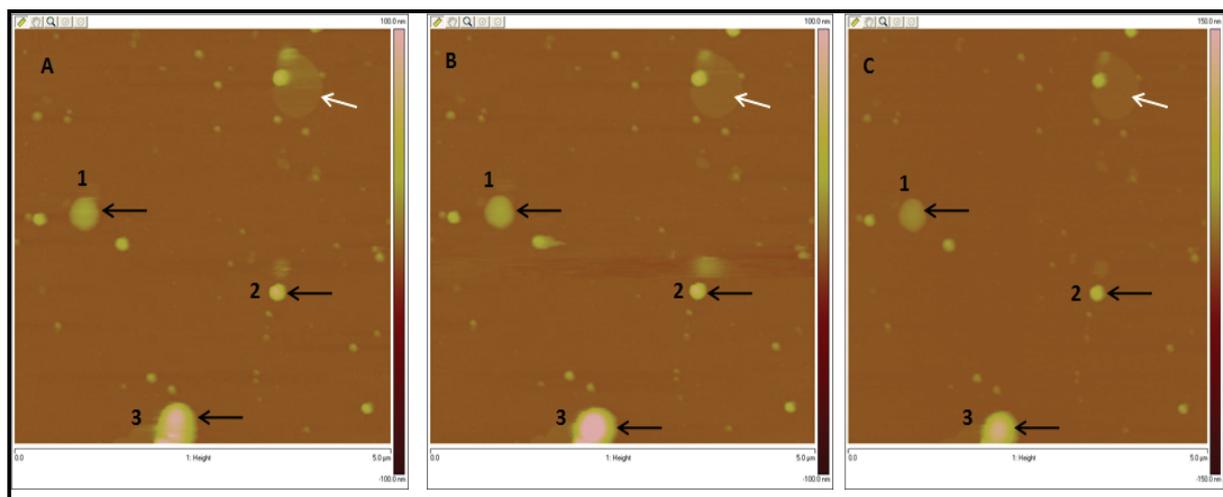


Figure 57 : Images bidimensionnelles obtenues par AFM des liposomes témoins (lot 4) (phospholipides/Cho/érythrodiol 5,75/5/0). Les 3 images sont prises sur une région de 5 μm x 5 μm et après environ 30 min d'imagerie. Les figures A, B et C sont relatives à la même zone balayée 3 fois de suite. L'échelle de couleur à droite de l'image correspond à la hauteur des vésicules en nm (la hauteur diminue de haut en bas).

La figure 57 représente une autre zone de cet échantillon. Cette zone a été balayée trois fois pour confirmer la stabilité structurale des vésicules observées et qui sont restées intactes après le deuxième balayage (57B est l'image de retour de 57A et 57C est l'image de retour de 57B).

Des vésicules qui se tiennent bien et qui gardent leur forme sphérique sont indiquées par les flèches noires. Les images 57B et 57C montre que ces vésicules n'ont pas bougé et gardent toujours les mêmes dimensions.

La vésicule indiquée par le numéro 1 est aplatie et garde au cours des balayages successifs une hauteur autour de 30 nm et un diamètre autour de 400 nm.

La vésicule indiquée par le numéro 2 garde après 3 balayages une hauteur de 75 nm environ et un diamètre de 250 nm environ.

Une troisième vésicule indiquée par le numéro 3 garde d'un balayage à l'autre des dimensions approximatives de 100 et de 500 nm pour la hauteur et le diamètre respectivement.

Un patch de hauteur de 5 nm (flèche blanche) apparaît dès le premier balayage (figures 57A, 57B et 57C) et ne croit plus durant les balayages successifs.

La formation de bicouches lipidiques qui apparaissent comme des patches, a été montrée dans plusieurs études (par exemple Egawa and Furusawa 1999, Jass et al. 2000 et Richter and Brisson 2005).

Richter et al. (2003) ont révélé la présence sur les images AFM, de vésicules immobilisées et de bicouches lipidiques qu'ils distinguent par leur hauteur et leur forme en patches respectivement (Richter et al. 2003). Reviakine and Brisson (2000) ont démontré que les images AFM des liposomes révèlent différents objets. Certains ne sont pas des vésicules adsorbées mais plutôt des disques de bicouches uniques « Single bilayers disks » qui se forment après le dépôt de l'échantillon sur le mica et dont la hauteur est de 5 nm alors que les vésicules intactes possèdent des hauteurs de quelques dizaines de nanomètres. Les vésicules et les bicouches diffèrent par leur apparence sur les images AFM (Reviakine et Brisson 2000).

Nous en concluons que pour l'ensemble des zones balayées sur toute la surface du mica et des répétitions d'imagerie du lot 4, deux aspects sont répétitifs : le premier aspect se manifeste par la présence de vésicules stables et intactes au cours du balayage (figures 56A et 57) et le deuxième par l'éclatement de vésicules en bicouches qui fusionnent avec des bicouches voisines déjà présentes en formant un patch plus grand de hauteur de 5 nm (figure 56B).

LUV avec érythrodiol (lot 5)

Comme dans le cas du lot 4, la surface du mica modifié sur laquelle a été déposé un échantillon du lot 5, est imagée par AFM.

Nous avons observé des bicouches lipidiques de 5 nm de hauteur (flèches blanches) qui sont étalées en continu sur toute l'image et qui couvrent une grande surface de la zone (figures 58 et 59B). De plus, des vésicules sphériques se tenant bien sur la surface (flèches noires) sont aussi observées dans la même zone de bicouches (figures 58 et 59B) ou uniquement dans une zone différente (figure 59A). La hauteur de ces vésicules varie entre 40 et 150 nm (figures 58 et 59). Nous avons remarqué que même dans les régions riches en vésicules intactes (figure 59B), des

bicouches de hauteur de 6 à 7 nm (flèches blanches) sont toujours présentes et leur surface augmente au cours du temps.

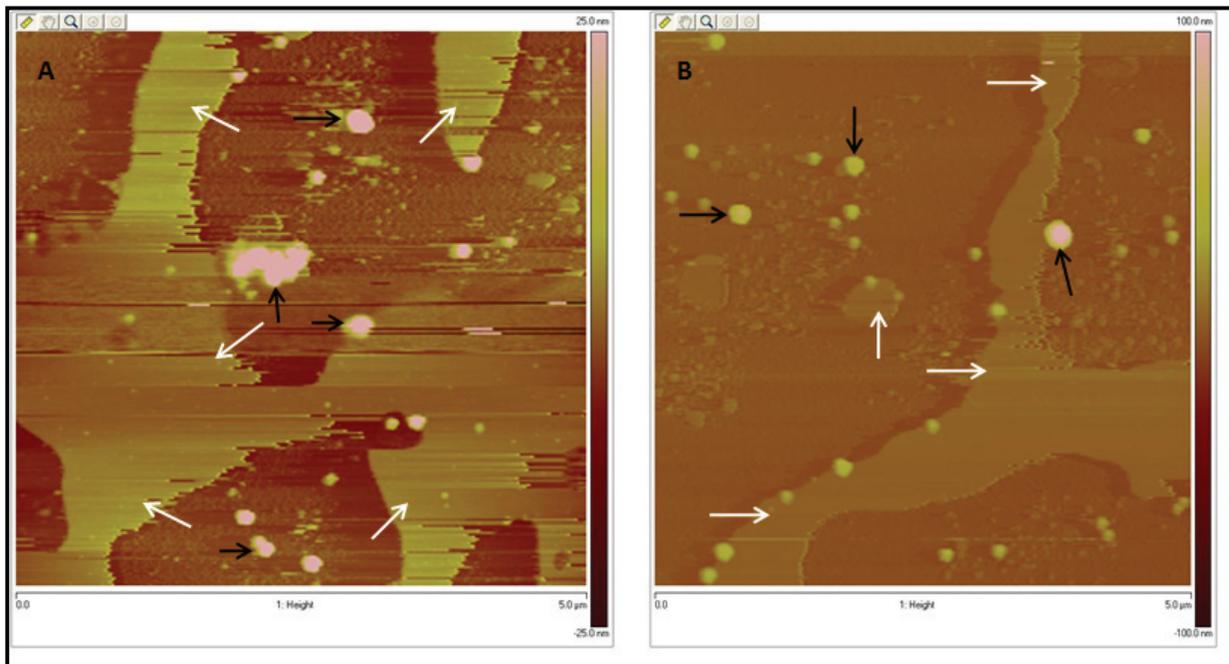


Figure 58 : Images bidimensionnelles obtenues par AFM des liposomes du lot 5 (phospholipides/Cho/érythrodiol 5,75/4,5/0,5). Deux zones différentes (A et B) de la surface du mica sont montrées. Les 2 images A et B, sont enregistrées sur une région de 5 μm x 5 μm et sont prises après respectivement 5 et 15 min d'imagerie. L'échelle de couleur à droite de l'image correspond à la hauteur des vésicules en nm (la hauteur diminue de haut en bas).

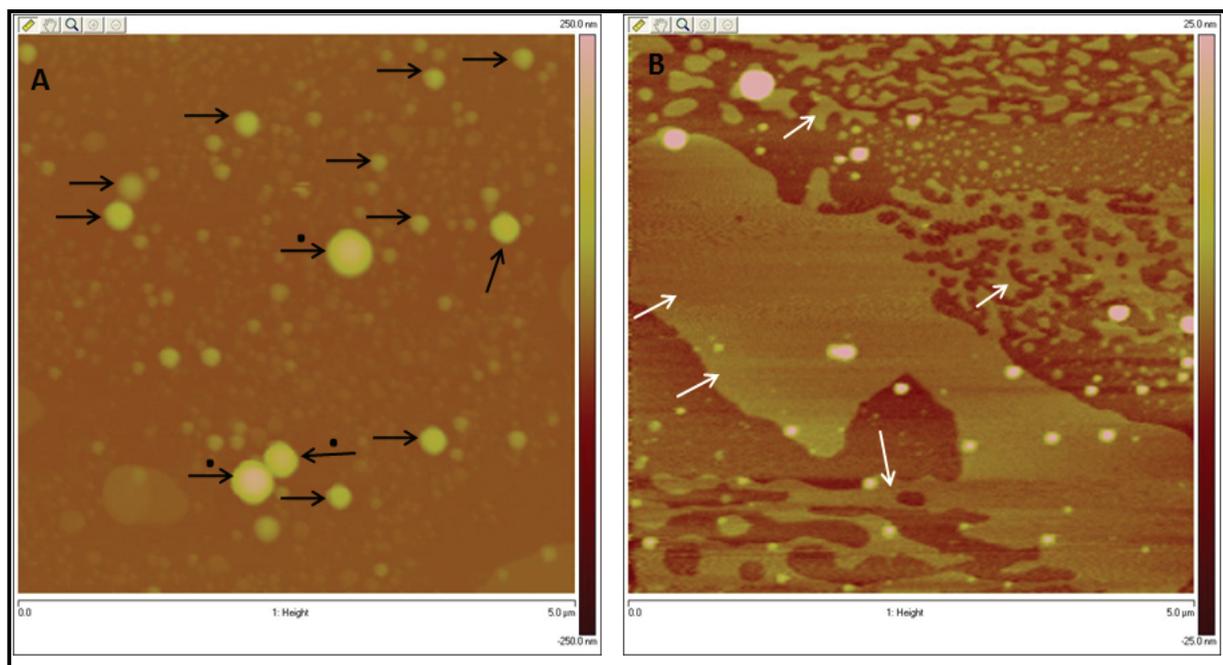


Figure 59 : Images bidimensionnelles obtenues par AFM des liposomes du lot 5 (phospholipides/Cho/érythrodiol 5,75/4,5/0,5). Deux zones différentes (A et B) de la surface du mica sont montrées. Les 2 images A et B sont enregistrées sur une région de 5 μm x 5 μm et sont prises après respectivement 30 et 90 min environ d'imagerie. L'échelle de couleur à droite de l'image correspond à la hauteur des vésicules en nm (la hauteur diminue de haut en bas).

Sur la figure 59A, la majorité des vésicules ont un diamètre variant entre 200 et 230 nm et une hauteur variant entre 70 et 90 nm (flèches noires). Certaines vésicules présentent des diamètres et des hauteurs plus élevées (flèches noires avec point). Leurs hauteurs sont voisines de 150 nm et leurs diamètres varient de 370 à 400 nm (flèches noires avec point). Ces dimensions rejoignent celles des liposomes témoins (lot 4), supposant que ces liposomes n'ont pas incorporé l'érythrodiol.

La formation des bicouches en présence de l'érythrodiol a été directement observée après dépôt de l'échantillon sur le mica, effet qui n'a pas été observé pour le lot 4.

LUV avec érythrodiol (Lot 6)

Sur les images obtenues pour les LUV du lot 6 contenant une quantité plus grande d'érythrodiol, nous avons observé des bicouches lipidiques qui sont réparties partout sur la surface dès le début de l'imagerie (figure 60A). Ceci montre que les vésicules sont éclatées en bicouches en présence de cette quantité d'érythrodiol. Le nombre de bicouches augmente dans toutes les régions observées de la surface du mica. Cela peut être dû à l'éclatement de certaines vésicules pendant l'imagerie pour former de nouvelles bicouches (figure 60B).

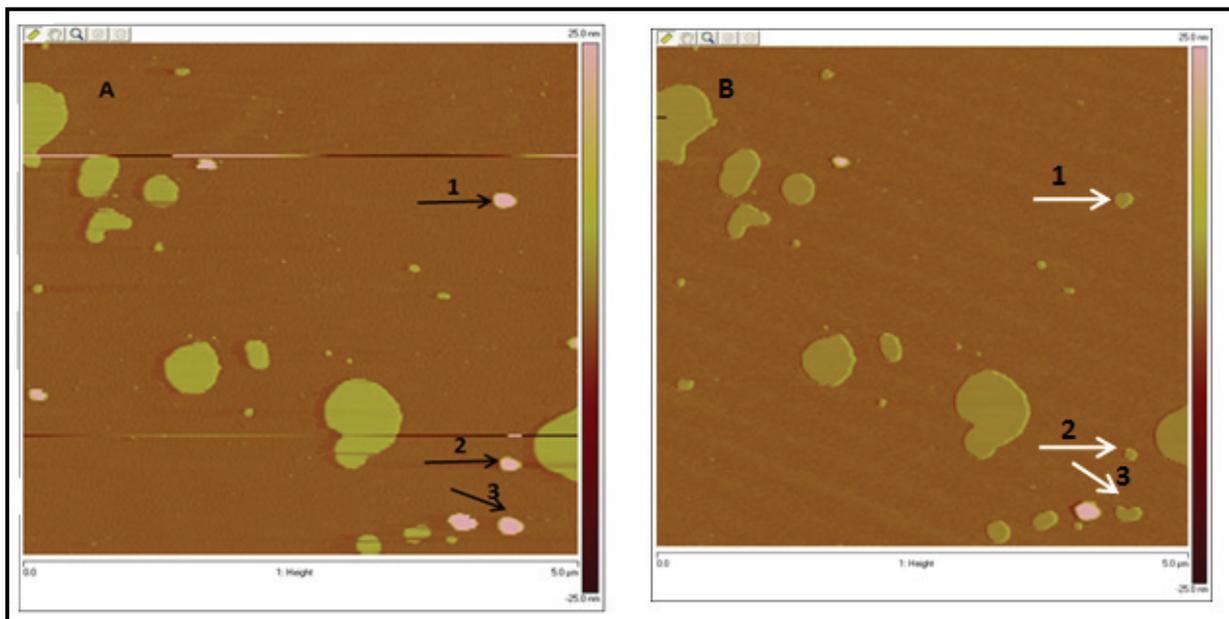


Figure 60 : Images bidimensionnelles obtenues par AFM des liposomes du lot 6 (phospholipides/Cho/érythrodiol 5,75/3,8/1,2). Les figures A et B sont relatives à la même zone du mica balayée deux fois de suite. Les 2 images sont prises sur une région de 5 μm x 5 μm et au début de l'imagerie. L'échelle de couleur à droite de l'image correspond à la hauteur des vésicules en nm (la hauteur diminue de haut en bas).

Les flèches noires sur la figure 60A indiquent les vésicules qui sont éclatées en bicouches sur la figure 60B (flèches blanches). Chaque vésicule et la bicouche qui lui en résulte sont indiquées par le même numéro.

De plus, nous avons observé des bicouches qui fusionnent avec d'autres voisines (figures 61A et 61B). La flèche noire indique la vésicule sur 61A qui est éclatée en bicouche et qui est fusionnée avec sa voisine (flèche blanche sur la figure 61B).

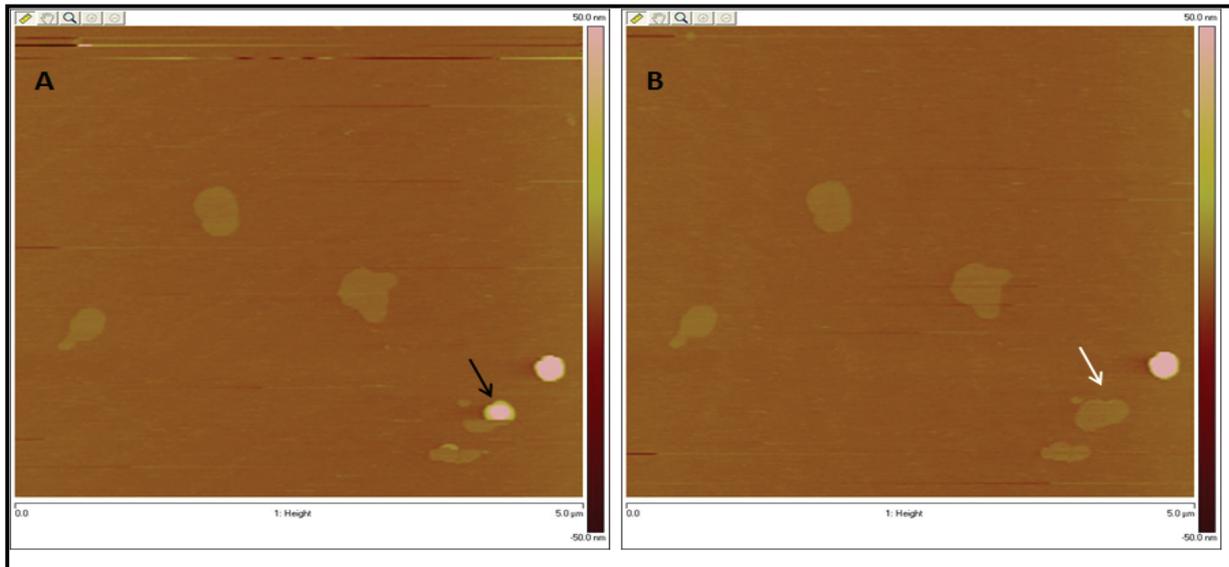


Figure 61 : Images bidimensionnelles obtenues par AFM des liposomes du lot 6 (phospholipides/Cho/érythrodiol 5,75/3,8/1,2). Les 2 images sont prises sur une région de 5 μm x 5 μm et après environ 45 min d'imagerie. Les figures A et B sont relatives à la même zone du mica balayée deux fois de suite. L'échelle de couleur à droite de l'image correspond à la hauteur des vésicules en nm (la hauteur diminue de haut en bas).

Au cours de l'imagerie certaines régions ne présentent que des bicouches lipidiques (figure 62A et 62B).

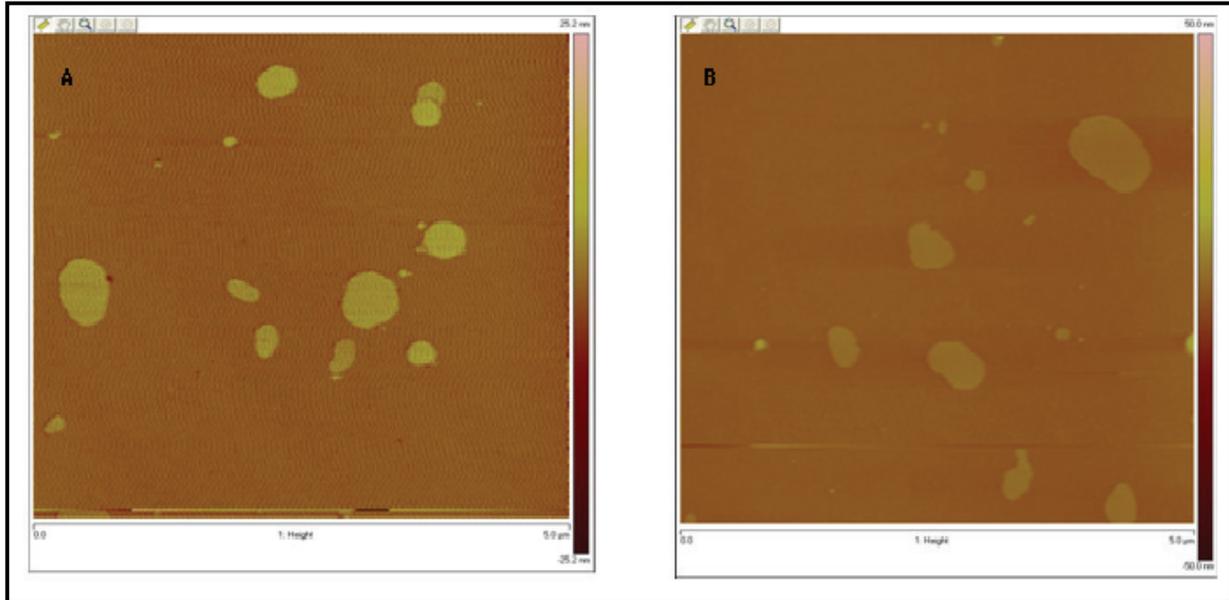


Figure 62 : Images bidimensionnelles obtenues par AFM des liposomes du lot 6 (phospholipides/Cho/érythrodiol 5,75/3,8/1,2). A et B sont deux zones différentes de la surface du mica. Les 2 images A et B sont enregistrées sur une région de $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ et sont prises après respectivement 60 et 75 min environ d'imagerie. L'échelle de couleur à droite de l'image correspond à la hauteur des vésicules en nm (la hauteur diminue de haut en bas).

Cet effet observé en présence de l'érythrodiol a été confirmé en augmentant le pourcentage d'érythrodiol jusqu'à 18% correspondant au rapport molaire DPPC/DPPG/DPPE/Cho/érythrodiol 5/0,5/0,25/3/2. Cette préparation a été étudiée uniquement par AFM. Les images obtenues de ce lot ont montré que la surface du mica a été complètement couverte par une continuité de bicouches de hauteur de 5 nm sur lesquelles existent des vésicules de dimensions comparables à celles des lots 5 et 6 (figures 63A et 63B).

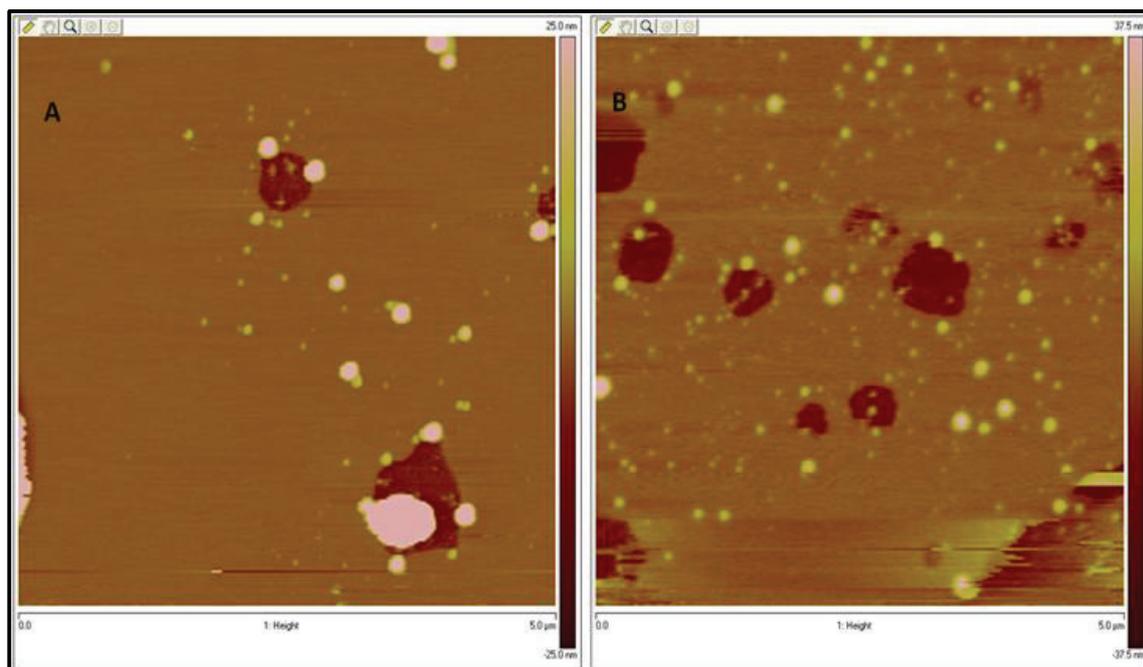


Figure 63 : Images bidimensionnelles obtenues par AFM du lot supplémentaire de liposomes avec érythrodiol (phospholipides/Cho/érythrodiol 5,75/3/2). Deux zones différentes A et B de la surface sont représentées et sont prises après respectivement 20 et 40 min d'imagerie. Les 2 images sont enregistrées sur une région de 5 μm x 5 μm . L'échelle de couleur à droite de l'image correspond à la hauteur des vésicules en nm (la hauteur diminue de haut en bas).

Les figures 63A et 63B montre la surface du mica (couleur brun foncé) sur laquelle s'étend une épaisseur de bicouches de 5 nm (couleur verte).

Le comportement des vésicules sur la surface du mica observé au cours du balayage, a permis de montrer un effet de l'érythrodiol favorisant l'éclatement des liposomes en bicouches de hauteur de 5 nm. Cet effet est en accord avec ce que nous avons obtenu par DSC qui suggère que l'érythrodiol est capable de s'insérer dans la bicouche lipidique et perturber les interactions hydrophobes entre les chaînes des phospholipides induisant une séparation de phase. Ces résultats supposent que l'érythrodiol perturbe la structure des liposomes en créant des espaces libres dans la membrane liposomiale aboutissant à sa fragilisation surtout à concentration élevée.

Effet de l'incorporation de l'érythrodiol sur la taille des liposomes

La figure 64 montre la variation de la taille des vésicules en absence (A) et en présence de l'érythrodiol (B et C pour les lots 5 et 6 respectivement).

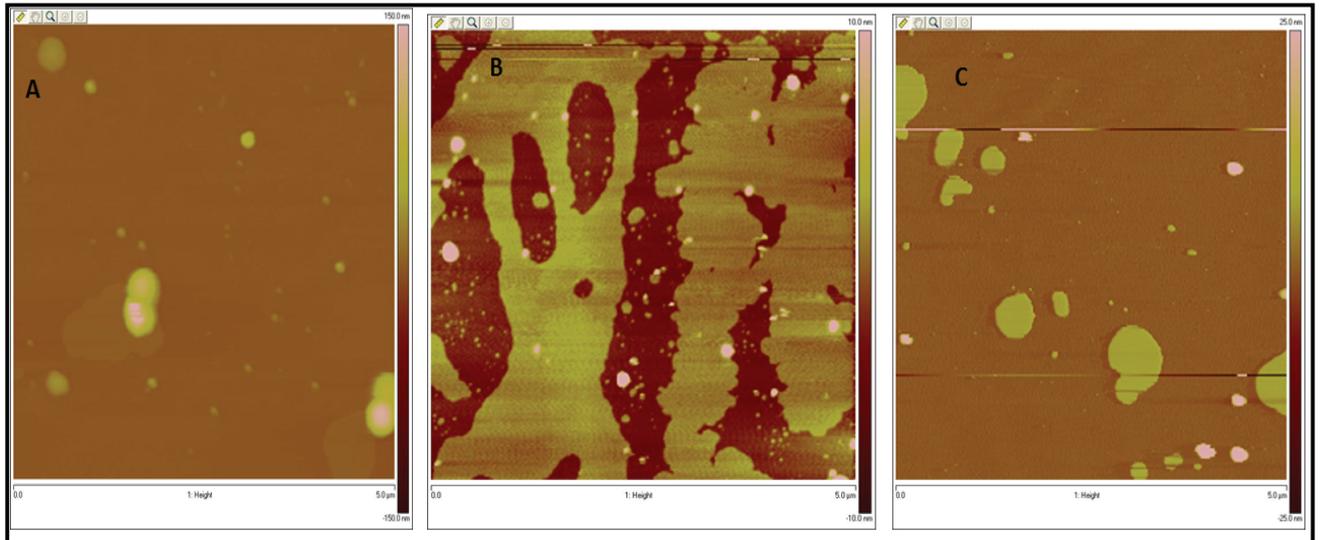


Figure 64 : Images bidimensionnelles obtenues par AFM, (A) : lot 4 (phospholipides/Cho/érythrodiol 5,75/5/0), (B) : lot 5 (phospholipides/Cho/érythrodiol 5,75/4,5/0,5) et (C) : lot 6 (phospholipides/Cho/érythrodiol 5,75/3,8/1,2). Les 3 images sont enregistrées sur une région de 5 μm x 5 μm . L'échelle de couleur à droite de l'image correspond à la hauteur des vésicules en nm (la hauteur diminue de haut en bas).

Sur cette figure, nous observons que la taille des liposomes diminue en présence de l'érythrodiol. En effet, on n'observe pas des vésicules de grande taille dans les lots 5 et 6.

La mesure de diamètre réalisée selon la figure 49 montre que le diamètre des vésicules du lot 4 varie entre 250 et 500 nm, celui des vésicules du lot 5 et du lot 6 varie entre 200 et 250 nm.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par DLS où la taille moyenne des liposomes du lot 5 est inférieure à la taille moyenne des liposomes du lot 4, mais elle est très proche de celle du lot 6 (tableau 10). Ainsi, la diminution de taille ne varie pas proportionnellement avec la quantité d'érythrodiol. Ce résultat a été confirmé par analyse des images AFM du lot où

l'érythrodiol est ajouté avec un pourcentage de 18%. Les vésicules présentent des diamètres comparables à celles des lots 5 et 6 (figure 63).

Effet de l'incorporation de l'érythrodiol sur la hauteur des liposomes

Dans ce paragraphe, nous comparons la hauteur des vésicules en absence (lot 4) et en présence (lots 5 et 6) de l'érythrodiol. La figure 65 montre des images tridimensionnelles des liposomes du lot 4 (figure 65A), du lot 5 (figure 65B) et du lot 6 (figure 65C).

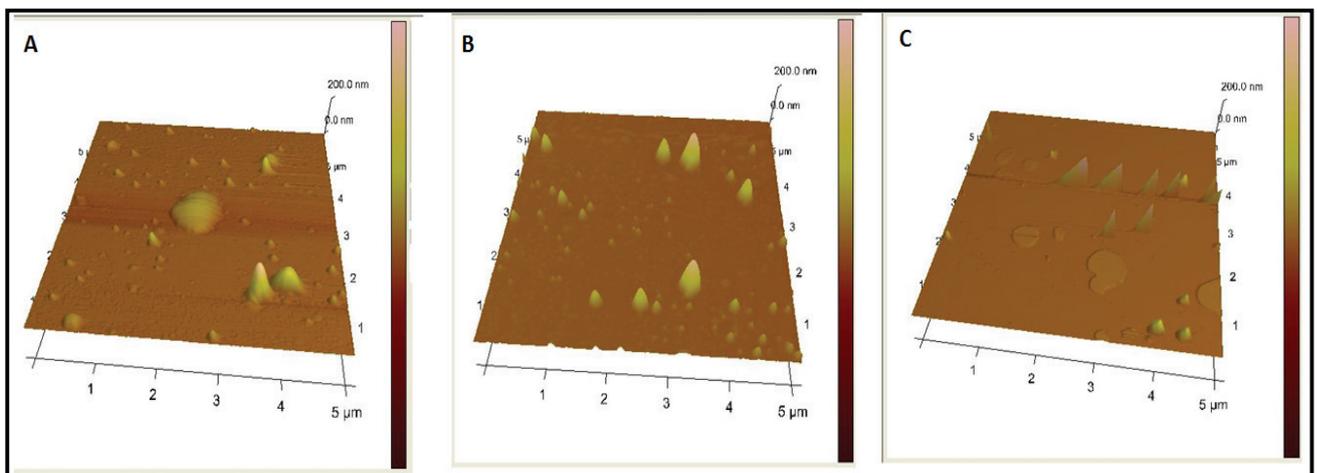


Figure 65 : Images tridimensionnelles obtenues par AFM, (A) : lot 4 (phospholipides/Cho/érythrodiol 5,75/5/0), (B) : lot 5 (phospholipides/Cho/érythrodiol 5,75/4,5/0,5) et (C) : lot 6 (phospholipides/Cho/érythrodiol 5,75/3,8/1,2). Les 3 images sont enregistrées sur une région de 5 μm x 5 μm. L'échelle de couleur à droite de l'image correspond à la hauteur des vésicules en nm (la hauteur diminue de haut en bas).

Pour chaque lot, les images montrent des vésicules de hauteur variant entre 25 et 150 nm.

Trois populations presque équiprobables sont présentes: une première qui contient des vésicules aplaties dont la hauteur varie de 25 à 30 nm, une deuxième de hauteur moyenne entre 40 et 80 nm et une troisième population dont la hauteur est supérieure à 100 nm. Il existe deux raisons qui expliquent la variabilité de la hauteur des vésicules adsorbées : premièrement, durant le balayage, les vésicules adsorbées sur la surface peuvent se déplacer, et deuxièmement, les

liposomes sont des objets mous et sont susceptibles d'être déformés par la pointe lors de l'imagerie. L'érythrodiol ne semble pas avoir un effet sur la hauteur des liposomes.

Pour conclure, les vésicules témoins restent intactes et existent toujours sur la surface du mica même à la fin du balayage (après plus de 2 heures). La présence de l'érythrodiol semble accélérer la formation des bicouches lipidiques. Le diamètre des liposomes diminue en présence de l'érythrodiol mais la hauteur ne varie pas.

6.6 Etude de la perméabilité membranaire en absence et en présence de la Cuc E – Cinétique de libération de la SRB

L'étude de la perméabilité membranaire a été réalisée avec les lots 7 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/5/0) et 8 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/3,8/1,2) qui sont des LUV encapsulant la SRB. La variation de la fluorescence des suspensions liposomiales diluées 300 fois avec du tampon Tris-HCl (0,1 M pH 7,4) a été suivie à 4 et 37°C. Avant incubation à 4 et 37°C, la fluorescence à t_0 (F_0) a été mesurée et est considérée comme la fluorescence minimale.

Au temps t_0 , le rapport $F_0/F_{max} \times 100$ pour les suspensions liposomiales des lots 7 et 8 est inférieur à 5%.

Pour évaluer la perméabilité des liposomes en fonction du temps, la fluorescence (F_t) au temps t est mesurée et le rapport $(F_t - F_0)/F_{max} \times 100$ est calculé (Sroda et al. 2008). F_{max} est la fluorescence maximale obtenue après lyse totale des liposomes par le Triton X100 (1%) et libération de tout leur contenu en SRB.

A 4°C, les liposomes des lots 7 et 8 sont stables. Leurs rapports $(F_t - F_0)/F_{max} \times 100$, ne dépassent pas 4% après 6 jours (figure 66).

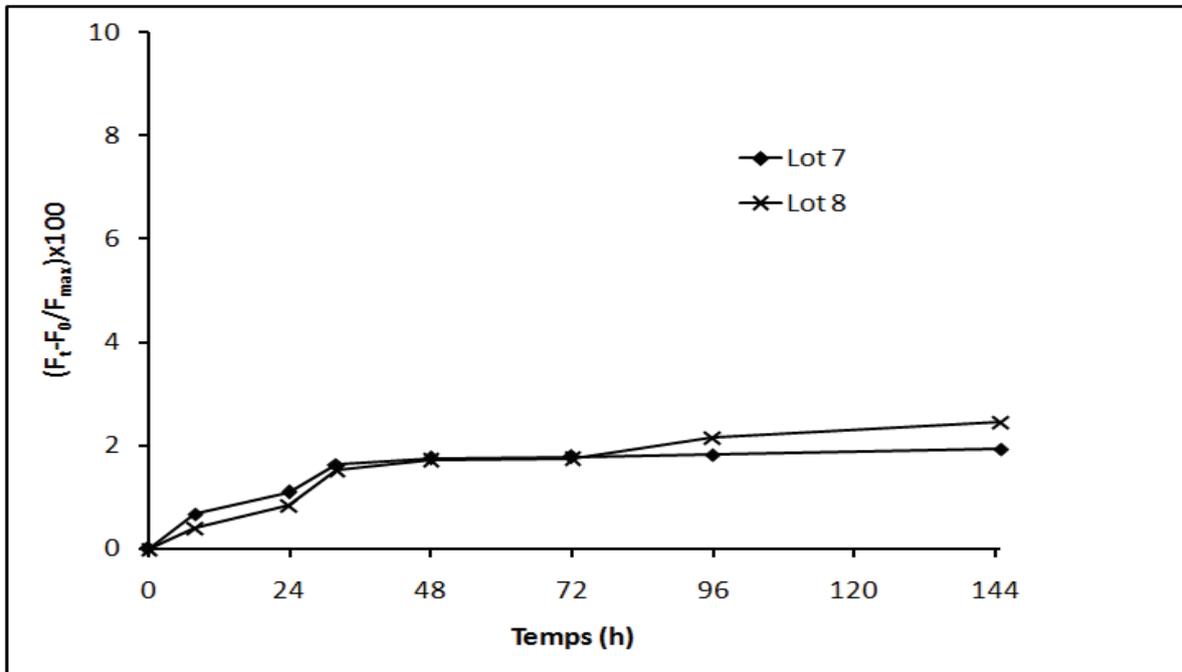


Figure 66 : Variation de la fluorescence en fonction du temps des suspensions liposomiales du lot 7 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/5/0) et du lot 8 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/3,8/1,2) à 4°C. F_t est la fluorescence intrinsèque de la suspension au temps t , F_0 est la fluorescence initiale mesurée au temps t_0 et F_{max} est la fluorescence maximale obtenue en présence du détergent non ionique, le Triton X-100 (1%).

A 37°C, la cinétique de libération de la SRB à partir des liposomes avec Cuc E (lot 8) est plus rapide que celle des liposomes témoins (lot 7) (figure 67). La libération de la SRB est claire dès le premier jour de la cinétique. $(F_t - F_0)/F_{max} \times 100$ atteint 40,38% après 8 jours pour le lot 8 alors que durant ce temps, ce rapport ne dépasse pas 17% pour le lot 7 (figure 67).

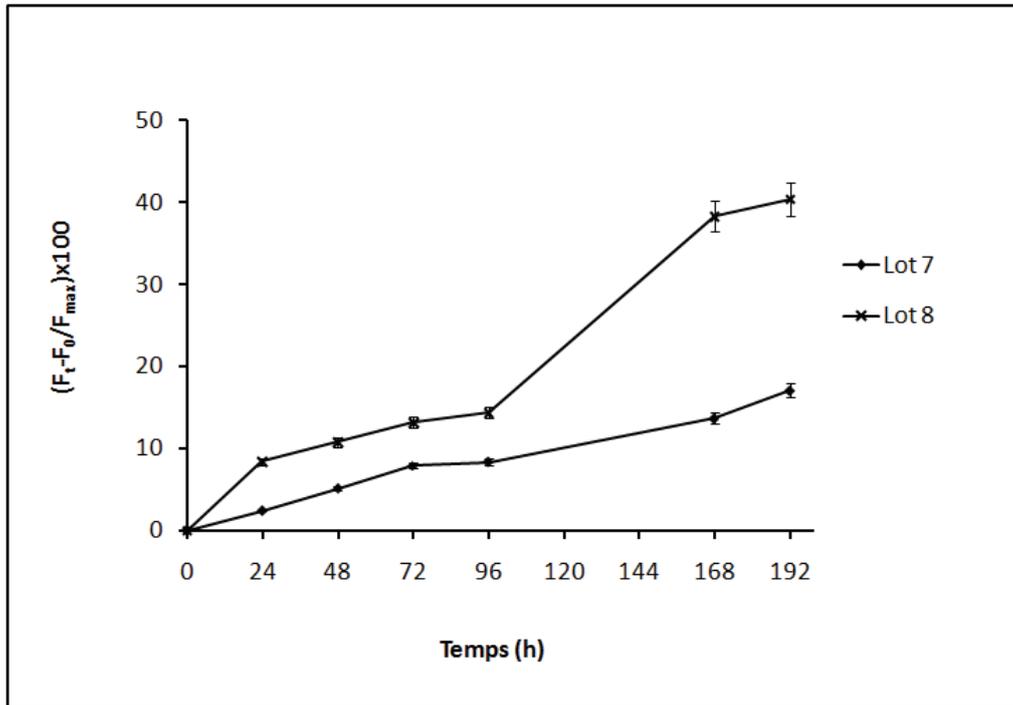


Figure 67 : Variation de la fluorescence en fonction du temps des suspensions liposomiales du lot 7 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/5/0) et du lot 8 (phospholipides/Cho/Cuc E 5,75/3,8/1,2) à 37°C. F_t est la fluorescence intrinsèque de la suspension au temps t , F_0 est la fluorescence initiale mesurée au temps t_0 et F_{max} est la fluorescence maximale obtenue en présence du détergent non ionique, le Triton X-100 (1%).

Les LUV sont largement utilisés pour encapsuler des fluorophores dans le compartiment aqueux, dans les études de la perméabilité membranaire (Chen et al. 2012, Ding et al. 2005, Khreich et al. 2008). Les liposomes témoins (lot 7) sont stables à 4°C, ce qui est en accord avec la littérature (Laouini et al. 2011, Singh et al. 2000). De plus, la cinétique de libération de la SRB est similaire pour les liposomes témoins (lot 7) et les liposomes avec Cuc E (lot 8), ce qui signifie que la Cuc E à cette température ne perméabilise pas les liposomes. Alors qu'à 37°C, la cinétique de libération de la SRB est plus rapide en présence de la Cuc E, ce qui indique que la Cuc E à cette température perméabilise la membrane liposomiale.

En comparaison avec d'autres études, certaines ont démontré une cinétique plus rapide de libération de la calcéine à partir des liposomes formés uniquement de DPPC. Par exemple, Chen et al. (2012), ont montré que la libération de la calcéine à 37°C, à partir des liposomes de DPPC, atteint 28% après 1h et arrive à 40% après 10 jours. En outre, Ding et al. (2005) ont montré que 28% de la calcéine sont libérés après 2 h à 37°C, ce pourcentage atteint 48% après 2 jours. Dans notre étude, la cinétique de libération de la SRB à partir des liposomes témoins (lot 7) est plus lente. Ceci peut être principalement dû à la différence dans la composition des liposomes. En effet, les liposomes témoins sont préparés dans cette étude d'un mélange de DPPC, DPPG, DPPE et du cholestérol alors que dans les études précédentes, le DPPC entre uniquement dans la formulation des liposomes.

En comparaison avec d'autres molécules, l'acide oléanolique et l'acide ursolique stabilisent la membrane liposomiale. La libération de la calcéine est réduite en leur présence à 25 et 42°C (Han et al. 1997). Il en résulte que les triterpènes pentacycliques ayant deux fonctions oxygénées de part et d'autre du noyau pentacyclique, se localisent d'une manière différente de la Cuc E qui possède trois fonctions oxygénées sur la chaîne latérale et trois autres sur le noyau tétracyclique. Ces résultats rejoignent ceux obtenus par DSC dans la mesure où les deux structures ont un comportement différent envers les bicouches lipidiques.

D'autre part, les oxystérols qui sont des dérivés endogènes du cholestérol avec une fonction oxygénée supplémentaire soit sur la chaîne latérale, soit sur le noyau stéroïde (Olkkonen and Hynynen 2009, Massey and Pownall 2006) ressemblent structurellement à la Cuc E. Les oxystérols ayant un groupement oxygéné sur le noyau stéroïde adoptent une orientation inclinée en orientant les deux groupements oxygénés (avec OH en C3) vers la surface polaire de la

bicouche lipidique, ce qui favorise un désordre au niveau de l'arrangement des phospholipides. Ils montrent un effet condensant moins important que le cholestérol (Massy and Pownall 2006). L'effet perméabilisant exercé par la Cuc E sur la membrane lipidique à 37°C peut être dû à un positionnement incliné de la Cuc E à l'interface de la membrane de façon similaire aux oxystérols ou tout simplement à l'interaction des fonctions oxygénées de la Cuc E avec les têtes polaires des phospholipides réduisant ainsi l'arrangement ordonné de ces molécules amphiphiles.

Conclusion et perspectives

La Cuc E et l'érythrodiol sont des triterpènes naturels auxquels sont largement exposés les êtres humains dans la vie quotidienne, principalement par la nourriture. Nous avons étudié dans ce travail, leur interaction avec les membranes des vésicules lipidiques par des techniques adéquates.

Nous avons préparé des MLV par la méthode d'hydratation du film lipidique, des LUV par la méthode d'évaporation en phase inverse suivie d'extrusion et des liposomes par injection d'éthanol. Chaque type de liposomes a été préparé en absence et en présence de la Cuc E ou de l'érythrodiol.

Les images obtenues par TEM ont confirmé la formation de vésicules sphériques unilamellaires pour les liposomes témoins, les liposomes avec Cuc E et ceux avec érythrodiol préparés par évaporation en phase inverse suivie d'extrusion. Les images obtenues par TEM pour les liposomes préparés par injection d'éthanol sans et avec érythrodiol ont montré la formation de vésicules sphériques oligolamellaires.

Le taux d'incorporation de ces molécules dans les liposomes a été déterminé par HPLC. Nos résultats ont montré que le taux d'incorporation de la Cuc E dans les LUV et dans les MLV, est respectivement égal à 85 et 98%. Celui de l'érythrodiol dans les liposomes préparés par injection d'éthanol est supérieur à 90%. Ceci démontre une haute interaction entre ces molécules et les vésicules liposomiales.

La mesure de taille des liposomes déterminée par DLS a montré que l'incorporation de la Cuc E ou de l'érythrodiol dans la composition des LUV provoque une diminution de leur taille. Ceci implique que ces triterpènes sont capables de moduler l'arrangement des molécules lipidiques lors de la formation ou de l'extrusion des vésicules liposomiales. L'effet de l'érythrodiol sur la taille des liposomes n'a pas été obtenu lorsque ceux-ci ont été préparés par injection d'éthanol. Les caractéristiques physiques comme la taille et la lamellarité des liposomes diffèrent selon la technique de préparation. Ceci implique que pour comparer l'effet de différentes molécules, la même technique doit être utilisée.

Par ailleurs, les analyses réalisées par DSC ont montré que la Cuc E ou l'érythrodiol interagissent avec les parties polaires de la bicouche lipidique du fait de la disparition du pic de pré-transition en présence de l'une ou l'autre molécule. Cependant, l'effet des deux molécules sur la transition de phase des phospholipides a été différent. En présence de la Cuc E, la température de transition n'est pas affectée. L'apparition du pic supplémentaire avec un taux de 12% de la Cuc E, montre que cette molécule induit la formation de domaines hétérogènes, mais cet effet n'est pas continu parce qu'à un taux supérieur (24%), la transition n'est pas affectée davantage. En présence de l'érythrodiol (17 et 34%), le pic de transition a montré deux transitions, ce qui indique une séparation de phase. De plus, les courbes thermiques ont révélé une diminution notable de l'enthalpie de transition pour les liposomes incorporant les deux triterpènes par rapport aux liposomes témoins, ce qui reflète une perturbation de l'arrangement des phospholipides.

Le comportement thermique de la bicouche lipidique, permet de conclure sur la localisation de la Cuc E ou de l'érythrodiol au niveau membranaire. Il apparaît que la Cuc E est localisée à l'interface polaire-apolaire de la bicouche et ne s'incorpore pas dans la membrane. Tandis que l'érythrodiol s'insère entre les chaînes des phospholipides en créant des domaines riches et d'autres pauvres en érythrodiol.

Les images obtenues par AFM ont montré la formation de vésicules de forme sphérique. Les mesures de taille réalisées par cette technique ont confirmé les résultats obtenus par DLS quant à la diminution de la taille en présence de la Cuc E ou de l'érythrodiol. Les mesures de la hauteur des liposomes ont révélé que les liposomes avec Cuc E sont plus hauts et plus résistants à la force exercée par la pointe AFM que les liposomes témoins, ce qui n'était pas le cas avec les liposomes contenant l'érythrodiol. En effet l'érythrodiol ne semblait pas induire une modification de la hauteur des liposomes.

Par ailleurs, un phénomène remarquable est décelé par analyse des images AFM des liposomes témoins et contenant l'un ou l'autre des deux triterpènes. En effet, l'érythrodiol a provoqué une déstabilisation des vésicules qui paraissaient instables sur la surface du mica et s'éclataient en bicouches lipidiques. Alors que les vésicules témoins et incorporant la Cuc E paraissaient plus stables à la surface du mica. De plus, la Cuc E semble induire un effet de stabilisation de la membrane. Les vésicules incorporant la Cuc E s'adsorbaient correctement sur la surface du mica

et présentait un aspect conique et pointu sur la surface. Les images AFM rejoignent les résultats obtenus par DSC suggérant une interaction différente des deux molécules au niveau membranaire.

La cinétique de libération de la sulforhodamine B incorporée dans la phase aqueuse interne des LUV, mesurée par la spectroscopie de fluorescence a permis d'étudier l'effet de la Cuc E sur la perméabilité membranaire. Les résultats obtenus ont révélé une stabilité des liposomes à 4°C et une déstabilisation en présence de la Cuc E à 37°C. L'étude de la perméabilité des liposomes incorporant l'érythrodiol reste à réaliser puisque les résultats obtenus par AFM et DSC supposent un effet de déstabilisation membranaire causé par l'érythrodiol.

En conclusion, tous ces résultats impliquent que la Cuc E et l'érythrodiol interagissent avec la membrane liposomiale et affectent ses propriétés physicochimiques. Leur effet sur la membrane ne semble pas être identique. La structure hautement oxygénée de la Cuc E empêche son insertion profonde dans la bicouche. Alors que les deux fonctions alcool de part et d'autre du noyau pentacyclique de l'érythrodiol ne l'empêchent pas de s'insérer dans la membrane et de perturber sa structure.

Des techniques structurales complémentaires peuvent être envisagées ultérieurement afin d'identifier les groupements fonctionnels de la Cuc E et de l'érythrodiol impliqués dans l'interaction avec des groupements définis des phospholipides et du cholestérol membranaires comme la diffraction des rayons X, la résonance magnétique nucléaire et la spectroscopie infrarouge.

De plus, des études impliquant d'autres triterpènes sont envisagées afin d'identifier le (s) motif (s) structural (aux) et les paramètres physico-chimiques régissant leur interaction membranaire.

Les résultats de l'étude du métabolisme des cucurbitacines réalisée en collaboration entre l'UMR 7561 CNRS - Université Henri Poincaré Nancy I et notre équipe portant sur le métabolisme des cucurbitacines, ont confirmé que les voies de métabolisation des cucurbitacines dépendent de leurs structures (Abbas et al. 2013). C'est ainsi que les cucurbitacines ne sont pas de bons substrats des UDP-glucuronosyl transférases qui sont des enzymes membranaires. Les résultats issus de notre thèse expliqueraient en partie la faible glucuronoconjugaison des cucurbitacines.

En outre, l'étude du passage membranaire de ces mêmes molécules et l'étude de leurs effets sur le passage d'autres seraient importantes dans la mesure où de nombreuses molécules de nature triterpénique sont capables d'affecter la perméabilité membranaire.

Nos résultats prouvent également que les liposomes peuvent être un système de vectorisation de la Cuc E. Ainsi, il serait possible de tester *in vitro et in vivo*, l'activité biologique de la Cuc E sous forme encapsulée et de la comparer avec celle de la Cuc E libre. Pour cela, il est nécessaire au préalable d'étudier la stabilité physique des liposomes et la cinétique de libération des molécules encapsulées dans des conditions biologiques et biomimétiques bien déterminées.

Références

- Abbas S, Vincourt JB, Habib L, Netter P, Greige-Gerges H, Magdalou J, 2013. The cucurbitacins E, D and I: Investigation of their cytotoxicity toward human chondrosarcoma SW 1353 cell line and their biotransformation in man liver. *Toxicology Letters* 216, 189-199.
- Abdelwahab SI, Hassan LEA, Sirat HM, Yagi SMA, Koko WS, Mohan S, Taha MME, Ahmad S, Chuen CS, Narrima P, Rais MM, 2011. Anti-inflammatory activities of cucurbitacin E isolated from *Citrullus lanatus* var. *citroides*: Role of reactive nitrogen species and cyclooxygenase enzyme inhibition. *Fitoterapia* 8, 1190-1197.
- Abeywardena M, Allen T, Charnock J, 1983. Lipid-protein interactions of reconstituted membrane-associated adenosinetriphosphatases. Use of a gel-filtration procedure to examine phospholipid-activity relationships. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* 729, 62-74.
- Aburai K, Yagi N, Yokoyama Y, Okuno H, Sakai K, Sakai H, Sakamoto K, Abe M, 2011. Preparation of liposomes modified with lipopeptides using a supercritical carbon-dioxide reverse phase evaporation method. *Journal of Oleo Science* 60, 209-215.
- Agil A, Miró M, Jimenez J, Aneiros J, Caracuel MD, García-Granados A, Navarro MC, 1999. Isolation of anti-hepatotoxic principle from the juice of *Ecballium elaterium*. *Planta Medica* 65, 673-675.
- Akbarzadeh A, Sadabady RR, Daaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, Samiei M, Kouhi M, Nejati-Koshki K, 2013. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters* 8, 102-110.
- Albi T, Lanzon A, Navas MA, 1986. Quantitative-determination of erythrodiol in oils by gas-chromatography with semi capillary columns (wide bore capillary). *Grasas y Aceites* 37, 277-281.

- Allouche Y, Beltran G, Gaforio JJ, Uceda M, Mesa DM, 2010. Antioxidant and antiatherogenic activities of pentacyclic triterpenic diols and acids. *Food and Chemical Toxicology* 48, 2885-2890.
- Anabousi S, Laue M, Lehr CM, Bakowsky U, Ehrhardt C, 2005. Assessing transferrin modification of liposomes by atomic force microscopy and transmission electron microscopy, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 60, 295-303.
- Anderson M, and Omri A, 2004. The effect of different lipid components on the in-vitro stability and release kinetics of liposomes formulations. *Drug Delivery* 11, 33-39.
- Arcadio C, and Cullis PR, 1995. Recent advances in liposomal drug-delivery systems. *Current Opinion in Biotechnology* 6, 698-708.
- Attard E, Brincat MP, Cushieri A, 2005. Immunomodulatory activity of cucurbitacin E isolated from *Ecballium elateium*. *Fitoterapia* 76, 439-441.
- Bakowsky H, Richter T, Kneuer C, Hoekstra D, Rothe U, Bendas G, Ehrhardt C, Bakowsky U, 2008. Adhesion characteristics and stability assessment of lectin-modified liposomes for site-specific drug delivery. *Biochimica et Biophysica Acta* 1778, 242-249.
- Balliano G, Caputo O, Viola F, Delprino L, Cattel L, 1983a. Cyclization of squalene-2,3-epoxide to 10α -cucurbita-5,24-dien- 3β -ol by microsomes from *cucurbita maxima* seedlings. *Phytochemistry* 22, 915-921.
- Balliano G, Caputo O, Viola F, Delprino L, Cattel L, 1983b. The transformation of 10α -cucurbita-5,24-dien- 3β -ol into cucurbitacin C by seedlings of *cucumis sativus*. *Phytochemistry* 22, 909-913.
- Bangham AD, Standish MM, Watkins JC, 1965. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology* 13, 238-252.
- Bangham AD, Standish MM, Watkins JC, Weissmann G, 1967. The diffusion of ions from a phospholipid model membrane system. *Protoplasma* 63, 183-187.

- Barenholz Y, Bombelli C, Bonicelli MG, di Profio P, Giansanti L, Mancini G, Pascale F, 2011. Influence of lipid composition on the thermotropic behavior and size distribution of mixed cationic liposomes. *Journal of Colloid and Interface Science* 356, 46-53.
- Bartalis J, and Halaweish FT, 2005. Relationship between cucurbitacins reverse-phase high performance liquid chromatography hydrophobicity index and basal cytotoxicity on HepG2 cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 818, 159-166.
- Bartalis J, and Halaweish FT, 2011. In vitro studies of cucurbitacins on HepG2 and HSCT6 liver cell lines. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 19, 2757-2766.
- Bartlett G, 1959. Phosphorus assay in column chromatography. *Journal of Biological Chemistry* 234, 466-468.
- Bendas G, Krause A, Bakowsky U, Vogel J, Rothe U, 1999. Targetability of novel immunoliposomes prepared by a new antibody conjugation technique. *International Journal of Pharmaceutics* 181, 79-93.
- Berg OG, Gelb MH, Tsai MD, Jain MK, 2001. Interfacial enzymology: the secreted phospholipase A(2)-paradigm. *Chemical Reviews* 101, 2613-2654.
- Berger N, Sachse A, Bender J, Schubert R, Brandl M, 2001. Filter extrusion of liposomes using different devices: comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics. *International Journal of Pharmaceutics* 223, 55-68.
- Berquand A, Fa N, Dufrêne YF, Mingeot-Leclercq MP, 2005. Interaction of the macrolide antibiotic azithromycin with lipid bilayers: Effect on membrane organization, fluidity, and permeability. *Pharmaceutical Research* 22, 465-475.
- Bertrand P, Jonas A, Laschewsky A, Legras R, 2000. Ultrathin polymer coatings by complexation of polyelectrolytes at interfaces: suitable materials, structure and properties. *Macromolecular Rapid Communications* 21, 319-348.

- Bhardwaj U, and Burgess D, 2010. Physicochemical properties of extruded and non-extruded liposomes containing the hydrophobic drug dexamethasone. *International Journal of Pharmaceutics* 388, 181-189.
- Bibi S, Kaur R, Henriksen-Lacey M, McNeil S, Wilkhu J, Lattmann E, Christensen D, Mohammed A, Perrie Y, 2011. Microscopy imaging of liposomes: From coverslips to environmental SEM. *International Journal of Pharmaceutics* 417, 138-150.
- Biltonen RL, 1990. A statistical-thermodynamic view of cooperative structural changes in phospholipid bilayer membranes: their potential role in biological function. *Journal of Chemical Thermodynamics* 22, 1-19.
- Biruss B, Dietl R, Valenta C, 2007. The influence of selected steroid hormones on the physicochemical behavior of DPPC liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids* 148, 84-90.
- Bjorkhem I, and Diczfalusy U, 2002. Oxysterols: friends, foes, or just fellow passengers? *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 22, 734-742.
- Blaskovich MA, Sun J, Cantor A, Turkson J, Jove R, Sefti S, 2003. Discovery of JSI-124 (Cucurbitacin I), a selective Janus Kinase/Signal Transducer and Activator Transcription 3 signaling pathway inhibitor with potent antitumor activity against human and murine cancer cells in mice. *Cancer Research* 63, 1270-1279.
- Bridson RH, Santos RCD, Al-Duri B, McAllister SM, Robertson J, Alpar HO, 2006. The preparation of liposomes using compressed carbon dioxide: strategies, important considerations and comparison with conventional techniques. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 58, 775-785.
- Cans AS, Wittenberg N, Karlsson R, Sombers L, Karlsson M, Orwar O, Ewing A, 2003. Artificial cells: Unique insights into exocytosis using liposomes and lipid nanotubes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 400-404.
- Castangia I, Manca M, Matricardi P, Sinico C, Lampis S, Fernandez-Busquets X, Fadda A, Manconi M, 2013. Effect of diclofenac and glycol intercalation on structural assembly of phospholipid lamellar vesicles. *International Journal of Pharmaceutics* 456, 1-9.

- Caudron E, Zhou JY, England P, Ollivon M, Prognon P, 2007. Some insights about 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene-lipid supramolecular assemblies by steady-state fluorescence measurements. *Applied Spectroscopy* 61, 963-969.
- Chang CJ, Chiang CH, Song WS, Tsai SK, Woung LC, Chang CH, Jeng SY, Tsai CY, Hsu CC, Lee HF, Huang CS, Yung MC, Liu JH, Lu KH, 2012. Inhibition of phosphorylated STAT3 by cucurbitacin I enhances chemoradiosensitivity in medulloblastoma-derived cancer stem cells. *Childs Nervous System* 28, 363-373.
- Chen J, Cheng D, Li J, Wang Y, Guo JX, Chen ZP, Cai BC, Yang T, 2012. Influence of lipid composition on the phase transition temperature of liposomes composed of both DPPC and HSPC. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 39, 197-204.
- Chen J, Chiu M, Nie R, Cordell G, Qiu S, 2005. Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities. *Natural Product Reports* 22, 386-399.
- Chetanachan P, Akarachalanon P, Worawirunwong D, Dararutana P, Bangtrakulnonth A, Bunjop M, Kongmuang S, 2008. Ultrastructural characterization of liposomes using transmission electron microscope. *Advanced Materials Research* 55-57, 709-711.
- Chrai S, Murari R, Ahmad I, 2002. Liposomes: A Review. *Biopharm* 14, 10-14.
- Ciolkowski M, Rozanek M, Szewczyk M, Klajnert B, Bryszewska M, 2011. The influence of PAMAM-OH dendrimers on the activity of human erythrocytes ATPases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1808, 2714-2723.
- Cong W, Liu Q, Liang Q, Wang Y, Luo G. 2009. Investigation on the interactions between pirarubicin and phospholipids. *Biophysical Chemistry* 143, 154-160.
- Crommelin DJA, and van Brommel EMG, 1984. Stability of liposomes on storage: Freeze dried, frozen or as an aqueous dispersion. *Pharmaceutical Research* 1, 159-163.
- De Gier J, Mandersloot JG, Van Deenen LLM, 1968. Lipid Composition and Permeability of Liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta* 822, 666-675.

- De Rosa G, De Stefano M, Ungaro F, La Rotond MI, 2008. Cold field emission gun-scanning electron microscopy: A new tool for morphological and ultrastructural analysis of liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* 362, 189-192.
- Degenhardt J, Köllner TG, Gershenzon J, 2009. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry* 70, 1621-1637.
- Dekkiche F, Corneci MC, Trunfio-Sfarghiu AM, Munteanu B, Berthier Y, Kaabar W, Rieu JP, 2010. Stability and tribological performances of fluid phospholipid bilayers: Effect of buffer and ions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 80, 232-239.
- Delporte C, Muñoz O, Rojas J, Ferrándiz M, Payá M, Erazo S, Negrete R, Maldonado S, San Feliciano A, Backhouse N, 2002. Pharmaco-Toxicological Study of *Kageneckia oblonga*, Rosaceae. *Zeitschrift für Naturforschung* 57, 100-108.
- Demetzos C, 2008. Differential scanning calorimetry (DSC), a tool to study the thermal behavior of lipid bilayers and liposomal stability. *Journal of Liposome Research* 18, 159-173.
- Detoni CB, Cabral-Albuquerque ECM, Hohlemweger SVA, Sampaio C, Barros TF, Velozo ES, 2009. Essential oil from *Zanthoxylum tingoassuiba* loaded into multilamellar liposomes useful as antimicrobial agents. *Journal of Microencapsulation* 26, 684-691.
- Dinan L, Whiting P, Girault JP, Lafont R, Dhadialla TS, Cress DE, Mugat B, Antoniewski C, Lepesant JA, 1997. Cucurbitacins are insect steroid hormone antagonists acting at the ecdysteroid receptor. *Biochemical Journal* 327, 643-650.
- Ding W-x, Qi X-r, Li P, Maitani Y, Nagai T, 2005. Cholesteryl hemisuccinate as a membrane stabilizer in dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes containing saikosaponin-d. *International Journal of Pharmaceutics* 300, 38-47.
- Dirr HW, Schabert JC, Weitz C, 1986. Cucurbitacin Δ^{23} -reductase from the fruit of *Cucurbita maxima* var. Green Hubbard. Physicochemical and fluorescence properties and enzyme-ligand Interactions. *Biochemical Journal* 233, 649-653.
- Domenech O, Francius G, Tulkens P, Van Bambeke F, Dufrêne Y, Mingeot-Leclercq MP, 2009. Interactions of oritavancin, a new lipoglycopeptide derived from vancomycin, with

- phospholipid bilayers: Effect on membrane permeability and nanoscale lipid membrane organization. *Biochimica et Biophysica Acta* 1788, 1832-1840.
- Dragicevic-Curica N, Scheglmann D, Albrecht V, Fahr A, 2009. Development of different temoporfin-loaded invasomes-novel nanocarriers of temoporfin: Characterization, stability and in vitro skin penetration studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 70, 198-206.
- Drummond DC, Meyer O, Hong K, Kirpotin DB, Papahadjopoulos D, 1999. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacological Reviews* 51, 691-723.
- Dua JS, Rana AC, Bhandari AK, 2012. Liposome: Methods of preparation and applications. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research* 3, 14-20.
- Dufrêne YF, and Lee GU, 2000. Advances in the characterization of supported lipid films with the atomic force microscope. *Biochimica et Biophysica Acta* 1509, 14-41.
- Duncan KKK, Duncan MDD, Alley MC, Sausville EA, 1996. Cucurbitacin E-induced disruption of the actin and vimentin cytoskeleton in prostate carcinoma cells. *Biochemical Pharmacology* 52, 1553-1560.
- Düzgüneş N, and Nir S, 1999. Mechanisms and kinetics of liposome-cell interactions. *Advanced Drug Delivery Reviews* 40, 3-18.
- Düzgüneş N, Faneca H, Lima MC, 2010. Methods to monitor liposome fusion, permeability, and interaction with cells. *Methods in Molecular Biology* 606, 209-232.
- Edwards K, Johnsson M, Silvadner M, Karlsson G, 1997. Effect of polyethyleneglycol-phospholipids on aggregate structure in preparations of small unilamellar liposomes. *Biophysical Journal* 73, 258-266.
- Egawa H, and Furusawa K, 1999. Liposome adhesion on mica surface studied by atomic force microscopy. *Langmuir* 15, 1660-1666.

- Egerdie B, and Singer M, 1982. Morphology of gel state phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine liposomes: A negative stain electron microscopic study. *Chemistry and Physics of lipids* 31, 75-85.
- El Maghraby GM, Williams AC, Barry BW, 2005. Drug interaction and location in liposomes: correlation with polar surface areas. *International Journal of Pharmaceutics* 292, 179-185.
- Elhissi AMA, O'Neill MAA, Roberts SA, Taylor KMG, 2006. A calorimetric study of dimyristoylphosphatidylcholine phase transitions and steroid-liposome interactions for liposomes prepared by thin film and proliposome methods. *International Journal of Pharmaceutics* 320, 124-130.
- Fan M, Xu S, Xia S, Zhang X, 2007. Effect of different preparation methods on physicochemical properties of salidroside liposomes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 3089-3095.
- Fukushima EO, Seki H, Ohyama K, Ono E, Umemoto N, Mizutani M, Saito K and Muranaka T, 2011. CYP716A subfamily members are multifunctional oxidases in triterpenoid biosynthesis. *Plant and Cell Physiology* 52, 2050-2061.
- Gao D, Tang S, Tong Q, 2012. Oleanolic acid liposomes with polyethylene glycol modification: promising antitumor drug delivery. *International Journal of Nanomedicine* 7, 3517-3526.
- Gentine P, Bubel A, Crucifix C, Bourel-Bonnet L, Frisch B, 2012. Manufacture of liposomes by isopropanol injection: characterization of the method. *Journal of Liposome Research* 22, 18-30.
- Ghanbarzadeh S, Valizadeh H, Zakeri-Milani P, 2013. The effects of lyophilization on the physico-chemical stability of sirolimus liposomes. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 3, 25-29.
- Glavas-Dodova M, Fredro-Kumbaradzi E, Goracinova K, Simonoska M, Calis S, Trajkovic-Jolevska S, Hincal AA, 2005. The effects of lyophilization on the stability of liposomes containing 5-FU. *International Journal of Pharmaceutics* 291, 79-86.
- Gregoriadis G, 1973. Drug entrapment in liposomes. *FEBS Letters* 36, 292-296.

- Gregoriadis G, Leathwood PD, Ryman BE, 1971. Enzyme entrapment in liposomes. *FEBS Letters* 14, 95-99.
- Greige-Gerges H, Abou Khalil R, Chahine R, Haddad C, Harb W, Ouaini N, 2007b. Effect of cucurbitacins on bilirubin-albumin binding in human plasma. *Life Sciences* 80, 579-585.
- Greige-Gerges H, Abou Khalil R, Mansour E, Magdalou J, Chahine R, Ouaini N, 2007a. Cucurbitacins from *Ecballium elaterium* juice increase the binding of bilirubin and ibuprofen to albumin in human plasma. *Chemico-Biological Interactions* 169, 53-62.
- Grit M, de Smidt JH, Struijke A, Crommelin DJA, 1989. Hydrolysis of phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions. *International Journal of Pharmaceutics* 50, 1-6.
- Gry J, Søbørg I, Andersson HC, 2006. Cucurbitacins in food plants. *TemaNord* 556, 9-67.
- Gulati M, Grover M, Singh S, Singh M, 1998. Lipophilic drug derivatives in liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* 165, 129-168.
- Hamilton RL Jr, Goerke J, Guo LS, Williams MC, Havel RJ, 1980. Unilamellar liposomes made with the French pressure cell: a simple preparative and semiquantitative technique. *Journal of Lipid Research* 21, 981-992.
- Hamimed S, 2009. Caractérisation chimique des principes à effet antidermatophyte des racines d'*Anacyclus pyrethrum* L. Thèse de magister, Université Mentouri Constantine, Faculté des Sciences Exactes, Département de Chimie, p. 27-28.
- Han SK, Ko YI, Park SJ, Jin IJ, Kim YM, 1997. Oleanolic acid and ursolic acid stabilize liposomal membrane. *Lipids* 32, 769-773.
- Harris FM, Best KB, Bell JD, 2002. Use of Laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order. *Biochimica et Biophysica Acta* 1565, 123-128.
- Heimburg T, 2000. A model for the lipid pretransition: coupling of ripple formation with the chain-melting transition. *Biophysical Journal* 78, 1154-1165.

- Henry CR, 2005. Morphology of supported nanoparticles. *Progress in Surface Sciences* 80, 92-116.
- Herrera J, and Sakulchaicharoen N, 2009. Microscopic and spectroscopic characterization of nanoparticles. Chapter 14 in *Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization*, First Edition, Informa Healthcare, pp. 237-240.
- Hill R, and Connolly J, 2012. Triterpenoids. *Natural Product Reports* 29, 780-818.
- Höfer C, Herrmann A, Müller P, 2010. Use of liposomes for studying interactions of soluble proteins with cellular membranes. V. Weissig (ed.), *Liposomes: Methods and Protocols*, vol 2: Biological Membrane Models, *Methods in Molecular Biology*, vol. 606, pp. 69-82.
- Hong JS, Vreeland WN, De Paoli Lacerda SH, Locascio LE, Michael Gaitan M, Srinivasa SR, 2008. Liposome-templated supramolecular assembly of responsive alginate nanogels. *Langmuir* 24, 4092-4096.
- Hosny K, 2010. Ciprofloxacin as ocular liposomal hydrogel. *American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech* 11, 241-246.
- Hou G, Niu J, Song F, Liu Z, Liu S, 2013. Studies on the interaction between ginsenosides and liposomes by equilibrium dialysis combined with ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 923-924, 1-7.
- Hu H, Liu D, Zhao X, Qiao M, Chen D, 2013. Preparation, characterization, cellular uptake and evaluation in vivo of solid lipid nanoparticles loaded with cucurbitacin B. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 39, 770-779.
- Hu M, Konoki K, Tachibana K, 1996. Cholesterol-independent membrane disruption caused by triterpenoid saponins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1299, 252-258.
- Huang JY, Buboltz JT, Feigenson GW, 1999. Maximum solubility of cholesterol in phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1417, 89-100.

- Hunter R, Midmore B, Zhang H, 2001. Zeta potential of highly charged thin double-layer systems. *Journal of Colloid and Interface Science* 237, 147-149.
- Huwylar J, Wu D, Pardridge W, 1996. Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 14164-14169.
- Immordino ML, Dosio F, Cattell L, 2006. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *International Journal of Nanomedicine* 1, 297-315.
- Imura T, Gotoh T, Otake K, Yoda S, Takebayashi Y, Yokoyama S, Takebayashi H, Sakai H, Yuasa M, Abe M, 2003. Control of physicochemical properties of liposomes using a supercritical reverse phase evaporation method. *Langmuir* 19, 2021-2025.
- Imura T, Otake K, Hashimoto S, Gotoh T, Yuasa M, Yokoyama S, Sakai H, Rathman JF, Abe M, 2002. Preparation and physicochemical properties of various soybean lecithin liposomes using supercritical reverse phase evaporation method. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 27, 133-140.
- Jaafar-Maalej C, Diab R, Andrieu V, Elaissari A, Fessi H, 2010. Ethanol injection method for hydrophilic and lipophilic drug-loaded liposome preparation. *Journal of Liposome Research* 20, 228-243.
- Jahn A, Vreeland WN, DeVoe DL, Locascio LE, Gaitan M, 2007. Microfluidic directed formation of liposomes of controlled size. *Langmuir* 23, 6289-6293.
- Jain R, and Shastri J P, 2012. Study of ocular drug delivery system using drug loaded liposomes. *International Journal of Pharmaceutical Investigation* 1, 35-41.
- Janga KY, Jukanti R, Velpula A, Sunkavalli S, Bandari S, Kandadi P, Veerareddy PR, 2012. Bioavailability enhancement of zaleplon via proliposomes: Role of surface charge. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 80, 347-357.

- Jass J, Tjarnhage T, Puu G, 2000. From liposomes to supported, planar bilayer structures on hydrophilic and hydrophobic surfaces: an atomic force microscopy study. *Biophysical Journal* 79, 3153-3163.
- Jayaprakasam B, Seeram NP, Nair MG, 2003. Anticancer and anti-inflammatory activities of cucurbitacins from *Cucurbita andreana*. *Cancer Letters* 189, 11-16.
- Jeong DW, Kim YH, Kim HH, Ji HY, Yoo SD, Choi WR, Lee SM, Han CK, Lee HS, 2007. Dose linear pharmacokinetics of oleanolic acid after intravenous and oral administration in rat. *Biopharmaceutics and Drug Disposition* 28, 51-57.
- Jiskoot W, Teerlink T, Beuvery C, Crommelin D, 1986. Preparation of liposomes via detergent removal from mixed micelles by dilution. *Pharmaceutisch Weekblad* 8, 259-265
- Jousma H, Talsma H, Spies F, Joosten JGH, Junginger HE, Crommelin DJA, 1987. Characterization of liposomes. The influence of extrusion of multilamellar vesicles through polycarbonate membranes on particle size, particle size distribution and number of bilayers. *International Journal of Pharmaceutics* 35, 263-274.
- Juan M, Wenzel U, Daniel H, Planas J, 2008. Erythrodiol, a natural triterpenoid from olives, has antiproliferative and apoptotic activity in HT-29 human adenocarcinoma cells. *Molecular Nutrition and Food Research* 52, 595-599.
- Juliano RL, and Stamp D, 1978. Pharmacokinetics of liposome-entrapped anti-tumor drugs, *Biochemical Pharmacology* 27, 21-27.
- Juliano RL, and Stamp D, 1979. Interactions of drugs with lipid membranes. Characteristics of liposomes containing polar or non-polar anti-tumor drugs. *Biochimica et Biophysica Acta* 586, 137-145.
- Kashiwada Y, Wang HK, Nagao T, Kitanaka S, Yasuda I, Fujioka T, Yamagishi T, Cosentino LM, Kozuka M, Okabe H, Ikeshiro Y, Hu CQ, Yeh E, Lee KH, 1998. Anti-AIDS agents. 30. Anti-HIV activity of oleanolic acid, pomolic acid, and structurally related triterpenoids. *Journal of Natural Products* 61, 1090-1095.

- Katsaras J, Tristram-Nagle S, Liu Y, Headrick RL, Fontes E, Mason PC, Nagle JF, 2000. Clarification of the ripple phase of lecithin bilayers using fully hydrated, aligned samples. *Physical Review E* 61, 5668-5677.
- Kemps JMA, Crommelin DJA, 1988. Liposomes for drug delivery from physico-chemical studies to application. *Pharm Weekbl* 123, 355-363.
- Khreich N, Lamourette P, Boutal H, Devilliers K, Créminon C, Volland H, 2008. Detection of *Staphylococcus enterotoxin B* using fluorescent immunoliposomes as label for immunochromatographic testing. *Analytical Biochemistry* 377, 182-188.
- Kimelberg HK, Tracy TF, Biddlecome SM, Bourke RS, 1976. The effect of entrapment in liposomes on the in vivo distribution of ³H-methotrexate in a primate. *Cancer Research* 36, 2949-2957.
- Kiyoshi M, Yuklo S, Masao H, 1992. Formation and mechanical stability of phospholipid vesicles. *Membrane* 17, 257-262.
- Ko Y, and Bickel U, 2012. Liposomes-encapsulated polyethylenimine/oligonucleotide polyplexes prepared by reverse phase evaporation technique. *American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech* 13, 373-378.
- Korkmaz F, and Severcan F, 2005. Effect of progesterone on DPPC membrane: Evidence for lateral phase separation and inverse action in lipid dynamics. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 440, 141-147.
- Koukoulitsa C, Durdagi S, Siapi E, Villalonga-Barber C, Alexi X, Steele BR, Micha-Screttas M, Alexis MN, Tsantili-Kakoulidou A, Mavromoustakos T, 2011. Comparison of thermal effects of stilbenoid analogs in lipid bilayers using differential scanning calorimetry and molecular dynamics: correlation of thermal effects and topographical position with antioxidant activity. *European Biophysics Journal* 40, 865-875.
- Kremer JM, Esker MW, Pathmamanoharan C, Wiersema PH, 1977. Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection method. *Biochemistry* 16, 3932-3935.

- Kučerka N, Perlmutter JD, Pan J, Tristram-Nagle S, Katsaras J, Sachs JN, 2008. The effect of cholesterol on short- and long-chain monounsaturated lipid bilayers as determined by molecular dynamics simulations and x-ray scattering. *Biophysical Journal* 95, 2792-2805.
- Kulkarni A, Han Y, Hopfinger AJ, 2002. Predicting Caco-2 cell permeation coefficients of organic molecules using membrane-interaction QSAR analysis. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* 42, 331-342.
- Kumar S, and Hoh JH, 2000. Direct visualization of vesicle bilayer complexes by atomic force microscopy. *Langmuir* 16, 9936-9940.
- Kunastitchai S, Pichert L, Sarisuta N, Müller BW, 2006. Application of aerosol solvent extraction system (ASES) process for preparation of liposomes in a dry and reconstitutable form. *International Journal of Pharmaceutics* 316, 93-101.
- Kyrikou I, Daliani I, Mavromoustakos T, Maswadeh H, Demetzos C, Hatziantoniou S, Giatrellis S, Nounesis G, 2004. The modulation of thermal properties of vinblastine by cholesterol in membrane bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1661, 1-8.
- Laing C, Baoukina S, Tieleman DP, 2009. Molecular dynamics study of the effect of cholesterol on the properties of lipid monolayers at low surface tensions. *Physical Chemistry Chemical Physics* 11, 1916-1922.
- Laouini A, Jaafar-Maalej C, Sfar S, Charcosset C, Fessi H, 2011. Liposome preparation using a hollow fiber membrane contactor-Application to spirinolactone encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics* 415, 53- 61.
- Lasic DD, Martin JF, Gabizon A, Huang SK, Papahadjopoulos D, 1991. Sterically stabilized liposomes: a hypothesis on the molecular origin of the extended circulation times. *Biochimica et Biophysica Acta* 1070, 187-192.
- Lee DH, Thoennissen NH, Goff C, Iwanski GB, Forscher C, Doan NB, Said JW, Koeffler P, 2011. Synergistic effect of low-dose cucurbitacin B and low-dose methotrexate for treatment of human osteosarcoma. *Cancer Letters* 306, 161-170.

- Lesieur S, Grabielle-Madelmont C, Paternostre MT, Olivon M, 1991. Size analysis and stability study of lipid vesicles by high-performance gel exclusion chromatography, turbidity and dynamic light scattering. *Analytical Biochemistry* 192, 334-343.
- Lévy D, Bluzat A, Seigneuret M, Rigaud JL, 1990. A systematic study of liposome and proteoliposome reconstitution involving Bio-Bead-mediated Triton X-100 removal. *Biochimica et Biophysica Acta* 1025, 179-190.
- Liang X, Mao G, Ng KY, 2004. Mechanical properties and stability measurement of cholesterol containing liposomes on mica by atomic force microscopy. *Journal of Colloid and Interface Science* 278, 53-62.
- Lipowsky R, and Sackmann E, 1995. *Structure and Dynamics of Membranes. Handbook of Biological Physics (Elsevier) 1A.*
- Liu DZ, Chen WY, Tasi LM, Yang SP, 2000. The effects of cholesterol on the release of free lipids and physical stability of lecithin liposomes. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers* 31, 269-276.
- Liu T, Peng H, Zhang M, Deng Y, Wu Z, 2010. Cucurbitacin B, a small molecule inhibitor of the Stat3 signaling pathway, enhances the chemosensitivity of laryngeal squamous cell carcinoma cells to cisplatin. *European Journal of Pharmacology* 641, 15-22.
- Lorin A, Flore C, Thomas A, Brasseur R, 2004. Les liposomes: description, fabrication et applications. *Biotechnology Agronomy Society and Environment* 8, 163-176.
- Lu T, Wang Z, Ma Y, Zhang Y, Chen T, 2012. Influence of polymer size, liposomal composition, surface charge, and temperature on the permeability of pH-sensitive liposomes containing lipid-anchored poly(2-ethylacrylic acid). *International Journal of Nanomedicine* 7, 4917-4926.
- Mañez S, Recio MC, Giner RM, Ríos JL, 1997. Effect of selected triterpenoids on chronic dermal inflammation. *European Journal of Pharmacology* 334, 103-105.

- MacDonald RC, Jones FD, Qiu R, 1994. Fragmentation into small vesicles of dioleoylphosphatidylcholine bilayers during freezing and thawing. *Biochimica et Biophysica Acta* 1191, 362-370.
- Madani F, Peralvarez-Marin A, Graslund A, 2011. Liposome model systems to study the endosomal escape of cell-penetrating peptides: Transport across phospholipid membranes induced by a proton gradient. *Journal of Drug Delivery* 2011, 1-8.
- Mahmud A, Patel S, Molavi O, Choi P, Samuel J, Lavasanifar A, 2009. Self-associating poly(ethylene oxide)-b-poly(*r*-cholesterylcarboxylate- ϵ -caprolactone) block copolymer for the solubilization of STAT-3 inhibitor cucurbitacin I. *Biomacromolecules* 10, 471-478.
- Maitani Y, Soeda H, Junping W, Takayama K, 2001. Modified ethanol injection method for liposomes containing β -sitosterol β -D-glucoside. *Journal of Liposome Research* 11, 115-125.
- Mao G, Liang X, Ng KY, 2004. Direct force measurement of liposomes by atomic force microscopy. *Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, pp. 933-942.
- Martin I, and Ruyschaert JM, 2000. Common properties of fusion peptides from diverse systems. *Bioscience Reports* 20, 483-500.
- Martin PAW, Blackburn M, Schroder RFW, Matsuo K and Li BW, 2002. Stabilization of Cucurbitacin E-glycoside, a Feeding Stimulant for Diabrotica Beetles, Extracted from Bitter Hawkesbury Watermelon. *Journal of Insect Science* 2, 19-24.
- Martín R, Miana M, Jurado-López R, Martínez-Martínez E, Gómez-Hurtado N, Delgado C, Bartolomé MV, San Román JA, Cordova C, Lahera V, Nieto ML, Cachafeiro V, 2012. Diol triterpenes block profibrotic effects of angiotensin II and protect from cardiac hypertrophy. *PLoS One* 7, 1-14.
- Massey JB, and Pownall HJ, 2006. Structures of biologically active oxysterols determine their differential effects on phospholipid membranes. *Biochemistry* 45, 10747-10758.

- Massey JB, and Pownall HJ, 2005. The polar nature of 7-ketocholesterol determines its location within membrane domains and the kinetics of membrane microsolvubilization by apolipoprotein A-I. *Biochemistry* 44, 10423-10433.
- Matos C, Moutinho C, Lobao P, 2012. Liposomes as a model for the biological membrane: Studies on daunorubicin bilayer interaction. *Journal of Membrane Biology* 245, 69-75.
- Matsingou C, Hatziantoniou S, Georgopoulos A, Dimas K, Terzis A, Demetzos C, 2005. Labdane-type diterpenes: thermal effects on phospholipid bilayers: incorporation into liposomes and biological activity. *Chemistry and Physics of Lipids* 138, 1-11.
- Mayer ID, Madden TM, Bally MU, Cullis PR, 1993. pH gradient-mediated drug entrapment in liposomes. In *Liposome Technology*, 2nd edition, Edited by Gregoriadis G. Boca Raton: CRC Press, pp. 27-44.
- Mayhew E, Lazo R, Vail WJ, King J, Green AM, 1984. Characterization of liposomes prepared using a microemulsifier. *Biochimica et Biophysica Acta* 775,169-174.
- McMullen TP, and McElhaney RN, 1995. New aspects of the interaction of cholesterol with dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers as revealed by high-sensitivity differential scanning calorimetry. *Biochimica et Biophysica Acta* 1234, 90-98.
- Mieli D, Giuffrida MC, Pignatello R, Castelli F, Sarpietro MG, 2011. Interaction of naproxen amphiphilic derivatives with biomembrane models evaluated by differential scanning calorimetry and Langmuir–Blodgett studies. *Journal of Colloid and Interface Sciences* 360, 359-369.
- Milhiet PE, and Le Grimellec C, 2011. Observing the nanoscale organization of model biological membranes by atomic force microscopy, *Life at the Nanoscale, Atomic Force Microscopy of Live Cells*, Edited by Yves Dufrêne, Pan Stanford Publishing, chapter 1, pp. 1-20.
- Militao G, Dantas IN, Ferreira PM, Alves AP, Chaves DC, Monte FJ, Pessoa C, de Moraes MO, Costa-Lotufu LV, 2012. In vitro and in vivo anticancer properties of cucurbitacin isolated from *Cayaponia racemosa*. *Pharmaceutical Biology* 50, 1479-1487.

- Mills T, Huang J, Feigenson G, Nagle J. 2009. Effects of cholesterol and unsaturated DOPC lipid on chain packing of saturated gel-phase DPPC bilayers. *General Physiology and Biophysics* 28, 126-139.
- Moh'd Atrouse O, 2002. The effects of liposome composition and temperature on the stability of liposomes and the interaction of liposomes with human neutrophils. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 5, 948-951.
- Molavi O, Ma Z, Mahmud A, Alshamsan A, Samuel J, Lai R, Kwon GS, Lavasanifar A, 2008. Polymeric micelles for the solubilization and delivery of STAT3 inhibitor cucurbitacins in solid tumors. *International Journal of Pharmaceutics* 347, 118-127.
- Molavi O, Mahmud A, Hamdy S, Hung R, Lai R, Samuel J, Lavasanifar A, 2009. Development of a poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticle formulation of STAT3 inhibitor JSI-124: Implication for cancer immunotherapy. *Molecular Pharmaceutics* 7, 364-374.
- Mukherjee P, Long L, Kim HG, Ghannoum M, 2009. Amphotericin B lipid complex is efficacious in the treatment of *Candida albicans* biofilms using a model of catheter-associated *Candida* biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents* 33,149-153.
- Muller DJ, and Engel A, 1997. The height of biomolecules measured with the atomic force microscopy depends on electrostatic interactions. *Biophysical Journal* 73, 1633-1644.
- Nakano K, Tozuka Y, Yamamoto H, Kawashima Y, Takeuchi HA, 2008. A novel method for measuring rigidity of submicron-size liposomes with atomic force microscopy. *International Journal of Pharmaceutics* 355, 203-209.
- Nakashima S, Matsuda H, Kurume A, Oda Y, Nakamura S., Yamashita M, Yoshikawa M, 2010. Cucurbitacin E as a new inhibitor of cofilin phosphorylation in human leukemia U937 cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 20, 2994-2997.
- Nishino H, Nishino A, Takayasu J, Hasegawa T, Iwashima A, Hirabayashi K, Iwata S, Shibata S, 1988. Inhibition of the Tumor-promoting Action of 11-O-Tetradecanoylphorbol-O-acetate by Some Oleanane-type Triterpenoid Compounds. *Cancer Research* 48, 5210-5215.

- Niu M, Lu Y, Hovgaard L, Wu W, 2011. Liposomes containing glycocholate as potential oral insulin delivery systems: preparation, in vitro characterization, and improved protection against enzymatic degradation. *International Journal of Nanomedicine* 6, 1155-1166.
- Nomura AI, Sato Y, Fujiwara K, 2013. Molecular robotics approach for constructing an artificial cell model. *ECAL*, 488-491.
- Nounou M, El-Khordagui L, Khallafallah N, Khalil S, 2005. Influence of different sugar cryoprotectants on the stability and physic-chemical characteristics of freeze-dried 5-fluorouracil plurilamellar vesicles. *Daru* 13, 133-142.
- Oku N, and MacDonald RC, 1983. Differential effects of alkali metal chlorides on formation of giant liposomes by freezing and thawing and dialysis. *Biochemistry* 22, 855-863.
- Olkkonen VM, and Hynynen R, 2009. Interactions of oxysterols with membranes and proteins. *Molecular Aspects of Medicine* 30, 123-133.
- Olson F, Hunt CA, Szoka FC, Vail WJ, Papahadjopoulos D, 1979. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 557, 9-23.
- Otake K, Imura T, Sakai H, Abe M, 2001. Development of a new preparation method of liposomes using supercritical carbon dioxide. *Langmuir* 17, 3898-3901.
- Otake K, Shimomura T, Goto T, Imura T, Furuya T, Yoda S, Takebayashi Y, Sakai H, Abe M, 2006. Preparation of liposomes using an improved supercritical reverse phase evaporation method. *Langmuir* 22, 2543-2550.
- Ovesna Z, Vachalkova A, Horvathova K, Tothova D, 2004. Pentacyclic triterpenic acids: New chemoprotective compounds. Mini-review *Neoplasma* 51, 327-333.
- Park JW, Hong K, Kirpotin DB, Papahadjopoulos D, Benz CC, 1997. Immunoliposomes for cancer treatment. *Advances in Pharmacology* 40, 399-435.

- Parmar M, Edwards K, Madden T, 1999. Incorporation of bacterial membrane proteins into liposomes: factors influencing protein reconstitution. *Biochimica et Biophysica Acta* 1421, 77-90.
- Patel S, Lavasanifar A, Choi P, 2010. Molecular dynamics study of the encapsulation capability of a PCL-PEO based block copolymer for hydrophobic drugs with different spatial distributions of hydrogen bond donors and acceptors. *Biomaterials* 31, 1780-1786.
- Patlolla JM, and Rao CV, 2012. Triterpenoids for cancer prevention and treatment: current status and future prospects. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 13, 147-155.
- Patočka J, 2003. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. *Journal of Applied Biomedicine* 1, 7-12.
- Pereira-Lachataignerais J, Pons R, Panizza P, Courbin L, Rouch J, López O, 2006. Study and formation of vesicles systems with low polydispersity index by ultrasound method. *Chemistry and Physics of Lipids* 140, 88-97.
- Perez-Camino MC, and Cert A, 1999. Quantitative determination of hydroxyl pentacyclic triterpene acids in vegetable oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 1558-1562.
- Perona JS, Arcemis C, Ruiz-Gutierrez V, Catalá A, 2005. Effect of dietary high-oleic-acid oils that are rich in antioxidants on microsomal lipid peroxidation in rats. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53, 730-735.
- Peters RR, Farias MR, Ribeiro-do-Valle RM, 1997. Anti-inflammatory and analgesic effects of cucurbitacins from *Wilbrandia ebracteata*. *Planta Medica* 63, 525-528.
- Peters RR, Saleh TF, Lora M, Patry C, de Brum-Fernandes AJ, Farias MR, Ribeiro-do-Valle RM, 1999. Anti-inflammatory effects of the products from *Wilbrandia ebracteata* on carrageenan-induced pleurisy in mice. *Life Sciences* 64, 2429-2437.
- Pollier J, and Goossens A, 2012. Oleanolic acid. *Phytochemistry* 77, 10-15.

- Potamitis C, Chatzigeorgiou P, Siapi E, Viras K, Mavromoustakos T, Hodzic A, Pabst G, Cacho-Nerin F, Laggner P, Rappolt M, 2011. Interactions of the AT1 antagonist valsartan with dipalmitoyl-phosphatidylcholine bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1808, 1753-1763.
- Prades J, Vogler O, Alemany R, Gomez-Florit M, Funari S, Ruiz-Gutierrez V, Barcelo F, 2011. Plant pentacyclic triterpenic acids as modulators of lipid membrane physical properties. *Biochimica et Biophysica Acta* 1808, 752-760.
- Pullmannova P, Bastos M, Bai G, Funari S, Lacko I, Devinsky F, Teixeira J, Uhrikova D, 2012. The ionic strength effect on the DNA complexation by DOPC-gemini surfactants liposomes. *Biophysical Chemistry* 160, 35-45.
- Purwaningsih E, and Schubert R, 2004. The preparation of liposomes derived from mixed micelles of lecithin added by sodium cholate, followed by dialyzing using hemoflow high flux F60S. *Makara Kesehatan* 8, 49-52.
- Radtchenko IL, Sukhorukov GB, Leporatti S, Khomutov GB, Donath E, Mohwald H, 2000. Assembly of alternated multivalent ion/polyelectrolyte layers on colloidal particles. Stability of the multilayers and encapsulation of macromolecules into polyelectrolyte capsules. *Journal of Colloid and Interface Science* 230, 272-280.
- Rahman YE, Rosenthal MW, Cerny EA, Moretti ES, 1974. Preparation and prolonged tissue retention of liposome encapsulated chelating agents. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 83, 640-647.
- Ramachandran S, Quist AP, Kumar S, Lal R, 2006. Cisplatin nanoliposomes for cancer therapy: AFM and fluorescence imaging of cisplatin encapsulation, stability, cellular uptake, and toxicity. *Langmuir* 22, 8156-8162.
- Ramirez-Aguilar KA, and Rowlen KL, 1998. Tip characterization from AFM images of nanometric spherical particles. *Langmuir* 14, 2562-2566.

- Recio MC, Prieto M, Bonucelli M, Orsi C, Máñez S, Giner RM, Cerdá-Nicolás M, Ríos JL, 2004. Antiinflammatory activity of two cucurbitacins isolated from *Cayaponia tayuya* roots. *Planta Medica* 70, 414-420.
- Reviakine I, and Alain Brisson A, 2000. Formation of supported phospholipid bilayers from unilamellar vesicles investigated by atomic force microscopy. *Langmuir* 16, 1806-1815.
- Rex S, and Schwarz G, 1998. Quantitative Studies on the Melittin-Induced Leakage Mechanism of Lipid Vesicles. *Biochemistry* 37, 2336-2345.
- Richter R, Mukhopadhyay A, Brisson A, 2003. Pathways of lipid vesicle deposition on solid surfaces: A combined QCM-D and AFM study. *Biophysical Journal* 85, 3035-3047.
- Richter RP, and Brisson AR, 2005. Following the formation of supported lipid bilayers on mica: A study combining AFM, QCM-D, and ellipsometry. *Biophysical Journal* 88, 3422-3433.
- Rodriguez S, Garda H, Heinzen H, Moyna P, 1997. Effect of plant monofunctional pentacyclic triterpenes on the dynamic and structural properties of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers. *Chemistry and Physics of Lipids* 89, 119-130.
- Rodriguez-Rodriguez R, Herrera MD, Perona JS, Ruiz-Gutierrez V, 2004. Potential vasorelaxant effects of oleanolic acid and erythrodiol, two triterpenoids contained in 'orujo' olive oil, on rat aorta. *British Journal of Nutrition* 92, 635-642.
- Rojas-Aguirre Y, Hernández-Luis F, Mendoza-Martínez C, Sotomayor CP, Aguilar LF, Villena F, Castillo I, Hernández D, Suwalsky M, 2012. Effects of an antimalarial quinazoline derivative on human erythrocytes and on cell membrane molecular models. *Biochimica et Biophysica Acta* 1818, 738-746.
- Rongen HA, Bult A, Van Bennekom WP, 1997. Liposomes and immunoassays. *Journal of Immunological Methods* 204, 105-133.
- Saade M, Magdalou J, Ouaini N, Greige-Gerges H, 2009. Stability of cucurbitacin E in human plasma: Chemical hydrolysis and role of plasma esterases. *Biopharmaceutics and Drug Disposition* 30, 389-397.

- Sadzuka Y, Hatakeyama H, Sonobe T, 2010. Enhancement of doxorubicin concentration in the M5076 ovarian sarcoma cells by cucurbitacin E co-treatment. *International Journal of Pharmaceutics* 383, 186-191.
- Sahoo SK, and Labhasetwar V, 2003. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discovery Today* 8, 112-1120.
- Sato N, Zhang Q, Ma CM, Hattori M, 2009. Anti-human immunodeficiency virus-1 protease activity of new lanostane-type triterpenoids from *Ganoderma sinense*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 57, 1076-1080.
- Sawai S, and Saito K, 2011. Triterpenoid biosynthesis and engineering in plants. *Frontiers in Plant Science* 2, 1-8.
- Schabert JC, and Teijema HL, 1968. The role of Cucurbitacin Δ^{23} -Reductase in the breakdown pathway of toxic bitter principles in *Cucurbita maxima*. *Phytochemistry* 7, 2107-2110.
- Schmidt P, Berger C, Scheidt HA, Berndt S, Bunge A, Beck-Sickinger AG, Huster D, 2010. A reconstitution protocol for the in vitro folded human G protein coupled Y2 receptor into lipid environment. *Biophysical Chemistry* 150, 29-36.
- Schwartz HM, Biedron SI, Von Holdt MM, Rehm S, 1964. A Study of some plant esterases. *Phytochemistry* 3, 189-200.
- Sessa G, and Weissmann G, 1968. Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *Journal of Lipid Research* 9, 310-318.
- Setzer WC, and Setzer MC, 2003. Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 3, 540-556.
- Shaheen SM, Shakil FRA, Hossen MN, Ahmed M, Amran MS, Ul-Islam MA, 2006. Liposome as a carrier for advanced drug delivery. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 9, 1181-1191.
- Sharma A, and Sharma US, 1997. Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics* 154, 123-140.

- Shashi K, Satinder K, Bharat P, 2012. A complete review on: Liposomes. *International Research Journal of Pharmacy* 3, 10-16.
- Shibata-Seki T, Masai J, Tagawa T, Sorin T, Kondo S, 1996. In-situ atomic force microscopy study of lipid vesicles adsorbed on a substrate. *Thin Solid Films* 273, 297-303.
- Shimanouchi T, Ishii H, Yoshimoto N, Umakoshi H, Kuboi R, 2009. Calcein permeation across phosphatidylcholine bilayer membrane: Effects of membrane fluidity, liposome size, and immobilization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 73, 156-160.
- Shuhua C, Shiping Z, Li C, Chi Y, 2012. Preparation and characterization of glucose liposome by supercritical reverse phase evaporation method. *Advanced Materials Research* 550-553, 1374-1377.
- Shuhua C, Xuewu L, Shiping Z, Chi Y, Jing Z, 2013. Preparation and characterization of metronidazole liposome by supercritical reverse phase evaporation method. *Advanced Materials Research* 668, 274-278.
- Siebert ST, Reeves SG, Durst RA, 1993. Liposome immunomigration field assay device for Alachlor determination. *Analytica Chimica Acta* 282, 297-305.
- Singh AK, Harrison SH, Schoeniger JS, 2000. Gangliosides as receptors for biological toxins: development of sensitive fluoroimmunoassays using ganglioside-bearing liposomes. *Analytical Chemistry* 72, 6019-6024.
- Sinico C, De Logu A, Lai F, Valenti D, Manconi M, Loy G, Bonsignore L, Fadda AM, 2005. Liposomal incorporation of *Artemisia arborescens* L. essential oil and in vitro antiviral activity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 59, 161-168.
- Siqueira JM Jr, Peters RR, Gazola AC, Krepsky PB, Farias MR, Rae GA, de Brum-Fernandes AJ, Ribeiro-do-Valle RM, 2007. Anti-inflammatory effects of a triterpenoid isolated from *Wilbrandia ebracteata* Cogn. *Life Sciences* 80, 1382-1387.
- Six DA, and Dennis EA, 2000. The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta* 1488, 1-19.

- Song J, Shi F, Zhang Z, Zhu F, Xue J, Tan X, Zhang L, Jia X, 2011. Formulation and evaluation of celastrol-loaded liposomes. *Molecules* 16, 7880-7892.
- Sriwongsitanont S, and Ueni M, 2011. Effect of freeze thawing process on the size and lamellarity of PEG-Lipid liposomes. *The Open Colloid Science Journal* 4, 1-6.
- Sroda K, Michalak K, Maniewska J, Gryniewicz G, Szeja W, Zawisza J, Hendrich A, 2008. Genistein derivatives decrease liposome membrane integrity–calcein release and molecular modeling study. *Biophysical Chemistry* 138, 78-82.
- Stark B, Pabst G, Prassl R, 2010. Long-term stability of sterically stabilized liposomes by freezing and freeze-drying: effects of cryoprotectants on structure. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 41, 546-555.
- Stevens PJ, and Lee RJ, 2003. Formulation kit for liposomal doxorubicin composed of lyophilized liposomes. *Anticancer Research* 23, 439-442.
- Stimac A, Segota S, Sikiric MD, Ribic R, Frkanec L, Svetlicic V, Tomic S, Vranesic B, Frkanec R, 2012. Surface modified liposomes by mannosylated conjugates anchored via the adamantyl moiety in the lipid bilayer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1818, 2252-2259.
- Stiti N, Triki S, Hartmann MA, 2007. Formation of triterpenoids throughout *Olea europaea* fruit ontogeny. *Lipids* 42, 55-67.
- Subczynski W, Raguz M, Widomska J, 2010. Studying lipid organization in biological membranes using liposomes and EPR spin labeling. V. Weissig (ed.), *Liposomes: Methods and Protocols*, vol. 2: Biological Membrane Models, *Methods in Molecular Biology*, vol. 606, pp. 247-269.
- Sullivan S, Connor J, Huang L, 1986. Immunoliposomes: Preparation, properties and applications. *Medicinal Research Reviews* 6, 171-195.
- Sun C, Zhang M, Shan X, Zhou X, Yang J, Wang Y, Li-Ling J, Deng Y, 2010. Inhibitory effect of cucurbitacin E on pancreatic cancer cells growth via STAT3 signaling. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 136, 603-610.

- Sung W, and Lee D, 2008. The combination effect of korean red ginseng saponins with kanamycin and cefatoxime against methicillin-resistant staphylococcus aureus. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 31, 1614-1617.
- Szoka F, and Papahadjopoulos D, 1978. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75, 4194-4198.
- Tannin-spitz T, Bergman M, Grossman S, 2007. Cucurbitacin glucosides: antioxydant and free-radical scavenging activities. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 364,181-186.
- Thompson AK, and Singh H, 2006. Preparation of liposomes from milk fat globule membrane phospholipids using a microfluidizer. *Journal of Dairy Science* 89, 410-419.
- Torchilin VP, Omelyanenko VG, Papisov MI, Bogdanov Jr AA, Trubetskoy VS, Herron JN, Gentry CA, 1994. Poly(ethylene glycol) on the liposome surface: on the mechanism of polymer-coated liposome longevity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1195, 11-20.
- Traikia M, Warschawski DE, Recouvreur M, Cartaud J, Devaux PF, 2000. Formation of unilamellar vesicles by repetitive freeze-thaw cycles: characterization by electron microscopy and ³¹P-nuclear magnetic resonance. *European Biophysics Journal* 29, 184-195.
- Trombetta D, Arena S, Tomaino A, Tita B, Bisignano G, De Pasquale A, Saija A, 2001. Effect of the exposure to gentamicin and diltiazem on the permeability of model membranes. *Farmaco* 56, 447-449.
- Tscharnuter W, 2000. Photon Correlation Spectroscopy in Particle Sizing. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. R.A. Meyers (Ed.) © John Wiley & Sons Ltd, Chichester, pp. 5469-5485.
- Tseng LP, Liang HJ, Chung TW, Huang YY, Liu DZ, 2007. Liposomes incorporated with cholesterol for drug release triggered by magnetic field. *Journal of Medical and Biological Engineering* 27, 29-34.

- Valenti D, De Logu A, Loy G, Sinico C, Bonsignore L, Cottiglia F, Garau D, Fadda AM, 2001. Liposome-incorporated *Santolina Insularis* essential oil: Preparation, characterization and *in vitro* antiviral activity. *Journal of Liposome Research* 11, 73-90.
- Varona S, Martin A, Cocero MJ, 2011. Liposomal incorporation of lavandin essential oil by a thin film hydration method and by Particles from Gas-Saturated Solutions. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 50, 2088-2097.
- Vemuri S, Yu CD, Wangsatorntanakun V, Roosdorp N, 1990. Large-scale production of liposomes by a microfluidizer. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 16, 2243-2256.
- Verma DD, Verma S, Blume G, Fahr A, 2003. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. *International Journal of Pharmaceutics* 258, 141-151.
- Vincken JP, Heng L, de Groot A, Gruppen H, 2007. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry* 68, 275-297.
- Wagner A, and Vorauer-Uhl K, 2010. Liposome technology for industrial purposes. *Journal of Drug Delivery* 2011, 1-9.
- Walde P, Cosentino K, Engel H, Stano P, 2010. Giant Vesicles: preparations and applications. *ChemBioChem* 848-865.
- Wang D, Kong L, Wang J, He X, Li X, Xiao Y, 2009. Polymyxin E sulfate-loaded liposome for intravenous use: preparation, lyophilization, and toxicity assessment *in vivo*. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology* 63, 159-167.
- Wang W, Zhao X, Hu H, Chen D, Gu J, Deng Y, Sun J, 2010. Galactosylated solid lipid nanoparticles with cucurbitacin B improves the liver targetability. *Drug Delivery* 17, 114-122.
- Weinstein J, and Leserman L, 1984. Liposomes as drug carriers in cancer chemotherapy. *Pharmacology and Therapeutics* 24, 207-233.

- Wen Z, Liu B, Zheng Z, You X, Pu Y, Li Q, 2010. Preparation of liposomes entrapping essential oil from *Atractylodes macrocephala koidz* by modified RESS technique. *Chemical Engineering Research and Design* 88, 1102-1107.
- Wendt K, Schulz G, Coray E, Liu D, 2000. Enzyme mechanisms for polycyclic triterpene formation. *Angewandte Chemie International Edition* 39, 2812-2833.
- Wolkers WF, Oldenhof H, Tablin F, Crowe JH, 2004. Preservation of dried liposomes in the presence of sugar and phosphate. *Biochimica et Biophysica Acta* 1661, 125-134.
- Wu PL, Lin FW, Wu TS, Kuoh CS, Lee KH, Lee SJ, 2004. Cytotoxic and anti-HIV principles from the rhizomes of *Begonia nantoensis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 52, 345-349.
- Xia S, and Xu S, 2005. Ferrous sulfate liposomes: preparation, stability and application in fluid milk. *Food Research International* 38, 289-296.
- Xu R, Fazio GC, Matsuda SPT, 2004. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry* 65, 261-291.
- Yang G, Chen B, Zhang Z, Gong J, Bai H, Li J, Wang Y, Li B, 2009. Cytotoxic activities of extracts and compounds from *Viscum coloratum* and its transformation products by *Rhodobacter sphaeroides*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 152, 353-365.
- Yang S, Chen J, Zhao D, Han D, Chen X, 2012. Comparative study on preparative methods of DC-Chol/DOPE liposomes and formulation optimization by determining encapsulation efficiency. *International Journal of Pharmaceutics* 434, 155-160.
- Yeagle PL, 1985. Cholesterol and the cell membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* 822, 267-287.
- Yoshida PA, Yokota D, Foglio MA, Rodrigues RAF, Pinho SC, 2010. Liposomes incorporating essential oil of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.): Characterization of aqueous dispersions and lyophilized formulations. *Journal of Microencapsulation* 27, 416-425.

Zasadzinski J, 1986. Transmission electron microscopy observations of sonication-induced changes in liposome structure. *Biophysical Journal* 49, 1119-1130.

Zhao L, and Feng SS, 2005. Effects of lipid chain unsaturation and headgroup type on molecular interactions between paclitaxel and phospholipid within model biomembrane. *Journal of Colloid and Interface Science* 285, 326-335.

Zolese G, Gratton E, Curatola G, 1990. Phosphatidic acid affects structural organization of phosphatidylcholine liposomes. A study of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) and 1-(4-trimethylammonium-phenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene (TMA-DPH) fluorescence decay using distributional analysis. *Chemistry and Physics of Lipids* 55, 29-39.

Annexe