

Amélioration des qualités nutritionnelles et organoleptiques des aliments par encapsulation de composés actifs (arômes, vitamines, antioxydants, acides gras insaturés...)

Joyce Azzi

▶ To cite this version:

Joyce Azzi. Amélioration des qualités nutritionnelles et organoleptiques des aliments par encapsulation de composés actifs (arômes, vitamines, antioxydants, acides gras insaturés...). Biochimie, Biologie Moléculaire. Université du Littoral Côte d'Opale; École doctorale des Sciences et de Technologie (Beyrouth), 2017. Français. NNT: 2017DUNK0460. tel-01721777

HAL Id: tel-01721777 https://theses.hal.science/tel-01721777

Submitted on 2 Mar 2018

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 du Littoral Côte

Doctorat Université Libanaise THESE de doctorat

Pour obtenir le grade de Docteur délivré par

Ecole Doctorale des Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement (Universite du Littoral Côte D'Opale)

et

L'Ecole Doctorale des Sciences et Technologie (Université Libanaise)

Spécialité : Chimie-Biologie des Molécules Bioactives Présentée et soutenue publiquement par

AZZI Joyce

Le 4 décembre 2017

Amélioration des qualités nutritionnelles et organoleptiques des aliments par encapsulation de composés actifs (arômes, vitamines, antioxydants, acides gras insaturés...)

> Directrice de thèse : **GREIGE-GERGES Hélène** Co-directrice de la thèse : **FOURMENTIN Sophie**

Membre du Jury

M. Alfred FAHR, Professor, Université d'Iéna, Rapporteur

Mme. Marie-Paule Mingeot-Leclercq, Université Catholique de Louvain, Rapporteur

M. Abdelhamid Elaissari, Université Claude Bernard Lyon 1, Examinateur

M. Patra Digambara, Université Américaine de Beyrouth, Examinateur

Mme. Sophie Fourmentin, Université du Littoral Côte D'Opale, Co-directrice de thèse

Mme. Hélène Greige-Gerges, Université Libanaise, Directrice de thèse

Mme. Lizette Auezova, Université Libanaise, Co-encadrante de thèse

Remerciements

J'adresse ma vive gratitude à tout le corps administratif de l'Ecole Doctorale des Sciences et Technologie à l'Université Libanaise et à l'Ecole Doctorale des Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement pour faciliter les procédures d'inscription en thèse de doctorat en cotutelle.

Je tiens à exprimer ma vive reconnaissance envers mes directrices de thèse, Professeurs Hélène Greige-Gerges et Sophie Fourmentin, pour la confiance qu'elles m'ont accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, pour leurs multiples conseils et pour toutes les heures qu'elles ont consacrées à diriger cette recherche. J'ai pu constamment bénéficier de leurs qualités scientifiques et humaines.

J'adresse de chaleureux remerciements à mon co-encadrant de thèse, Professeur Lizette Auezova pour son attention de tout instant sur mes travaux, pour ses conseils avisés et son écoute qui ont été prépondérants pour la bonne réussite de cette thèse. Son optimisme et sa confiance en moi ont été des éléments mo*teurs pour moi. J'ai pris un grand plaisir à travailler* avec elle.

Je tiens à remercier également Professeur David Landy pour son accueil chaleureux à chaque fois que j'ai sollicité son aide, ainsi que pour ses multiples encouragements. Sa rigueur, sa capa*cité d'analyse des problèmes et ses très nombreuses connaissances m'ont permis de* progresser et ont répondu à plusieurs de mes préoccupations.

Mes remerciements vont aussi *au Professeur Alia Jraij qui m'a guidée et m'a consacrée* beaucoup de temps durant les études de microscopie à force atomique.

Je tiens également à témoigner ma gratitude à Professeur Roland Habchi, pour son aide précieuse à la réalisation des imageries par la microscopie à force atomique.

Je souhaite exprimer mes remerciements à l'ingénieur d'étude au sein de l'équipe chimie supramoléculaire Steven Ruellan pour l'aide qu'il m'a apportée dans les études RMN.

Toute ma reconnaissance envers les Professeurs Alfred Fahr et Marie-Paule Mingeot-Leclercq et les Docteurs Hamid ElAissari et Patra Digambara *pour m'avoir fait l'honneur d'être* membre de jury de ma thèse.

Je désire en outre remercier tous les membres de l'équipe de Molécules Bioactives (Dr Nathalie Khreich, Dr Maya Kayouka et Dr Amal Najjar) pour leurs conseils et leur amitié. Je remercie l'Université Libanaise et l'Université du Littoral Côte D'Opale pour la bourse doctorale et l'Agence Universitaire de la Francophonie (Programme de Coopération Scientifique Inter-Universitaire, PCSI 2015-2017) pour le soutien financer durant les trois années de thèse.

Rien de très inattendu si je remercie mes amis et mes compagnons de café qui sont Riham Gharib, Rola Abboud, Carla Atallah, Ghenwa Nasr, Elissa Ephrem, Eliane Saliba, Tarek Moufawad et Samar Kaddah. Grâce à eux, la vie quotidienne fut bercée de discussions et d'actes aussi scientifiques qu'imbéciles...

Je remercie particulièrement Carla qui a su me soutenir, me supporter, m'encourager. . . durant les derniers mois de rédaction qui n'ont pas toujours été des plus agréables.

Je souhaite remercier spécialement Elise et Reem pour leur support tout au long de la thèse.

Je remercie également *mes amies à l'Université Americaine de Beyrouth* : Remi Safi, Tala Kanson, Jamal El Saghir, Farah Kouzi et Sara Al Ghadban.

Ma reconnaissance va à ceux qui ont plus particulièrement assuré le soutien affectif au cours *de ces trois années et sans lesquels je n'en serais pas là aujourd'hui : ma famille.*

Lexique

AA: activité antioxydante Abs: absorbance ABTS: acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique AcCoA: acétylCoA AFM: Atomic Force Microscopy CA 125: cancer antigen 125 CB2: cannabinoïdes de type 2 CD: cyclodextrine CE: efficacité de complexation CGTase: cyclodextrine glycosyl transférase CHI: chalone isomérase Chol: cholestérol CHS: chalone synthase CLHP: chromatographie Liquide à Haute Performance Co: molécule compétiteur CoA: coenzyme A COVs: composés organiques volatils CRYSMEB: β-cyclodextrine méthylée en position 2 DAD: détecteur UV à barrette de diodes DCL: drug-in-cyclodextrin-in-liposomes DFR: dihydroflavonol reductase DIMEB: dimethylated β -cyclodextrin (2,6-di-O-methyl- β -cyclodextrine) DMAPP: diméthyleallyl-diphosphate DM: dynamique moléculaire DPPH: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle DRV: dried-rehydrated vesicle EE: éfficacité d'encapsulation EFSA: European Food Safety Authority ERO: espèces réactives de l'oxygène FDA: Food and Drug Administration F3H: flavanone-3-β-hydroxylase

F3'H: flavanone-3'-β-hydroxylase FLS: flavonol synthase FOSHU: Food for Specified Health Use FPP: farnésyl-diphosphate FS: flavone synthase GGPP: géranylgéranyl-diphosphate GPP: géranyl-diphosphate GRAS: Generally Recognized as Safe GSH: glutathion GSQ: glutathionyl-quercétine GT: glycosyl transferase GUV : giant unilamellar vesicles HCl: acide chlorhydrique HE: huile essentielle HFL: hydratation du film lipidique HMG-CoA: hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase ¹HNMR: proton nuclear magnetic resonance HP-β-CD: hydroxypropyle-β-cyclodextrine IC50: concentration inhibitrice médiane I3C: indole-3-carbinol IgA: immunoglobuline A IL-8: interleukine 8 IPP: isopentényl-diphosphate K_f: constante de formation LCs: liposomes conventionnels LDL: lipoprotéine de basse densité LDOX: leucoanthocyanidine dioxygénase LPS: lipopolysaccharide LUV: large unilamellar vesicles MDA: malondialdéhyde MEP: 2-C-méthylérythritol-4-phosphate MLV: multilamellar vesicles

MM: mécanique moléculaire MO: orange de méthyle MQ: méthodes quantiques MVA: acide mévalonique MVV: multivesicular vesicles NaCl: chlorure de sodium NaOH: hydroxyde de sodium NDIR: détecteur infrarouge non dispersif Ner: nérolidol NF-κ β : nuclear factor-kappa β OLV: vésicules oligolamellaires OSA: octenyl succinic anhydride PA: principe actif PAL: phénylalanine ammonialyase PC: phosphatidylcholine PDI: polydispersity index PPs: phénylpropanoïdes Protéine-SH: sulfhydrile d'une protéine Quer: quercétine

Résumé

L'incorporation d'ingrédients bioactifs dans les produits alimentaires est en plein essor. Il a été démontré que ces ingrédients possèdent des propriétés biologiques importantes permettant l'amélioration de la santé et la prévention des maladies dites de civilisations. Toutefois, l'ajout de ces molécules bioactives est dans la plupart des cas impossible ou insuffisant, du fait que ces composés ne sont que peu solubles dans les systèmes aqueux et présentent i) une stabilité limitée contre les dégradations chimique ou physique, ii) une libération non contrôlée ou une faible biodisponibilité. Face à ses contraintes, les recherches actuelles visent à élaborer des systèmes d'encapsulation efficaces pour résoudre ces problèmes de formulation. Dans notre étude, deux représentants d'ingrédients alimentaires ont été choisi : le sesquiterpène nérolidol (Ner) et le flavonoïde quercétine (Quer) présentant diverses activités biologiques mais des propriétés physicochimiques problématiques. Ainsi, l'objectif de notre travail a été d'encapsuler ces composés actifs dans les cyclodextrines (CDs), les liposomes conventionnels (LCs) et le système mixte cyclodextrine-liposomes (DCLs) afin de développer des systèmes naturels et éco-compatibles ayant des applications potentielles dans les domaines alimentaires. Trois axes ont été abordés. Le premier axe a porté sur la préparation et la caractérisation des complexes d'inclusion CD/invité en solution et à l'état solide. Les techniques de spectroscopie UV-visible, Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP), Carbone Organique Total (TOC), ¹H Résonance magnétique nucleaire (RMN), 2D ROESY RMN et de la modélisation moléculaire ont été utilisées comme outils pour la caractérisation des complexes obtenus. Des études de phase de solubilité ont également été réalisées. Le deuxième axe a porté sur la préparation des LCs et DCLs par la méthode d'injection éthanolique et leur caractérisation. Les préparations des LCs encapsulant la quercétine a été réalisée à partir de phospholipides naturels de jaune d'œuf (Lipoid E80) et de soja insaturés (Lipoid S100) ou saturés (Phospholipon 90H) afin d'étudier l'effet de la composition lipidique sur les caractéristiques des liposomes. La formulation optimale a été par la suite appliquée pour préparer des LCs encapsulant le nérolidol et DCLs encapsulant les deux molécules. Ce dernier est produit par l'incorporation des complexes d'inclusion HP-β-CD/Ner (à différents rapport molaire CD:Ner) et SBE-β-CD/Quer dans la cavité aqueuse des liposomes. Le dernier axe a été orienté vers l'évaluation de l'effet de l'encapsulation sur les propriétés physicochimiques du nérolidol et de la quercétine (libération in vitro, photostabilité, stabilité dans les milieux gastro-intestinales, stabilité de stockage) et leur activité antioxydante. Les résultats ont montré que les CDs ont été capables d'encapsuler les composés actifs étudiés, d'augmenter leur solubilité, leur photostabilité ainsi que leur activité antioxydante. En outre, les liposomes à base de Lipoid E80 ont été trouvés majoritairement de taille nanométrique et ont conféré aux molécules une efficacité d'encapsulation (EE) élevée ainsi qu'une meilleure stabilité par rapport aux deux autres types de liposomes. De plus, la taille des DCLs ainsi que leur EE ont été prouvées dépendante du rapport molaire CD:invité. Par rapport aux LCs, les DCLs ont assuré une libération prolongée du nérolidol, ont augmenté la photostabilité des composés et la stabilité de la quercétine dans les milieux biologiques. Les résultats de cette étude suggèrent que les ces systèmes peuvent être considérés comme outils prometteurs pour l'optimisation des formulations alimentaires incorporant le nérolidol et/ou la quercétine.

Mots clés: Cyclodextrines, composition lipidique, constante de formation, drug-incyclodextrin-in-liposomes, hydroxyl- β -cyclodextrine, injection éthanolique, libération, liposomes conventionnels, nérolidol, quercétine, sulfobutyléther- β -cyclodextrine, stabilité.

Abstract

Phytochemicals are widely distributed secondary metabolites, divided into three major classes: terpenoids, flavonoids and alkaloids. They are shown to possess important biological properties such as anti-cancer, anti-inflammatory and anti-microbial properties. Therefore, increasing the use of these bioactive molecules in food products may reduce the risk of widespread diseases referred to as "diseases of civilization". However, their low solubility, susceptibility to degradation and their rapid release reduce their bioavailability in the human body and thus their biological effect. To solve the aforementioned physicochemical drawbacks, encapsulation systems were developed to allow the incorporation of phytochemicals in food. In this study, two food ingredients: the sesquiterpene nerolidol and the flavonol quercetin were selected du to their potent biological activities but their problematic physicochemical properties. Therefore, the aim of this work was to encapsulate these molecules into cyclodextrins (CDs), conventional liposomes (CLs) and the double system drug-in-cyclodextrin-in-liposomes (DCLs), in order to develop natural and biocompatible formulations that may find applications in food fields. This project was built around three main research axes. The first part dealt with the preparation and the characterization of CD/guest inclusion complexes both in solution and in solid state. Characterizations were performed with UV-visible spectroscopy, High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Total Organic Carbon (TOC), ¹H NMR, 2D ROESY NMR, and molecular modeling. These investigations were complemented with phase solubility studies. The second axis addressed the preparation of CLs and DCLs by ethanol injection method and characterization of the vesicles. CLs encapsulating quercetin were prepared from three different types of phospholipids (Lipoid E80, Lipoid S100, Phospholipon 90H) in order to study the effect of lipid composition on the characteristics of liposomes. The optimal formulation was then selected to prepare nerolidol loaded-CLs and DCLs encapsulating the two compounds. HP-β-CD/Ner (at different CD:Ner molar ratios) and SBE-β-CD/Quer inclusion complexes were used as the aqueous phase in the DCL system. The last part focused on the effect of encapsulation on the physicochemical properties of nerolidol and quercetin (in vitro release, photostability, stability in gastro-intestinal fluids, storage stability) and their antioxidant activities. Results demonstrated that CDs could successfully encapsulate bioactive compounds, enhance their solubility, photostability and antioxidant activity. Furthermore, Lipoid E80liposomes were nanometric in size, exhibited a high entrapment efficiency and higher stability in comparison to the other formulations. Moreover, CD:guest molar ratio influenced the size of DCLs and their encapsulation efficiency. When compared to CLs, DCLs extended the release of nerolidol, enhanced the photostability of both compounds and increased the stability of quercetin in biological fluids. These results could be considered as a promising tool to achieve an optimized and efficient formulations incorporating nerolidol and quercetin in food industry.

Keywords: Cyclodextrins, lipid composition, formation constant, drug-in-cyclodextrin-inliposomes, hydroxyl- β -cyclodextrin, ethanol injection, release, conventional liposomes, nerolidol, quercetin, sulfobutylether- β -cyclodextrin, stability.

Introducti	on	1
Partie 1. E	tude Bibliographique	3
Chapitre I	. Les aliments fonctionnels et leurs composés bioactifs	
I. Alime	nts	
I.1 H	istoire et définition des aliments fonctionnels	
I.2 Pr	opriétés biologiques des aliments fonctionnels	5
I.2.1	Aliments d'origine végétale	5
I.2.2	Les aliments d'origine animale	
I.3 Le	es composés bioactifs des aliments	
I.3.1	Les composés terpéniques	15
I.3.2	Les phénylpropanoïdes	
Chapitre I	I. Les systèmes d'encapsulation	
II. Dével	oppement d'aliments fonctionnels en industrie	
II.1 Le	es différents systèmes d'encapsulation des aliments fonctionnels	
II.1.1	À base de lipides	
II.1.2	À base de polysaccharides	
II.1.3	À base de protéines	
II.2 Li	posomes	
II.2.1	Définition	
II.2.2	Classification	
II.2.3	Composition	
II.2.4	Méthodes de préparation	
II.2.5	Caractérisation	
II.2.6	Applications	
II.3 C	yclodextrines	54
II.3.1	Historique	
II.3.2	Structures et propriétés physicochimiques	
II.3.3	Modifications chimiques des cyclodextrines	
II.3.4	Formation de complexes d'inclusion	
П.3.5	Techniques de caractérisation des complexes d'inclusion	
II.3.6	Applications	61
II.4 Sy	stème mixte cyclodextrine-liposome	64
II.4.1	Propriétés du système DCL	64
II.4.2	Effet des CDs sur la stabilité des DCLs	

II.4.3	Effet des liposomes sur la stabilité des DCLs	66
II.4.4	Comparaison entre LCs et DCLs	67
II.5 Les	s différents systèmes d'encapsulation pour la quercétine	74
II.6 Co	nclusion	77
Objectifs et	t stratégie de travail	78
-		
Partie 2. Ex	xperimentale	84
Chapitre II	1. Materiels et Méthodes	84
III. Matér	riels et Méthodes	84
111.1 F	Produits chimiques	84
III.2 E	Etude du phénomène d'inclusion	84
III.2.1	Caractérisation analytique des complexes d'inclusion en solution	85
III.2.2	Caractérisation des complexes d'inclusion à l'état solide	93
III.3 F liposomes	Préparation et caractérisation des LCs et du système mixte cyclodextrine- s	94
III.3.1	Préparation des LCs et DCLs par la méthode d'injection éthanolique	94
III.4 M la quercét	Mise au point de la méthode chromatographique pour le dosage du nérolidol tine	et de 100
III.4.1	Optimisation des paramètres de détection et de quantification	100
III.5 C	Caractérisation des LCs et DCLs	101
III.5.1	Mesure de la taille par granulomètre à diffraction laser	101
III.5.2	Détermination de l'efficacité d'encapsulation	101
III.5.3	Détermination du rendement d'encapsulation	102
III.5.4	Mesure de la rigidité par microscopie à force atomique	102
III.6 E auercétine	Effet de l'encapsulation sur les propriétés physicochimique du nérolidol et de	e la 103
III.6.1	Etude de libération du nérolidol in vitro	103
III.6.2	Etude de la photostabilité des composés actifs sous forme libres et encapsu 104	lés
III.6.3 la quero	Etude de la stabilité physico-chimique des liposomes encapsulant le nérolic	dol et 105
III.6.4 biologi	Etude de la stabilité de la quercétine libre ou encapsulée dans les milieux ques	106
III.6.5	Etude de l'activité antioxydante	107
III.7 A	Analyse statistique	108

Partie 3. Résultats et discussion10)9
Chapitre IV. Résultats et discussion)9
IV. Résultats et discussion10)9
IV.1 Etude du phénomène d'inclusion des composés actifs dans les CDs 10)9
IV.1.1 Caractérisation analytique des complexes d'inclusion en solution)9
IV.1.2 Modélisation moléculaire11	19
IV.2 Caractérisation des complexes d'inclusion à l'état solide	20
IV.3 Conclusion	21
V. Encapsulation du nérolidol et de la quercétine dans les LCs et DCLs	22
V.1 Mise au point de la méthode chromatographique pour le dosage du nérolidol et de la	a
quercétine	22
V.1.1 Spectres UV-visible	22
V.1.2 Dosage par CLHP	22
V.2 Optimisation de la formulation lipidique12	24
V.2.1 Effet du type de phospholipide sur la taille des liposomes	24
V.2.2 Effet du type de phospholipide sur l'efficacité et le rendement d'encapsulation de la quercétine	28
V.2.3 Effet du type de phospholipide sur la stabilité chimique des liposomes	29
V.3 Caractérisation des LCs et des DCLs encapsulant le nérolidol et la quercétine 13	37
V.3.1 Choix des CDs pour la formation des DCLs	37
V.3.2 Détermination de la taille des LCs et DCLs encapsulant le nérolidol et la quercétine	38
V.3.3 Détermination de l'efficacité et du rendement d'encapsulation14	43
V.4 Effet de l'encapsulation sur les propriétés physicochimiques du nérolidol et de la	
quercétine14	45
V.5 Etude de libération in vitro du nérolidol14	45
V.6 Etude de la photostabilité des composés actifs sous forme libre et encapsulé 14	17
V.6.1 Photostabilité du nérolidol14	17
V.6.2 Photostabilité de la quercétine par les CDs, LCs et DCLs	52
V.7 Stabilité physico-chimique des liposomes encapsulant le nérolidol15	53
V.8 Etude de la stabilité de la quercétine dans les milieux biologiques15	55
VI. Etude de l'activité antioxydante	57
Conclusions et Perspectives	59
Liste des travaux	74
Références	75

Liste des Figures

Figure 1 : Structure chimique du β -glucane, constituant majeur de l'avoine
Figure 2 : La structure chimique des isoflavones du soja
Figure 3 : Structure chimique du lycopène, ingrédient majeur des tomates
Figure 4 : Le sulforaphane, composé bioactif dans les crucifères (Herr & Büchler, 2010) 10
Figure 5 : Structure chimique des composés organosulfurés dans Allium sativum
Figure 6 : Strucutre de l'acide alpha linolénique (acide gras oméga 3) et ses effets bénéfiques
sur la santé13
Figure 7 : L'isoprène, unité de base des terpènes
Figure 8 : Voie de biosynthèse de l'IPP et du DMAPP (Paduch et al., 2007-modifié)
Figure 9 : La voie de l'acide mévalonique (Ashour et al., 2010)
Figure 10 : Classification des sesquiterpènes
Figure 11 : Structure chimique de cis (structure à gauche) et trans (structure à droite) du
nérolidol
Figure 12 : La classification des phénlylpropanoides
Figure 13 : Schéma simplifié de biosynthèse des flavonoïdes (Buer et al., 2010). Abbréviations
: CHS= chalcone synthase ; CHI= chalcone isomérase ; F3H= flavanone-3-hydroxylase; F3'H=
flavonone-3'-hydroxylase; FLS= flavonol synthase; DFR= dihydroflavonol réductase;
LDOX= leucoanthocyanidine dioxygénase ; GT= glucosyl transférase
Figure 14 : Structure chimique de base des flavonoïdes (C6-C3-C6)27
Figure 15 : Structure chimique de la quercétine et ses sources majeurs d'aliments (Bischoff,
2008)
Figure 16 : Les réactions de dégradation de la quercétine (Wang et al., 2016)
Figure 17 : La réactivité biologique de la quercétine-O-quinone
Figure 18 : Représentation schématique des émulsions (à gauche) et des microémulsions (à
droite)
Figure 19 : Structure de liposome
Figure 20 : Classification des liposomes
Figure 21 : Structure des phospholipides (Monteiro et al., 2014)
Figure 22 : Configuration L β (à gauche) et L α (à droite) des phospholipides au sein de la
membrane phospholipidique (Lorin et al., 2004)
Figure 23 : Comportement de la membrane au-dessus et au-dessous de la température de
transition
Figure 24 : Structure du cholestérol et son positionnement dans la bicouche lipidique 44
Figure 25 : Préparation des MLV par la méthode d'hydratation du film lipidique
Figure 26 : Obtention des SUV par sonication
Figure 27 : Préparation des liposomes par injection d'éthanol
Figure 28 : Préparation des liposomes par évaporation en phase inverse
Figure 29 : Principe de fonctionnement de la AFM
Figure 30 : Obtention des CDs natives par dégradation enzymatique de l'amidon par la
CGTase
Figure 31 : Structures chimiques des dérivés de la β-CD
Figure 32 : Représentation schématique du phénomène d'inclusion
Figure 33 : Représentation schématique des principales stœchiométries observées entre la CD
et l'invité

Figure 34 : Diagrammes de solubilité selon Higushi et Connors (Higuchi & Connors, 1965). Figure 35 : Schéma représentatif du système « drug-in-cyclodextrin-in-liposome » avec les complexes d'inclusion CD/PA incorporés dans la phase aqueuse des liposomes (Gharib et al., Figure 39 : Profils de solubilité des isomères cis (a) et trans-nérolidol (b) et de leur mélange racémique (c). Ils représentent la concentration en molécule invitée solubilisée en fonction de la concentration en CD (les expériences de phase de solubilité ont été réalisées deux fois). 110 Figure 41 : Diagramme de phase de solubilité de l'HE de Cabreuva obtenu par TOC montrant Figure 42 : Tracé des variations de l'absorbance de la quercétine en fonction de la **Figure 43 :** Etude par ¹H RMN de la complexation entre le trans-nérolidol et la β -CD : déplacement chimique des protons de la β -CD en absence et en présence du trans-nérolidol (a) et récapitulatif des variations de déplacements chimiques ($\Delta\delta$) des protons de la β -CD sous Figure 45 : Représentation des conformères les plus stables des complexes d'inclusion CD/cis-Figure 46 : Histogrammes montrant les valeurs d'EE % des complexes d'inclusion CD/Ner (a) **Figure 47 :** Spectres UV-visible du nérolidol (a) et de la quercétine (b) montrant les λ_{max} . 122 Figure 48: Chromatogrammes obtenus par CLHP pour le nérolidol (10 µg/mL) (a) et la Figure 49 : Courbes d'étalonnage utilisées pour le dosage du nérolidol (a) et de la quercétine Figure 50 : Graphes représentatifs des différentes formulations liposomiales montrant la Figure 51 : Photostabilité de la quercétine libre en solution aqueuse et encapsulée dans les Figure 53 : Le pourcentage de la quercétine restant dans les différentes formulations après 1 Figure 54 : Images bidimensionnelles obtenues par AFM montrant les liposomes constitués de Lipoid E80 (a), Lipoid S100 (b) et Phospholipon 90H (c) avant irradiation par les rayons UVC. Figure 55 : Histogramme montrant les valeurs du module d'Young (E) obtenues pour les trois Figure 56: Images bidimensionnelles obtenues par AFM (A) montrant les liposomes constitués de Lipoid E80 (a), Lipoid S100 (b) et Phospholipon 90H (c) et histogramme montrant Figure 57 : Histogramme montrant la concentration du nérolidol et de la quercétine solubilisée

Figure 58 : Graphes représentatifs des différentes formulations liposomiales : a) LCs, b) CDs
libres encapsulées dans les liposomes, c) DCLs montrant la distribution de taille des vésicules
obtenue par granulométrie laser
Figure 59 : Profils de libération du nérolidol à partir des CDs (a) et des formulations
liposomiales (b) en solution au cours du temps
Figure 60 : Profils de photodégradation de : a) cis-nérolidol, b) trans-nérolidol, c) nérolidol
libre ou en présence d'une solution de HP- β -CD à différentes concentrations et d) de l'HE de
Cabreuva libre ou complexée avec 1 mM HP-\beta-CD. Les résultats sont exprimés en pourcentage
de nérolidol restant en solution à chaque intervalle de temps148
Figure 61 : Photostabilité du nérolidol libre en solution aqueuse et encapsulé dans les
liposomes (CLs et DCLs) après irradiation aux rayons UVB150
Figure 62 : Photostabilité de la quercétine libre en solution aqueuse et encapsulée dans les
liposomes (LCs et DCLs) après irradiation aux rayons UVC152
Figure 63 : Graphes montrant la concentration de la quercétine restante au cours du temps dans
les milieux gastrique (a) et intestinal (b)
Figure 64 : Diagrammes montrant l'activité antioxydante du nérolidol (a) et de la quercétine
(b) en l'absence et en présence de CDs

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Classification des terpènes (Breitmaier, 2006).	18
Tableau 2 : Les propriétés physicochimiques essentielles du nérolidol.	22
Tableau 3 : Occurrence des différentes classes de flavonoïdes dans les aliments (Manac	ch et
al., 2004)	29
Tableau 4 : Principaux phospholipides qui constituent les formulations liposomiales	
(Immordino et al., 2006; Shashi et al., 2012)	42
Tableau 5 : Propriétés physicochimiques des cyclodextrines natives.	56
Tableau 6 : Comparaison de la vitesse de libération entre DCLs et d'autres formulation	S
liposomiales	70
Tableau 7 : Les systèmes d'encapsulation de la quercétine.	75
Tableau 8 : Présentation des formulations liposomiales encapsulant la quercétine	97
Tableau 9 : Présentation des formulations encapsulant le nérolidol.	99
Tableau 10 : Valeurs de K _f (M^{-1}), gain de solubilité S _t /S ₀ et CE obtenues à partir des	
diagrammes de phase de solubilité	112
Tableau 11 : Valeurs de $K_f(M^{-1})$ obtenues par spectroscopie UV-visible en comparaiso	n avec
des valeurs de phase de solubilité	116
Tableau 12 : Caractéristiques des différentes formulations liposomiales (pourcentage et	taille
des deux populations de liposomes)	127
Tableau 13 : Les valeurs de EE dans la suspension liposomiale et de RE de la quercétin	e dans
les liposomes constitués des trois types de lipides	129
Tableau 14 : Distribution de taille des liposomes après 1 an de stockage des formulation	ns à 4
°C	132
Tableau 15 : Caractéristiques des LCs et DCLs témoins et encapsulant le nérolidol et la	ι
quercétine (pourcentage et taille des deux populations de liposomes)	141
Tableau 16 : Valeurs d'efficacité et de rendement d'encapsulation du nérolidol et de la	
quercétine dans les LCs et DCLs.	143
Tableau 17 : Vitesse de dégradation K (min ⁻¹) du nérolidol libre ou complexé en solution	on
sous irradiation UVB	148
Tableau 18 : Constantes de vitesse de dégradation K (min ⁻¹) du nérolidol libre ou encap	osulé
dans les liposomes sous irradiation UVB	151
Tableau 19 : Caractéristiques des liposomes après un an de stockage à 4 °C (taille et	
pourcentage du nérolidol restant dans les liposomes)	154

Introduction

Introduction

De nos jours, l'alimentation n'est plus seulement considérée comme un élément de survie, assurant la croissance et le développement du corps humain mais, elle s'avère importante dans la prévention et la réduction de diverses maladies chroniques tels que diabète, obésité, cardiopathies, affections respiratoires, cancers...

De ce fait, la demande pour une alimentation équilibrée et des produits alimentaires fonctionnels qui répondent à des besoins spécifiques de santé est en croissance constante. De telles attentes ont suscité le développement d'aliments apportant une valeur ajoutée au-delà de leur simple valeur nutritive en incorporant à ces aliments des ingrédients bioactifs. Ces ingrédients appartiennent majoritairement aux métabolites secondaires de plantes tels que les alcaloïdes, les terpénoides et les phénylpropanoïdes.

Parmi ces ingrédients, le sesquiterpene nérolidol et le flavonoïde quercétine ont été choisis et ont fait l'objet de notre étude. Ces molécules possèdent de nombreuses propriétés biologiques (antioxydante, antimicrobienne, anti-inflammatoire, anticancéreuse, etc.) et sont considérées comme sans danger (Generally Recognized as Safe, GRAS) et approuvées par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (Food and Drug Administration, FDA). Ce statut permet leur incorporation dans les aliments afin d'assurer une meilleure protection et pour fournir des propriétés fonctionnelles à long terme.

Toutefois, ces molécules sont très faiblement solubles dans l'eau et sensibles aux conditions environnementales (chaleur, lumière, oxygène). De plus, la quercétine possède un goût amer et une faible biodisponibilité. Afin de contourner ces problèmes, divers systèmes d'encapsulation, à base de lipides, à base de polysaccharide et à base de protéines, ont été développés pour améliorer les propriétés physicochimiques des composés et empêcher ainsi leur inactivation durant les procédés industriels. Dans notre travail, nous nous sommes intéressées à l'encapsulation du nérolidol et de la quercétine dans trois types de systèmes : les CDs, LCs, et le système mixte DCL.

Ce travail de thèse a été réalisé en collaboration entre le Laboratoire des Molécules Bioactives (Faculté des Sciences, Section II, Université Libanaise) et l'Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (Université du Littoral Côte d'Opale, Dunkerque). Cette étude vise à encapsuler le nérolidol et la quercétine dans les trois types de systèmes, de les caractériser et d'examiner leur effet sur la protection, la libération ainsi que l'activité antioxydante des molécules bioactives.

Dans ce contexte, nous avons étudié l'interaction de ces deux composés avec différents types de CDs afin de choisir le meilleur complexe pour la formation des DCLs. Des techniques expérimentales et théoriques ont été utilisées pour la caractérisation des complexes d'inclusion afin de trouver les facteurs qui conditionnent la stabilité des liaisons entre les CDs et les deux molécules. Nous avons ensuite recherché la formulation lipidique optimale pour l'encapsulation du nérolidol. De ce fait, nous avons utilisé la quercétine comme molécule modèle pour la préparation des liposomes à partir de trois types de lipides par la méthode d'injection éthanolique : deux phospholipides insaturés (Lipoid E80, Lipoid S100) et un saturé (Phospholipon 90H). Par la suite, nous avons étudié l'effet de la composition lipidique sur les caractéristiques des liposomes. La meilleure formulation a été ainsi choisie pour l'incorporation du nérolidol et de la quercétine dans les LCs. Nous avons aussi préparé des liposomes encapsulant des complexes d'inclusion d'hydroxypropryl-β-CD/Ner et de sulfobutyléther-β-CD/Quer, dissouts dans la phase aqueuse formant le DCL, dans le but d'améliorer les caractéristiques des liposomes obtenus par la méthode conventionnelle. Des techniques analytiques et microscopiques ont été employées pour caractériser les liposomes en termes de taille, d'efficacité et rendement d'encapsulation. Après avoir compris et optimisé le procédé d'encapsulation, nous avons par la suite évalué l'effet de ces trois systèmes sur despropriétés physico-chimiques et biologiques du nérolidol et de la quercétine.

Ce manuscrit est organisé en trois grandes parties constituées de cinq chapitres :

La première partie présente une synthèse bibliographique divisée en deux chapitres. Le premier chapitre porte sur les aliments fonctionnels et leurs ingrédients bioactifs (Chapitre I).
Les systèmes d'encapsulation et leurs applications font l'objet du deuxième chapitre (Chapitre II).

-La deuxième partie développe la stratégie de travail que nous avions suivie pour la préparation et la caractérisation des complexes d'inclusion CD/invité, LCs et DCLs ainsi que les méthodes expérimentales utilisées dans ce but (**Chapitre III**).

- La troisième partie de ce manuscrit s'intéresse aux résultats obtenus et à leur discussion à l'égard de la littérature (**Chapter IV**).

Ce manuscrit s'achève par une conclusion générale et des perspectives.

Partie 1. Etude Bibliographique

Partie 1. Etude Bibliographique Chapitre I. Les aliments fonctionnels et leurs composés bioactifs

I. Aliments

La présence de macronutriments (protéines, matières grasses, glucides, fibres) et de minéraux confèrent aux aliments une source d'énergie indispensable au bon fonctionnement de l'organisme. On parle alors de la propriété nutritionnelle des aliments. À ceci, s'ajoute les qualités organoleptiques attribuées aux caractéristiques physiques et chimiques perçus par les organes des sens chez l'homme. En effet, les aliments sont choisis non seulement pour leurs valeurs nutritionnelles mais aussi pour leur apparence, leur bon goût et leur odeur agréable.

Toutefois, les recherches scientifiques qui ont débuté au 20^{ème} siècle ont montré qu'audelà de ces qualités, les aliments peuvent réduire le risque des maladies dites «de civilisation » comme le diabète, l'obésité ou le cancer. Ceci est dû principalement à la présence d'ingrédients bioactifs possédant diverses activités biologiques. Une troisième propriété est ainsi accordée aux aliments : la propriété fonctionnelle (Roberfroid, 2000; El Sohaimy, 2012).

I.1 Histoire et définition des aliments fonctionnels

Le concept des aliments fonctionnels n'est pas un concept nouveau puisqu'il a été abordé, il y a ~2500 années, par le médecin grec Hippocrate qui affirmait que « l'alimentation soit ta première médecine ». Des recommandations nutritionnelles visant à traiter ou à prévenir certaines maladies ont été documentées dans les textes d'Hippocrate et de Véda ainsi que dans la médicine traditionnelle chinoise (Guha et al., 1985; Pan et al., 2014). Par exemple, le thé à base de menthe a été prescrit pour lutter contre les troubles digestifs, le jus de Canneberge contre les infections urinaires ou bien le citron utilisé par les marins contre le scorbut. La thérapie médicamenteuse ensuite apparut au 19^{ème} siècle ce qui a limité l'utilisation des aliments fonctionnels. Durant les années 1900, l'importance du régime alimentaire dans la prévention et la promotion de la santé a été de nouveau mise en valeur. De ce fait, durant la première moitié du 20^{ème} siècle, les scientifiques focalisaient leurs recherches sur l'identification d'ingrédients importants, particulièrement les vitamines, et sur leur rôle dans la prévention de nombreuses maladies liées à l'alimentation (Hasler, 1998).

En 1970, les mauvaises habitudes alimentaires (aliments riches en graisses, consommation élevée de viande, etc.) ont conduit à l'accroissement de l'incidence des maladies chroniques comme les pathologies cardio-vasculaires, l'obésité, le diabète ainsi qu'à certains types de cancers. Ce phénomène est devenu une préoccupation majeure de santé publique,

aboutissant ainsi à l'émergence de nombreuses directives en termes de santé (Doyon & Labrecque, 2008). Le Japon initia pour la première fois, en 1980, avec la croissance de la population vieillissante et du coût de la santé, de vastes recherches visant à définir et sélectionner les aliments ayant un effet bénéfique sur la santé ainsi qu'à identifier leurs fonctions au niveau de l'organisme. C'est alors que l'expression « aliments fonctionnels » est née. À partir de 1991, le ministère japonais de la Santé et du Bien-être introduisit un système d'octroi de permis de distinguer tout aliment fonctionnel sous le label de FOSHU (Food for Specified Health Use). Ces aliments ont été ensuite développés aux Etats-Unis et ultérieurement en Europe (Obe, 2001; Verschuren, 2002).

Il n'existe pas actuellement une définition globale pour les aliments fonctionnels et chaque pays possède sa propre interprétation (Day et al., 2009; Martirosyan & Singh, 2015). De façon générale, ils sont définis comme des aliments naturels, ou modifiés ou des ingrédients alimentaires ayant des propriétés supplémentaires liées à la modulation de certaines fonctions physiologiques et qui vont au-delà de leurs propriétés nutritionnelles de base (Hasler, 2002). Ces aliments sont utilisés dans la vie courante et leur fonctionnalité dépend du contexte géographique et/ou culturel.

Japon

Comme déjà mentionné précédemment, l'apparition des aliments fonctionnels a débuté au Japon qui définit les aliments fonctionnels comme suit :

"Foods which are expected to have certain health benefits, and have been licensed to bear a label claiming that a person using them for specified health use may expect to obtain the health use through the consumption thereof" (Bigliardia & Galati, 2013).

Leur classification repose sur plusieurs critères relatifs au type de produit ou à sa fonctionnalité. Onze catégories d'ingrédients ont été reconnues et plusieurs centaines de produits ont été labélisés FOSHU. Ils sont destinés, par exemple, à réguler le transit gastrointestinal (les pré- et probiotiques dans les produits laitiers fermentés), à améliorer l'absorption des minéraux (phosphopeptides de caséine), à régler la pression artérielle (lactotripeptides, glycosides dans les feuilles de Eucommiacea) et à diminuer le taux de cholestérol et de sucre dans le sang (chitosane, protéines de soja, produits à base d'avoine), etc (Siró et al., 2008).

Europe

L'Union Européenne ne dispose pas, jusqu'à présent, d'une législation harmonisée sur les aliments fonctionnels, elle se base alors sur les allégations nationales de santé (Obe, 2001).

En Europe, la définition des aliments fonctionnels est la suivante: *'A food can be regarded as* functional if it is satisfactorily demonstrated to beneficially affect one or more target functions in the body, beyond adequate nutritional effects, in a way which is relevant to either an *improved state of Health and wellbeing, or a reduction of risk disease*" (Verschuren, 2002).

Ces aliments fonctionnels ne peuvent pas être sous forme de capsules ou de poudre et visent à améliorer la santé et le bien-être et/ou réduire le risque de maladies (Smith et al., 1997).

États-Unis

Aux Etats-Unis, le terme "aliments fonctionnels" n'existe pas. Tout aliment ou ingrédient alimentaire possédant des effets bénéfiques sur la santé doit être approuvé par la "Food and Drug Administration" (FDA). Les définitions de cette catégorie d'aliments proposées par plusieurs associations américaines, comme "National Academy of Sciences", "Food and Nutrition Board" et "The International Life Sciences Institute", reposent sur la même conception des aliments fonctionnels définis auparavant ("A conventional food with nutrient-content claims, pre-approved health claims, an authoritative statement such as the Food and Drug Administration Modernization Act, and structure-function claims with disclaimer or structure-*function claims without disclaimer*"). Néanmoins, pour l' "American Dietetic Association", tout aliment est considéré fonctionnel puisqu'il possède une valeur nutritive ; l'essentiel est de consommer avec modération et suivant un régime alimentaire bien équilibré (Hasler, 2002).

I.2 Propriétés biologiques des aliments fonctionnels

I.2.1 Aliments d'origine végétale

De nombreuses recherches scientifiques (in vitro, in vivo, cliniques et épidémiologiques) ont prouvé qu'une alimentation à base de plantes pouvait réduire le risque d'apparition de maladies chroniques. Par exemple, des études épidémiologiques ont rapporté une relation inverse entre la consommation régulière de fruits et de légumes et le risque de cancer du côlon (Magalhães et al., 2012), de l'estomac (Stevens et al., 2011), du pancréas (Cappellani et al., 2012), de la prostate (Watson et al., 2013), du sein (Aune et al., 2012) et des ovaires (Paxton et al., 2012).

Cet effet est attribué à la présence de métabolites secondaires des plantes nommés aussi « composés phytochimiques » (Hasler, 1998; Rodríguez-Casado, 2016). Ces molécules bioactives exercent au niveau de l'organisme diverses fonctions, comme l'altération ou l'activation de facteurs de transcription, la modification du métabolisme cellulaire, etc (Traka & Mithen, 2011).

Plusieurs études ont démontré que la majorité des composés phytochimiques possèdent des propriétés antioxydantes (Chiva-Blanch & Visioli, 2012; Giampieri et al., 2012; Lipinski, 2011; Speciale et al., 2011) et anti-inflammatoires (Nishino et al., 2005; Zhao et al., 2011) ce qui leur confère des propriétés pharmacologiques importantes. En outre, Wang & Bohn. (2012) ont montré qu'un mélange de polyphénols (anthocyanines, proanthocyanines et flavonols) présents naturellement dans les fruits rouges possède une activité anticancéreuse supérieure à celle des polyphénols individuels. Cela révèle l'importance de la consommation de fruits et légumes qui contiennent des mélanges d'ingrédients bioactifs et possèdent des activités biologiques potentiellement amplifiées, on parle ainsi d'effet additif ou synergique.

Quelques exemples d'aliments fonctionnels d'origine végétale sont présentés ci-dessous :

I.2.1.1 Avoine

Les aliments à base d'avoine ont fait l'objet de plusieurs investigations, particulièrement en raison de leur contenu en β -glucane, une fibre soluble présente en grande quantité dans cette céréale (**Figure 1**). Une consommation régulière d'avoine peut réduire le taux de cholestérol surtout la lipoprotéine de basse densité (LDL) diminuant ainsi l'occurrence des maladies cardiovasculaires (Truswell, 2002). Cette fibre soluble favorise l'excrétion fécale du cholestérol en diminuant sa fabrication par le foie, ce qui entraîne une réduction significative du taux de cholestérol plasmatique. Une étude menée par la compagnie "Quaker Oats" a conclu que la consommation de 3 g de β -glucane (équivalent à 60 g d'aliments à base d'avoine) aboutit à une réduction de 5 % du taux de cholestérol sanguin (Hasler, 1998). L'avoine peut également traiter le diabète de type 2 par la normalisation des taux de glucose et d'insuline. En effet, le β -glucane ralentirait l'absorption des glucides dans l'intestin, ce qui diminuerait la glycémie après les repas, entraînant par le fait même une réduction des besoins en insuline (Jenkins et al., 2002 ; Shen et al., 2016 ; Tapola et al., 2005 ; Tessari & Lante, 2017).



Figure 1 : Structure chimique du β -glucane, constituant majeur de l'avoine.

I.2.1.2 Soja

Le soja joue un rôle crucial dans la prévention et le traitement des maladies cardiovasculaires (Erdman, 2000; Sacks et al., 2006), du cancer du sein (Fen-Jin and Chen, 2013; Lu et al., 2000), de l'ostéoporose ainsi que dans le maintien du capital osseux chez les femmes post-ménopausées (Messina & Messina, 2000; Taku et al., 2011). De plus, la réduction des taux de cholestérol (LDL) et de triglycérides par le soja est bien documentée (Hermansen et al., 2003 ; Taku et al., 2011; van Ee, 2009; Zhuo et al., 2004). En effet, le seuil de consommation de soja nécessaire pour réduire le taux de cholestérol est de 25 g (Sacks et al., 2006).

De nombreuses molécules anticancéreuses ont été identifiées dans cet aliment comme les phytostéroles, les saponines, les acides phénoliques, les acides phytiques et les isoflavones (Mense et al., 2008). Ces derniers sont les plus intéressants parmi les autres composés, vu que le soja est la source alimentaire majeure d'isoflavones (Kudou et al., 1991). Il contient trois isoflavones principaux : génistéine, daidzéine et glycitéine (**Figure 2**) (Sacks et al., 2006). Ces molécules miment structuralement et/ou fonctionnellement l'action des œstrogènes naturels (17- β -œstradiol). À des concentrations bien déterminées, les isoflavones possèdent une activité antagoniste vis-à-vis des récepteurs œstrogéniques. Cela peut expliquer pourquoi les populations qui consomment une quantité élevée de soja (Asie du Sud-Est) ont un risque réduit de cancers œstrogène-dépendants (Allred et al., 2004 ; Trock et al., 2006). Selon une recherche effectuée auprès de 120 femmes de Shanghai, un régime riche en soja permet de réduire de 50 % le risque de cancer du sein. Les chercheurs ont mesuré les niveaux d'isoflavones contenues dans l'urine des sujets afin de déterminer quelle était leur consommation de soja. Les isoflavones sont d'excellents marqueurs de la consommation de soja, parce qu'ils sont des composés très abondants dans le soja et solubles dans l'eau. Les chercheurs ont découvert que les femmes qui avaient les plus hauts niveaux d'isoflavones étaient la moitié moins susceptible de développer un cancer du sein par rapport à celles qui montraient les plus faibles taux d'isoflavones (Zheng et al., 1999).



Figure 2 : La structure chimique des isoflavones du soja.

I.2.1.3 Tomates

Les effets antioxydants et anticancéreux des tomates ou des produits dérivés (jus, ketchup, sauce tomate, soupe) sont attribués majoritairement à la présence de caroténoïdes (lycopène) et de polyphénols (l'acide férulique, l'acide chlorogénique, l'acide caféique et des flavonoïdes tels que la quercétine, le kaempférol, la rutine, la naringinine).

La tomate est la source majeure de lycopène dont les teneurs varient en fonction des critères agronomiques (Figure 3). Le lycopène se montre très actif ; il : i) neutralise les espèces réactifs de l'oxygène (ERO ou ROS : reactive oxygen species) ; ii) réduit l'hypertension artérielle ; iii) inhibe la prolifération des cellules cancéreuses humaines, surtout le cancer de la prostate au niveau de la phase G0-G1 du cycle cellulaire (Etminan et al., 2004 ; Holzapfel et al., 2013 ; Story et al., 2010). Il a été démontré que la cuisson des tomates augmente la biodisponibilité du lycopène par rapport à des tomates crues puisqu'elle favorise la transformation du lycopène en sa forme cis qui est mieux absorbable que l'isomère trans (El Sohaimy, 2012 ; Unlu et al., 2007). Une méta-analyse a montré que le risque de développement du cancer de la prostate chez les hommes (>47000 personnes) qui consommaient au moins 10 portions de tomates et de ses dérivés par jour a été diminué d'environ 35 % pour les personnes à un stade avancé du cancer et de 53 % pour les hommes qui en consomment peu (Giovannucci et al., 1995). Une autre observation a prouvé que la consommation de sauce tomate (au moins 2 portions par semaine) était associée à une réduction de 23 % du risque de cancer de la prostate (Giovannucci et al., 2002). D'autre part, plusieurs études randomisées cliniques ont révélé une diminution du taux de l'antigène prostatique spécifique (le PSA : prostate-specific antigen), marqueur biologique du cancer de la prostate, chez les personnes ayant une hyperplasie ou un cancer de la prostate (Kavanaugh et al., 2007).



Figure 3 : Structure chimique du lycopène, ingrédient majeur des tomates.

I.2.1.4 Brocoli

Le brocoli, légume appartenant à la famille des Brassicaceae (crucifères) dans laquelle on trouve aussi le chou-fleur, le chou de Bruxelles et le chou vert, est connu pour ses effets antioxydants, anticancéreux et anti-inflammatoires (Latté et al., 2011). Des études épidémiologiques ont suggéré que la consommation d'au moins une portion de brocoli par semaine peut diminuer l'incidence et le développement du cancer colorectal, de l'estomac, des poumons et de la prostate (Park & Pezzuto, 2002 ; Jeffery & Keck, 2008 ; Lin et al., 1998 ; Hara et al., 2003 ; Traka & Mithen, 2011; Verhoeven et al., 1996).

Les principaux constituants des Brassicaceae sont les glucosinolates. Leur hydrolyse par l'enzyme myrosinase (enzyme présente dans les cellules végétales) aboutit à la formation de nombreux produits bioactifs comme les isothiocyanates (sulforaphane) (Figure 4), les thiocyanates, les nitriles, l'oxazolidine-2-thione et les indoles comme l'indole-3-carbinol (I3C) (Hasler, 1998). Ces molécules modulent plusieurs processus cellulaires par la régulation du cycle cellulaire, de l'apoptose, etc... Par exemple, l'I3C inhibe la cancérogenèse spontanée ou induite par des substances chimiques, au niveau des glandes mammaires, du foie, des poumons, de l'utérus et du tractus gastro-intestinal. Son activité anticancéreuse peut être attribuée à sa capacité de cibler différentes voies de signalisation qui régissent la progression du cycle cellulaire, l'apoptose, l'homéostasie hormonale, l'angiogenèse tumorale, la réparation de l'ADN ainsi que la résistance multiple aux anticancéreux (Weng et al., 2008). En outre, le sulforaphane est potentiellement actif et majoritairement responsable des effets bénéfiques du brocoli (Zhang et al., 1992). Le sulforaphane est un puissant antioxydant et anticancéreux dont le mécanisme d'action implique la détoxification des xénobiotiques par l'induction des enzymes de la phase I du métabolisme (essentiellement les cytochromes P450) (Herr et al., 2010). Il a été observé que le sulforaphane présente une activité antibactérienne contre des bactéries Gram négatifs comme Helicobacter pylori chez l'animal et l'homme (Yanaka et al., 2009) et des bactéries Gram positifs comme Staphylococcus aureus (Aires et al., 2011 ; Dufour et al., 2015 ; Fahey et al., 2002). De plus, des études précliniques et cliniques ont conclu que le sulforaphane possède une activité anti-inflammatoire suite à l'inhibition de la production des cytokines (Juge et al., 2007). D'autres ingrédients bioactifs ont été identifiés dans le brocoli comme les flavonoïdes (quercétine et kaempférol), les acides phénoliques (acide sinapinique) et les caroténoïdes (la lutéine et la zéaxanthine) (Aires et al., 2011).



Figure 4 : Le sulforaphane, composé bioactif dans les crucifères (Herr & Büchler, 2010).

I.2.1.5 Ail

Allium sativum, plus connu sous le nom d'ail, est utilisé depuis plusieurs centaines d'années dans les préparations culinaires et médicinales. L'ail est composé majoritairement de deux groupes de molécules phytochimiques : les flavonoïdes (anthocyanines et flavonols) et les composés organosulfurés (allicine, diallyl sulfide, diallyl disulfide et ajoène, **Figure 5**) qui lui confèrent ses effets bénéfiques pour la santé (Griffiths et al., 2002). Suite à la coupure de l'ail, l'alliine est libérée et sera transformée sous l'action de l'enzyme l'allinase en allicine (molécule responsable de l'odeur caractéristique de l'ail). Les recherches scientifiques menées in vitro ont montré que l'ail possède des propriétés antibactériennes, antivirales, anti-fongiques (Groppo et al., 2007 ; Sohn et al., 2009), anti-inflammatoires (Keiss et al., 2003), anticancéreuses (Antony & Singh, 2011; Kaschula et al., 2011) et des effets cardioprotecteurs (Sobenin et al., 2010). Une diminution du taux de cholestérol plasmatique et de la pression artérielle ainsi qu'une augmentation de l'activité fibrinolytique ont été observées chez des personnes ayant consommé des suppléments d'ail parallèlement avec un régime riche en lipides (Durak et al., 2004 ; Kojuri et al., 2007). De plus, une méta-analyse a montré que l'ail peut réguler le taux de glucose et potentiellement réduire les complications liées au diabète (Kook et al., 2009). Par ailleurs, de

nombreuses investigations épidémiologiques indiquent une corrélation positive entre la consommation d'ail et la réduction de certains types de cancers comme le cancer de l'estomac, de l'œsophage, du pancréas et le cancer colorectal (Chan et al., 2005; González et al., 2006; Tanaka et al., 2004). Les résultats d'une méta-analyse portant sur 18 études épidémiologiques publiées entre 1966 et 1999 démontrent une diminution de 30 % du risque du cancer colorectal et d'environ 50 % du risque de cancer de l'estomac en cas de consommation élevée d'ail (Fleischauer & Arab, 2001). Enfin, d'autres études ont indiqué qu'une quantité élevée en allium (>10g/jour vs <2.2g/jour) est associée à une réduction de 50 % du risque de cancer de la prostate (Hsing et al., 2002).





Figure 5 : Structure chimique des composés organosulfurés dans Allium sativum.

I.2.1.6 Olives (Olea europaea)

L'olive et l'huile d'olive occupent une place très importante dans l'alimentation des pays méditerranéens (Grèce, Italie, sud de la France, Tunisie, Liban...) (Trichopoulou & Lagiou, 1997). L'huile d'olive est amplement utilisée dans la médecine traditionnelle comme laxatif doux, émollient, adoucissant et sédatif, etc. (Belarbi et al., 2011 ; Visioli et al., 2002). Des études in vitro et in vivo ont montré que l'olive est un puissant antioxydant ce qui explique l'importance du régime alimentaire méditerranéen pour la santé (Kawaguchi et al., 2011; Raederstorff, 2009).

Malgré la complexité de la composition chimique des olives, les ingrédients actifs responsables de son effet biologique sont principalement l'acide oléique, les composés phénoliques (hydroxytyrosol, tyrosol et oleuropéine) et le squalène (Owen et al., 2000). Par exemple, la capacité de l'hydroxytyrosol et du tyrosol à piéger les radicaux libres a été démontrée supérieure à celle de la vitamine E et de l'hydroxytoluène butylé. D'autre part, l'olive est également connue pour son effet cardioprotecteur, particulièrement pour sa capacité à réduire la pression artérielle et à diminuer le taux de cholestérol (Waterman et al., 2007). En effet, l'hydroxytyrosol et le tyrosol inhibent l'oxydation du LDL dans le plasma et régulent plusieurs biomarqueurs du stress oxydatif à de très faibles concentrations (Owen et al., 2000 ; Visioli et al., 2002). De même, des études in vitro ont montré que l'hydroxytyrosol et l'oleuropéine inhibent la production d'isoprostanes, marqueurs de l'oxydation de LDL (Salami et al., 1995). En outre, des données épidémiologiques ont suggéré que la consommation d'olive et de ses dérivés réduit l'incidence de certains cancers comme le cancer du sein, de la peau et du colon (Harwood et al., 2002 ; Owen et al., 2000 ; Visioli et al., 2002). Finalement, l'activité antimicrobienne des trois polyphénols de l'olive a été prouvée in vitro contre des souches bactériennes responsables des infections intestinales et respiratoires (Romero et al., 2007).

I.2.2 Les aliments d'origine animale

Bien qu'un nombre considérable de substances naturelles bioactives sont d'origine végétale, il existe également un certain nombre de composants physiologiquement actifs dans les produits d'origine animale qui méritent d'être considérés pour leur rôle potentiel dans l'amélioration de la santé humaine.

I.2.2.1 Poissons

Les acides gras oméga-3 constituent une classe importante des acides gras polyinsaturés dont la source majeure est l'huile de poisson. Le rôle des oméga-3 est relié principalement à la prévention des maladies cardiovasculaires (Figure 6). Des chercheurs ont remarqué que, dans le Grand Nord, les Esquimaux, qui consomment beaucoup de poissons, étaient rarement touchés par les maladies cardiovasculaires malgré leur régime alimentaire riche en lipides (Hasler, 1998). À partir de ce constat, les acides gras oméga-3 ont été largement étudiés et des études épidémiologiques ont démontré que la consommation d'aliments riches en graisses oméga-3 réduit l'incidence des maladies cardiovasculaires ainsi que les complications qui leur sont associées. Par exemple, plusieurs études ont montré que la consommation de 3 à 5 g d'huile de poisson peut faire diminuer le taux de triglycérides sanguins de 30 à 50 %, notamment chez les personnes atteintes de diabète de type 2 (Montori et al., 2000). Une méta-analyse publiée en 2002 et regroupant les résultats de 11 études (15806 sujets) a confirmé que chez les personnes atteintes de maladies coronariennes, la consommation d'oméga-3 sous forme alimentaire ou sous forme de suppléments réduisait les décès attribuables aux infarctus du myocarde et les morts subites (Bucher et al., 2002). Enfin, une étude menée sur 2033 hommes souffrant de maladies cardiovasculaires a montré que les hommes qui mangeaient du poisson au moins deux

fois par semaine avaient un taux de mortalité (29 %) plus faible que ceux qui n'en consommaient pas (Leaf et al., 2003).



Figure 6 : Strucutre de l'acide alpha linolénique (acide gras oméga 3) et ses effets bénéfiques sur la santé.

I.2.2.2 Produits laitiers

Les produits laitiers sont considérés fonctionnels puisqu'ils représentent l'une des meilleures sources de calcium, nutriment essentiel pour prévenir l'ostéoporose. Toutefois, d'autres composants fonctionnels ont été identifiés dans ces produits, connus sous le nom de 'probiotiques' (Heller, 2001). Les probiotiques sont des micro-organismes bénéfiques présents dans la flore buccale, intestinale et vaginale. Leur présence permet notamment d'inhiber la prolifération des micro-organismes nuisibles qui peuvent, par exemple, provoquer des diarrhées infectieuses ou des vaginites. Les probiotiques contribuent également à la digestion des aliments. Plus particulièrement, les produits laitiers fermentés, comme le yaourt, facilitent la digestion du lactose, notamment chez les personnes qui y sont intolérantes (De Vrese et al., 2001). Dans un organisme en bonne santé, le tube digestif est colonisé environ par 400 espèces différentes de microorganismes et qui forment un écosystème stable et essentiel au maintien d'une bonne santé. La prise d'antibiotiques, le stress, les infections ou une déficience du système immunitaire peuvent déséquilibrer cet écosystème. Les probiotiques agissent selon trois principaux mécanismes : a) modulation de l'activité du système immunitaire intestinal ; b) augmentation de la fonction de barrière de la muqueuse intestinale, en accentuant par exemple la production du mucus ou des anticorps de type Immunoglobuline A (IgA); c) les probiotiques ont des effets antimicrobiens directs, en prenant la place des bactéries pathogènes (phénomène de compétition) et en empêchant leur adhésion aux parois intestinales (Kechagia et al., 2012 ; Martínez-Cañavate et al., 2009). Bien que divers effets bénéfiques pour la santé soient attribués aux probiotiques, la prévention et le traitement des diarrhées a suscité plus d'attention. Les bactéries lactiques, en particulier Lactobacillus rhamnosus GG, Lactobacillus casei, Lactobacillus acidophillus, Bifidobacterium bifidus et la levure Sacharomyces boulardii peuvent réduire les risques de diarrhée infectieuse aiguë causée par la gastroentérite d'origine virale, tant chez les enfants que chez les adultes (Allen et al., 2004 ; Van Niel et al., 2002).

Une méta-analyse, réalisée à Londres, a évalué l'efficacité de certains probiotiques (Saccharomyces boulardii, Enterococcus faecium, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus bulgaricus et Bifidobacterium longum) pour la prévention de la diarrhée consécutive à la prise d'antibiotiques. Les résultats de cette méta-analyse suggèrent que le S. boulardii et le Lactobacillus seraient efficaces dans la prévention de ce type de diarrhée (D'Souza et al., 2002). Enfin, des études menées sur l'efficacité des probiotiques contre l'infection à Helicobacter pylori (cause de nombreuses gastrites et de la plupart des ulcères gastroduodénaux) ont fait l'objet de 2 méta-analyses. L'une d'elles (10 études, 963 participants) a montré que les bactéries lactiques de laits fermentés (lactobacilles et bifidobactéries), combinées à la trithérapie classique, augmentent de 5 à 15 % les chances de guérison (Zou et al., 2009). L'autre (8 études, 1 372 participants) a conclu que les lactobacilles améliorent non seulement le taux de réussite du traitement classique, mais qu'ils atténuent aussi ses effets indésirables (Sachdeva & Nagpal, 2009).

I.3 Les composés bioactifs des aliments

Les propriétés biologiques des aliments, comme déjà décrites précédemment, résultent notamment de la présence de molécules bioactives naturelles. On parle de métabolites secondaires de plantes qui jouent un rôle crucial dans la défense des plantes contre les herbivores ainsi que dans l'interaction plante/environnement (Korkina, 2007). Ces métabolites sont divisés en trois grandes classes :

Les alcaloïdes et les composés azotés

Les composés terpéniques

Les composés phénylpropanoïdes (PPs)

Dans ce mémoire, nous nous sommes intéressés uniquement aux composés terpéniques (le sesquiterpene nérolidol) et aux PPs (le flavonoïde quercétine).

I.3.1 Les composés terpéniques

I.3.1.1 Définition

Le mot « terpène » provient du mot « térébenthine » ou résine de conifères (Phillips et al., 1999). La distillation de cette résine aboutit à la formation de l'huile essentielle (HE) de térébenthine qui contient des acides résiniques et des hydrocarbures. Ces derniers représentent les terpènes. On distingue aussi les terpénoïdes, dérivés de terpènes (alcools, aldéhydes, cétones, acides, lactones, etc...). Dans la suite du manuscrit, les deux termes « terpènes » et « terpénoïdes » seront référés sans différence sous un seul terme « terpènes ».

Les terpènes constituent la famille la plus structurellement et fonctionnellement variée et la plus abondante parmi les produits naturels. Plus de 65000 structures ont été identifiées jusqu'à présent (Berthelot et al., 2012). Ils regroupent des molécules à structure simple, de poids moléculaire variable, saturées et insaturées (Christianson, 2008). Malgré leur diversité structurale, tous les terpènes sont issus de la condensation d'unités de base à 5 carbones de type isoprène (**Figure 7**) (Ashour et al., 2010).



Figure 7 : L'isoprène, unité de base des terpènes.

Les unités isoprènes peuvent être reliées entre elles par des jonctions tête-queue (T-Q) ou queue-queue (Q-Q) pour former les mono ou sesquiterpènes linéaires ou cycliques, composants principaux des huiles essentielles (HEs), les diterpènes comme le squalène, etc (Poulter, 1990; Chizzola, 2013). Parmi les terpènes, on trouve des composés hautement polymérisés tel le caoutchouc.

I.3.1.2 Biosynthèse des terpènes

Les terpènes sont synthétisés par la condensation des unités isopentényl-diphosphate (IPP) ou de son isomère allylique diméthyleallyl-diphosphate (DMAPP) issues de la voie classique de l'acide mévalonique ou de son alternative non-mévalonique : la voie du méthylérythritol phosphate (**Figure 8**) (Berthelot et al., 2012). Dans ce mémoire, nous détaillerons uniquement la voie de synthèse du nérolidol : la voie mévalonique.

I.3.1.2.1 La formation des blocs de construction : IPP et DMAPP

La première étape de synthèse des terpénoides consiste à la formation de l'unité isoprénique de base : isopentényl-pyrophosphate (IPP), obtenue par la voie du mévalonate avec l'acétylCoA (AcCoA) comme précurseur. Cette voie est initiée par la condensation de trois molécules d'AcCoA pour former le (S)-3-hydroxy-3-méthyleglutaryl-CoA (HMG-CoA). Ensuite, le HMG-CoA est réduit en acide mévalonique (MVA) par la HMG-CoA réductase. Une série de phosphorylations et une décarboxylation du MVA aboutissent à la formation de l'IPP. L'isomérisation de l'IPP par la IPP isomérase donne une autre unité de la voie MVA : le DMAPP (**Figure 8**) (Christianson, 2008; Paduch et al., 2007).



Figure 8 : Voie de biosynthèse de l'IPP et du DMAPP (Paduch et al., 2007-modifié).

I.3.1.2.2 Formation des prényl-diphosphates : GPP, FPP et GGPP

La seconde étape dans la voie MVA débute par la condensation tête-queue de l'IPP en trois prényl-diphosphates : géranyl-diphosphate (GPP), farnésyl-diphosphate (FPP) et gérnaylgéranyl-diphosphate (GGPP). Ces réactions sont catalysées par des prényltransférases avec les prényl-diposhphate comme substrat : GPP, FPP et GGPP synthases (Dewick, 2002). La troisième étape est une série de cyclisations et de réarrangements moléculaires des prényl-diphosphates aboutissant à la formation des molécules représentatives de chaque classe de terpènes. GPP, FPP et GGPP sont, respectivement, les précurseurs des monoterpènes, des sesquiterpènes et des diterpènes. FPP et GGPP peuvent également se dimériser par le couplage tête-tête pour produire les tri- et tétraterpènes (**Figure 9**) (Ashour et al., 2010; Berthelot et al., 2012). La grande variété des structures terpéniques est due à l'évolution de la superfamille des terpènes synthases qui compte jusqu'à présent plus de 100 gènes (Tholl, 2006).


Figure 9 : La voie de l'acide mévalonique (Ashour et al., 2010).

I.3.1.3 Classification des terpènes

Les terpènes possèdent tous la même formule de base : $(C_5H_x)_n$ avec x qui est variable en fonction du degré d'insaturation de la molécule. Leur classification repose sur le nombre entier n d'unités isoprènes (**Tableau 1**). On distingue :

n=1 : les hemiterpènes (C₅)

n=2: les monoterpènes (C₁₀)

n=3 : les sesquiterpènes (C15)

```
n=4: les diterpènes (C<sub>20</sub>)
```

```
n=5 : les sesterpènes (C<sub>25</sub>)
```

```
n=6: les triterpènes (C<sub>30</sub>)
```

```
n=8 : les tétraterpènes ou caroténoïdes (C40)
```

```
n >8 : les polyterpènes (> C40)
```

On peut également classer les terpènes selon le nombre de cycles présents dans leur structure : les terpènes acycliques (présentant une structure ouverte), les terpènes monocycliques, les terpènes bicycliques, les terpènes tricycliques et les terpènes tétracycliques.

Le tableau suivant représente quelques exemples des différentes classes de terpènes ainsi que leur occurrence dans les aliments.

Classes	Acycliques	Monocycliques	Bicycliques	Occurrence dans les aliments
Hemiterpènes C5	Pérol	_	_	Citron, canneberge, myrtilles
Monoterpènes C ₁₀	Linalool OH	Limonène	α/β-Pinène	Menthe, agrumes, gingembre
Sesquiterpènes C ₁₅	Nérolidol	α/β-Bisabolol	Germacrène	Bigaradier, bergamote, pelures de Citrus junos
Diterpènes C ₂₀	Acide phytanique	Rétinol		Produits laitiers, carottes, conifères
Sesterterpènes C ₂₅	Pentaprénol	_	_	Pommes de terre
Triterpènes	Squalène	_	_	Huile d'olive

Tableau 1 : Classification des terpènes (Breitmaier, 2006).

Parmi les différentes classes de terpènes, nous nous intéresserons plus particulièrement à la famille des sesquiterpènes à laquelle appartient le nérolidol, qui a fait l'objet de notre étude.

I.3.1.3.1 Sesquiterpènes

Les sesquiterpènes sont des composés possédant 15 atomes de carbone qui se trouvent généralement sous forme d'hydrocarbures ou de leurs dérivés oxygénés (alcools, aldéhydes, cétones, acides carboxyliques et lactones). Il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes.

On distingue des sesquiterpènes linéaires, monocycliques, bicycliques, tricycliques et

polycycliques (**Figure 10**). Ils sont présents dans les HEs et agissent comme phéromones, hormones juvéniles et agents de défense (Cordell, 1976; Grabmann, 2005). En outre, les sesquiterpènes et surtout les sesquiterpènes lactones constituent un groupe important de produits pharmaceutiques très actifs. L'exemple le plus connu est l'artémisinine qui est à la base des médicaments antipaludiques les plus efficaces (Lange & Ahkami, 2013).



Figure 10 : Classification des sesquiterpènes.

I.3.1.3.2 Sesquiterpènes acycliques

Farnésènes

Les farnésènes sont des hydrocarbures ramifiés avec quatre doubles liaisons. E,E- α -farnésènes et E,E- β -farnésènes sont des constituants de diverses HEs. La forme α se trouve dans la pelure des pommes, des poires et d'autres fruits. Parmi les produits d'oxydation des farnésènes, on distingue l'alcool primaire farnésol et l'alcool tertiaire nérolidol (existant sous forme d'isomères E et Z) présents dans de nombreuses HEs dont celle des fleurs de neroli, d'oranger et de gingembre (Chizzola, 2013; Fraga, 2007). Les aldéhydes α -sinensal et β -sinensal issus de α - et β -farnésènes contribuent à l'odeur des HEs de nombreuses espèces de citrus (Breitmaier, 2006; Chizzola, 2013).

I.3.1.3.3 Sesquiterpènes monocycliques

Ils sont divisés en quatre classes : cyclofarnésanes, bisabolanes, germacranes, élémanes et humulanes.

Les cyclofarnésanes et les bisabolanes

Les cyclofarnésanes sont obtenus suite à la cyclisation des carbones C6 et C7 des farnésanes. L'acide abscissique est un cyclofarnésane présent dans les feuilles de chou-fleur, de pomme de terre et de rose. Il joue le rôle d'hormone végétale impliquée dans le développement et la germination des graines et dans la tolérance des plantes aux stress. La fermeture au niveau de C1 et C6 des farnésanes aboutit à la formation des bisabolanes, qui représentent la classe la plus importante des sesquiterpènes monocycliques. On compte par exemple l' α -zingibérène, composant majeur de l'HE du gingembre (Zingiber officinalis) et le β -curcumène, composé principal de l'huile de curcuma (Curcuma aromatica et Curcuma longa). En outre, il existe des dérivés oxygénés des bisabolanes comme l' α -bisabolol qui est l'ingrédient caractéristique de la camomille allemande (Matricaria recutita).

Les germacranes et les humulanes

Deux autres groupes de sesquiterpènes monocycliques ayant un cycle constitué de 10 et 11 atomes de carbones sont les germacranes (germacrène A, B et D) et les humulanes (α -humulène), respectivement. Les germacrènes B se trouvent dans l'HE de Citrus junos et les germacrènes D dans l'huile de Citrus bergamia (la bergamote) alors que les humulènes ont été isolés de l'houblon et sont aussi présents dans l'HE de Lauracées (Lindera strychnifolia).

I.3.1.3.4 Sesquiterpènes polycycliques

Vue la diversité de cette catégorie, on détaille uniquement le groupe le plus important, les caryophyllanes.

Caryophyllanes

Les caryophyllanes sont obtenus suite à une cyclisation de C2 et C10 des humulanes en cyclobutane. Le caryophyllène est un sesquiterpène bicyclique composé d'un macrocycle à 9 atomes de carbone avec un noyau cyclobutane. Il est un constituant majeur des HEs produites par le giroflier, le chanvre cultivé, le romarin, l'eucalyptus et le thym. Sous forme de mélange avec son isomère cis l'isocaryophyllène, ils se trouvent dans l'huile de clou de girofle et de jasmin (Jasminum sambac). Le β -caryophyllène agit comme agoniste du récepteur des

cannabinoïdes de type 2 (CB2) et possède un effet anti-inflammatoire cannabimimétique in vivo (Gertsch et al., 2008).

I.3.1.4 Nérolidol

Le nérolidol (3,7,11-triméthyledodéca-1,6,10-triène-3-ol), connu aussi sous le nom de péruviol, est un sesquiterpène alcool acyclique, ayant une odeur florale, présent dans de nombreuses HEs provenant de nombreuses plantes comme Baccharis dracunculifolia, Amaranthus retroflexus, Canarium schweinfurthii, Elettaria cardamomum (L.) Maton, Momordica charantia L., Piper aleyreanum C. DC, Piper claussenianum (Miq.) C. DC et Myrocarpus fastigiatus (Tan et al., 2015). Dans la nature, le nérolidol existe sous deux formes d'isomères E ou cis et Z ou trans (**Figure 11**). Il est incorporé dans les produits cosmétiques (savons, shampoings et parfums) et non cosmétiques (produits ménagers) (Lapczynski et al., 2008; Saito et al., 2015). Sa consommation mondiale est estimée entre 10 et 100 tonnes par an. En outre, le nérolidol est largement utilisé en industrie agroalimentaire en tant qu'exhausteur de goût vu qu'il est approuvé par la FDA (U.S. Food and Drug Administration ; 21 CFR 172.515) et reconnu comme GRAS (generally recognized as safe) et comme un aromatisant naturel (Lapczynski et al., 2008; McGinty et al., 2010).



Figure 11 : Structure chimique de cis (structure à gauche) et trans (structure à droite) du nérolidol.

I.3.1.4.1 Propriétés physicochimiques

Le nérolidol possède quatre stéréo-isomères : deux énantiomères et deux isomères géométriques (cis et trans, et leurs énantiomères). Ceci est dû à la présence de la double liaison en position C6 et à un centre asymétrique en C3 (Chan et al., 2016). Le nérolidol est une molécule hautement hydrophobe, ce qui lui confère une capacité à diffuser à travers les membranes biologiques et interagir avec les protéines intracellulaires (Park et al., 2009). Le spectre d'absorption caractéristique du nérolidol se trouve entre 210 et 240 nm avec une faible absorption entre 250 et 300 nm. Le **Tableau 2** résume les propriétés physicochimiques du nérolidol.

Nom	Nérolidol	
Etat physique	Liquide	
Couleur	Jaune clair	
Odeur	Douceâtre- floral	
Formule chimique	C ₁₅ H ₂₆ O	
Point d'éclair	96,1 °C	
Point de fusion	-75 °C	
Point d'ébullition	276 °C à 1,013 hPa	
Pression de vapeur	0,1 mmHg à 20 °C	
Densité	0,8744 g/mL	
Solubilité aqueuse	1,532 mg/L à 25 °C	
Soluble dans les solvants organiques (éthanol, acétonitrile, méthanol)		
LogKoe	5,68	

Tableau 2 : Les propriétés physicochimiques essentielles du nérolidol.

I.3.1.4.2 Propriétés biologiques du nérolidol

L'un des défis majeurs de l'industrie alimentaire est de préserver les aliments et de garantir leur sécurité sanitaire durant la production industrielle. La détérioration des aliments constitue un problème d'une ampleur considérable pour les industries agroalimentaires. Elle peut être due à une dégradation physique ou chimique ou à la présence de microorganismes (Gould, 1996). Cela conduit généralement à des altérations au niveau du goût, de l'odeur et de la couleur des aliments et donc à la perte des qualités organoleptiques et nutritionnelles (Shahidi & Ambigaipalan, 2015).

L'utilisation à long terme d'antioxydants ou antimicrobiens synthétiques est suspectée d'effets tératogènes, mutagènes et cancérigènes (Amorati et al., 2013 ; Botterweck et al., 2000). Par conséquent, l'incorporation de molécules bioactives naturelles, comme alternatives aux produits synthétiques, semble prometteur pour la préservation des aliments. Plus particulièrement, les terpènes ont pris une place remarquable comme agents antioxydants ou antimicrobiens très efficaces grâce à leur caractère lipophile et à la présence de groupements fonctionnels. Parmi ces terpènes, le nérolidol possède de puissantes activités biologiques. Quelques exemples de ses activités seront mentionnés ci-dessous.

Propriétés antioxydantes

Les HEs contenant du nérolidol présentent des propriétés antioxydantes. Il a été démontré que le nérolidol protège les cellules contre le stress oxydant en neutralisant les ERO (Nogueira Neto et al., 2013; Vinholes et al., 2014). Par exemple, Vinholes et al. (2014) a évalué

l'effet antioxydant du cis-nérolidol par la méthode de piégeage des radicaux libres de DPPH et des radicaux hydroxyles. Le cis-nérolidol était capable de réduire plus efficacement les radicaux hydroxyles que les radicaux du DPPH. Vue sa capacité à piéger plusieurs types de radicaux, le cis-nérolidol a pu également protéger les cellules intestinales (Caco-2) contre le stress oxydant généré par l'hydroperoxyde de tert-butyle (Vinholes et al., 2014). Dans une autre étude menée par le même auteur, il a été démontré que le cis-nérolidol inhibe la peroxydation lipidique des membranes des cellules hépatiques induite par l'hydroperoxyde de tert-butyle, en diminuant le taux du malondialdéhyde (MDA) de $36,50 \pm 4,47 \%$ (Vinholes et al., 2014). En outre, le nérolidol (mélange de cis et trans) protège les neurones de l'hippocampe chez les souris adultes Swiss albinos contre des dommages neuronaux causés par le stress oxydant. Ceci s'effectue en diminuant le taux de MDA et de nitrite et en stimulant l'activité des enzymes superoxyde dismutase et catalase à des doses de 25, 50 et 75 mg/Kg de nérolidol (Nogueira Neto et al., 2013).

Propriété antimicrobienne

La présence d'un hydroxyle sur un système d'électrons délocalisés ainsi que la longueur de la chaine aliphatique sont des paramètres déterminants dans l'activité antimicrobienne des terpènes (Kogen et al., 1999; Togashi et al., 2010). Ils agissent soit par dégradation de la paroi cellulaire, de la membrane cytoplasmique et destruction du système enzymatique, soit par épuisement de la chaîne de transport des électrons (Burt et al., 2007 ; Dorman & Deans, 2000). Les terpènes alcool avec une chaine carbonée entre 10 et 12 carbones comme farnésol et nérolidol possèdent une forte activité antibactérienne vis-à-vis de Staphylococcus aureus FDA209P en comparaison avec les monoterpènes géraniol (en C8) et linalol (en C6) et les diterpènes plaunotol (en C11), géranylgéraniol et phytol (en C16) (Togashi et al., 2010). Le nérolidol exerce son effet par la rupture de la membrane cellulaire des bactéries aboutissant ainsi à la libération de leur contenu cytoplasmique (libération des ions K⁺) et donc à la mort cellulaire (Hada et al., 2003 ; Inoue et al., 2004; Togashi et al., 2010). Une étude menée par Hada et al. (2003) a montré que le nérolidol présente une activité antibactérienne puissante contre 14 souches de S.aureus sensibles à l'antibiotique méticilline et 20 souches de S.aureus résistants à ce dernier, avec des valeurs de CMI (concentration minimale inhibitrice) comprises entre 512 et jusqu'à des valeurs supérieures à 1024 µg/mL. En outre, il a été rapporté que le nérolidol n'agit pas uniquement au niveau des membranes bactériennes mais peut également bloquer l'expression de certains gènes responsables de la pathogénicité des bactéries. Lee et al. 2014 a prouvé que le cis-nérolidol présent dans l'HE du poivre noir inhibe l'expression du gène HLA de l'α-hémolysine produite par S.aureus, protéine responsable de la destruction des érythrocytes chez l'homme. Par ailleurs, le nérolidol peut potentialiser l'action de nombreux antibiotiques (Brehm-Stecher & Johnson, 2003; Goncalves et al., 2011; Simões et al., 2008) comme amoxicilline/acide clavulanique contre S.aureus et celle des amoxicilline/acide clavulanique, ceftadizime et imipenème contre E.coli (Goncalves et al., 2011). En conséquence, le potentiel effet antibactérien du nérolidol accorde à cette molécule une application thérapeutique prometteuse pour lutter contre la multirésistance des bactéries aux médicaments.

Propriété anticancéreuse

De nombreuses études ont montré l'effet antiprolifératif du nérolidol in vitro et in vivo. Pour les études in vitro, le nérolidol possède des effets cytotoxiques vis-à-vis des cellules cancéreuses du sein BT-20 et de l'utérus HeLa avec une concentration inhibitrice médiane IC50 de 2,96 et 3,02 µg/mL, respectivement (Kubo & Morimitsu, 1995). En plus, le trans-nérolidol purifié des feuilles de Zornia brasiliensis Vogel a inhibé la croissance de nombreux types de cellules cancéreuses : B16-F10 (mélanome de souris), HepG2 (cancer hépatique), HL-60 (leucémie promyélocytaire) et K562 (leucémie myéloblastique) avec des IC50 >25 ; >25 ; 21,99 et 17,58 µg/mL, respectivement (Costa et al., 2015). De la même manière, le cis-nérolidol et d'autres sesquiterpènes alcools (α -bisabolol, cédrol, patchoulol et santalol) ont exercé leur activités anti-tumorales contre les cellules HeLa (Boris et al., 2011).

L'effet anticancéreux du nérolidol a été également testé in vivo sur des rats mâles de type F344 chez lesquels une carcinogenèse intestinale a été induite par l'azoxyméthane (15 mg/kg de poids corporel). Les résultats ont montré une diminution de l'incidence de l'occlusion intestinale de 82 à 33 % chez les rats traités par le nérolidol (Wattenberg, 1991). En plus, le nombre de tumeurs par rat a été réduit de 1,5 à 0,7 chez les rats traités. Ceci est dû à l'inhibition des étapes post-prénylation de la protéine proto-oncogène Ras (Casey et al., 1989). Une autre étude menée par Costa et al. (2015) a démontré que l'HE de Zornia brasiliensis Vogel contenant majoritairement du trans-nérolidol (100 mg/kg) a réduit la taille de la tumeur mélanique de 38,61 % chez des souris traitées en comparaison avec les contrôles.

Promoteur de pénétration cutanée

Le nérolidol a été démontré comme l'un des potentiels promoteurs de pénétration cutanée. Ainsi, sa capacité a été montrée d'augmenter de plus de 20 fois le taux de diffusion du 5-fuorouacil à travers le stratum corneum. Cet effet a été attribué à l'insertion de la chaine carbonée du nérolidol entre les phospholipides de la couche cornée conduisant ainsi à la perturbation des chaines lipidiques au niveau de la membrane et donc de sa perméabilité (Cornwell et al., 1996). De même, le potentiel de perméabilité de la peau des rats vis-à-vis de la sélégiline a été augementé de 3,2 fois en présence du nérolidol, de 2,8 et 2,6 fois en présence de la carvone et de l'anéthole, respecitvement (Chan et al., 2016). En outre, l'administration transdermique d'un alpha-bloquant, l'alfuzosine, a été améliorée en présence de différents terpènes selon l'ordre suivant : nérolidol> farnésol> limonène> linalol> géraniol> carvone> fenchone> menthol. Ceci est apparemment dû au caractère hydrophobe élevé du nérolidol (logP = 5,68) par rapport aux autres terpènes (Prasanthi & Lakshmi, 2012). Enfin, El-Kattan et al. 2001 ont prouvé également que nérolidol améliore plus efficacement l'absorption percutanée in vitro de quatre médicaments (nicardipine, hydrocortisone, carbamazepine et tamoxifène) en comparaison avec d'autres terpènes (fenchone, thymol et D-limonène).

I.3.2 Les phénylpropanoïdes

Les phénylpropanoïdes (PPs) constituent une classe de métabolites secondaires abondamment présents dans le règne végétal. Ce sont des composés non azotés qui renferment au moins un noyau aromatique portant un groupement hydroxyle (Cheynier et al., 2013). Ces molécules sont synthétisées à partir de la phénylalanine obtenue par la voie de l'acide shikimique. La désamination de cet acide aminé par une enzyme clé la phénylalanine ammonia-lyase (PAL), conduit à l'acide cinnamique (Vogt, 2010). Ce dernier constitue un carrefour métabolique intermédiaire. Les phénylpropanoïdes sont subdivisés en plusieurs groupes : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tannins, les stilbènes, les coumarines et autres (**Figure 12**). Dans notre travail, nous nous sommes intéressés aux flavonoïdes précisément à la quercétine.



Figure 12 : La classification des phénlylpropanoides.

I.3.2.1 Biosynthèse des flavonoïdes

La biosynthèse des flavonoïdes implique la transformation de la phénylalanine en coumaroyl-coA par la voie métabolique des PPs. Le coumaroyl-coA est un élément clé dans la synthèse de la chalcone, précurseur des flavonoïdes. La naringinine chalcone est obtenue par une série de réactions de décarboxylation, condensation, cyclisation intramoléculaire et aromatisation entre un ester CoA de p-coumaryle et trois molécules d'ester CoA de malonyle sous l'action de la chalcone synthase (CHS) (Figure 13) (Peer & Murphy, 2007; Thuy et al., 1998). Ensuite, la cyclisation interne de la chalcone (motif C) aboutit à la formation de la naringinine en présence de la chalcone isomérase (CHI). La naringinine est soit convertie stéréospécifiquement en (2R,3R)-dihydroflavonols (dihydrokaempférol ou dihydroquercétine) soit oxydée en flavones, sous l'action de la flavanone 3-β-hydroxylase (F3H) et la flavone synthase (FS) (Buer et al., 2010). Les flavones possèdent en plus des flavanones une double liaison entre les carbones 2 et 3 du cycle C alors que les (2R,3R)-dihydroflavonols se caractérisent par un groupe hydroxyle sur l'hétérocycle central C. La flavonol synthase (FLS) catalyse la transformation de (2R,3R)-dihydroflavonol en flavonol (quercétine ou kaempférol) entraînant la perte des centres stéréogènes en 2 et 3 du dihydroflavonol initial. Enfin, quant à la synthèse des anthocyanes et leurs dérivés, plusieurs enzymes interviennent dans la formation de ces pigments anthocyaniques. Par exemple, les leucoanthocyanidines sont obtenus suite à la réduction du dihydroflavonol par la dihydroflavonol reductase (DFR). La leucoanthocyanidine dioxygénase (LDOX) conduit ensuite à la cyanidine qui sera, à son tour, glycosylée par la glycosyl transférase (GT) formant une anthocyanine (Figure 13) (Buer et al., 2010; Ferreyra et al., 2012; Tanaka et al., 2008).



Figure 13 : Schéma simplifié de biosynthèse des flavonoïdes (Buer et al., 2010).
Abbréviations : CHS= chalcone synthase ; CHI= chalcone isomérase ; F3H= flavanone-3hydroxylase; F3'H= flavonone-3'-hydroxylase ; FLS= flavonol synthase; DFR= dihydroflavonol réductase; LDOX= leucoanthocyanidine dioxygénase ; GT= glucosyl transférase.

I.3.2.2 Classification des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments végétaux simples ou glycosylés, responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Ils constituent le groupe le plus diversifié des polyphénols, caractérisés par leur structure benzo- γ -pyrone et sont distribués de façon ubiquitaire dans le règne végétale (Havsteen, 2002). On compte plus que 9000 composés dans ce groupe (Buer et al., 2010). La structure de base des flavonoïdes comporte deux noyaux benzéniques (annotés par A et B) liés par un hétérocycle à l'oxygène (C) (**Figure 14**).



Figure 14 : Structure chimique de base des flavonoïdes (C₆-C₃-C₆).

La variété des composés est essentiellement liée au degré d'hydroxylation/méthylation/glycosylation de chacun des trois cycles des molécules de base. Ils sont alors divisés en plusieurs groupes : les flavones (flavone, apigénine et lutéoline), les flavonols (quercétine, kaempférol, myricétine et fisétine), les flavanones (hespérétine et naringinine), les flavan-3-ols (catéchines et epicatéchines), les isoflavones (daidzéine et génistéine) et les anthocyanines (pélargonidine et cyanidine) (Tableau 3) (Kumar & Pandey, 2013). Les flavonoïdes modulent de nombreuses et importantes fonctions chez les plantes, par exemple, ils: i) inhibent le transport de l'auxine (Peer & Murphy, 2007) et provoquent l'accumulation de cette hormone en réduisant son oxydation (Mathesius, 2001) ; ii) jouent un rôle d'attraction des pollinisateurs et sont impliqués dans le phénomène de l'allélopathie (Bais et al., 2006); iii) constituent une source de défense chez les plantes contre l'UV et les parasites (Treutter, 2005) et modulent le taux des ERO (Agrawal, 2011; Taylor & Grotewold, 2005). De part leur importance chez les plantes, les flavonoïdes présentent un intérêt particulier au niveau de la santé humaine vue leurs propriétés pléthoriques pharmacologiques, particulièrement leur activité antioxydante (Yao et al., 2004). Cette puissante activité est due à la présence de doubles liaisons conjuguées et des groupements fonctionnels (Mierziak et al., 2014).

Les flavonols et plus précisément la quercétine, le kaempférol et la myricétine, se trouvent abondamment dans les aliments et sont responsables de la couleur, du goût, de la prévention de l'oxydation des graisses et de la protection des enzymes et des vitamines (Yao et al., 2004). La préparation et le traitement des aliments en industrie peuvent diminuer le taux des flavonoïdes selon les méthodes utilisées. L'apport alimentaire en flavonoïdes varie entre 100 et 1000 mg/jour (Aherne & O'Brien, 2002).

Classes	Structures	Occurrence dans l'alimentation
Flavones	$7 \xrightarrow{8} 1 \xrightarrow{1'} 5' \xrightarrow{6'} 5'$	Céleri et persil
Flavonols	$\begin{array}{c} & & & & & & \\ & & & & & & \\ & & & & & $	Brocoli, ails, oignons, tomates et pommes
Flavanones	$\begin{array}{c} & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & $	Jus d'orange, de citron et de pamplemousse
Flavan-3-ols	$\begin{array}{c} 3' \\ 3' \\ 4' \\ 7 \\ 6 \\ 5 \\ 4 \\ 3 \\ OH \end{array}$	Thé, chocolat, raisins, abricots, vin, pêches et haricots
Isoflavones	$7 \xrightarrow{8} 1$ $2 \xrightarrow{2'} 3'$ $5 \xrightarrow{4} 3 \xrightarrow{1'} 3'$ $6' \xrightarrow{5'} 4'$	Soja et tofu
Anthocyanines	$R = \frac{7}{R} = \frac{8}{5} + \frac{1}{4} + \frac{1}{10} + \frac{2}{6} + \frac{3}{5} + \frac{1}{6} + \frac{1}{10} + \frac{1}{6} + \frac{1}{10} + \frac$	Fraises, mûres et cerises

Tableau 3 : Occurrence des différentes classes de flavonoïdes dans les aliments (Manach et al., 2004).

I.3.2.3 La quercétine

La quercétine (3,3',4',5,7 -pentahydroxyflavanone) est un flavonoïde de type flavonol, abondamment présent dans de nombreuses plantes alimentaires comme la câpre, le cacao, l'oignon, le brocoli, le thé, le vin rouge, les pommes, l'aronia, les cerises, le cassis et les myrtilles (**Figure 15**) (Bischoff, 2008). Dans les plantes, la quercétine se trouve sous forme glycosylée ou liée à une fonction éther ou à un acide phénolique. La quercétine présente une structure typique des flavonoïdes, avec cinq groupements hydroxyles. Des dérivés glycosylés de la quercétine peuvent être obtenus en substituant les hydroxyles par plusieurs types d'oses comme le glucose, rhamnose, xylose, galactose, etc...



Figure 15 : Structure chimique de la quercétine et ses sources majeurs d'aliments (Bischoff, 2008).

I.3.2.3.1 Propriétés physicochimiques

La quercétine se présente sous forme de poudre jaune, faiblement soluble dans l'eau (2472 mg/L à 25 °C et LogK_{oe}= 1,48) mais soluble dans les solvants organiques (éthanol, méthanol) et dans les lipides (Kelly, 2011). Elle dispose de deux bandes d'absorption en UV-visible : la bande I varie entre 300 et 380 nm (λ_{max} =360 nm) attribuée au noyau B et la bande II entre 240 et 280 nm attribuée au système benzoyle A-C (λ_{max} =256 nm) (Bancirova, 2015).

La quercétine est exposée à l'oxydation durant le traitement et le stockage des aliments (Igual et al., 2011; Zafrilla et al., 2001). La stabilité chimique de la quercétine est influencée par la concentration en oxygène (Buchner et al., 2006), le pH (Moon et al., 2008), la température (Ranilla et al., 2009) ainsi que par la présence des ions métalliques (Chen et al., 2009 ; Dehghan & Khoshkam, 2012). L'oxydation de la quercétine aboutit à la formation de plusieurs produits d'oxydation, dont majoritairement les quinones (une ortho-quinone et trois para-méthylènequinones). L'oxydation peut se produire uniquement sur le noyau B en position 4' et 5' pour donner l'ortho-quinone. En revanche, une oxydation additionnelle sur les noyaux A ou C aboutit aux trois para-méthylènequinones. Le clivage de la quercétine en acide protocatéchique peut également avoir lieu (**Figure 16**).



Figure 16 : Les réactions de dégradation de la quercétine (Wang et al., 2016).

La quercétine-quinone est hautement réactive et réagit instantanément avec la fonction thiol du glutathion (GSH). À des faibles concentrations de GSH, la quercétine-quinone agit en formant l'adduit glutathionyl-quercétine (GSQ) par une addition de Michael entre la quinone et le groupement sulfhydrile d'une protéine (protéine-SH). L'adduit formé n'est pas stable et peut se dissocier ultérieurement en quercétine-quinone et GSH. À des concentrations élevées de GSH, la quinone dissociée réagit de nouveau avec un GSH pour donner le GSQ (Boots et al., 2005) (**Figure 17**).



Figure 17 : La réactivité biologique de la quercétine-O-quinone.

D'autre part, il a été démontré que la quercétine est peu stable dans les solvants organiques à pH>7 et que la vitesse de dégradation de la quercétine est plus élevée dans des conditions alcalines (Buchner et al., 2006 ; Moon et al., 2008). Une pression atmosphérique (100 °C pour 50 min) ou une pression d'ébullition (121 °C pour 10 min), aboutit, par exemple, à une perte de 70 % de la quercétine contenue dans les haricots (Phaseoulus vulgaris L.) (Ranilla et al., 2009). Le traitement par pasteurisation (80 °C pour 91 s) réduit de ~17 % la quantité de quercétine présente dans le jus de pamplemousse (Igual et al., 2011).

I.3.2.3.2 Propriétés biologiques

La quercétine possède de nombreuses activités biologiques. Elle a suscité un grand intérêt, durant ces dernières années, grâce à son activité antioxydante et plus récemment son activité anticancéreuse contre une variété de cellules cancéreuses. Vu ses effets potentiels sur la santé humaine, les scientifiques envisagent l'utilisation de la quercétine comme nutraceutique dans les industries alimentaire et pharmaceutique (Boots et al., 2008). Dans ce qui suit nous allons aborder les propriétés biologiques de la quercétine.

Propriétés antioxydantes

Il a été démontré que la quercétine présente une forte activité antioxydante in vitro et in vivo et ceci à travers sa puissante capacité à réduire les radicaux libres de l'oxygène comme l'anion superoxyde O_2^{--} (Kukongviriyapan et al., 2012), NO⁻⁻ (Luangaram et al., 2007) et ONOO⁻ (Kim et al., 2013). Les dommages cellulaires créés par ses radicaux au niveau des cellules et des tissus humains peuvent entrainer l'apparition de nombreuses maladies telles les maladies cardiovasculaires, le cancer, le diabète et autres (Valko et al., 2006). En effet, son activité est attribuée : (i) au motif catéchol dans le noyau B ; (ii) à la double liaison en position 2,3 en conjugaison avec la fonction carbonyle en C4 dans le noyau C (stabilisation du système par délocalisation des électrons et donc augmentation de la réactivité de la molécule) ; (iii) aux groupements hydroxyle en position 3 et 5 de l'hétérocycle qui peuvent interagir avec le noyau B et améliorer ainsi la planéité de la molécule (Heijnen et al., 2001 ; Silva et al., 2002). De même, une étude a montré que la quercétine pourrait accroître, de façon significative, la capacité de piégeage des radicaux ABTS par les antioxydants endogènes, de 6,2 fois plus que le Trolox (Arts et al., 2004).

Propriété anticancéreuse

De nombreuses études in vitro et in vivo ont élucidé le potentiel anticancéreux de la quercétine vis-à-vis d'un grand nombre de cancers comme le cancer du sein (Singhal et al., 1995), du colon (Dihal et al., 2006), du pancréas (Zhou et al., 2010), de la prostate (Aalinkeel et al., 2008), le cancer gastrique (Yoshida et al., 1990) et la leucémie (Larocca et al., 1995), etc... (Dajas, 2012 ; Gibellini et al., 2011). L'effet anticancéreux de la quercétine est dû à plusieurs mécanismes (antioxydant, antiprolifératif et pro-apoptotique) auxquels s'ajoute sa capacité à inhiber les facteurs de croissance et les kinases responsables de la prolifération et la métastase cellulaire. Elle agit également en synergie avec les agents chimiothérapeutiques (Scambia et al., 1990, 1992). Par exemple, une faible concentration de la quercétine a pu inhiber la prolifération des cellules cancéreuses du sein de type MDA-MB et Sk-Br3 (Jeong et al., 2009). En plus, l'induction de l'apoptose des cellules cancéreuses dans l'ascite à travers l'activation des récepteurs de mort par la quercétine a été démontrée chez les rats développant un lymphome (Li et al., 2016). Quatre études épidémiologiques de cohorte et six études de castémoins ont révélé une association entre la consommation de flavonoïdes et le risque de cancer. Plus précisément, la prise du flavonoïde quercétine pourrait réduire l'incidence du cancer des poumons (Neuhouser, 2004). Une étude clinique de phase I, menée chez des personnes atteintes de cancer de l'ovaire et résistantes à la cisplatine, a montré la réduction du taux de marqueur tumorale CA 125 (cancer antigen 125), suite à l'administration de deux doses intraveineuses de quercétine (420 mg/m²). Dans la même étude, le taux plasmatique d'alpha-fetoprotéine a été également diminué chez des patients ayant un cancer hépatique (Ferry et al., 1996).

Propriété anti-inflammatoire

La quercétine est munie d'une capacité anti-inflammatoire puissante (Rubió et al., 2013; Ruma et al., 2013). Les recherches suggèrent que cette molécule pourrait inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires, induite par l'endotoxine le lipopolysaccharide (LPS). Par exemple, la quercétine peut inhiber la production du facteur de nécrose tumorale (TNF) dans les macrophages stimulés par le LPS (Sah et al., 2011) et de même inhiber la libération de l'interleukine 8 (IL-8) dans les cellules du poumon (Geraets et al., 2007). En outre, Bureau et al. 2008 ont montré que la quercétine peut inhiber le taux d'ARN messager de cytokines dans les cellules gliales (le TNF- α et l'interleukine IL-1 α) dont l'expression est stimulée par le LPS. D'autre part, certains auteurs considèrent que l'effet anti-inflammatoire de la quercétine peut être associé à ses propriétés antioxydantes et sa capacité de piégeage des radicaux libres (Comalada et al., 2005 ; Nijveldt et al., 2001). En effet, les ERO sont impliqués dans les processus inflammatoires via l'activation de facteurs de transcription, comme la NF- κ B (nuclear factor-kappa B), associés à la réponse immunitaire (MacNee, 2001). La NF- κ B activera ultérieurement la production de TNF- α . Par conséquent, l'élimination des ERO par la quercétine pourrait inhiber l'inflammation (Nair, 2006).

Dans ce chapitre, nous avons abordé la fonctionnalité des aliments qui est reliée principalement à la présence de diverses classes d'ingrédients bioactifs. Néanmoins, l'activité de ces ingrédients est souvent diminuée vu qu'elle est influencée, en grande partie, par leurs propriétés physicochimiques (faible solubilité, faible stabilité...). Pour résoudre ce problème et donc améliorer les propriétés fonctionnelles des aliments, des systèmes d'encapsulation ont été développés. Le chapitre 2 sera consacré à une présentation des trois systèmes d'encapsulation qui ont fait l'objet de notre étude : les liposomes, les cyclodextrines et le système mixte cyclodextrine-liposomes.

Chapitre II. Les systèmes d'encapsulation

II. Développement d'aliments fonctionnels en industrie

Les consommateurs du monde industrialisé sont de plus en plus conscients de la relation entre l'alimentation et la santé. De ce fait, la demande pour une alimentation équilibrée et des produits alimentaires fonctionnels qui répondent à des besoins spécifiques de santé est en croissance constante. De telles attentes ont suscité le développement d'aliments apportant une valeur ajoutée au-delà de leur simple valeur nutritive en ajoutant à ces aliments des ingrédients bioactifs (Siró et al., 2008). Ces derniers sont extraits et purifiés de nombreuses plantes et utilisés comme suppléments alimentaires ou bien ajoutés à des produits alimentaires. Cependant, les procédés technologiques traditionnels de transformation des aliments peuvent modifier leurs propriétés organoleptiques et sensorielles du fait que ces composés bioactifs sont peu solubles dans les systèmes aqueux et présentent (i) une stabilité limitée contre les dégradations chimique ou physique, (ii) une incompatibilité avec la matrice alimentaire ou encore (iii) une libération non contrôlée ou une faible biodisponibilité. Pour résoudre ces problèmes, de nouveaux procédés industriels comme la microencapsulation ont été développés. Ces nouvelles technologies diffèrent des procédés traditionnels puisque qu'elles peuvent empêcher l'inactivation des ingrédients bioactifs au cours de la transformation industrielle (Palzer, 2009). L'encapsulation est une technique permettant d'emprisonner des liquides ou des solides dans une enveloppe qui les isole dans le but de les protéger de l'environnement extérieur, ou de maitriser leur libération dans un environnement choisi. À noter que les systèmes d'encapsulation doivent être approuvés comme GRAS et agrés par les agences internationales de sécurité sanitaire des aliments comme l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA, European Food Safety Authority) et la FDA pour être utilisés dans l'industrie alimentaire (Nedovic et al., 2011).

On distingue différents systèmes d'encapsulation :

- À base de lipides : cires (cire d'abeille, cire de paraffine, cire de carnauba), émulsions/microémulsions et liposomes.
- À base de polysaccharides : amidons, amyloses, amylopectines, dextrines, chitosanes, maltodextrines, pectines, cyclodextrines, celluloses et ses dérivés.
- À base de protéines : caséines, gélatines, gliadines, albumines et glutens (Benshitrit et al., 2012; Desai & Park, 2005).

Les principaux critères pour choisir un système d'encapsulation adéquat sont (Desai & Park, 2005; Nedovic et al., 2011) :

- La fonctionnalité ajoutée au produit final.
- La concentration des molécules encapsulées.
- La taille et la stabilité du système.
- Le type de libération.
- Le matériel doit être biocompatible, biodégradable et non toxique.
- Le coût de production.

II.1 Les différents systèmes d'encapsulation des aliments fonctionnels

Dans ce qui suit, nous présentons quelques exemples des différents types de systèmes d'encapsulation ensuite nous détaillons uniquement les systèmes utilisés dans notre étude : liposomes, cyclodextrines et le système mixte cyclodextrine-liposomes.

II.1.1 À base de lipides

II.1.1.1 Cires

Les cires sont utilisées comme systèmes d'encapsulation pour les ingrédients alimentaires bioactifs, précisément pour ceux qui sont solubles dans l'eau. Par exemple, elles étaient traditionnellement incorporés dans les fruits et légumes frais afin de prolonger leur durée de stockage après récolte vu qu'elles sont plus résistants à l'humidité que d'autres types de matériels lipidiques (Kamper & Fennema, 1984; Shahidi & Han, 1993). En effet, les cires de paraffines ou les cires d'abeille sont des puissantes molécules qui empêchent la diffusion de l'eau grâce à leur structure moléculaire caractéristique formée de longues chaines hydrocarbonées saturées et par l'absence de groupements polaires (Shahidi & Han, 1993).

II.1.1.2 Émulsions/microémulsions

Les émulsions forment le système colloïdal le plus communément utilisé dans l'industrie alimentaire. Ce système est constitué de deux liquides non-miscibles, généralement l'eau et l'huile, stabilisé par l'ajout de tensioactifs/co-tensioactifs (Martins et al., 2007). Le premier liquide (l'eau ou l'huile) est dispersé dans le second liquide (l'huile ou l'eau) sous forme de petites gouttelettes pour former des émulsions H/E ou E/H. La taille des gouttelettes varie de quelques dizaines de nanomètres à quelques millimètres. On distingue également les

microémulsions dont la taille est comprise entre 5 et 50 nm (Neves et al., 2015). Les émulsions et les microémulsions assurent la solubilisation ou la dissolution des molécules lipophiles. Afin de libérer leur contenu, les émulsions sont soumises à une digestion lipidique suite à leur interaction avec la bile et les enzymes digestives de l'intestin (Patel & Velikov, 2011).



Figure 18 : Représentation schématique des émulsions (à gauche) et des microémulsions (à droite).

II.1.2 À base de polysaccharides

Les polysaccharides constituent une catégorie variée et polyvalente de biopolymères, produits par la nature et qui sont utilisés depuis l'antiquité comme additifs alimentaires. Ces polysaccharides sont des hydrocolloïdes capables d'encapsuler des molécules de diverses propriétés physicochimiques aussi bien que des structures biologiques complexes comme les phages (Dini et al., 2014; Fathia et al., 2014).

II.1.2.1 Amidons

L'amidon est composé par l'assemblage d'unités de glucose liées entre elles par des liaisons α d-(1 \rightarrow 4) et/ou α -d-(1 \rightarrow 6). Ce polymère biodégradable et biocompatible est formé d'un mélange de deux homopolymères : l'amylose et l'amylopectine (Barsby et al., 2001). Les nanoparticules à base d'amidon ont été utilisées pour l'encapsulation de l'insuline (Jain et al., 2008), d'acides gras insaturés (Lesmes et al., 2009; Zabar et al., 2009) ainsi que d'arômes (Itthisoponkul et al., 2007). Les amidons naturels sont généralement hydrophiles ce qui limite leur application dans l'encapsulation des molécules hydrophobes. Des dérivés d'amidons hydrophobes ont été ainsi développés afin d'accroître leur application comme les amidons dialdéhydes et les amidons propyles utilisés pour encapsuler des agents lipophiles pharmaceutiques (DanMi et al., 2007 ; Jain et al., 2011). Les amidons modifiés avec l'anhydride octényl-succinique (Octenyl Succinic Anhydride, OSA) ont été également développés pour l'encapsulation d'additifs alimentaires et d'arômes (Fathia et al., 2014; Jeon et al., 2003; Qi et al., 1999).

II.1.2.2 Celluloses

La cellulose constitue le polysaccharide le plus abondant sur terre, composée d'unités de glucoses reliées entre elles par des liaisons β -d-(1 \rightarrow 4). La cellulose, telle quelle, ne peut pas être utilisée comme agent d'encapsulation vue sa faible solubilité et sa grande taille. Par conséquent, elle est généralement soumise à des modifications physiques, chimiques ou biochimiques pour produire un matériel d'encapsulation adéquat. On distingue par exemple, la nanocellulose crystalline et les esters de celluloses (Favier et al.,1995; Shukla & Tiwari, 2012). Ces derniers constituent une classe de celluloses modifiées et sont divisés en deux catégories : les esters de celluloses non-entériques (acétate de cellulose, acétobutyrate de cellulose et acétopropionate de cellulose) qui sont insolubles dans l'eau et sont appropriés pour assurer une libération prolongée de molécules bioactives dans des produits alimentaires pâteux. Les esters de cellulose) sont eux insolubles dans les solutions acides mais solubles dans les solutions alcalines. Ils sont alors utilisés pour cibler des molécules sensibles à l'acide (vitamines, probiotiques et prébiotiques) dans le colon vu qu'ils les retiennent dans l'estomac (pH acide) et les libèrent dans le colon où le pH est neutre (Fathia et al., 2014; Shukla & Tiwari, 2012).

II.1.3 À base de protéines

Les protéines possèdent des propriétés fonctionnelles importantes ce qui les rend très efficaces comme système d'encapsulation pour les ingrédients alimentaires. Le système d'encapsulation à base de protéines le plus couramment utilisé en industrie alimentaire est la gélatine. La gélatine est une protéine hydrosoluble obtenue par hydrolyse partielle du collagène. Ce système est non toxique et rentable. La gélatine est thermoréversible, elle fond lorsqu'elle est chauffée et se solidifie lorsqu'elle est refroidie. Elle forme un gel colloïdal semi-solide lorsqu'elle est ajoutée à une solution aqueuse. Ces propriétés caractéristiques sont utilisées efficacement pour la formation de capsules (Shahidi & Han, 1993).

II.2 Liposomes

II.2.1 Définition

Le mot liposome est dérivé des deux mots grecs : «Lipos» qui signifie graisse et «soma » qui signifie le corps. Les liposomes ont été fabriqués pour la première fois dans les années 60 en Angleterre par Alec Bangham qui étudiait les phospholipides et la coagulation sanguine (Bangham, 1993; Laouini et al., 2012). Les liposomes (Figure 19) sont de simples vésicules microscopiques dans lesquels un volume aqueux est entièrement entouré par une membrane composée d'une ou de plusieurs bicouches phospholipidiques (Anwekar et al., 2011). La membrane des liposomes est composée de lipides naturels ou synthétiques, qui sont relativement non-toxiques, non-immunogènes, biocompatibles et biodégradables (Laouini et al., 2012). Leur taille varie de 20 nm à quelques dizaines de µm (Frézard, 1999). Ils sont formés spontanément en milieux aqueux avec les queues apolaires au centre de la bicouche non accessible à l'eau et les têtes polaires exposées au milieu aqueux (Poznansky & Weglicki, 1974). La réorganisation des phospholipides dans l'eau est régie par une variété de forces intermoléculaires comme les interactions électrostatiques, les liaisons hydrogènes ainsi que les forces de Van Der Waals (Lasic, 1998). Vu leur structure caractéristique, les liposomes peuvent encapsuler efficacement à la fois des substances hydrophiles (dans le noyau central aqueux), lipophiles (dans la membrane) et amphiphiles (à l'interface lipidique aqueuse) (Akbarieh et al., 1991; Uhumwangho & Okor, 2005).



Figure 19 : Structure de liposome.

II.2.2 Classification

Les liposomes sont principalement classés en fonction de leur taille et du nombre de leurs bicouches (**Figure 20**) (Lorin et al., 2004; Rongen et al., 1997; Shaheen et al., 2006). On distingue alors les liposomes unilamellaires qui sont formés d'une seule lamelle ou bicouche concentrique enfermant un compartiment aqueux et les liposomes multilamellaires ayant une structure d'oignon et sont formés de plusieurs lamelles ou bicouches concentriques séparées par des compartiments aqueux.

- (i) Les vésicules unilamellaires de petite taille «small unilamellar vesicles, SUV» : 20-100 nm.
- (ii) Les vésicules unilamellaires de grande taille «large unilamellar vesicles, LUV»: 100 à 1000 nm.
- (iii) Les vésicules oligolamellaires, OLV: 100-500 nm (comptent environ 5 bicouches concentriques).
- (iv) Les vésicules géantes «giant unilamellar vesicles, GUV» : > 1000 nm.
- (v) Les vésicules multilamellaires «multilamellar vesicles, MLV» : > 500 nm (comptent plusieurs bicouches concentriques entre 5 et 20).
- (vi) Les vésicules multivésiculaires «multivesicular vesicles, MVV» sont formées de plusieurs bicouches non concentriques emprisonnées dans une vésicule plus grosse (généralement >1 μm).



Figure 20 : Classification des liposomes.

II.2.3 Composition

Les membranes liposomiales sont généralement composées d'un ou plusieurs types de phospholipides. Le cholestérol entre souvent dans la composition des liposomes.

II.2.3.1 Phospholipides

Les phospholipides (**Figure 21**), appartenant à la famille des glycérolipides, sont construits à partir du glycérol, dont deux fonctions alcool ont été estérifiées par des acides gras, pouvant comporter une ou plusieurs insaturations, formant la zone hydrophobe (apolaire) du phospholipide. La troisième fonction alcool porte un groupe polaire phosphate, lui-même estérifié par différents groupements, souvent azotés, constituant ainsi la tête polaire du lipide (Farzi, 2012).



Figure 21 : Structure des phospholipides (Monteiro et al., 2014).

Les phospholipides les plus employés sont des glycérophospholipides d'origine naturelle (lécithines de soja ou de jaune d'oeuf) ou synthétique (Winterhaltera & Lasic, 1993). Les sphingolipides peuvent entrer aussi dans la composition des liposomes. La sphingomyéline avec le cholestérol sont à l'origine de la formation de microdomaines rigides dans les membranes (Shashi et al., 2012) (**Tableau 4**). Les caractéristiques de la bicouche lipidique dépendent du type de(s) phospholipide(s) qui la constitue(nt).

Lipides		Abréviations	Carbones : Saturations	Charges
Phospholipides naturels neutres	Phosphatidylcholine de jaune d'oeuf	EPC		0
	Phosphatidylcholine de soja	SPC		0
Phospholipides synthétiques neutres	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
Phospholipides synthétiques chargés négativement	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
	Dipalmitoyl acide phosphatidique	DPPA	16 :0	-1 ou -2
Lipides chargés positivement	Stéarylamine	SA	18:0	+1
	Dioleoyloxytriméthyleamoniopropane	DOTAP	18:1	+1

Tableau 4 : Principaux phospholipides qui constituent les formulations liposomiales(Immordino et al., 2006; Shashi et al., 2012).

II.2.3.2 Température de transition des phospholipides

Plusieurs facteurs peuvent influencer le comportement des lipides dans une membrane lipidique et donc influencer la membrane lipidique elle-même. La température est un facteur important. En effet, au-delà d'une certaine température appelée température de transition de phase (T_m) , les phospholipides passent d'une configuration ordonnée ou configuration trans $(L\beta)$ à une configuration désordonnée ou configuration gauche $(L\alpha)$ (**Figure 22**).



Figure 22 : Configuration L β (à gauche) et L α (à droite) des phospholipides au sein de la membrane phospholipidique (Lorin et al., 2004).

Dans la conformation ordonnée, les chaînes des molécules de phospholipides sont étirées au maximum et parallèles entre elles. À l'inverse, dans la conformation désordonnée, les chaînes latérales des phospholipides oscillent autour d'un axe moyen perpendiculaire au plan de la bicouche phospholipidique. Les chaînes hydrocarbonées sont alors moins étirées et l'épaisseur de la bicouche diminue. Lorsque les phospholipides sont dans la configuration L β , la bicouche phospholipidique des liposomes est dite rigide. Par contre, lorsque les phospholipides sont dans la configuration L α , la bicouche des liposomes est dite fluide (état dans lequel les queues des phospholipides ne sont plus étirées mais animées de mouvement plus ou moins pendulaires) (Lorin et al., 2004) (**Figure 23**).



Figure 23 : Comportement de la membrane au-dessus et au-dessous de la température de transition.

II.2.3.3 Cholestérol

Le stérol qui entre le plus souvent dans la constitution des liposomes est le cholestérol. Le cholestérol possède un anneau tétracyclique hydrophobe (noyau stérol) avec un groupe β -hydroxyl en position 3 et une chaîne hydrocarbonée iso-octyle de l'autre extrémité. Il s'oriente dans la membrane biologique perpendiculairement à la bicouche plane de façon à ce que la fonction hydroxyle soit localisée à l'interface membrane-eau et que la chaîne iso-octyle pointe à l'intérieur de la bicouche lipidique (**Figure 24**) (Patel, 2006; Patil et al., 2005).



Figure 24 : Structure du cholestérol et son positionnement dans la bicouche lipidique.

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 (**Figure 24**) (Kyrikou et al., 2005). 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 aux molécules hydrophiles et aux ions (Mills et al., 2009) (**Figure 24**). Il est alors un modulateur de la fluidité de la membrane cellulaire.

D'autre part, le cholestérol peut également contrôler l'EE et les caractéristiques des liposomes, notamment leur stabilité (Johnson et al., 1971). En effet, le cholestérol stabilise la membrane et augmente la rigidité des vésicules (Pathak et al., 2012). Des études basées sur l'analyse du module d'Young (paramètre mesurant la rigidité de la membrane) par microscopie à force atomique (Atomic Force Microscopy : AFM) montrent que le cholestérol peut augmenter la rigidité de la membrane composée de lipides insaturés comme EPC, DSPC ou DPPC (Henriksen et al., 2006 ; Liang et al., 2004 ; Needham & Nunn, 1990). Par contre, la présence du cholestérol dans des membranes composées de lipides saturés aboutit à une diminution de leur rigidité (Takechi-Haraya et al., 2016).

Il peut diminuer également la perméabilité aux molécules hydrophiles et celle de la bicouche aux ions et aux solutés ainsi que la liaison des liposomes aux protéines du sang comme l'albumine, la transferrine, les macroglobulines et les opsonines sériques... En outre, le cholestérol diminue l'incorporation d'autres molécules hydrophobes dans la bicouche de la membrane ; ceci soit par l'augmentation du caractère lipophile de la bicouche ce qui conduit à une concurrence entre les molécules hydrophobes et les molécules de cholestérol pour l'espace lipophile dans la bicouche lipidique (Fang et al., 2001), soit par la diminution de la flexibilité de la bicouche ce qui diminue la possibilité de l'intégration des molécules lipophiles dans la membrane lipidique (Mohammed et al., 2004).

II.2.4 Méthodes de préparation

Tous les procédés de préparation des liposomes comportent quatre étapes de base :

- 1. Elimination du solvant organique.
- 2. Dispersion du lipide dans un milieu aqueux.
- 3. Purification du liposome formé.
- 4. Analyse du produit final (Akbarzadeh et al., 2013).

En plus, le choix correct de la méthode de préparation des liposomes dépend des paramètres suivants :

- 1. Caractéristiques physico-chimiques de la molécule encapsulée et ceux des composants lipidiques.
- 2. La nature du milieu dans lequel les vésicules lipidiques seront dispersées.
- 3. La concentration efficace de la substance encapsulée et sa toxicité potentielle.
- 4. La taille optimale et la durée de vie des vésicules pour l'application prévue.
- 5. La reproductibilité de la méthode et la possibilité de production des liposomes à grande échelle (Gómez-Hens & Fernández-Romero, 2006; Mozafari et al., 2008).

Plusieurs méthodes de préparation ont été développées afin de produire des liposomes de diamètre souhaité (SUV, LUV ou MLV). On distingue les méthodes de dispersion mécanique (extrusion, sonication, micro-émulsification et congélation-décongélation) et les méthodes non-mécaniques (méthode d'élimination du détergent, hydratation du film lipidique, méthode par infusion d'éther et injection éthanolique) (Chonn & Cullis, 1998; Schroeder et al., 2009; Watwe & Bellare, 1995).

II.2.4.1 Préparation des MLV

La méthode d'hydratation du film lipidique est la méthode la plus couramment utilisée pour la préparation des MLV. Elle implique la dissolution des phospholipides dans un solvant organique ou dans un mélange de solvants organiques qui est le plus souvent un mélange de chloroforme:méthanol (2:1). Le solvant organique est ensuite évaporé dans un ballon pour obtenir un film lipidique. Ce film lipidique est hydraté par ajout d'un tampon aqueux ; la dispersion ainsi formée est soumise à une agitation pour une durée bien précise. 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. Le taux d'encapsulation et la taille des MLV dépendent de la durée d'hydratation et des conditions

d'agitation pour une même composition lipidique (Dua et al., 2012; Laouini et al., 2012; Watwe & Bellare, 1995) (**Figure 25**).



Figure 25 : Préparation des MLV par la méthode d'hydratation du film lipidique.

II.2.4.2 Préparation des SUV

Les SUV sont généralement produites par sonication des MLV à l'aide d'un bain à ultrasons ou d'une sonde. La sonication dans un bain à ultrasons est conseillée vu que la température peut être contrôlée et la dispersion liposomiale est davantage protégée par rapport à l'utilisation de la sonde (contamination des liposomes par les particules métalliques libérées par la sonde). La dispersion liposomiale est soumise à des ultrasons pour 5 à 10 min à une température supérieure à la T_m du phospholipide. Cette étape de sonication est suivie d'une ultracentrifugation afin de séparer les LUV des SUV (Pereira-Lachataignerais et al., 2006) (**Figure 26**).



Figure 26 : Obtention des SUV par sonication.

Les SUV peuvent être également obtenues par extrusion des MLV sur une Press de French à 20 000 psi à 4°C à travers un petit orifice (Hamilton et al., 1980).

Une autre méthode de préparation des SUV est la méthode d'injection éthanolique, qui peut être utilisée pour produire des liposomes unilamellaires à grande échelle. Elle consiste à injecter une solution éthanolique de phospholipides dans une phase aqueuse par une pompe à seringue sous agitation magnétique. La formation spontanée des liposomes se fait dès que la solution éthanolique entre en contact avec la phase aqueuse. Enfin, l'éthanol et une partie de l'eau sont éliminés par évaporation rotative sous pression réduite (Jaafar-Maalej et al., 2010) (**Figure 27**).

Cette méthode présente plusieurs avantages par rapport à d'autres techniques :

- Obtention de liposomes de petite taille avec une distribution étroite (Justo & Moraes, 2005; Sonar et al., 2008).
- Méthode simple, elle se base sur une seule étape (sans extrusion ou sonication).
- Rapide, reproductible, simple, peu coûteuse.
- Obtention de liposomes stables avec un taux d'encapsulation élevé surtout pour les molécules hydrophobes (Jaafar-Maalej et al., 2010).
- Se distingue par des conditions de préparation douces sans utilisation de solvants dangereux ni d'étapes mécaniques qui peuvent endommager les lipides ainsi que les substances encapsulées (Wagner et al., 2002).
- Production à grande échelle.

Le diamètre des liposomes obtenus dépend de la vitesse d'injection, de la vitesse d'agitation et de la concentration de phospholipides dissoute dans l'éthanol. Par exemple, plus la concentration des lipides dans la phase organique augmente plus la taille des liposomes augmente (Jaafar-Maalej et al., 2010; Kremer et al., 1977). En plus, la taille des vésicules décroît avec l'augmentation de la vitesse d'agitation de la phase aqueuse (Jaafar-Maalej et al., 2010) et augmente avec l'augmentation du rapport volumique solvant/eau (Maitani et al., 2001; Yang et al., 2012). En revanche, la vitesse d'injection de la solution organique (Jaafar-Maalej et al., 2010; Kremer et al., 1977; Song et al., 2011), la variation du pH du milieu (Maitani et al., 2001) et le contenu en cholestérol n'affectent pas la taille des liposomes (Jaafar-Maalej et al., 2010). L'EE est également affectée par plusieurs paramètres. Il a été démontré que l'efficacité d'encapsulation de la cytosine arabinoside, une substance hydrophile, augmente avec l'augmentation de la concentration des lipides dans la phase organique mais elle diminue avec l'augmentation du contenu en cholestérol et la diminution du rapport volumique solvant/eau (Jaafar-Maalej et al., 2010). L'EE de cette molécule varie entre 3 et 16 %. Par ailleurs, l'EE de la béclométhasone dipropionate, une molécule hydrophobe, est plus élevée (entre 87 et 100 %), diminue légèrement en présence du cholestérol, et augmente avec l'augmentation de la concentration des lipides (Jaafar-Maalej et al., 2010). Selon les conditions utilisées, des OLV ou des LUV peuvent être aussi produites par la méthode d'injection éthanolique.



Figure 27 : Préparation des liposomes par injection d'éthanol.

II.2.4.3 Préparation des LUV

L'évaporation en phase inverse est utilisée principalement pour former des LUV constitués d'une grande cavité aqueuse (également appelés REV pour reverse phase evaporation vesicles) (Figure 28). Elle consiste à dissoudre les phospholipides dans un solvant organique (diéthyléther ou isopropyléther) (1) suivi par une injection rapide d'une solution aqueuse contenant des molécules hydrophiles ce qui provoque la formation d'une émulsion huile/eau (2). Le solvant organique est ensuite éliminé à l'aide d'un évaporateur rotatif sous pression réduite conduisant à la formation de micelles inversées. En poursuivant l'évaporation, ces micelles sont regroupées et forment l'état « gel » (3). Le point critique de cette procédure est la rupture de l'état de gel. Enfin, les liposomes sont formés après élimination du solvant par évaporation sous pression réduite (4) (Szoka & Papahadjopoulos, 1978). Cette méthode est utilisée pour encapsuler des petites et des macromolécules telles que l'ARN et diverses enzymes sans perte d'activité tout en assurant un taux d'encapsulation élevé. Les vésicules ainsi obtenues ont un volume aqueux d'encapsulation 4 fois supérieur à celui des MLV obtenues par hydratation du film lipidique et 30 fois supérieur à celui des SUV obtenues par sonication (Laouini et al., 2012 ; Szoka & Papahadjopoulos, 1978). Cette méthode permet d'obtenir une encapsulation maximale de la phase aqueuse (jusqu'à 65 % pour des solutions de faible force ionique) permettant d'encapsuler une grande variété de macromolécules hydrosolubles avec une grande efficacité (Laouini et al., 2012 ; Szoka & Papahadjopoulos, 1978). 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 (Szoka & Papahadjopoulos, 1978).



Figure 28 : Préparation des liposomes par évaporation en phase inverse.

II.2.5 Caractérisation

Les liposomes sont caractérisés par leur morphologie (forme, nombre de couches), l'intégrité de la membrane lipidique (rigidité, perméabilité et fluidité), leur taille et leur distribution de taille ainsi que leur efficacité d'encapsulation. D'autres paramètres sont également étudiés et comprennent la charge de surface par mesure du potentiel zêta et les transitions de phase des phospholipides par calorimétrie différentielle à balayage. Dans notre étude, les liposomes ont été caractérisés en termes de taille, de taux d'encapsulation, ainsi que par mesure de leur rigidité.

II.2.5.1 Détermination de la taille des liposomes

La taille des liposomes est l'un des paramètres les plus étudiées et qui influe en majorité leur application. Par exemple, pour des applications pharmaceutiques, il est préférable que les liposomes soient de tailles comprises entre 2 et 5 μ m. Deux méthodes sont principalement utilisées pour déterminer la taille des liposomes : la diffusion dynamique de la lumière (Frederiksen et al., 1997 ; Meure et al., 2009 ; Otake et al., 2001) et la granulométrie laser (Kunastitchai et al., 2006 ; Li et al., 2008).

II.2.5.1.1 Diffusion dynamique de la lumière

Cette méthode repose sur le mouvement brownien des particules de quelques nanomètres à quelques micromètres. Lorsque ces particules sont en suspension dans un gaz ou un liquide, elles sont animées d'un mouvement aléatoire, dit mouvement brownien, qui permet leur collision avec les molécules d'eau. Ainsi, réparties uniformément, leur position change mais leur répartition dans l'espace reste identique (Loi de Fick). Lorsqu'un faisceau de lumière traverse une suspension de particules au repos, l'équilibre du système sera rétabli au bout d'un certain temps grâce au mouvement brownien des particules. Expérimentalement, des

fluctuations d'intensité de la lumière sont observées. L'échelle de ces fluctuations contient des informations sur la taille et la concentration des particules (Loi de Stokes Einstein). La taille des liposomes est ainsi déterminée.

II.2.5.1.2 Granulométrie laser

Cette technique est basée sur la théorie de la diffraction de la lumière (théorie de Fraunhofer). La diffraction de la lumière est un phénomène qui se produit à chaque fois qu'un faisceau lumineux rencontre un obstacle (un corps d'indice optique différent) qui s'interpose dans la propagation du flux incident. Plus l'obstacle est étroit, plus la déviation angulaire de la lumière sera importante. En assimilant les particules (taille de l'ordre du micromètre) contenues dans une suspension à des obstacles, l'analyse de la figure de diffraction obtenue en faisant circuler un faisceau lumineux dans cette suspension permet de remonter à la taille des particules. À partir de la théorie de diffusion de la lumière de Mie, la distribution granulométrique des particules est calculée en se basant sur le modèle sphérique équivalent en volume. La distribution de taille est représentée sous forme de courbe montrant le pourcentage en volume des particules.

II.2.5.2 Détermination de l'efficacité d'encapsulation des liposomes

Indépendamment de l'application visée, les effets observés d'une molécule dépendent de la dose utilisée, il sera alors convenable de déterminer, au préalable, la quantité des molécules encapsulées dans la vésicule.

Le pourcentage d'encapsulation est défini par la proportion de la molécule associée aux vésicules par rapport à la quantité initialement présente. Cette mesure n'est effectuée qu'après élimination des molécules non-encapsulées (Bridson et al., 2006 ; Varona et al., 2011). Il existe des méthodes physiques de séparation : chromatographie (Yang et al., 2012) ou dialyse (Wen et al., 2010). Les techniques de séparation physique peuvent entraîner une dégradation des liposomes (rupture ou perte du matériel encapsulé).

Le pourcentage d'encapsulation (EE %) est calculé en utilisant l'équation suivante (Kunastitchai et al., 2006) :

En outre, le rendement de l'expérience pourrait être calculé par :

 $RE \% = \frac{\text{Quantité de molécules totale dans la suspension liposomiale}}{\text{Quantité totale théorique de molécules ajoutées lors de la préparation}} \times 100 \text{ (Eq.2)}$

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

II.2.5.3 Mesure de l'intégrité des liposomes

II.2.5.3.1 Mesure de perméabilité des liposomes

La perméabilité membranaire peut être évaluée suite à l'encapsulation d'un marqueur fluorescent ou radioactif dans des liposomes et à la détermination du pourcentage libéré dans le milieu environnant. La calcéine ou la carboxyfluorescéine sont deux marqueurs fluorescents qui ont la propriété d'émettre peu de fluorescence quand ils sont concentrés (« self-quenching »). La perméabilité des liposomes encapsulant ces molécules en concentration adéquate peut être déterminée. En effet, la fluorescence est minimale lorsque ces fluorophores sont présents dans la cavité aqueuse des liposomes. Leur libération dans le milieu extérieur conduit à une augmentation de la fluorescence mesurable par fluorimétrie (Düzgüneş, 2003).

II.2.5.3.2 Mesure de la rigidité membranaire

La rigidité des liposomes joue un rôle crucial dans la stabilité physique des liposomes. La rigidité des liposomes unilamellaires peut être évaluée par AFM (Spyratou et al., 2009). Le principe de la AFM consiste à déplacer une pointe fine située au bout d'un levier (le cantilever) à la surface d'un échantillon. Ceci permet de mesurer les forces d'interaction entre l'atome du bout de la pointe et les atomes de la surface balayée. La déviation du levier, résultant de ces forces (forces de répulsion ionique, forces de Van Der Waals, forces électrostatiques, forces de friction...) est généralement quantifiée par un capteur optique (**Figure 29**). Cette technique permet d'obtenir des informations topographiques de la surface d'un échantillon aqueux ou sec ainsi qu'elle permet de mesurer les propriétés mécaniques et biophysiques des cellules, l'élasticité, l'adhérence, la dureté, la friction, la rigidité et la rugosité des surfaces (Carvalho & Santos, 2012). La rigidité membranaire est déterminée par le calcul du module d'Young (E) suivant le modèle de Hertz. Un matériau ayant un module d'élasticité petit. Donc tant que la valeur de ce module est élevée, tant que le matériau est rigide (Dulińska et al., 2006).



Figure 29 : Principe de fonctionnement de la AFM.

II.2.6 Applications

II.2.6.1 Pharmaceutiques

De nombreux médicaments présentent une marge thérapeutique étroite ce qui signifie que la différence entre leur dose efficace et leur dose toxique est faible. Pour résoudre ce problème, l'utilisation de systèmes d'encapsulation comme les liposomes s'est montrée efficace pour réduire la toxicité des médicaments. Les avantages et les limitations de ce système dépendent fortement de l'interaction des liposomes avec la cellule et de leur acheminement dans l'organisme après administration (Akbarzadeh et al., 2013). Le principe actif (PA) peut être véhiculé dans l'organisme par simple injection. Les études in vitro et in vivo ont montré que les liposomes interagissent majoritairement par simple adsorption suivie ultérieurement d'une internalisation par endocytose. Les liposomes peuvent fusionner également avec les membranes cellulaires. Dans le troisième cas, un échange peut avoir lieu entre les constituants de la bicouche lipidique (lipides ou cholestérols) et les constituants de la membrane cellulaire permettant la libération du PA dans la cellule (Gregoriadis, 1995). L'exemple le plus réussi de l'utilisation des liposomes en thérapeutique est celui de l'antibiotique anti-fongique l'amphotéricine B commercialisé sous le nom d'Ambiosome[®]. En effet, ce médicament est très toxique (peut causer une neurotoxicité) mais très actif contre les infections fongiques. Son encapsulation dans les liposomes a pu réduire de manière drastique sa toxicité, ce qui a permis son utilisation comme anti-fongique puissant (Lopez-Berestein et al., 1985). De même, les liposomes ont été utilisés en thérapie anticancéreuse pour l'encapsulation de la doxorubicine HCl commercialisée sous le nom de l'adriamycine (Akbarzadeh et al., 2013).
II.2.6.2 Cosmétologiques

L'application de nombreuses substances en cosmétologie nécessite leur production sous forme d'émulsion huileuse ou de solution alcoolique. L'huile et l'alcool peuvent endommager la peau en cas d'application prolongée. L'encapsulation dans les liposomes permet de contourner ce problème (Lasic, 1998; Redziniak, 2003). Les composants des liposomes jouent un rôle de promoteur d'absorption en diminuant l'imperméabilité du stratum corneum, favorisant ainsi la pénétration de la molécule encapsulée (Weiner et al., 1989). Parmi les produits commercialisés, on trouve ces vésicules lipidiques dans le soin Niosomes de Lancôme, le gel aux liposomes pour la crème Capture et dans les Parfums Cristian Dior ...(Redziniak, 2003).

II.2.6.3 Agroalimentaires

La capacité des liposomes à solubiliser les composés hydrophobes, de protéger les molécules labiles (arômes) des dégradations chimiques ou physiques et de leur assurer une libération prolongée rend intéressant l'application de ces vésicules en industrie alimentaire. Leur utilisation dans ce domaine semble prometteuse vu que les lipides qui les constituent sont extraits souvent des aliments comme le jaune d'œuf ou les grains de soja. L'exemple classique en industrie alimentaire est l'utilisation de liposomes dans la production du fromage. Le but est de diminuer la durée d'affinage des fromages affinés (Camembert, Roquefort, Gouda...) qui peut durer de quelques semaines à plusieurs mois, voire quelques années. L'affinage, l'étape la plus complexe de la fabrication des fromages, est un processus biochimique complexe et long qui est commandé par le développement et l'activité des micro-organismes, précisément par les enzymes. Ces derniers (pepsines et protéases) sont utilisés pour la digestion enzymatique des constituants du caillé. Suite à l'encapsulation de ces enzymes dans les liposomes, la durée d'affinage a été diminuée de 30 à 50 %, permettant une meilleure dispersion de ces agents. De plus, la libération des substances sapides et odorantes ainsi que la modification de la texture du fromage, résultant de la digestion enzymatique, ont été réduit (Al Khalaf et al., 1988; Law & King, 1985).

II.3 Cyclodextrines

II.3.1 Historique

Les cyclodextrines (CDs) ont été découvertes, en 1891, par Villiers. Une substance cristalline de composition (C₆H₁₀O₅)_n,3H₂O a été isolée, pour la première fois, suite à la dégradation enzymatique de l'amidon, et plus précisément de l'amylose, par une souche de microorganismes (Figure 30). L'enzyme impliquée est la cyclodextrine glycosyl transférase (CGTase). Le produit obtenu a été nommé « cellulosine » vu qu'il ressemble à la cellulose par sa résistance à l'hydrolyse acide et ses propriétés non réductrices (Villiers, 1891). En 1904, Schardinger a isolé la souche bactérienne responsable de la production de ce produit : Bacillus Macerans (Eastburn & Tao, 1994). Il distingue deux molécules différentes : la dextrine cristalline α et la dextrine crystalline β (Schardinger, 1903). Il les différencie par leur capacité à former des complexes de couleurs différentes avec l'iode : gris-vert et rouge-pourpre, respectivement (Schardinger, 1911). En 1930, Freudenberg et al. ont élucidé la structure de ces dextrines constituées par l'assemblage de 6 à 12 motifs de glucose, reliés par des liaisons $\alpha(1 \rightarrow 4)$, dans une conformation ⁴C₁ (Freudenberg et al., 1939). C'est cette même équipe qui, en 1948, découvre la y-dextrine (constituée de 8 unités de glucose) et qui détermine entièrement sa structure (Freudenberg et al., 1953). En 1949, l'équipe de French s'intéresse à la production des dextrines qu'il nomme cyclohexaamylose, cycloheptaamylose et cyclooctaamylose (α -, β et γ -cyclodextrine, respectivement) et à leur caractérisation physico-chimique (French, 1957). Ensuite, Cramer a étudié les propriétés des complexes d'inclusion formés par les cyclodextrines (Cramer, 1954).



Figure 30 : Obtention des CDs natives par dégradation enzymatique de l'amidon par la CGTase.

II.3.2 Structures et propriétés physicochimiques

De point de vue structure, les CDs adoptent une forme conique tronquée ou une forme d'anneau, conséquence de la conformation en chaise des résidus glucopyranoses. Cette structure possède une cavité centrale interne dont les ouvertures sont bordées de groupes hydroxyles. On distingue les groupements hydroxyles primaires, portés par les carbones C-6 bordant le petit diamètre (face primaire), et les groupements hydroxyles secondaires, portés par les carbones C-2 et C-3 situés à l'entrée large du cône (face secondaire). La présence de ces fonctions alcools explique le caractère hydrophile de l'extérieur du cône. L'existence de deux séries de protons H₃ et H₅, disposées en anneaux à l'intérieur de la CD, ainsi que les liaisons éthers confèrent à la cavité un caractère relativement hydrophobe (Szejtli, 2004). Cette combinaison de zone hydrophobe et hydrophile est à l'origine même du phénomène d'inclusion en solution aqueuse (Loftsson & Brewster, 1996). Les CDs les plus connues et étudiées sont l' α -CD, la β -CD et la γ -CD. Ces CDs, dites natives, sont composées de 6,7 et 8 unités de glucose, respectivement. La surface hydrophile des CDs fournit une solubilité relativement bonne dans l'eau, bien que la β-CD soit la moins soluble dans l'eau (18,5 mg/mL) par rapport aux autres CDs natives. La faible solubilité aqueuse de la β-CD s'explique par l'établissement de liaisons intramoléculaires, stabilisant la molécule, rendant sa structure plus rigide et empêchant ainsi l'hydratation de la CD. Ceci n'est pas observable avec l' α et la γ -CD vu que la taille de la cavité est soit trop petite $(\alpha$ -CD) soit trop grande (γ -CD). La solubilité des CDs natives augmente avec la température et elle est généralement plus faible dans les solvants organiques (Tableau 5) (Loftsson & Brewster, 2012). Concernant leur toxicité, ces CDs ne présentent pas de nocivité majeure pour l'homme et sont autorisées dans l'industrie agro-alimentaire comme additif alimentaire (E457, E459 et E458 pour l' α -CD, la β -CD et la γ -CD, respectivement) (Szente & Szejtli, 2004).

Tableau 5 : Propriétés physicochimiques des cyclodextrines natives.



	α-CD	β-CD	γ-CD
Nombre d'unité de glucose	6	7	8
Formule moléculaire	$(C_6H_{10}O_5)_6$	$(C_6H_{10}O_5)_7$	$(C_6H_{10}O_5)_8$
Carbones asymétriques	30	35	40
Masse moléculaire (g/mol)	972,	1134,9	1297,1
Diamètre de la cavité (Å)	5,7	7,8	9,5
Diamètre de la périphérie (Å)	14,6-15	15,4-15,8	17,5-19
Volume de la cavité (Å ³)	173	262	427
Hauteur du cône (Å)	7,8	7,8	7,8
Molécules d'eau retenues dans la cavité	6-8	11-12	13-17
Température de fusion (°C)	275	280	275
pKa à 25°C	12,3	12,2	12,1
LogP à 25°C	-13	-14	-17
Solubilité dans l'eau à 25 (mg/mL)	145	18,5	232

II.3.3 Modifications chimiques des cyclodextrines

Afin d'améliorer les caractéristiques physicochimiques des CDs natives (solubilité, capacité d'inclusion...), ou d'apporter de nouvelles propriétés (introduction de chromophores, de motifs fluorescents...), des modifications chimiques sur les groupements hydroxyles en position C-2, C-3 et C-6 peuvent avoir lieu. On distingue par exemple, des réactions d'alkylation, d'hydroxyalkylation, de sulfatation, d'acétylation, d'amination, d'estérification ou encore d'éthérification (Szente & Szejtli, 1999). Les dérivés les plus étudiés sont les dérivés de la β -CD comme les dérivés hydroxypropylés : l'hydroxypropyle- β -CD (HP- β -CD), les dérivés méthylés : la RAMEB (méthylée de manière aléatoire sur l'intégralité des hydroxyles primaires ainsi que sur 7 à 9 hydroxyles secondaires) et la CRYSMEB (méthylée en position 2 de la β -CD) et les dérivés sulfobutylés : la sulfobutyléther- β -CD (SBE- β -CD) ou Captisol[®] (**Figure 31**) (Del Valle, 2004). Elles sont caractérisés par leur grande solubilité à température ambiante (qui s'explique par l'absence de liaisons intramoléculaires), une meilleure stabilité du complexe d'inclusion (qui est due à la grande flexibilité de la molécule substituée et l'absence de liaisons

hydrogènes) et enfin à leur caractère non toxique (les dérivés DIMEB et HP- β -CD présentent une plus faible néphrotoxicité que la β -CD) (Szejtli, 1997; Uekama et al., 1998).



Figure 31 : Structures chimiques des dérivés de la β -CD.

II.3.4 Formation de complexes d'inclusion

Grâce à leur structure caractéristique, les CDs sont capables d'inviter dans leur espace interne, de façon réversible, diverses classes de molécules (hydrocarbures aliphatiques, composés aromatiques et phénoliques, des gaz, des ions ou encore des polymères). On parle alors de complexes d'inclusions, formés suite à des interactions non-covalentes entre la CD et la molécule invitée, ce qui rend possible la réversibilité du système. De plus, ce phénomène d'inclusion peut avoir lieu aussi bien à l'état liquide que solide ou gazeux (**Figure 32**) (Liu & Guo, 2001). En phase aqueuse, la cavité des cyclodextrines est occupée par les molécules d'eau ce qui conduit à une instabilité relative vu que le système est énergétiquement peu favorable (interactions polaire-apolaire). L'ajout de la molécule invitée déplace les molécules d'eau vers l'extérieur. Elle pénètre dans la cavité par la plus grande ouverture et le côté le plus accessible. Une fois dans la cavité, l'invité forme des interactions de Van Der Waals, des interactions hydrophobes et/ou des liaisons hydrogènes avec la CD, stabilisant ainsi le système (Marques, 2010; Szejtli et al., 1982).



Figure 32 : Représentation schématique du phénomène d'inclusion.

La complémentarité stérique entre les espèces hôte et invité s'avère primordiale pour la formation du complexe d'inclusion. En effet, l'inclusion va dépendre de la taille relative de la

cavité de la CD par rapport à la taille de la molécule invitée. Si l'invité est de taille trop importante, il ne pourra pas pénétrer à l'intérieur de la cavité de la CD, alors que s'il est de trop petite taille, il y aura peu d'interaction avec la CD. De même, les différents volumes internes présentés par les CDs leur confèrent des propriétés complexantes différenciées (α -CD > β -CD > γ -CD). Ainsi, l' α -CD complexe plus facilement des petites molécules (chaînes aliphatiques), la β -CD peut complexer les composés aromatiques ou les hétérocycles et la γ -CD s'accommode de macromolécules (stéroïdes, macrocycles) (Loftsson & Brewster, 1996). Par ailleurs, la stœchiométrie des complexes est directement consécutive à la compatibilité géométrique qui s'exerce ente la cyclodextrine et l'invité. De ce fait, il est possible qu'une cyclodextrine accommode plus d'un invité ou que l'invité mobilise plus d'une cyclodextrine. On parle alors de différentes stœchiométries (1:1, 1:2, 2:1, 2:2), en faisant apparaître, dans l'ordre, le nombre de molécules hôtes puis de molécules invitées (**Figure 33**). Le cas le plus fréquent est l'obtention d'un complexe hôte/invité de stœchiométrie 1:1 (Landy et al., 2007).



Figure 33 : Représentation schématique des principales stœchiométries observées entre la CD et l'invité.

II.3.5 Techniques de caractérisation des complexes d'inclusion

La capacité des CDs à inclure un grand nombre de molécules dépend majoritairement de la stabilité des complexes impliqués. De nombreuses techniques analytiques sont employées pour étudier le phénomène d'inclusion et pour mesurer la stabilité des composés d'inclusion aussi bien à l'état liquide que solide. Dans ce cadre, la caractérisation vise à la fois à fournir des informations structurelles et à déterminer l'affinité entre espèces moléculaires. Nous présentons dans la suite les différentes méthodes utilisées pour caractériser les complexes d'inclusion en solution.

II.3.5.1 Sur le plan structurel

II.3.5.1.1 Résonnance Magnétique Nucléaire (RMN)

La RMN en milieu liquide est une technique très largement utilisée dans les analyses pharmaceutiques et biomédicales variées tels que l'identification structurale, la métabolomique ou bien encore le contrôle de qualité des principes actifs et des excipients (Malet-Martino & Holzgrabe, 2011). Elle est également exploitée dans l'analyse des interactions entre la CD et l'invité. Cette technique repose sur l'interprétation des modifications de l'environnement magnétique des noyaux propres à la CD lors de la complexation avec l'invité. En effet, la modification de la résonance des protons à l'intérieur de la cavité (H₃ et H₅) témoigne de la présence de la molécule invitée dans la cavité et donc à la formation de complexes d'inclusion. Tandis que les protons localisés à l'extérieur (H₂, H₄ et H₆) de la cavité restent pratiquement inchangés. Il est également possible d'évaluer le niveau de pénétration du composé dans la cavité de la CD par la modification de résonnance des protons H₅ situés plus profondément dans la cavité que les protons H₃. D'autre part, la molécule invitée présente quant à elle, des modifications de déplacements chimiques au niveau de la plupart de ses protons, ce qui permet de déterminer la portion de cette molécule qui interagit avec la CD. De même, la RMN à deux dimensions comme les techniques de ROESY ou NOESY sont utilisées pour l'analyse des complexes d'inclusion. Les taches de corrélation issues de ces techniques permettent de définir les protons de la molécule hôte et invité qui présentent une proximité spatiale lors du phénomène d'inclusion (Schneider et al., 1998).

II.3.5.2 Sur le plan de la stabilité

Un grand nombre de techniques a été exploité pour l'étude de la stabilité du complexe. Cette dernière est généralement exprimée en termes de constante de stabilité ou de formation (K_f). On note par exemple, les techniques spectroscopiques : UV-visible (Decock et al., 2006; Tanemura, Saito, Ueda, & Sato, 1998), fluorescence (Kfoury et al., 2014 ; Zhan et al., 2008), espace de tête statique « headspace » couplé à la chromatographie en phase gazeuse (Ciobanu et al., 2012, 2013; Kfoury et al., 2014), dichroïsme circulaire (Lu et al., 2008)... ainsi que les méthodes de mesure de la solubilité.

II.3.5.2.1 Spectroscopie UV-visible

La spectroscopie UV-visible est couramment utilisée pour la détermination de la K_f . Il existe deux types de protocoles expérimentaux : la méthode directe ou de titration et la méthode indirecte ou de compétition. La première est employée pour les molécules invitées qui absorbent

dans l'UV-visible alors que la deuxième est intéressante pour les molécules qui ne possèdent pas de chromophore. La titration (méthode directe), la plus couramment utilisée, consiste à observer la variation du signal de l'une des espèces (dite molécule titrée, l'invité) sous l'addition d'une concentration graduelle de la seconde (dite molécule titrante ou la CD) (Landy et al., 2000). La méthode indirecte repose sur l'étude des variations spectrales d'une molécule tierce désignée sous le nom de compétiteur lors de l'ajout de la CD puis l'invité (Mohamed et al., 2009).

II.3.5.2.2 Méthode de solubilité

La méthode de solubilité est également connue sous le nom de méthode Higushi et Connors (1965). Elle consiste à mesurer la concentration maximale que le substrat peut atteindre en présence d'une solution aqueuse de CD. D'un point de vue expérimental, il s'agit de placer le substrat en excès dans des solutions à différentes concentrations de CDs, puis de filtrer le mélange après 24 h d'agitation et enfin de mesurer la quantité totale de substrat solubilisé. Un diagramme de solubilité est ainsi réalisé en représentant sur un graphique la solubilité apparente du composé en fonction de la concentration totale en CD. Différents types de courbes caractérisant les interactions CD/invité peuvent être ainsi obtenus (**Figure 34**) :

-Le diagramme de type A : lorsque la concentration de l'invité augmente de manière continue sous l'augmentation de la concentration en CD (solubilité du complexe au moins équivalente à celle de la CD). On distingue plusieurs profils de type A : A_L (le complexe est du 1^{er} ordre et l'augmentation est parfaitement linéaire), A_P (le complexe est d'ordre supérieur à 1, l'augmentation de la concentration de CD aboutit à un plus fort accroissement de la solubilité du fait de la formation simultanée de complexes de plus hautes stœchiométries), A_N (rarement observé) (Loftsson et al., 2005).

-Le diagramme de type B : obtenu lorsque le complexe présente une solubilité limitée, inférieure à celle de la CD. Le type B_s désigne les diagrammes de phase de solubilité où la solubilité du complexe est supérieure à celle de l'invité seul ; et le type B_I , si le complexe formé est moins soluble que l'invité seul.



Figure 34 : Diagrammes de solubilité selon Higushi et Connors (Higuchi & Connors, 1965).

Les K_f peuvent être déduites des diagrammes de type A_L et de la partie linéaire des diagrammes B_S selon l'équation suivante :

$$K_{f} = \frac{\text{Pente}}{S_{0} (1 - \text{pente})} (\text{Eq. 3})$$

où S_0 est la solubilité intrinsèque de l'invité (en absence de CD) et Pente est la pente du diagramme de phase de solubilité.

L'efficacité de complexation (CE) peut être également déterminée à partir des diagrammes de solubilité. Ce paramètre reflète la capacité de solubilisation de la CD vis-à-vis de la molécule étudiée et permet de déterminer le rapport CD: invité optimal pour la préparation des complexes sous forme solide. Il est obtenu à partir de l'équation suivante (Loftsson & Duchêne, 2007) :

$$CE = S_0 \times K_{1:1} = \frac{[CD/I]}{[CD]} = \frac{Pente}{1 - pente} (Eq. 4)$$

II.3.6 Applications

La capacité de former des complexes d'inclusion avec un grand nombre de molécules confère aux cyclodextrines des propriétés très particulières, leur permettant d'être utilisées dans de nombreuses applications, y compris industrielles. En effet, leur production à l'échelle industrielle n'a débuté qu'à partir de 1979 vu le coût élevé des cyclodextrines et le manque de connaissances sur leur toxicité. À partir de 1984, la production des cyclodextrines s'est fortement accrue. Actuellement, on trouve leur application dans plusieurs domaines : pharmaceutique, cosmétique, agroalimentaire, textile, environnemental, catalyse... (Szejtli, 1985; Szejtli, 2004). Nous présenterons dans ce qui suit quelques applications des cyclodextrines.

II.3.6.1 Pharmaceutiques

Le problème majeur qui touche l'industrie pharmaceutique concerne la faible solubilité et la sensibilité de la plupart des principes actifs (PA). Cela aboutit généralement à une faible biodisponibilité et donc à un effet biologique réduit (Loftsson & Brewster, 2010). Le principal but de l'utilisation des cyclodextrines en industrie pharmaceutique est d'améliorer la dissolution, la solubilité des PA ainsi que d'augmenter leur stabilité (Loftsson & Duchêne, 2007; Stella et al., 1999). La solubilisation des PA hydrophobes peut être réalisée par leur inclusion dans les cyclodextrines qui remplacent alors avantageusement l'utilisation de cosolvants organiques et les surfactants, parfois à l'origine des effets secondaires. La stabilité des médicaments se trouve également améliorée vu qu'ils sont confinés dans la cavité des CDs et donc protégés de l'environnement extérieur (Davis & Brewster, 2004). D'autre part, les CDs peuvent contrôler le taux et la vitesse de libération des PA, qui dépendent de leurs caractéristiques physicochimiques (hydrophobicité) et de celles du complexe (stœchiométrie, stabilité) (Stella et al., 1999). Par exemple, l'utilisation des dérivés éthylés de CDs peut ralentir la dissolution des PA trop hydrophiles (Uekama et al., 1998). Il existe actuellement une quarantaine de formulations contenant des CDs, surtout la β -CD et la HP- β -CD comme : les complexes β-CD/piroxicam (anti-inflammatoire non stéroïdien), HP-β-CD/itraconazole (antifongique) et les vaccins DAPTACEL® (Groupe Sanofi, Pasteur) contre la diphtérie, le tétanos et la coqueluche (avec la diméthyle- β -CD). Un autre avantage des cyclodextrines en industrie pharmaceutique est de diminuer l'amertume et le goût désagréable des médicaments (Szejtli & Szente, 2005). On note par exemple, l'ibuprofène, un anti-inflammatoire non stéroïdien connu pour être trop amer ou l'eszopiclone, un médicament utilisé pour traiter les insomnies, connu pour laisser un très mauvais goût en bouche... (Duchêne et al., 2009 ; Szejtli & Szente, 2005 ; Uekama et al., 1998).

II.3.6.2 Agro-alimentaires

L'utilisation des cyclodextrines dans le domaine agro-alimentaire est bien documentée dans la littérature. Elles sont utilisées pour solubiliser les colorants et les vitamines, supprimer les goûts et les odeurs indésirables, prolonger la libération des arômes et protéger les composés labiles contre l'oxydation et la dégradation par la chaleur, etc (Astray et al., 2009; Fenyvesi et al., 2016). Les CDs sont décomposées dans le corps humain en D-glucose qui est donc assimilé par

le corps comme un sucre (Alonso et al., 2009; Astray et al., 2009 ; Del Valle, 2004; Marques, 2010; Szejtli, 2004). Elles sont référencées dans l'Union Européenne comme stabilisants, liants et additifs ou supports alimentaires. La β-CD est utilisée, depuis longtemps, pour éliminer le cholestérol des produits laitiers et des œufs (Awad et al., 1997). Par exemple, l'ajout de 0,6 % de β-CD au lait réduit le taux de cholestérol du beurre de 95 % sans modifier la composition des acides gras (Alonso et al., 2010) . De plus, l'amertume des jus d'agrumes causée par la présence du limonène et de la naringine pose un problème au niveau de l'industrie alimentaire. La complexation de ces composés avec la CD a été appliquée pour éliminer le goût amer du jus (Hedges, 1998). En outre, les CDs peuvent être utilisées pour améliorer les caractéristiques nutritionnelles des produits comme le lait, le mayonnaise ou la crème. En effet, les émulsions de crème, de mayonnaise ou de margarines sont stabilisées suite à leur encapsulation dans l'α-CD (Astray et al., 2009; Del Valle, 2004; Szente & Szejtli, 2004).

II.3.6.3 Environnementales

L'application des CDs en environnement a été récemment abordée et leur utilisation à grande échelle reste limitée. Toutefois ces molécules peuvent jouer un rôle très important dans le domaine de la protection de l'environnement en termes de solubilisation des polluants organiques, d'enrichissement et de déplacement de polluants organiques et métalliques du sol, de l'eau et de l'air ou encore pour le traitement des eaux usées (Crinia & Morcellet, 2002; Phan et al., 2002 ; Yudiarto et al., 2000). Vu que les CDs sont non toxiques et biodégradables et ne présentent pas de concentration minimale effective comme les surfactants usuels, elles remplacent alors ces derniers dans la dépollution des sols (Viglianti et al., 2006). Par exemple, α , β -CD et les dérivés de la β -CD (HP- β -CD, RAMEB et CRYSMEB) ont été employés pour l'élimination des composés organiques volatils (COVs) tels que le tétrachlorométhane, chloroforme, dichlorométhane, toluène, et les dérivés benzéniques (Blach et al., 2008; Fourmentin et al., 2007 ; Fourmentin et al., 2013). D'autre part, la HP- β -CD est utilisée comme agent destructeur et/ou masquant des mauvaises odeurs dans les désodorisants (CLENZAIRE[®], FEBREZE[®], OUST[®]) ou bien pour le piégeage des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) (Hara et al., 2002; Sui et al., 2013; Sun et al., 2013).

II.4 Système mixte cyclodextrine-liposome

La cyclodextrine est l'un des agents typiques de solubilisation de nombreux composés hydrophobes (Zhang & Ma, 2013). Toutefois, suite à l'administration du complexe d'inclusion CD/PA dans l'organisme, une dissociation rapide du complexe aura lieu. Ceci est dû soit à la dilution de ce dernier dans les fluides biologiques soit à cause du déplacement de l'invité par d'autres molécules (Lu et al., 2012 ; Ozdemir & Erkin, 2012). D'autre part, les molécules hautement hydrophobes, insérées généralement dans la bicouche lipidique, aboutissent généralement à la désintégration de la membrane lipidique (Kirby & Gregoriadis, 1983 ; Takino et al., 1994). Afin d'éviter ces inconvénients, un nouveau système mixte connu sous le nom de « drug-in-cyclodextrin-in-liposome » ou DCL a été proposé pour la première fois par McCormack et Gregoriadis en 1994 (**Figure 35**). Il repose sur l'encapsulation du complexe d'inclusion hôte/invité dans la phase aqueuse des liposomes (McCormack & Gregoriadis, 1994).



Figure 35 : Schéma représentatif du système « drug-in-cyclodextrin-in-liposome » avec les complexes d'inclusion CD/PA incorporés dans la phase aqueuse des liposomes (Gharib et al., 2015).

II.4.1 Propriétés du système DCL

Les DCLs ont été conçus pour regrouper les avantages des deux systèmes d'encapsulation : d'une part, les CDs augmentent la solubilité des molécules hydrophobes, leur biodisponibilité et elles empêchent la désintégration de la membrane lipidique (Chen et al., 2014); d'autre part, les liposomes réduisent la vitesse de libération de l'invité du complexe d'inclusion (Gharib et al., 2015). Ainsi, les DCLs peuvent contrôler l'administration in vivo des PAs, retardant leur libération et améliorant donc leur activité biologique (Chen et al., 2014 ; Jain et al., 2008).

II.4.2 Effet des CDs sur la stabilité des DCLs

Il a été démontré que le système DCL améliore la stabilité des vésicules lipidiques (Gillet et al., 2009 ; Skalko-Basnet et al., 2000). Néanmoins, les CDs, précisément les dérivés méthylés, peuvent éliminer les composants lipidiques des membranes cellulaires et des liposomes tout en formant des complexes d'inclusion avec eux. Par conséquent, les lipides peuvent entrer en compétition avec l'invité dans la cavité des CDs et donc aboutir à la libération partielle ou complète de l'invité (Chen et al., 2014). Étudier la stabilité des liposomes en présences de CDs est donc primordial pour la production des DCLs.

II.4.2.1 Interaction cyclodextrines-liposomes

L'interaction entre les CDs et les liposomes dépend principalement du type de CD, notamment de la taille et l'hydrophobicité de la cavité des CDs. Par calorimétrie différentielle à balayage, il a été démontré que la DIMEB (2,6-di-O-méthyle-β-cyclodextrine) diminue les valeurs d'enthalpie de la transition de phase des liposomes constitués de DPPC en fonction de la quantité de cette CD. Ceci est attribué probablement à la capacité de la CD à complexer la DPPC et donc de l'extraire de la bicouche lipidique. Par contre, la présence de la β-CD et d'HPβ-CD n'a pas induit des modifications des paramètres thermodynamiques des vésicules (Puglisi et al., 1996). Dans une autre étude menée par Puskas et al. (2006), l'interaction entre des solutions de CDs (α -CD, β -CD, γ -CD) et des liposomes unilamellaires (SUV) constitués de DPPC a été caractérisée en termes de stabilité physique (mesure des tailles particulaires en fonction du temps d'incubation) et par des « isothermes de liaisons » (déterminées par méthode spectroscopique). La quantité de CD liée par mole de DPPC augmente dans le sens suivant : γ- $CD < \beta$ -CD $< DIMEB << \alpha$ -CD. Ces résultats obtenus sont en corrélation avec la diminution de la stabilité physique des membranes (γ -CD < β -CD < α -CD) (Puskas et al., 2006). En outre, l'affinité de différentes CDs pour le cholestérol a été déterminée par des études de phase solubilité. L'affinité des CDs vis-à-vis du cholestérol augmente dans cet ordre : β -CD = γ -CD = HP- γ -CD = SBE- β -CD < HP- β -CD < DIMEB < RAMEB = TRIMEB (2,3,6-tri-O-méthyleβ-cyclodextrine). Concernant les phosphatidylcholines de soja (SPC), l'affinité des CDs augmente dans cet ordre : β -CD = γ -CD = HP- γ -CD = SBE- β -CD < HP- β -CD < TRIMEB < RAMEB < DIMEB. En effet, les dérivés méthylés de la β -CD, possèdent une cavité plus profonde et plus hydrophobe en comparaison avec d'autres CDs, et donc ils ont tendance à former, préférablement, des complexes d'inclusion avec des composés hautement hydrophobes comme le cholestérol (Piel et al., 2007).

D'autre part, dans le cas des systèmes DCLs, des études suggèrent que la présence du PA dans la cavité peut retarder les interactions des CDs avec les composants lipidiques. Dans ce cas, l'affinité de la molécule pour la CD est supérieure à celle des lipides ou du cholestérol ce qui réduit la déstabilisation du système lipidique (Hatzi et al., 2007). Par exemple, la stabilité de la trétinoïne (utilisée dans le traitement des maladies dermatologiques) dans LCs et les DCLs formés à partir du DIMEB a été comparée. Les résultats ont montré que les deux systèmes (DCLs et LCs) sont stables en termes de taille et zêta potentiel avec des valeurs d'efficacité d'incorporation élevées. Leur stabilité chimique au cours du temps a été aussi confirmée. Dans le même ordre d'idée, plusieurs complexes d'inclusion ont été formés entre différents types de CDs (β -CD, γ -CD, DIMEB, TRIMEB, CRYSMEB, RAMEB, HP- β -CD et HP- γ -CD) et la β -méthasone puis encapsulés dans des liposomes constitués de SPC. Aucune destruction des liposomes n'est observée même en présence des cyclodextrines méthylées à des concentrations supérieures à 40 mM. Ceci peut être dû à l'affinité élevée des CDs vis-à-vis de la β -méthasone, qui permet l'encapsulation d'une grande quantité de complexes dans les liposomes avec une interaction moindre des CDs avec les composants lipidiques de la bicouche (Piel et al., 2006).

II.4.3 Effet des liposomes sur la stabilité des DCLs

Il existe d'autres facteurs qui peuvent influencer la stabilité du système DCL comme la composition lipidique ainsi que le type de liposomes utilisé. Par exemple, l'étude menée par Sanchez et al. (2011), a montré que la RAMEB élimine le cholestérol des liposomes géantes (GUV) à une température supérieure à la température de transition T_m. La stabilité des liposomes a été également évaluée pour plusieurs types de liposomes (SUV, MLV et driedrehydrated vesicle : DRV) constitués de différents lipides (EPC, H-EPC, DSPC) en présence des solutions de RAMEB, HP-β-CD ou HP-γ-CD. La diminution éventuelle de l'intégrité membranaire a été évaluée en encapsulant de la calcéine et confirmée par des mesures de turbidité et de tailles particulaires (Hatzi et al., 2007). L'effet déstabilisant de la RAMEB sur la membrane lipidique des MLV et SUV était supérieur par rapport à celui des CDs hydroxypropylées, qui n'ont pas montré d'effet sur la bicouche lipidique. Pour les liposomes DRV, composés d'un des trois types de phospholipides, ils étaient affectés de la même manière quel que soit le dérivé de la CD utilisé. Les vésicules SUV présentaient une meilleure stabilité parmi les autres types de liposomes en termes de libération de la calcéine. L'augmentation de la stabilité en cas des SUV est due au fait qu'ils possèdent une faible courbure membranaire ce qui empêche les CDs d'interagir avec les bicouches et d'extraire leurs lipides (Hatzi et al., 2007).

II.4.4 Comparaison entre LCs et DCLs

II.4.4.1 Taille et morphologie des vésicules

La modification de la taille des vésicules dépend de la composition des liposomes (type de phospholipide, présence du cholestérol, rapport molaire de phospholipides : cholestérol, concentration du complexe CD/principe actif) et la méthode de préparation des liposomes (Gharib et al., 2015). L'encapsulation du complexe d'inclusion CD/invité résulte généralement d'une augmentation de la taille des MLV et des LUV (Chen et al., 2014). Toutefois, pour les SUV, la présence de CD ne modifie pas la taille de ces vésicules même à des concentrations élevées en CD (Maestrelli et al., 2006). Par exemple, la taille des MLV encapsulant le célécoxib a augmenté de 1,32 µm pour les LCs à 6,52 µm pour les DCLs formés à partir du complexe d'inclusion β -CD/célécoxib, respectivement (Jain et al., 2007). Néanmoins, les SUV encapsulant le complexe d'inclusion HP-β-CD/β-lapachone possèdent une taille légèrement supérieure que celle obtenue avec les LCs (Cavalcanti et al., 2011). D'autres études ont montré des résultats contradictoires concernant l'effet des CDs sur la taille des liposomes. Des complexes d'inclusion de la bétaméthasone en présence de différents types de CDs (β-CD, DIMEB, TRIMEB, RAMEB, HP-y-CD) sont incorporés dans les MLV à des concentrations de CD de 10 et 40 mM (Piel et al., 2006). À ces deux concentrations, aucune différence significative n'a été obtenue entre la taille des liposomes incorporant la bétaméthasone et celle des liposomes incorporant les complexes CD/bétaméthasone (Piel et al., 2006). De même, la taille des liposomes LUV témoins ne diffère pas significativement de celle obtenue avec les liposomes encapsulant la prédnisolone et les liposomes encapsulant les complexes CD/prédnisolone (Fatouros et al., 2001). Quant à la morphologie des liposomes, les études ont montré que les CDs n'affectent pas la forme des vésicules lipidiques ce qui indique que les complexes sont inclus dans les vésicules (Maestrelli et al., 2005).

II.4.4.2 Efficacité d'encapsulation

La quantité des molécules hydrophobes incorporées dans la bicouche lipidique est généralement limitée en termes de rapport molaire lipide/molécule (Chen et al., 2014). Par conséquent, l'encapsulation de complexes d'inclusion CD/invité dans les liposomes a été proposée pour améliorer l'EE et le RE (McCormack & Gregoriadis, 1994). Par exemple, le rendement et l'efficacité d'incorporation de l'eugénol (présent dans de nombreuses autres plantes y compris la cannelle, le basilic, la muscade) dans les DCLs sous forme de complexes d'inclusion HP- β -CD/eugénol a été augmenté de ~2 fois par rapport aux LCs (Sebaaly et al., 2016). De même, plusieurs composés pharmaceutiques ont été encapsulés plus efficacement dans les DCLs que dans les LCs, on cite par exemple : nifédipine, prédnisolone, indométacine, célécoxib, bétaméthasone (Skalko-Basnet et al., 2000; Fatouros et al., 2001 ; Dhule et al., 2012 ; Chen et al., 2007 ; Piel et al., 2006). Cependant, pour d'autres PA, les valeurs d'EE ont été supérieures dans les MLV que dans les DCLs comme kétoprofène et benzocaïne (Maestrelli et al., 2005, 2010). En effet, pour la préparation des LCs, la dissolution du composé se fait dans la phase lipidique alors que pour la préparation des DCLs, le composé est dissout dans la phase aqueuse sous forme de complexe. Par conséquent, le volume occupé par la phase aqueuse, dans le cas des MLV, est inférieur à celui occupé par la phase lipidique ce qui permet une meilleure encapsulation des molécules hydrophobes (Maestrelli et al., 2005).

D'autre part, l'EE des DCLs, pourrait dépendre également du type de CD utilisé. Il a été démontré que les liposomes (MLV ou SUV) encapsulant des complexes d'inclusion formés à partir de l'HP- β -CD présentent un meilleur rendement que ceux avec la β -CD (Maestrelli et al., 2005 ; Fatouros et al., 2001 ; Chen et al., 2007). Ceci peut être attribué à la cavité plus hydrophobe de la HP- β -CD et à sa meilleure solubilité aqueuse par rapport à la β -CD (Maestrelli et al., 2005 ; Fatouros et al., 2001). De plus, plusieurs auteurs ont montré une corrélation entre l'EE et la concentration du complexe CD/invité (Piel et al., 2006 ; Maestrelli et al., 2006). L'EE du kétoprofène dans les DCLs augmente avec la concentration du complexe HP- β -CD/kétoprofène jusqu'une concentration de 10 mM. Au-delà de cette concentration, l'EE diminue du fait de la déstabilisation de la membrane par la CD (Maestrelli et al., 2006).

Un autre facteur peut aussi influencer l'EE des DCLs : le type de liposome formé. Les MLV possèdent la meilleure efficacité d'encapsulation suivies par les LUV et les SUV. Le petit volume aqueux des SUV est le facteur principal qui aboutit à la réduction de l'efficacité d'incorporation de ces vésicules (Maestrelli et al., 2006).

II.4.4.3 Cinétique de libération

Le profil de libération des vésicules, encapsulant les molécules bioactives des aliments, est l'un des facteurs primordiaux à contrôler en industrie agroalimentaire. En assurant une libération contrôlée, l'efficacité de ces molécules est améliorée et par la suite les qualités nutritionnelles des aliments seront conservées (Rodríguez et al., 2016).

Des études de libération des PA à partir des LCs et des DCLs ont été menées et comparées afin de déterminer l'effet des CDs sur la vitesse de libération de ces PA. Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 6**.

La présence de composés actifs sous forme de complexe d'inclusion dans la phase aqueuse des liposomes peut moduler la cinétique de libération in vitro de ces molécules. Dans la plupart des cas, les DCLs présentent une libération prolongée en comparaison avec les LCs. En effet, la molécule doit franchir plusieurs barrières (les CDs ensuite la bicouche lipidique) pour qu'elle diffuse hors des vésicules (Jain et al., 2007). La libération des molécules bioactives à partir des DCLs peut se réaliser de deux façons : i) les complexes d'inclusion CDs/molécule sont transportés du compartiment aqueux interne vers les bicouches lipidiques, puis libérés dans le milieu sous forme de complexe intact ; ii) il y a libération de l'agent actif libre dans la phase aqueuse, qui est en équilibre avec sa forme complexée (Figure 36) (Gharib et al., 2015). Vu que la bicouche lipidique a été démontrée imperméable à l'HP-β-CD, ainsi la libération du composé à partir des DCLs formés par le complexe HP-β-CD/invité se fait probablement selon la deuxième route (Joguparthi & Anderson, 2008). Par exemple, la libération du resvératrol, dans les LCs et les DCLs a été comparée. Les résultats ont montré que la vitesse de libération du resvératrol à partir des LCs (61,6 % à t =1h) était plus rapide que celle à partir des DCLs, formés du complexe d'inclusion HP- γ -CD/resvératrol (45,9 % à t=1h) (Soo et al., 2016). En revanche, Cavalcanti et al. (2011), et Fatouros et al. (2001), ont démontré que les LCs prolongent la libération du prédnisolone et de la β-lapachone par rapport aux DCLs. En outre, le profil de libération dépend également du type de CD inclue dans les DCLs. Ainsi, la vitesse de libération de la bétaméthasone à partir de types de DCLs augmente dans le sens suivant : HP- β -CD $\approx \gamma$ -CD < RAMEB < HP- γ -CD \approx en absence de CD < CRYSMEB à une concentration en CD de 10 mM (Piel et al., 2006). Des résultats contradictoires montrent que les CDs : HP-y-CD, CRYSMEB (Gillet et al., 2009), HP- β -CD et β -CD (Chen et al., 2007) n'affectent pas significativement le taux de libération du PA. Le type de liposomes semble également influer le taux de libération des molécules. Par exemple, les LUV assurent une libération contrôlée du kétoprofène suivi par les MLV ensuite les SUV. Les dispersions liposomales LUV possèdent une densité et une viscosité élevées ce qui les rend les plus efficaces dans la rétention des composés. La libération rapide des SUV est attribuée à leur petite taille (Maestrelli et al., 2006).



Figure 36 : Mécanisme de libération du PA des DCLs (Chen et al., 2014).

Tableau 6 : Comparaison de la vitesse de libération entre DCLs et d'autres formulations liposomiales.	
--	--

Molécules	CDs	Liposomes	Vitesse de libération	Références
bioactive	Type de CD	Composition		
	Méthode de préparation	Méthode de préparation		
	du complexe	Structure		
	HP-β-CD	SPC:Chol:MPEG ₂₀₀₀ -:	-La vitesse de libération de HP- β -CD/barbigerone est plus	Qiu et al.,
Barbigérone	PPA	DSPE:Vitamin E	rapide (80 % à 1 h) que celle du DCL (35 % à 1 h)	2015
		Injection éthanolique		
	HP- γ -CD; β -CD;	SPC:Chol:SA	-La vitesse de libération des DCLs augmente dans le sens	Piel et al.,
	CRYSMEB; DIMEB;	HFL	: HP- β -CD $\approx \gamma$ -CD < RAMEB < HP- γ -CD \approx en absence de	2006
	RAMEB; TRIMEB	MLV	CD < CRYSMEB à une concentration de CD de 10 mM	
	PPA		-Une corrélation entre l'EE et la vitesse de libération de la	
			bétaméthasone existe quelque soit le type et la	
			concentration des CDs.	
Bétaméthasone	HP-γ-CD; Crysmeb	PC ou DMPC ± désoxycholate	-La libération de la bétaméthasone augmente avec la	Gillet et al.,
	PPA	de sodium	température (25 °C et 37 °C)	2009
		HFL	-Pour les MLV classiques et déformables, le type de CD	
		MLV	utilisé n'affecte pas le pourcentage de la bétaméthasone	
			libéré	
			-La libération de la bétaméthasone des MLV déformables	
			(HP-y-CD: 75 %; CRYSMEB: 70 %) est améliorée par	

			rapport à des MLV non-déformables (HP-7-CD: 60 %;	
			CRYSMEB: 50 %)	
Cálásarih	0 CD	SDC. Chall built a system	La vitage de libération est alus regide des MLV	Toin at al
Celecoxid	p-CD	SPC:Choi: nulle neutre	-La vitesse de liberation est plus rapide des MLV	Jain et al.,
	Pétrissage en phase	REV; HFL	encapsulant la célécoxib (80 % à 48 h) que les MVV (80	2007
	solide	MVV; MLV	% à 120 h)	
Doxorubicine	γ-CD	DSPE-PEG (pégylé)	-La vitesse de libération de la célécoxib est plus lente à	Hagiwara,
	Non déterminé	Déshydratation-hydratation	partir de γ -CD/-PEG LUV que celle à partir de PEG LUV	et al., 2006
		LUV	encapsulant la doxorubicine	
Indométacine	β-CD, HP-β-CD	SPC:Chol	-La vitesse de libération de l'indométacine est plus lente à	Chen et al.,
	Lyophilisation	HFL	partir de CD/indométacine-MLV comparé à celle de	2007
		MLV	l'indométacine-MLV	
			-Aucune différence significative de la vitesse de libération	
			entre β -CD/indométacine-MLV et HP- β -CD/	
			indométacine-MLV	
	β-CD/HP-β-CD	PC:Chol	-Le kétoprofène se libère à travers la membrane artificielle	Maestrelli et
Kétoprofène	Co-évaporation	HFL	dans l'ordre : kétoprofène-MLV> HP-β-CD/ kétoprofène -	al., 2005
		MLV	$MLV > \beta$ -CD/ kétoprofène-MLV	

	HP-β-CD	PC:Chol	-La vitesse de libération du kétoprofène augmente dans le	Maestrelli et
	Co-évaporation	HFL; REV; extrusion	sens : HP- β -CD/kétoprofène-LUV < HP- β -CD/	al., 2006
		MLV ; LUV ; SUV	kétoprofène -MLV < HP-β-CD/kétoprofène -SUV	
B-lapachone	HP-β-CD	SPC:Chol:SA	-La vitesse de libération de la β -lapachone est plus lente à	Cavalcanti
	Lyophilisation	HFL	partir de β -lapachone-MLV comparé à celle de HP- β -CD/	et al., 2011
		MLV	ß-lapachone -MLV	
Prédnisolone	β-CD/HP-β-CD	PC:Chol	-La vitesse de libération du prédnisolone augmente dans le	Fatouros et
	PPA	Déshydratation-hydratation	sens : prédnisolone-LUV (9,4 %) < HP-β-CD/	al., 2001
		LUV	prédnisolone-LUV (18,3 %) < β -CD/ prédnisolone-LUV	
			(43 %)	
Resvératrol	HP-γ-CD	DPPC : Chol	-La vitesse de libération du resvératrol à partir des LCs	Soo et al.,
	PPA	HFL	(61,6 % à t =1 h) était plus rapide que celle à partir des	2016
			DCLs (45,9 % à t=1 h)	

*PPA : préparation en phase aqueuse, MPEG₂₀₀₀-: monométhoxy polyéthylène glycol 2000–distéaroyl phosphatidyl-éthanolamine; SPC : phosphatidylcholine de soja, SA : stéarylamine ; PC : phosphatidylcholine ; HFL : hydratation du film lipidique ; Chol : cholestérol, REV : évaporation en phase inverse

II.4.4.4 Stabilité chimique et physique

Dans les aliments, les composés actifs sont souvent dispersés en milieu aqueux ce qui augmente leur susceptibilité à la dégradation. L'encapsulation dans les liposomes ou dans les CDs est efficace pour la protection de ces composés (Loukas et al., 1998). Il a été démontré que les DCLs accroissent de façon significative la stabilité chimique des molécules par rapport aux LCs (Gillet et al., 2009 ; Skalko-Basnet et al., 2000). Par exemple, la stabilité de la riboflavine et de l'ascorbate de sodium, molécules sensibles à la lumière et à l'oxydation, a été augmenté de 270 et 125 fois, respectivement, après leur encapsulation dans les DCLs par rapport aux molécules libres (Loukas et al., 1995). De même, l'encapsulation de l'anéthole dans les DCLs a abouti à une augmentation de sa photostabilité de 12,6 fois dans les DCLs par rapport à 2,3 fois dans les LCs (Gharib et al., 2016). D'autre part, les DCLs encapsulant la quercétine présentent une meilleure protection contre la peroxydation lipidique par les ERO que les LCs. En effet, l'activité de la quercétine était augmentée de 50 fois dans les DCLs que dans les liposomes (Shaji & Iyer, 2012). En outre, les études ont montré que les systèmes DCLs sont stables durant le stockage à 4 °C pour une durée d'un an (Cirri et al., 2009 ; Gharib et al., 2016 ; Sebaaly et al., 2016).

II.4.4.5 Activités biologiques

L'activité anticancéreuse du LPSF/AC04 (5Z)-[5-acridine-9-ylmethylène-3-(4-méthylebenzyle)-thiazolidine-2,4-dione] contre les cellules tumorales du sein T47D a été évaluée in vitro en l'incorporant dans les LCs ou les DCLs (Mendonça et al., 2012). Cette étude a démontré que l'activité de LPSF/AC04 est deux fois plus importante dans les DCLs que dans les LCs. Ce résultat est dû à une augmentation de la solubilité du PA donc à une meilleure pénétration dans les cellules ce qui aboutit à une amélioration de son activité biologique. Dhule et al. (2012) ont montré également que l'encapsulation dans les DCLs du complexe d'inclusion HP- γ -CD/curcumine aboutit à une puissante activité anticancéreuse de la curcumine par rapport aux LCs. De plus, ce système présente une faible toxicité vis-à-vis des cellules normales (Dhule et al., 2012). De même, les DCLs contenant le complexe HP- β -CD/curcuminoïdes ont montré une activité antiproliférative contre les cellules tumorales des poumons sans présenter un effet toxique sur les fibroblastes pulmonaires normales (Agashe et al., 2011).

L'encapsulation dans le système mixte peut améliorer de façon significative les propriétés pharmacocinétiques du PA. Par exemple, le honokiol non-encapsulé est rapidement éliminé de l'organisme après injection intraveineuse alors que suite à son administration sous forme

encapsulé dans les DCLs, son élimination est retardée et le temps de demi-vie est prolongée dans l'organisme (Wang et al., 2011).

II.5 Les différents systèmes d'encapsulation pour la quercétine

Afin d'améliorer la stabilité, la solubilité ainsi que la biodisponibilité de la quercétine, divers systèmes d'encapsulation ont été développés. Dans le tableau ci-dessous (**Tableau 7**), nous présenterons les différents systèmes d'encapsulation utilisés pour incorporer la quercétine. À noter que l'encapsulation du nérolidol a été menée pour la première fois dans notre étude.

Tableau 7 : Les systèmes d'encapsulation de la quercétine.

Systèmes d'enca	psulation	Résultats obtenues	Références
Nano-émulsions (Huile/Eau)		-Augmentation de la solubilité de 0,17-7,7 $\mu g/mL$ dans l'eau jusqu'à 4,2 mg/mL dans	Gao et al., 2009
		les particules	Takahashi et al.,
		-Augmentation de la biodisponibilité	2007
		-Libération rapide de la quercétine	
		- Faible stabilité dans les milieux gastriques	
Nanoparticules	lipidiques solides	-Augmentation de la biodisponibilité (5,71 fois) par rapport à la solution de quercétine	Müller et al., 1997
(SLN)		encapsulée dans 4 % sodium carboxyméthylecellulose	Fathi et al., 2012
		-Libération biphasique (phase rapide-libération prolongée jusqu'à 24 h)	Li et al., 2009
		-Efficacité d'encapsulation élevée	
		-Forte possibilité d'agrégation	
		-Risque de recristallisation	
Vecteurs lipidiques nanostructurés		-Les NLC encapsulant quercétine montrent une bonne stabilité thermique et un profil	Sun et al., 2014
(NLC)		de libération prolongé	Liu et al., 2014
		-Augmentation de la solubilité de 1000 fois	
		-Amélioration de l'activité anticancéreuse de la quercétine	
		-Efficacité d'encapsulation élevée (89 %)	
Nanoparticules	À base de protéines	-Amélioration de la stabilité de la quercétine dans les milieux acides et basiques	Joye &
polymères	(albumine)	-Augmentation de la stabilité chimique de la quercétine (photostabilité et stabilité	McClements,
		dans les conditions alcalines)	2014

	Patel et al., 2012
À base de -Augmentation de l'efficacité d'encapsulation	Ha et al., 2013
polysaccharides -Augmentation de la solubilité	Hazra et al., 2015
(chitosane)	Xing et al., 2007
Synthétiques (PLGA) - Amélioration de la biodisponibilité de la quercétine	Kumar et al., 2015
-Libération contrôlée	
Inorganiques (Fe ₃ O ₄) -Meilleure activité anticancéreuse	Sapino et al., 2015
Complexes d'inclusion -Amélioration de la solubilité et des propriétés antioxydantes de	la quercétine Jullian et al., 2007
-CD/Quer présente une meilleure activité anticancéreuse in vivo	Kale et al., 2006
-Libération rapide	
Micelles -Amélioration de la capacité de piégeage des radicaux libre	Zhou & Wang,
-Capacité de solubilisation limitée	2015
Liposomes -Efficacité d'encapsulation élevée	Jangde & Singh,
-Libération biphasique (phase rapide-libération lente et prolongé	e) 2016
-Bonne stabilité de stockage	Shaji and Iyer.,
-Faible stabilité dans les milieux acides	2012
-Coût élevé des produits de bases	Eathi at al 2012

II.6 Conclusion

À travers cette partie bibliographique, le développement des aliments fonctionnels en industrie alimentaire a été exploité. Les différents systèmes d'encapsulation qui permettent d'améliorer les propriétés physicochimiques de ces ingrédients ont été présentés. Nous nous sommes intéressés à trois systèmes dont deux à bases de lipides (LCs et DCLs) et un troisième à base de polysaccharide (CDs). L'utilisation des DCLs, un système regroupant les avantages offerts par les CDs et les LCs, semble prometteur pour l'encapsulation des molécules étudiées dans notre travail (le nérolidol et la quercétine).

Objectifs et Stratégie de travail

Objectifs et stratégie de travail

Objectifs

Au-delà des propriétés de base des aliments, un nouveau concept est apparu au début du 20^{ème} siècle : le concept de fonctionnalité. Il est défini comme étant la capacité des aliments à intervenir au niveau des fonctions de l'organisme et de moduler son activité. Des recherches scientifiques approfondies ont dévoilé la présence de molécules bioactives qui sont en grande partie responsables de cette fonctionnalité.

Dans notre étude, deux molécules ont été choisies : le sesquiterpène nérolidol et le flavonoïde quercétine. Le choix de ces molécules repose sur le fait qu'elles possèdent de nombreuses activités biologiques importantes (antioxydantes, antimicrobiennes. anticancéreuses et anti-inflammatoires) et qu'elles sont omniprésentes dans une variété d'aliments (gingembre, néroli, pomme, brocoli etc...). De plus, ces deux molécules sont reconnues comme GRAS et approuvées par la FDA. Par conséquent, elles peuvent être introduites dans les aliments comme alternatives aux préservatifs synthétiques. Néanmoins, leur application en industrie alimentaire est limitée à cause de leur faible solubilité aqueuse ainsi que leur susceptibilité à la dégradation chimique et physique. La nanoencapsulation a été développée à petite échelle et puis transmise au niveau industriel dans le but de solubiliser, protéger et assurer une libération contrôlée des produits alimentaires. Plus précisément, diverses études ont montré la capacité des liposomes et des CDs à améliorer les propriétés physicochimiques de principes actifs et d'arômes.

Le but de notre travail était de trouver un système d'encapsulation approprié (CDs, LCs ou DCLs) pour le nérolidol et la quercétine et par la suite d'étudier l'effet de l'encapsulation sur ses propriétés physicochimiques et biologiques.

Tout d'abord, nous avons évalué les différents complexes d'inclusion CDs/Ner. Ensuite, la quercétine, molécule bien caractérisée dans la littérature, a été encapsulée dans des liposomes composés de plusieurs types de phospholipides afin de trouver le meilleur phospholipide répondant aux caractéristiques des liposomes visés : une taille de l'ordre d'une centaine de nanomètre, une distribution de taille homogène, une efficacité d'encapsulation élevée et une bonne stabilité.

Nous avons également préparé un système mixte d'encapsulation basé sur des liposomes encapsulant des complexes d'inclusion des composés actifs et ceci dans le but d'améliorer les caractéristiques des liposomes obtenus par la méthode conventionnelle.

Stratégie de travail

L'étude des phénomènes d'inclusion entre les différentes CDs, le nérolidol et la quercétine, la préparation et la caractérisation des formulations liposomiales (LCs et DCLs) ainsi que l'étude de l'effet de l'encapsulation sur les propriétés physicochimiques et biologiques de ces deux composés ont été menées dans notre étude. Un schéma récapitulatif montrant la stratégie expérimentale adoptée dans notre travail est présenté ci-dessous.



Schéma I : Méthodologie suivie pour l'étude des phénomènes d'inclusion du nérolidol et de la quercétine dans différents types de CDs (α -CD, β -CD, γ -CD, HP- β -CD, CRYSMEB, RAMEB, SBE- β -CD). Les complexes d'inclusion ont été préparés et caractérisés en solution et à l'état solide.



Schéma II : Méthodologie suivie pour l'optimisation, la préparation et la caractérisation des formulations liposomiales encapsulant le nérolidol et la quercétine.



Schéma III: Méthodologie suivie pour évaluer l'effet de l'encapsulation sur les propriétés physicochimiques des composés actifs.

Préparation et caractérisation des complexes d'inclusion CD/invité en solution et à l'état solide

Des CDs natives (α -CD, β -CD, γ -CD) et des dérivés de β -CD (HP- β -CD, RAMEB, CRYSMEB et SBE- β -CD ou Captisol®) ont été choisis pour préparer et étudier les complexes d'inclusions CD/invité (nérolidol ou quercétine). Les différents types de CDs ont été utilisés afin de comparer le comportement du nérolidol et de la quercétine en solution ou à l'état solide en présence de CDs natives et de CDs modifiées (présentant une meilleure solubilité).

L'affinité entre les CDs et les composés actifs a été étudiée en solution par spectroscopie UV-visible (méthode directe et méthode de compétition avec l'orange de méthyle) ainsi que par phase de solubilité (Higuchi & Connors, 1965; Landy et al., 2000). Les complexes d'inclusion ont été caractérisés sur le plan stabilité et sur le plan structurel.

Sur le plan stabilité, les K_f, la stœchiométrie des complexes ainsi que l'effet de l'encapsulation sur la solubilité de ces deux molécules ont été ainsi déterminées.

De plus, la caractérisation structurale des complexes d'inclusion CD/Ner a été menée par spectroscopie RMN. En effet, l'interaction du nérolidol avec la cavité de la β -CD peut être confirmée tout en observant les variations de plusieurs types de signaux plus particulièrement les déplacements chimiques (δ) à partir de la ¹H RMN. Les variations du déplacement chimique traduisent une modification de l'environnement chimique des noyaux étudiés, et donc il est possible de suivre les réponses spectrales des protons situés dans la cavité de la CD (H₃, H₅ et H₆) ou des protons de la molécule invitée (Schneider et al., 1998). Une étude théorique de modélisation moléculaire a été également menée pour simuler la géométrie et la structure des complexes d'inclusion et conforter les résultats expérimentaux.

L'application de complexes d'inclusion CD/molécules bioactives, sous forme liquide, en industrie pharmaceutique ou alimentaire est soumise à de très fortes contraintes (stabilité, libération rapide, etc). Par conséquent, des formulations sous forme de poudre peuvent être développées afin d'augmenter leur durée de vie (Bilia et al., 2014; Desai & Park, 2005). La HP- β -CD est largement utilisée en industrie agroalimentaire vu qu'elle est hautement hydrosoluble (>500 mg/mL) et approuvée par la FDA. Des formulations d'HP- β -CD (à différentes concentrations en CDs) encapsulant le nérolidol ont été préparées et leurs teneurs et efficacités d'encapsulation ont été ainsi déterminées.

Préparation et caractérisation des LCs et des DCLs :

En raison de leur structure et leur composition, les liposomes ont été largement utilisés comme modèle membranaire. Vue leur biocompatibilité, leur biodégradabilité ainsi que leur

sécurité d'emploi, l'application des liposomes est actuellement très variée en industrie pharmaceutique, cosmétique et alimentaire. En industrie alimentaire, les liposomes sont utilisés pour encapsuler des protéines, des enzymes, des vitamines, des antioxydants ainsi que des arômes (Mozafari et al., 2006, 2008, Taylor et al., 2005); L'avantage de ce système par rapport à d'autres systèmes réside dans la stabilité accrue qu'il confère dans les produits alimentaires présentant une activité importante de l'eau (boissons et laits...) (Mozafari et al., 2008; Mozafari et al., 2008).

Trois types de phospholipides ont été choisis dans notre étude dont deux insaturés (Lipoid E80 et Lipoid S100) et un saturé (Phospholipon 90H). Le Lipoid E80 est un phospholipide provenant du jaune d'œuf alors que le Lipoid S100 et le Phospholipon 90H proviennent du soja. Ces phospholipides sont naturels, peu coûteux comparés aux phospholipides synthétiques et contiennent en majorité de la phosphatidylcholine qui est un constituant majeur de la membrane biologique. Nous nous sommes intéressées à comparer les caractéristiques des liposomes obtenus par ces trois types de phospholipides libres et encapsulant la quercétine afin d'élaborer la formulation liposomiale adéquate pour l'encapsulation du nérolidol. En premier lieu, les LCs sont préparés par la méthode d'injection éthanolique. Nous avons choisi cette méthode vue qu'elle est simple, rapide, reproductible, peu coûteuse et transposable à grande échelle (Jaafar-Maalej et al., 2010). En plus, les méthodes courantes de préparation des liposomes, notamment l'hydratation du film lipidique et l'évaporation en phase inverse, nécessitent des traitements mécaniques tels que la sonication, l'extrusion et l'utilisation de solvants toxiques (chloroforme, diéthyleéther ou isorpropyleéther).

La caractérisation des structures liposomiales a été ensuite menée par des analyses de la rigidité membranaire par AFM de liposomes blancs, par la mesure de la taille de toutes les formulations liposomiales par granulométrie laser ainsi que par la détermination de l'efficacité d'encapsulation et du rendement par CLHP de ces différents liposomes vis-à-vis de la quercétine. L'AFM est un microscope d'imagerie, développé en 1986 par Binnig, Quate et Gerber, permettant de visualiser la topographie 3D de la surface d'un échantillon physique ou biologique, de l'ordre du nanomètre, se trouvant dans son environnement naturel avec une résolution élevée. L'AFM s'avère actuellement une technique puissante pour étudier les propriétés mécaniques (rigidité, élasticité, viscosité, viscoélasticité, adhésion) de diverses structures biologiques (Carvalho & Santos, 2012).

Le meilleur type de phospholipide (Lipoid E80) a été ultérieurement utilisé pour produire des LCs encapsulant le nérolidol. Comme les complexes d'inclusion sont instables dans un milieu aqueux (Chen et al., 2014) et que les molécules hydrophobes peuvent être rapidement libérées à partir des bicouches lipidiques après administration in vivo (Maestrelli et al.,2005; Takino et al., 1994), l'encapsulation dans les DCLs permet de contourner les problèmes associés à chaque système et de combiner leurs avantages. Les DCLs augmentent davantage la stabilité et l'efficacité d'encapsulation des molécules que la simple incorporation dans les liposomes par la méthode dite conventionnelle (Chen et al., 2014). Les DCLs ont été ainsi formés et caractérisés à partir des complexes d'inclusion SBE- β -CD/Quer et HP- β -CD/Ner.

L'effet de l'encapsulation sur les caractéristiques physicochimiques et biologiques du nérolidol et de la quercétine a été finalement évalué : i) la taille des liposomes par granulométrie laser ; ii) l'efficacité d'encapsulation et le rendement par la méthode de CLHP optimisée ; iii) la libération du nérolidol à travers les CLs et DCLs ; iv) la photostabilité des deux molécules au cours du temps ; v) la capacité des formulations liposomiales à retenir le nérolidol après un an de stockage à 4 °C ; vi) la stabilité de la quercétine dans les milieux gastrique et intestinale ; vii) l'activité antioxydante du nérolidol et de la quercétine en absence et en présence des différentes CDs suivie par spectrophotométrie suite au piégeage du radical libre DPPH[•]. Cette méthode est simple et rapide et elle est recommandée pour les composés ayant des groupements hydroxyles. Elle s'effectue à température ambiante, ce qui permet d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles (Popovici et al., 2010).

Partig 2 : Operimentale

Partie 2. Experimentale Chapitre III. Matériels et Méthodes

III. Matériels et Méthodes

III.1 Produits chimiques

Nérolidol (98 %, mélange des isomères cis (40 %) et trans (60 %)), le trans-nérolidol (≥85 %), Quercitine (≥95 %, standard analytique), le thymol (>99 %), l'anéthole (99 %) et le cholestérol (>95 %) sont fournis par Sigma-Aldrich, France. L'HE de Cabreuva (Myrocarpus fastigiatus) (64,54 % de trans-nérolidol) est fournie par Herbes et Traditions (Comines, France). L'orange de méthyle (MO) est fourni par Acros Organics (Massachusetts, Etats-Unis). α -CD, β -CD, HP- β -CD (DS = 5,6) et RAMEB (DS = 12,6) sont fournies par Wacker-Chemie (Lyon, France). La CRYSMEB (DS = 4,9) provient de Roquette Frères (Lestrem, France). La SBE- β -CD (DS = 6,5) est fournie par Ligand Pharmaceuticals Incorporated (La Jolla, Etats-Unis). La pepsine, la pancréatine (d'origine porcine), l'acide taurocholique, le phosphate de potassium (KH₂PO₄), NaCl, HCl et NaOH sont fournis de Sigma Aldrich. Les trois phospholipides sont fournis par Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Allemagne): Lipoid E80 (composé de 80-85 % phosphatidylcholine de jaune d'œuf, 7-9.5 % phosphatidyléthanolamine, 2 % eau, 0.2 % éthanol), Lipoid S100 (phospholipide non hydrogéné composé de 94 % phosphatidylcholine de 3 % lysophosphatidylcholine, 0,5 % soja, N-acylphosphatidyléthanolamine, 0,1 % phosphatidyléthanolamine, 0,1 % phosphatidylinositol, 2 % eau et 0,2 % éthanol) et Phospholipon 90H (phospholipide hydrogéné composé de 90 % phosphatidylcholine de soja, 4 % lysophosphatidylcholine, 2 % triglycérides, 2 % eau, 0,5 % éthanol et 1% iode). Les membranes de dialyse (MWCO : 0,5-1 kDa et 8-12 kDa) sont fournies par Spectrum Lab (Breda, Hollande). Méthanol (HPLC-grade) est fourni par Sigma Aldrich (France). L'eau est purifiée par un système Milli-Q obtenue à partir d'un système de synergie Millipore (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA).

III.2 Etude du phénomène d'inclusion

Dans cette partie, l'interaction entre les différentes CDs et les deux composés actifs a été évaluée afin de mettre en évidence la formation de complexes d'inclusion CD/Ner et CD/Quer. Ces études de caractérisation étaient indispensables afin d'optimiser le choix des systèmes CD/invité pour le développement des DCLs. Dans un premier temps, nous avons

étudier la capacité des CDs à solubiliser ces deux composés par des études de phase de solubilité en utilisant les techniques d'UV-visible, de CLHP et de TOC (pour déterminer la solubilité de l'huile de Cabreuva contenant le nérolidol). À partir des profils de phase de solubilité obtenus, les K_f des complexes d'inclusion ont été calculées. Les K_f ont été également déterminées par spectroscopie UV-visible en appliquant la méthode directe et une méthode par compétition. De plus, une étude expérimentale par spectroscopie ¹H RMN et 2D ROESY suivie d'une étude théorique de modélisation moléculaire ont été menées pour élucider la structure tridimensionnelle des complexes et déterminer l'orientation des invités dans la cavité. Enfin, nous avons caractérisé les complexes d'inclusion CD/Ner sous forme solide en déterminant la teneur et l'efficacité d'encapsulation du nérolidol en présence de différentes concentrations de CDs.

III.2.1 Caractérisation analytique des complexes d'inclusion en solution

Afin de mettre en évidence la formation du complexe d'inclusion en solution entre les CDs et les composés actifs, des méthodes analytiques délivrant des informations sur la stœchiométrie, l'affinité et l'efficacité de complexation des CDs vis-à-vis des invités sont utilisées dans notre travail. La géométrie du complexe est également examinée par modélisation moléculaire et par RMN. Les molécules hôtes testées sont des CDs natives : α -CD, β -CD et γ -CD ou modifiées : HP- β -CD, CRYSMEB, RAMEB, SBE- β -CD (Captisol[®]). Les deux molécules étudiées sont le nérolidol et la quercétine.

III.2.1.1 Détermination des Kf

III.2.1.1.1Méthode de solubilité

La méthode de solubilité ou la méthode de Higushi & Connors (1965) vise à mesurer la concentration maximale que le substrat peut atteindre en solution en présence de molécules complexantes.

De point de vue pratique, le substrat (nérolidol ou quercétine) est placé en excès dans des solutions de CDs (α -CD, β -CD, γ -CD, HP- β -CD, RAMEB, CRYSMEB et SBE- β -CD) de concentrations croissantes. Pour la quercétine, des concentrations de 0 ; 1,25 ; 2,5 ; 5 ; 7,5 et 10 mM sont utilisées pour toutes les CDs. Les mêmes concentrations ont été utilisées pour le nérolidol, à l'exception de l' α -CD et la β -CD où des concentrations de 0 ; 0,325 ; 0,625 ; 0,75 et 1 mM sont utilisées afin d'éviter la précipitation des complexes CD/Ner. Une solution ne contenant pas de CD est aussi préparée afin de déterminer la solubilité aqueuse intrinsèque de l'invité (S₀). Les mélanges sont mis à l'équilibre pendant 24 h sous agitation continue (120 rpm) puis filtrés à l'aide d'un filtre à membrane en acétate de cellulose de 0,45 μ m, pour retenir tout excès d'invité insoluble.

La concentration du nérolidol en absence et en présence de CD a été déterminée par CLHP (décrite dans le chapitre III, paragraphe III.4). La quantité de la quercétine dans les filtrats a été déterminée par spectroscopie UV-visible. Pour se faire, une gamme d'étalon a été préparée dans l'éthanol à partir d'une solution mère de 100 μ g/mL pour obtenir des solutions filles de concentrations entre 1 et 10 μ g/mL. La longueur d'onde maximale de la quercétine utilisée dans l'analyse est de 370 nm.

Les profils des diagrammes de solubilité sont obtenus en traçant la solubilité apparente du nérolidol ou de la quercétine en fonction de la concentration totale en CD. Le calcul de K_f et de CE se fait notamment à partir des courbes de type A_L où le diagramme de solubilité est linéaire (Voir chapitre II, paragraphe II.3.5.2.2,). Comme les concentrations mesurées sont au moins égales à la solubilité de l'espèce invitée seule, la complexation se traduit généralement par une variation de signal plus intense que dans le cas des méthodes directes telles que la titration.

III.2.1.1.2Mesure par carbone organique total (TOC)

Dans le but d'étudier la capacité de solubilisation de la CD vis-à-vis de l'HE de Cabreuva (contenant majoritairement du trans-nérolidol), une nouvelle méthode, récemment développée dans notre équipe a été utilisée (Miriana et al., 2016). Cette méthode utilise la mesure de carbone organique total (Total Organic Carbon, TOC) qui est basée sur l'oxydation complète des composés organiques (la CD, l'invité ou le complexe CD/I) en CO₂. Le CO₂ ainsi libéré est détecté à l'aide d'un détecteur infrarouge non dispersif (NDIR) à partir d'un analyseur Shimadzu TOC-VCSH (Etats-Unis).

De point du vue pratique, la phase de solubilité est réalisée en mélangeant l'huile de Cabreuva en excès avec différentes solutions de HP- β -CD (0; 1,25; 2,5; 5; 7,5 et 10 mM). Ensuite, les mélanges sont soumis à une agitation continue de 120 rpm pour 2 h puis sont filtrés à l'aide d'un filtre à membrane en acétate de cellulose de 0,45 µm. Des solutions de HP- β -CD seule ont été aussi préparées aux mêmes concentrations utilisées pour la phase de solubilité dans l'eau.

1 mL de chaque filtrat ou de solution de CD seule a été ajouté à 14 mL d'eau distillée et analysé par TOC afin de déterminer la valeur de TOC_T et TOC_{CD} , respectivement.

La quantité de l'HE dans le filtrat (TOC_{HE}) est ainsi calculée suivant l'équation :

 $TOC_{HE} = TOC_T - TOC_{CD} (Eq.5)$
avec TOC_T et TOC_{CD} correspondent aux valeurs de TOC mesurées pour le filtrat et la solution de CD ne contenant pas d'invité, respectivement. La solubilité d'HE est ensuite déduite d'une concentration connue d'HE (déterminée par l'analyseur). Les résultats ainsi obtenus sont exprimés en concentration massique de l'HE (g.L⁻¹).

III.2.1.1.3Spectroscopie UV-visible

La spectroscopie UV-visible est adaptée afin de caractériser les complexes d'inclusion CD/invité. Une méthode de titration est alors réalisée pour calculer les K_f. Il existe deux méthodes de titration : l'une directe appliquée aux molécules ayant un chromophore et l'autre indirecte ou de compétition pour les molécules ne présentant pas de spectre d'absorption dans l'UV-visible. Dans notre étude, les K_f pour CD/Quer et CD/Ner sont déterminées par la méthode directe et la méthode de compétition, respectivement.

Principe de la méthode directe de titration

La titration directe consiste à observer les variations spectrales d'une espèce (quercétine), à une concentration fixe, en ajoutant une concentration graduelle d'un autre composé (CDs). Plus ces variations sont importantes, meilleure est l'interaction entre ces deux molécules et donc plus la K_f sera élevée. Les spectres d'absorption de la quercétine sont uniquement enregistrés vu que la CD ne présente pas de spectres d'absorption dans la zone de mesure choisie. Les propriétés spectrales de la quercétine seront modifiées suite à l'incorporation de cette dernière dans la cavité de la CD. Cette différence spectrale permet de calculer les K_f CD/Quer via un calcul numérique (Landy et al., 2000).

La stœchiométrie, étant supposée correspondre au modèle 1-1, la concentration du complexe est calculée comme suit :

$$[CD]_{I]} = -\frac{1}{2} \sqrt{\left[\left(\frac{1}{K_{f}} + [CD]_{T} + [I]_{T}\right)^{2} - 4 [CD]_{T} [I]_{T}} + \frac{1}{2} \left(\frac{1}{K_{f}} + [CD]_{T} + [I]_{T}\right)$$
(Eq.6)

avec T total.

Pour une certaine valeur de K_f, la [CD/I] est connue ce qui nous permet de déterminer les caractéristiques spectrales du complexe, telles que $\varepsilon_{CD/G}$.

En présence de la CD, l'absorbance de la solution varie selon le coefficient d'absorption molaire de l'invité ($\varepsilon_{invité}$) et du complexe ($\varepsilon_{CD/I}$) ainsi que de leurs concentrations à l'équilibre :

 $A = A_I + A_{CD/I} = l.(\epsilon_I . [I] + \epsilon_{CD/I} . [CD/I])$ (Eq.7)

avec A l'absorbance, l la largeur de la cuve (cm), [I] et [CD/I] les concentrations de l'invité et du complexe (mol.L⁻¹), respectivement et ε le coefficient d'absorptivité moléculaire (L.mol⁻¹.cm⁻¹) à la longueur d'onde λ à laquelle la mesure a été réalisée (500-310 nm).

L'absorbance de la solution varie selon le coefficient d'absorption molaire de l'invité (ε_I). Si le coefficient d'absorption molaire de l'invité est supérieur à celui du complexe $\epsilon_I > \epsilon_{CD/I}$, l'absorption de la solution comprenant les deux espèces CDs et invité sera plus forte que celle de l'invité seul. Alors qu'elle sera plus faible s'il lui est inférieur. Les calculs sont traités sur Excel à l'aide d'un algorithme adéquat (Newton–Raphson) développé par Landy et al. (2000).

Dans notre travail, nous avons utilisé la méthode directe pour déterminer la stœchiométrie des complexes d'inclusion SBE- β -CD/Quer. La molécule titrée (quercétine) est maintenue à une concentration fixe de 0,1 mM alors que la CD (molécule titrante) est ajoutée à des concentrations variées (0,1 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 et 1 mM). Le mélange est mis à l'équilibre pour 1 h à 25 °C. L'évolution de l'absorbance de la quercétine est suivie à 25 °C avec un spectromètre Perkin Elmer Lambda 2S entre 310 et 500 nm. La dérivée de l'aire sous la courbe a été calculée dans la zone ente 380 et 370 nm, où les spectres ne se chevauchent pas. À l'aide d'un traitement numérique utilisé si les complexes possèdent une stœchiométrie 1:1, la K_f est alors obtenue (Landy et al., 2000).

Principe de la méthode de compétition

L'étude du phénomène d'inclusion entre une molécule hôte et une molécule invitée peut être réalisée par la méthode de compétition (Landy et al., 2000). Elle consiste à suivre l'absorbance d'une molécule compétitrice (Co) en présence de différentes concentrations de CDs et puis avec l'ajout de l'invité. L'application de cette méthode conduit à l'obtention des stabilités entre les CDs et les invités sous forme de K_f.

Tout d'abord, le complexe d'inclusion CD/Co est caractérisé par la méthode de titration directe en variant la concentration de CD. Ensuite, une certaine quantité de la molécule invitée est ajoutée à une solution contenant la CD et le Co. L'addition de la CD aboutit à une diminution de l'absorbance du Co vu qu'il y a eu formation de complexe d'inclusion CD/Co. Par la suite, l'ajout de l'invité à la solution de CD/Co conduit par effet de compétition à l'expulsion de la molécule de Co vers l'extérieur de la cavité de la CD et donc son remplacement par la molécule invitée (**Figure 37**). Ceci résulte d'une diminution de la quantité de CD disponible pour le Co et donc à l'augmentation de son absorbance.



Figure 37 : Principe de la méthode de compétition.

Le compétiteur le plus couramment utilisé en UV-visible, pour caractériser les complexes d'inclusion CD/I, est l'indicateur MO puisqu'il présente une forte différence entre l'absorptivité de sa forme libre et de sa forme complexée (Decock et al, 2006 ; Landy et al, 2000). L'absorbance de la solution MO+CD+I obtenue sera d'autant plus élevée et plus proche de la courbe de MO que la quantité de substrat introduite sera élevée et que l'affinité CD/I sera forte.

Dans notre cas, nous avons observé les variations spectrales successives du MO sous l'addition de différents types de CDs (α -CD, β -CD et HP- β -CD) puis du nérolidol. Dans une solution aqueuse de MO à 0,1 mM, les solutions mères de CDs sont préparées à des concentrations finales de 0,5 mM pour la β -CD et de 0,2 mM pour l' α - CD et l'HP- β -CD. Des solutions diluées de β -CD +MO sont ensuite préparées pour obtenir des solutions de 0,5 ; 0,25 et 0,1 mM. Les solutions diluées d' α -CD et d'HP- β -CD sont obtenues à des concentrations de 0,2 ; 0,1 et 0,05 mM. Le nérolidol est ajouté à une concentration de 0,1 mM dans un volume approprié de la solution de (MO + CD). Les solutions obtenues sont mises à l'équilibre à 25 °C. L'enregistrement des spectres est réalisé avec un spectromètre Perkin Elmer Lambda 2S entre 520 et 530 nm, ce qui correspond à la zone optimale où le MO présente une différence d'absorption significative entre la forme libre et complexée, à 25 °C.

Pour calculer les K_f des complexes d'inclusion CD/Ner, la procédure suivie est décrite ci-dessous :

La K_f du complexe d'inclusion CD/MO est déterminée par la méthode de titration directe en suivant l'absorbance du MO suite à l'addition des solutions de CD. L'absorbance mesurée est définie par l'équation (Eq.7). Cette relation permet de calculer la concentration de [CD/MO] et par la suite la K_f du complexe d'inclusion CD/MO.

La connaissance de cette K_f et l'enregistrement préalable des spectres des solutions MO, MO+CD et MO+CD+I permettent alors la détermination de la K_f des complexes CD/I. Cette dernière est obtenue par la combinaison de deux algorithmes.

Le premier algorithme permet de calculer les concentrations de chacune des espèces à l'équilibre à partir d'une valeur postulée de K_f du complexe CD/I. Le deuxième consiste à calculer l'absorbance théorique à partir des concentrations précédemment estimées. L'algorithme répète cette procédure en faisant varier la valeur de K_f jusqu'à ce que l'absorbance théorique corresponde à l'absorbance expérimentale.

Etape 1 : l'algorithme postule une valeur de K_r pour le complexe CD/Ner Etape 2 : la concentration [CD/MO]₁ est calculée à partir de l'équation (Eq.6) avec [CD]_D = [CD]_T

Etape 3 : l'algorithme calcule la concentration $[CD/I]_1$ à partir de l'équation (Eq.6) en considérant que $[CD]_D=[CD]_T - [CD/MO]_1$

Etape 4 : l'algorithme calcule la concentration $[CD/MO]_{n+1}$ à partir de l'équation (Eq.6) en considérant que $[CD]_D = [CD]_T - [CD/I]_1$

Etape 5 : l'algorithme lance une comparaison des deux concentrations successives [CD/MO]₁ et [CD/MO]₂

Si $[CD/MO]_2 \neq [CD/MO]_1 \Rightarrow [CD/MO]_1$ prend la valeur de $[CD/MO]_2 \Rightarrow$ la procédure retourne à l'étape 3.

Si $[CD/MO]_2 = [CD/MO]_1 \Rightarrow$ respect de la coexistence des deux équilibres \Rightarrow la procédure passe à l'étape 6.

Etape 6 : l'algorithme calcule l'absorbance théorique de la solution CD+MO+I à partir de la relation (3) sur la base des concentrations obtenues à l'étape 5.

Etape 7 : l'algorithme compare des absorbances théoriques et observées :

Si Abs théorique \neq Abs observée \Rightarrow la valeur postulée pour la valeur de Kf du complexe CD/I n'est pas valable donc une nouvelle valeur est postulée pour la Kf du complexe CD/I et la procédure reprend à l'étape 1. Si Abs théorique = Abs observée \Rightarrow La Kf est égale à la valeur postulée.

Cette méthodologie développée mène à la détermination de valeurs précises et fiables des K_f . En effet, les constantes calculées sont de vraies constantes de stabilité et non pas des constantes apparentes (Landy et al., 2000).

III.2.1.2 RMN

La RMN est menée afin de mettre en évidence l'inclusion du nérolidol dans la CD. Les solutions de β -CD (0,1 mM) et de β -CD/trans-nérolidol ([trans-nérolidol] = 3,28 mM) sont préparées dans l'eau deutérée D₂O à 99,98 %. Vue la faible solubilité du trans-nérolidol, son spectre ¹H RMN n'a pas pu être obtenu. Tous les spectres ¹H RMN sont enregistrés sur des appareils Bruker Avance III spectromètre à 400 MHz à température ambiante (Résolution FID à 0,18Hz/point).

Nous avons également déterminé la structure 3D du complexe d'inclusion CD/Ner par 2D RMN. L'objectif de cette expérience de corrélation dipolaire à deux dimensions est de mettre en valeur la proximité de certains noyaux dans l'espace et de détecter les interactions dipolaires inter- et intramoléculaires entre les protons de la CD et la molécule invitée. Plus la distance entre deux protons est grande plus l'intensité de la corrélation NOE est faible. Les expériences 2D ROESY sont menées à 25 °C avec des temps de mélange de 600 ms durant le spin-lock en utilisant la méthode « States-TPPI ». 64 scans sont enregistrés pour obtenir une meilleure résolution des spectres ROESY.

III.2.1.3 Modélisation moléculaire

Dans le but de mieux comprendre le phénomène de complexation et de visualiser une structure tridimensionnelle du complexe d'inclusion β -CD/Ner, une étude théorique de modélisation moléculaire est employée. Cette méthode consiste à simuler par des traitements informatiques et mathématiques la géométrie et les propriétés des molécules ou de systèmes de molécules. Les méthodes de modélisations comprennent : les méthodes quantiques (MQ), la mécanique moléculaire (MM) et la dynamique moléculaire (DM).

Les MQ sont basées sur le calcul des énergies absolues des électrons et sur la résolution de l'équation de Schrödinger. La complexité de ces méthodes augmente avec le nombre d'électrons, elles ne peuvent donc être appliquées qu'à de petits systèmes (quelques dizaines à quelques centaines d'atomes).

La MM est utilisée pour des molécules de grande taille, telles que les macromolécules biologiques (protéines, acides nucléiques) ou des systèmes comportant un grand nombre de molécules. En effet, elle repose sur le calcul des énergies relatives des atomes (énergie conformationnelle) par établissement d'un champ de forces empiriques.

La DM a pour but d'observer la déformation structurale d'une molécule après apport énergétique et de calculer les mouvements de cette molécule, le plus souvent à partir des énergies de la MM, en appliquant les lois de la mécanique classique. Elle permet de simuler l'évolution des systèmes dans le temps (Lesyng & McCammon, 1993).

Ces méthodes sont souvent utilisées pour déterminer la géométrie et l'énergie d'interaction des complexes d'inclusion. Précisément, par MM, l'approche employée consiste à étudier le comportement des invités durant la complexation en utilisant le système des coordonnées XYZ (Eid et al., 2011; Shi & Ye, 2010).

Dans notre cas, nous avons mené des recherches conformationnelles sur le complexe d'inclusion β -CD/Ner par la méthode de Monte Carlo associée à la MM. La méthode de Monte Carlo consiste à échantillonner de façon aléatoire et plus exhaustive la surface de potentiel définie par le complexe étudié en effectuant des translations et des rotations aléatoires de la molécule invitée selon les trois axes de coordonnées XYZ (Alcaro et al., 2003, 2004 ; Kim et al., 2002). Avant la simulation du complexe, l'invité est optimisé afin d'obtenir la conformation la plus stable de la molécule. Ensuite, la structure de la β -CD est fixée avec les sept oxygènes glycosidiques dans le plan XY et l'axe Z qui passe par le centre de la β -CD. La conformation la plus stable de l'invité est par la suite placée sur l'axe Z, à une certaine distance de la molécule hôte, et peut être orientée soit vers la partie positive de l'axe des Z soit vers la partie négative. En effet, l'orientation de l'invité dépend du groupement fonctionnel qui pénètre dans la β -CD. Enfin, l'invité est déplacé le long de l'axe Z, vers l'intérieur de la cavité de la β -CD pour trouver des conformations de plus en plus stables.

Le logiciel Schrödinger est utilisé dans notre étude avec l'interface graphique Maestro 9.7 et le module de MM Macromodel afin d'obtenir les conformations les plus stables dans lesquelles le nérolidol peut se trouver dans la cavité de la β -CD. Ce logiciel permet de supprimer les conformations dupliquées, de minimiser l'énergie d'une structure ou d'une série de structures, de réaliser des recherches conformationnelles et des simulations de DM ainsi que d'effectuer un traitement implicite de la solvatation (Kimura et al., 2007 ; Lino et al., 2002 ; Pinto et al., 2004). La recherche se fait dans des conditions bien précises et fixées au départ : température constante, milieu gazeux ou en présence de solvant.

Durant les simulations, la structure de la β -CD est maintenue figée avec l'option Freeze Atoms, du menu Substructure. En effet, on a choisi de fixer la structure de la CD puisque qu'on vise à interpréter la capacité d'inclusion et non pas son comportement interne. En plus, le temps nécessaire pour une simulation avec la β -CD libre est très important étant donné le grand nombre de degrés de liberté de cette structure. L'optimisation d'une CD non maintenue rigide conduirait à des minima locaux et non au minimum global, ce qui rend impossible la comparaison des conformations de complexation (la CD se trouvant dans des états énergétiques différents).

La première étape avant la simulation est de construire le cis- et trans-nérolidol et ensuite il sera soumis à une recherche conformationnelle avant de le placer dans la cavité de la CD. Les conditions suivantes sont appliquées :

- Champ de force : MMFs ;

- Milieux aqueux avec une constante diélectrique de 78,0 ;

- Méthode de minimisation : FMNR (conjugate gradient minimization, convergence fixée à 0,05 kJ Å-1 mol-1) avec un maximum d'itérations de 100 ;

- Méthode d'échantillonnage : Mixed torsional/Low mode sampling ;

- 1000 conformations générées.

Suite à cette simulation, le complexe CD/Ner est optimisé. Une recherche conformationnelle est ensuite lancée, à partir de la conformation minimale, et à l'aide de la méthode de Monte Carlo selon les conditions décrites ci-dessous :

- Champ de force : MMFs ;

- Milieux aqueux avec une constante diélectrique de 78,0 ;

Méthode de minimisation : FMNR (conjugate gradient minimization, convergence fixée à 0,01 kJ Å⁻¹ mol⁻¹) avec un maximum d'itérations de 1000 ;

- Méthode d'échantillonnage : Mixed torsional/Low mode sampling ;

- 5000 conformations générées.

III.2.2 Caractérisation des complexes d'inclusion à l'état solide

L'encapsulation moléculaire du nérolidol dans la CD a été caractérisée après lyophilisation et la teneur et l'efficacité d'encapsulation du nérolidol ont été déterminées.

III.2.2.1 Préparation des complexes d'inclusion à l'état solide (freeze-drying)

Le nérolidol (10 mM) est ajouté à des solutions aqueuses d'HP- β -CD de différentes concentrations (10, 25, 50 et 100 mM). Les mélanges CD:Ner de rapport molaire 1:1 ; 2,5:1 ; 5:1 et 10:1 sont soumis à une agitation de 300 rpm, à 25 °C pendant 24 h puis filtrés à l'aide d'un filtre à membrane en acétate de cellulose (0,45 μ m). Les filtrats sont congelés à -80 °C et lyophilisés (-85 °C, 0 Pa) à l'aide d'un Christ Alpha 2-4 LD Freeze dryer (Allemagne) jusqu'à l'élimination complète de l'eau. Le complexe d'inclusion solide est ainsi récupéré sous forme de poudre.

III.2.2.2 Détermination de la teneur en nérolidol et de l'efficacité d'encapsulation

Tout d'abord, 10 mg du complexe lyophilisé sont dissous dans 10 ml d'éthanol. Cela mène à la dissociation du complexe et la libération du contenu en nérolidol.

Ensuite, la quantité de nérolidol présente dans les différentes solutions est déterminée par la méthode de CLHP, décrite dans le paragraphe III.4 (chapitre III).

La teneur en nérolidol et l'efficacité d'encapsulation (EE_{CD}) sont calculées comme suit :

Teneur en nérolidol =
$$\frac{\text{masse de nérolidol (mg)}}{\text{masse du complexe d'inclusion (g)}}$$
 (Eq. 8)

Et
$$EE_{CD} \% = \frac{m_{exp}}{m_t} \times 100 \text{ (Eq.9)}$$

Avec m_{exp} la masse de nérolidol déterminée expérimentalement et m_t est la masse théorique (la masse initiale ajoutée lors de la préparation du complexe d'inclusion).

III.3 Préparation et caractérisation des LCs et du système mixte cyclodextrine-liposomes

III.3.1 Préparation des LCs et DCLs par la méthode d'injection éthanolique

III.3.1.1 Préparation des LCs

Les LCs (témoins ou encapsulant le nérolidol ou la quercétine) sont préparés par la méthode d'injection éthanolique optimisée par Sebaaly et al. (2015). Elle consiste à injecter un volume de 10 ml de la phase organique (solution éthanolique de phospholipides contenants ou non du cholestérol) dans un volume de 20 mL d'eau ultrapure à l'aide d'une seringue en verre (Fortuna optima, GmbH-Allemagne). La vitesse d'injection, égale à 1 mL/min, est contrôlée par une pompe pousse-seringue automatique (fournie par KDS 100, KdScientific, Holliston, USA). Au cours de l'injection, la solution est soumise à une agitation continue avec une vitesse de 400 rpm. La température de préparation doit être fixée au-dessus de la température de transition de chaque type de phospholipide afin de maintenir les lipides dans leur état fluide (25 °C pour le Lipoid E80 et Lipoid S100 et 55 °C pour le Phospholipon 90H). Suite à la formation des liposomes, la solution est maintenue sous agitation à 400 rpm pendant 15 min pour homogénéiser le milieu. Enfin, l'éthanol et une partie de l'eau sont éliminés sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif Rotavapor R-144 (Büchi, Switzerland) à 40 °C. Les liposomes sont stockés à 4 °C. Chaque lot est préparé trois fois.

III.3.1.2 Préparation des complexes d'inclusion dans la phase aqueuse

Les complexes d'inclusion HP- β -CD/Ner et SBE- β -CD/Quer sont préparés en solution aqueuse à différents rapports molaires CD:invité : 1:1 ; 2,5:1 ; 5:1 et 10:1. Les mélanges sont soumis à une agitation de 300 rpm à 25 °C pendant 24 h puis filtrés à travers des filtres d'acétate de cellulose (Sigma-Aldrich, France) de 0,45 μ m. Ils sont conservés à 4 °C pour servir ultérieurement dans la préparation des DCLs.

III.3.1.3 Préparation des DCLs

La formation des DCLs est réalisée comme décrit au-dessus par injection éthanolique ; toutefois la phase aqueuse est constituée de la solution de complexes d'inclusion CD/invité.

III.3.1.4 Formulations liposomiales

III.3.1.4.1 Liposomes encapsulant la quercétine

Trois types de phospholipides ont été utilisés pour la production de LCs témoins ou encapsulant la quercétine : Lipoid E80, Lipoid S100, et Phospholipon 90H. Le DCL a été formé uniquement à partir du phospholipide Lipoid E80. Le cholestérol a été ajouté dans la phase organique à toutes les préparations liposomiales. Toutes les préparations liposomiales sont présentées dans le **Tableau 8**.

Les différentes formulations sont préparées comme suit :

1) des liposomes témoins préparés en absence de la quercétine à partir des trois types de phospholipides et du cholestérol. Les rapports molaires sont : Lipoid E80:Chol (100:98), Lipoid S100:Chol (100:117) et Phospholipon 90H:Chol (100:98).

2) les liposomes Lipoid E80:Chol:Quer de rapport molaire 100:98:20. Les concentrations massiques dans la phase organique du Lipoid E80, du cholestérol et de la quercétine sont de 40, 20 et 3,02 mg/mL, respectivement.

3) les liposomes Lipoid S100:Chol:Quer de rapport molaire 100:117:20. Les concentrations massiques dans la phase organique du Lipoid S100, du cholestérol et de la quercétine sont de 10, 5 et 0,66 mg/mL, respectivement.

4) les liposomes Phospholipon 90H:Chol:Quer de rapport molaire 100:98:20. Les concentrations massiques dans la phase organique du Phospholipon 90H, du cholestérol et de la quercétine sont de 10, 5 et 0,79 mg/mL, respectivement.

5) les liposomes Lipoid E80:Chol:SBE-β-CD de rapport molaire 100:98:190, composés de Lipoid E80 (40 mg/mL) et de cholestérol (20 mg/mL) encapsulant les SBE-β-CD libres (10, 25, 50 et 100 mM) ajoutés à la phase aqueuse ; 6) les liposomes Lipoid E80:Chol:SBE-β-CD/Quer de rapport molaire 100:98:190:38, composés de Lipoid E80 (40 mg/mL) et de cholestérol (20 mg/mL) encapsulant le complexe d'inclusion SBE-β-CD/Quer (à un rapport molaire 5:1) ajoutés à la phase aqueuse.

Tableau 8 : Présentation des formulations liposomiales encapsulant la quercétine.

Formulations	Phase aqueuse	Phase organique	Rapport molaire Lipide/Chol/CD/Quer	
Formulations	Compositions et concentrations	Compositions et concentrations		
Liposomes témoins		Lipoid E80 (40 mg/mL) et cholestérol (20 mg/mL)		
	Eau ultrapure	Lipoid S100 (10 mg/mL) et cholestérol (5 mg/mL)	100:117:0:0	
		Phospholipon 90H (10 mg/mL) et cholestérol (5 mg/mL)	100:98:0:0	
LCs		Lipoid E80 (40 mg/mL), cholestérol (20 mg/mL) et quercétine (3,02 mg/mL)	100:98:0:20	
	Eau ultrapure	Lipoid S100 (10 mg/mL), cholestérol (5 mg/mL) et quercétine (0,66 mg/mL)	100:117:0:20	
		Phospholipon 90H (10 mg/mL), cholestérol (5 mg/mL) et quercétine (0,79 mg/mL)	100:98:0:20	
DCLs	SBE-β-CD (50 mM) /Quer (10 mM)	Lipoid E80 (40 mg/mL) et cholestérol (20 mg/mL)	100:98:190:38	

III.3.1.4.2 Liposomes encapsulant le nérolidol

Les formulations liposomiales encapsulant le nérolidol ont été préparées à partir du phospholipide Lipoid E80 (50 mg/ml) à différents rapports molaires Lipoid E80:Ner. Le nérolidol a été dissous dans la phase organique. Les complexes d'inclusion HP- β -CD/Ner ont été ajoutés à la phase aqueuse pour la formation des DCLs.

Les formulations liposomiales sont :

1) liposomes témoins préparés en absence du nérolidol

2) LCs encapsulant nérolidol où les rapports molaires Lipoid E80:Ner sont de 100:1; 100:2,5; 100:5 et 100:10.

2) les liposomes Lipoid E80:HP- β -CD de rapport molaire 100:30. La concentration massique dans la phase organique du Lipoid E80 est de 50 mg/mL et celle de HP- β -CD libres est de 10 mM dans la phase aqueuse.

Les DCLs préparés à partir de différents rapports molaires CD/Ner sont :

3) les liposomes Lipoid E80:HP- β -CD/Ner de rapport molaire 100:30:30. La concentration massique dans la phase organique du Lipoid E80 est de 50 mg/mL. Dans la phase aqueuse, le complexe HP- β -CD/Ner est préparé à un rapport molaire égal à 1:1.

4) les liposomes Lipoid E80:HP- β -CD/Ner de rapport molaire 100:75:30. La concentration massique dans la phase organique du Lipoid E80 est de 50 mg/mL. Dans la phase aqueuse, le complexe HP- β -CD/Ner est préparé à un rapport molaire égal à 2,5:1.

5) les liposomes Lipoid E80:HP- β -CD/Ner de rapport molaire 100:150:30. La concentration massique dans la phase organique du Lipoid E80 est de 50 mg/mL. Dans la phase aqueuse, le complexe HP- β -CD/Ner est préparé à un rapport molaire égal à 5:1.

6) les liposomes Lipoid E80:HP-β-CD/Ner de rapport molaire 100:303:30. La concentration massique dans la phase organique du Lipoid E80 est de 50 mg/mL. Dans la phase aqueuse, le complexe HP-β-CD/Ner est préparé à un rapport molaire égal à 10:1.

Tableau 9 : Presentation des formulations encapsulant le nerolidol.
--

Formulations	Phase aqueuse		Phase organique	Rapport molaire Lipide/CD/Ner	
	Compositions et concentrations		Compositions et concentrations		
Liposomes témoins			Lipoid E80 (50 mg/mL)	100	
LCs	Eau ultrapure		Lipoid E80 (50 mg/mL) et nérolidol (0,15 mg/mL)	100:0:1	
			Lipoid E80 (50 mg/mL) et nérolidol (0,38 mg/mL)	100:0:2,5	
			Lipoid E80 (50 mg/mL) et nérolidol (0,75 mg/mL)	100:0:5	
			Lipoid E80 (50 mg/mL) et nérolidol (1,5 mg/mL)	100:0:10	
DCLs	HP-β-CD (10 mM)	Nérolidol (10 mM)		100:30:30	
	HP-β-CD (25 mM)		Lipoid E80 (50 mg/mL)	100:75:30	
	HP-β-CD (50 mM)			100:150:30	
	HP-β-CD (100 mM)			100:303:30	

III.4 Mise au point de la méthode chromatographique pour le dosage du nérolidol et de la quercétine

Afin de doser le nérolidol ou la quercétine présentes dans les différentes formulations liposomiales, la chromatographie en phase liquide à haute performance (CHLP) est utilisée et les paramètres chromatographiques sont optimisés.

III.4.1 Optimisation des paramètres de détection et de quantification

La CLHP utilisée est une Hitachi LaChrom Elite® (pompe L-2130, injecteur automatique L-2200) couplée à un détecteur UV à barrette de diodes (DAD) (L-2455). Les analyses sont menées en mode isocratique à l'aide d'une colonne Supelco C18 (15 cm x 4.6 mm, 5 μ m) pour le nérolidol et d'une colonne Zorbax Eclipse XDB C18 Agilent (15 cm x 4.6 mm, 5 μ m) pour la quercétine. La phase mobile pour la détection du nérolidol est constituée d'un mélange méthanol:eau (75:25 v/v) et celle de la quercétine du mélange méthanol:eau (70:30 v/v). Le volume injecté à travers la boucle d'injection est fixé à 20 μ L. Le débit est de 1 mL/min et la longueur d'onde est de 212 nm et de 256 nm pour le nérolidol et la quercétine, respectivement. L'étalon interne utilisé est le thymol pour la quantification du nérolidol et l'anéthole pour celle de la quercétine.

III.4.1.1 Préparation des solutions mères et dilutions du nérolidol

Des solutions mères de nérolidol et de thymol à une concentration de 1 mg/mL sont préparées dans du méthanol. Pour la préparation de la gamme d'étalonnage du nérolidol, des prélèvements de la solution mère sont dilués dans le méthanol afin d'obtenir une gamme d'étalonnage de concentrations allant de 1 à 250 μ g/mL. Une solution fille de thymol est préparée à partir de la solution mère (1 mg/mL) dans du méthanol pour obtenir une concentration de 100 μ g/mL.

III.4.1.2 Préparation des solutions mères et dilutions de la quercétine

La solution mère est préparée dans du méthanol (1 mg/mL). Ensuite, plusieurs dilutions sont faites afin d'obtenir une gamme de concentrations entre 1 et 100 μ g/mL. La solution d'étalon interne de l'anéthole de concentration de 10 μ g/mL est également préparée dans le méthanol à partir d'une solution mère de 1 mg/mL.

III.4.1.3 Méthode de quantification

La quantité du nérolidol et de la quercétine dans les différentes formulations est déterminée suite à un traitement adéquat des échantillons. Un aliquot de 100 μ L de chaque solution de la gamme étalon ou des différents échantillons (complexe d'inclusion, LCs ou DCLs) sont ajoutés à 100 μ L d'étalon interne (thymol à 100 μ g/mL ou anéthole à 10 μ g/mL) et ensuite à 200 μ L de méthanol. Puis, les mélanges subissent une sonication pendant 10 min à froid pour garantir la solubilisation complète des systèmes et la libération de leur contenu. Cette étape est suivie d'une centrifugation à 15000 rpm pendant 15 min à 4 °C. 300 μ L sont prélevés du surnageant dont 20 μ L sont analysés par CLHP. Le dosage des constituants est répété trois fois pour chaque échantillon.

III.5 Caractérisation des LCs et DCLs

III.5.1 Mesure de la taille par granulomètre à diffraction laser

La taille et la distribution de taille de toutes les formulations liposomiales sont déterminées par la méthode de diffraction laser. L'appareil utilisé est un Partica LA-950V2 Laser Diffraction Particle Size Distribution Analyzer (Horiba, Japon). Il mesure la distribution granulométrique des particules en mesurant la variation angulaire de l'intensité de la lumière diffusée lorsqu'un faisceau laser traverse un échantillon de particules dispersées. 2 mL de chaque suspension liposomiale ont été analysés par granulométrie à diffraction laser. L'analyseur offre une large gamme de mesure entre 10 nm et 3000 µm.

III.5.2 Détermination de l'efficacité d'encapsulation

L'efficacité d'encapsulation du nérolidol ou de la quercétine dans les LCs ou DCLs est déterminée par la méthode de CLHP décrite dans le paragraphe III.4 (chapitre III). Des prélèvements sont effectués à partir des suspensions liposomiales pour déterminer la concentration totale du nérolidol ([Ner]_{total}) ou de la quercétine ([Quer]_{total}). Pour obtenir les concentrations des molécules libres ([Ner]_{libre} et [Quer]_{libre}), les suspensions liposomiales sont soumises à une centrifugation à 15 000 rpm pendant 1 h et à 4 °C en utilisant des filtres vivaspin (Vivaspin 500 centrifugal concentrators, Sartorius Stedim Biotech, Allemagne, MWCO = 10 kDa). Le filtrat est ainsi récupéré et la concentration des molécules libres est ainsi déterminée par CLHP.

L'efficacité d'encapsulation des molécules étudiées dans les LCs et DCLs est calculée par l'équation suivante :

$$EE \% = \frac{[composé actif]_{liposome}}{[composé actif]_{total}} \times 100 (Eq.10)$$

avec $[\text{composé actif}]_{\text{liposome}} = [\text{composé actif}]_{\text{total}} - [\text{composé actif}]_{\text{libre}};$ le composé actif étant le nérolidol ou la quercétine.

III.5.3 Détermination du rendement d'encapsulation

Le rendement d'encapsulation (RE) du nérolidol et de la quercétine dans les LCs est calculé selon l'équation suivante :

RE % =
$$\frac{m_{\text{liposome}}}{m_{\text{théorique}}} \times 100 \text{ (Eq.11)}$$

Avec $m_{liposome}$ la masse du nérolidol ou de la quercétine incorporée dans les liposomes ($m_{liposome} = m_{total} - m_{libre}$) et la $m_{théorique}$ est la masse initiale de la molécule active ajoutée à la phase organique lors de la préparation des liposomes.

Le RE du nérolidol et de la quercétine dans les DCLs est déterminé comme suit :

$$RE_{DCL} \% = \frac{m_{DCL}}{m_{théorique}} \times 100 \text{ (Eq.12)}$$

Avec m_{DCL} la masse du nérolidol ou de la quercétine incorporée dans les DCLs et la $m_{théorique}$ est la masse initiale ajoutée à la phase aqueuse sous forme de complexe d'inclusion CD/invité lors de la préparation du complexe.

III.5.4 Mesure de la rigidité par microscopie à force atomique

L'AFM est utilisée pour déterminer la rigidité des liposomes témoins formés à partir de trois types de phospholipides (Lipoid E80, Lipoid S100 et Phospholipon 90H) avant et après 48 h d'irradiation sous lampe UVC (rayons à courte longueur d'onde, λ = 270 nm). Les échantillons sont dilués dans l'eau ultrapure (les liposomes formés de Lipoid E80 et Lipoid S100 sont dilués 30 fois et ceux formés par le Phospholipon 90H sont dilués 50 fois). 6 µL de chaque échantillon sont déposés sur une surface mica (9 mm de diamètre et de 0,1 mm d'épaisseur) et sont laissés sécher pendant 20 min à l'air libre avant l'analyse. Toutes les images sont prises avec le mode contact en utilisant une sonde « Pyrex-Nitride probe, PNP-TR » ayant une constante de raideur de 0,08 N/m et une fréquence de résonance de 17 kHz (NanoWord Innovative Technologies, Nano And More, Paris). Les pointes utilisées sont pyramidales ayant

un rayon de courbure inférieur à 10 nm. Les images sont enregistrées avec des dimensions de 5 μ m x 5 μ m et une vitesse d'analyse de 3 Hz avec un appareil AFM de type Agilent 5420 (Keysight Technologies, Californie, Etats-Unis). Les images sont ensuite analysées avec le logiciel PicoView (Keysight Technologies, Californie, Etats-Unis). La rigidité des liposomes est déterminée en calculant le module d'élasticité d'Young (E) (paramètre proportionnel à la rigidité). Avec le mode spectroscopie de force dans le logiciel PicoView, 100 courbes de forces d'interaction pointe-vésicules sont obtenues. À partir de ces courbes, le module d'Young est déduit selon l'équation suivante :

$$E = \frac{4 k^2 (1-v)}{3 \tan \alpha^2} \times 10^6 \text{ KPa (Eq.13)}$$

Avec v le coefficient de Poisson de la vésicule (fixé à 0,5), k la pente de la partie linéaire de la courbe de force et α le demi-angle de la pointe.

III.6 Effet de l'encapsulation sur les propriétés physicochimique du nérolidol et de la quercétine

III.6.1 Etude de libération du nérolidol in vitro

La cinétique de libération du nérolidol à partir des CDs, LCs et DCLs est évaluée à température ambiante (25 °C) par dialyse. Pour les LCs et DCLs, les différentes formulations liposomiales sont soumises à une centrifugation (15000 rpm pour 1 h à 4 °C) afin d'éliminer les molécules libres. Le culot est ensuite récupéré et dissous dans un volume de 5 mL d'eau ultrapure. Les filtrats de CD/Ner préparés comme décrit dans le paragraphe III.3.1.2 (chapitre III) et le culot des formulations liposomiales ont été ensuite placés dans les membranes de dialyse. Ces dernières (limite d'exclusion ''MWCO'' de 8-10 KDa pour les LCs et DCLs et 0,5-1 kDa pour les CDs) sont traitées avant le processus de dialyse comme suit : elles sont trempées dans l'eau distillée pour 30 min à température ambiante pour éliminer la glycérine.

Les boudins de dialyse contenant les complexes d'inclusions et les suspensions liposomiales sont placés dans un bécher de 500 mL eau ultrapure. Le processus de dialyse est accéléré en agitant le liquide de contre-dialyse avec un barreau magnétique à une vitesse de 200 rpm et à 25 °C. À des intervalles de temps bien précis (0, 2, 8, 24, 48, 56, 72,143, 166 h), un

volume de 100 μ L de chaque échantillon est prélevé de l'intérieur de la membrane et remplacé par le même volume d'eau et la concentration du nérolidol est ainsi déterminée par CHLP. Le taux de libération du nérolidol à partir des CDs, LCs ou DCLs est calculé selon l'équation suivante :

Taux du nérolidol libéré (%) =
$$\frac{[\text{Ner}]_{t_0} - [\text{Ner}]_t}{[\text{Ner}]_{t_0}} \times 100 \text{ (Eq. 14)}$$

avec $[Ner]_{t_0}$ et $[Ner]_t$ les concentrations du nérolidol présentes initialement ou après un temps t à l'intérieur de la membrane de dialyse, respectivement.

III.6.2 Etude de la photostabilité des composés actifs sous forme libres et encapsulés

III.6.2.1 Photostabilité du nérolidol

La photostabilité du nérolidol libre (pure ou dans l'huile de Cabreuva) ou encapsulé dans les CDs, LCs ou DCLs est menée au cours du temps après exposition des solutions à un rayonnement UVB ($\lambda = 310$ nm).

Différentes solutions aqueuses de HP- β -CD (0,5 ; 1 et 10 mM) et des solutions aqueuses de α -, β - et SBE- β -CD (à 1 mM) ont été préparées en présence du nérolidol (0,1 mM). L'huile de Cabreuva ([trans-nérolidol] = 0,322 mM) a été également ajoutée à une solution aqueuse contenant l'HP- β -CD à 1 mM. Les solutions sont ensuite mises à l'équilibre pour 24 h à 25 °C pour permettre la formation des complexes d'inclusion. Pour tester la photostabilité du nérolidol libre, des solutions aqueuses de nérolidol pur ou dans l'huile de Cabreuva ont été préparées à une concentration de 0,1 et 0,322 mM, respectivement. Des aliquotes de chaque solution ont été ainsi placés dans un réacteur à quartz pour les expériences de photodégradation.

De même, des solutions aqueuses de nérolidol libre (0,045 mM) et des suspensions liposomiales (LCs et DCLs) encapsulant le nérolidol (158 µg/mL) ont été transférées dans le photoréacteur.

L'irradiation est réalisée à l'aide d'un appareil Multirays (Heliosquartz) équipé de 10 lampes UVB (15 W chacune). 100 μ L de chaque solution sont prélevés à des intervalles de temps différents (0, 60, 120, 180, 240, 330, 390 et 450 min) et la quantité de nérolidol restante après irradiation a été déterminée par CLHP selon la méthode décrite dans le paragraphe III.4 (chapitre 3).

III.6.2.2 Photostabilité de la quercétine

La photodégradation de la quercétine est suivie sous forme libre et suite à son encapsulation dans les CDs et les liposomes.

Des solutions aqueuses de la quercétine libre (5 μ g/mL), les complexes d'inclusion SBE- β -CD/Quer au rapport molaire CD:Quer 5:1 (préparés précédemment) ainsi que les différents types de LCs (Lipoid E80, Lipoid S100 et Phospholipon 90H) et les DCLs encapsulant la quercétine ont été transférés dans des cuvettes en quartz et exposés au rayonnement UVC (λ = 254 nm) pendant 72 h. Des prélèvements sont effectués à différents intervalles de temps (0; 0,5; 1; 2; 3; 4; 6; 8; 24; 48; 72 h).

La quantité du nérolidol ou de la quercétine restante dans la solution après irradiation est calculée comme suit :

Composé actif restant (%) =
$$\frac{C_t}{C_i} \times 100$$
 (Eq.15)

Avec C_t et C_i les concentrations du nérolidol ou de la quercétine présentes dans la solution après et avant irradiation, respectivement.

La constante de dégradation (K, min⁻¹) est obtenue à partir des profils de photodégradation du nérolidol suivant l'équation :

Ln [composé actif] = -Kt+b (Eq.16)

III.6.3 Etude de la stabilité physico-chimique des liposomes encapsulant le nérolidol et la quercétine

Les liposomes témoins et encapsulant la quercétine ou le nérolidol ont été stockés à 4 °C pendant 1 an. La stabilité de stockage a été évaluée en comparant la taille des vésicules et le pourcentage des composes actifs restant en solution après 1 an de stockage. À noter que pour le nérolidol la quantité incorporée ($[Ner]_{1an} = [Ner]_{total}$ - $[Ner]_{libre}$) restante dans les vésicules a été déterminée après stockage. De ce fait, pour obtenir les concentrations des molécules libres ($[Ner]_{libre}$), les suspensions liposomiales ont été soumises à une centrifugation à 15 000 rpm pendant 1 h et à 4 °C en utilisant des filtres vivaspin.

Le pourcentage du composé actif restant est déterminé par CLHP suivant l'équation :

Composé actif restant (%) =
$$\frac{C_{1 an}}{C_{t_0}} \times 100$$
 (Eq.17)

Avec $C_{1 an}$ et C_{t_0} concentration en quercétine restante après 1 an et lors de la préparation, respectivement. $C_{1 an}$ et C_{t_0} concentrations en nérolidol dans les vésicules après 1 an et lors de la préparation, respectivement.

III.6.4 Etude de la stabilité de la quercétine libre ou encapsulée dans les milieux biologiques

La stabilité de la quercétine libre ou encapsulée dans les CDs, LCs et DCLs est déterminée dans deux milieux biologiques gastrique et intestinal en déterminant le pourcentage de quercétine restant au cours du temps.

Le milieu gastrique est préparé selon la Pharmacopée Américaine (USP 37, NF 32, 2014) comme suit : 2 g de NaCl et 3,2 g de la pepsine sont dissous dans 7 mL HCl, la solution est ensuite complétée jusqu'à 1 L d'eau ayant un pH acide de 1,2.

D'autre part, la préparation du milieu intestinal est également réalisée selon la Pharmacopée Américaine avec quelques modifications. 6,8 g de KH₂PO₄ sont dissous dans 250 mL eau suivie par l'ajout de 77 mL NaOH (0,2 N) et 500 mL eau. Ensuite, 10 g de pancréatine (mélange d'enzymes : amylase, lipase, et protéase) sont ajoutés au mélange et le pH est ajusté à 6,8 à l'aide d'une solution de NaOH (0,2 N) ou HCl (0,2 N). L'acide taurocholique est ajouté à la solution à une concentration de 6 mM pour mimer les acides biliaires. La solution est complétée jusqu'à 1 L d'eau.

Pour réaliser les expériences de stabilité de la quercétine libre, une solution mère est préparée dans l'acétonitrile à 1 mg/mL puis diluée dans le milieu biologique (gastrique et intestinal) afin d'obtenir une concentration finale en quercétine de $10 \mu g/mL$.

Pour la stabilité de la quercétine sous forme de complexe d'inclusion SBE- β -CD/Quer : un aliquote de 500 μ L est prélevé de la solution des complexes d'inclusion SBE- β -CD/Quer (rapport molaire CD:Quer 5:1) et ajouté à 4,5 mL du milieu biologique.

Quant à la stabilité dans les formulations liposomiales (LCs : Lipoid E80:Chol:Quer, Lipoid S100:Chol:Quer, Phospholipon 90H:Chol:Quer et DCLs) : Tout d'abord, les liposomes sont soumis à une centrifugation à 5000 rpm pour 10 min. Ensuite, 500 μ L du culot obtenu sont transférés à 4,5 mL du milieu gastrique ou intestinal.

La stabilité de la quercétine dans le milieu gastrique est suivie pendant 4 h alors que celle dans le milieu intestinal pour 6 h. À chaque intervalle de temps t, 100 μ L de chaque solution sont prélevés et la quantité de quercétine présente en solution est déterminée par CLHP.

Le pourcentage de la quercétine restant est calculé suivant l'équation :

Quercétine restante (%) =
$$\frac{[Quer]_t}{[Quer]_{t_0}} \times 100 (Eq.18)$$

avec $[Quer]_{t_0}$ et $[Quer]_t$ les concentrations de quercétine présentes initialement ou après un temps t en solution, respectivement.

III.6.5 Etude de l'activité antioxydante

L'effet de l'encapsulation par les CDs (α -CD, β -CD, γ -CD, HP- β -CD, RAMEB, CRYSMEB et SBE- β -CD) sur l'activité antioxydante du nérolidol et de la quercétine a été mené par piégeage du radical neutre DPPH[•]. Cette méthode décrite par Brand-Williams et al. (1995) est adaptée dans notre travail aux molécules libres ou leurs complexes d'inclusion avec quelques modifications. Elle consiste à suivre la diminution de l'absorbance du DPPH[•] en présence de la molécule antioxydante par spectrophotométrie à une longueur d'onde entre 515 et 518 nm. La solution violette de départ se transforme alors en une solution jaunâtre due à la réduction du DPPH• (**Figure 38**).



Figure 38 : La réaction de piégeage du DPPH[•] (Boligon, 2014).

Vue la très faible solubilité de ces deux molécules dans les phases aqueuses, nous avons préparé des solutions aqueuses diluées en composés actifs en présence ou absence de 10 mM de CD (1 mg de nérolidol ou quercétine dans 50 mL d'eau ou de la solution de CD). Les solutions sont équilibrées à 25 °C pour permettre la formation des complexes d'inclusion. Un aliquote de 2 ml de chaque solution (les molécules libres ou les complexes d'inclusions) est ensuite mélangé avec 2 ml d'une solution éthanolique de DPPH[•]. La solution de DPPH[•] est préparée au moins 2h à l'avance à une concentration de 100 μ M dans l'éthanol pour assurer la solubilisation complète du radical. Elle est ultérieurement stockée pour 4 à 5 jours à l'abri de la

lumière. Les mélanges sont mis en agitation à 25 °C et à l'obscurité pendant 48 h pour le Nérolidol et pendant 2 h pour la quercétine. L'absorbance est ensuite enregistrée à 517 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-visible (Perkin Elmer Lambda 2S, Allemagne). L'activité antioxydante (AA%) est calculée selon la relation suivante :

AA % =
$$\left(1 - \frac{Abs_s}{Abs_0}\right) \times 100$$
 (Eq.19)

Avec Abs_s et Abs₀ : les absorbances de la solution à tester et du contrôle, respectivement.

III.7 Analyse statistique

Les différences significatives entre les caractéristiques de différentes formulations liposomiales ont été évaluées par le t-test (independent samples t-test). P<0,05 correspond au résultat statistiquement significatif

Partig 3 : Résultats et Discussion

Partie 3. Résultats et discussion Chapitre IV. Résultats et discussion

IV. Résultats et discussion

Dans ce chapitre, nous présenterons les résultats obtenus dans le travail de thèse et nous les discuterons en regard à la littérature. Nous commencerons tout d'abord par la caractérisation des complexes d'inclusion CD/Ner (Azzi et al., 2017) et CD/Quer en solution et à l'état solide. Nous présentons ensuite l'effet de la composition lipidique sur la taille, l'efficacité d'encapsulation, le rendement, la stabilité physicochimique et sur la rigidité membranaire de liposomes témoins et encapsulant la quercétine (Azzi et al., 2017 ; soumis). Par la suite, la formulation liposomiale optimale a été utilisée pour l'encapsulation du nérolidol dans les LCs, qui a été appliquée pour la première fois dans ce travail (Azzi et al., 2017 ; révisé). Les DCLs encapsulant le nérolidol et la quercétine ont été aussi préparés afin d'augmenter la stabilité des vésicules conventionnels. Nous terminerons le chapitre par la présentation des caractéristiques physico-chimiques, de la cinétique de libération du nérolidol à partir des LCs et DCLs, de l'étude de la stabilité physicochimique, de la photostabilité et de la stabilité de la quercétine dans les milieux biologiques. Enfin, l'activité antioxydante des deux composés sera évaluée sous leur forme libre et encapsulée.

IV.1 Etude du phénomène d'inclusion des composés actifs dans les CDs

IV.1.1 Caractérisation analytique des complexes d'inclusion en solution

IV.1.1.1 Détermination des constantes de formation (Kf)

IV.1.1.1.1 Etude de phase de solubilité

La capacité des CDs (natives : α -CD, β -CD et γ -CD ou modifiées : HP- β -CD, CRYSMEB, RAMEB, SBE- β -CD) à solubiliser le nérolidol (isomères cis et trans et le mélange racémique) et la quercétine a été évaluée par des études de phase de solubilité selon la méthode décrite par Higuchi et Connors (Higuchi & Connors, 1965).

La concentration totale solubilisée des invités dans les solutions de CDs a été déterminée par la méthode CLHP optimisée pour le nérolidol et par spectroscopie UV-visible pour la quercétine. Les profils de phase de solubilité ont été établis en traçant la solubilité apparente du nérolidol (**Figure 39**) et de la quercétine (**Figure 40**) en fonction de la concentration en CD. La solubilité intrinsèque (S_0) du cis et trans-nérolidol dans l'eau a été trouvée de 0,0248 et 0,0346 mM, respectivement. Celle de la quercétine a été trouvée de 0,02 mM, ce qui est tout à fait en corrélation avec la littérature (Pralhad & Rajendrakumar, 2004; Sri et al., 2007).

À la vue des profils de phase de solubilité obtenus (**Figure 39**), nous pouvons remarquer que la solubilité des composés augmente d'une façon linéaire avec la concentration en CD. Par exemple, une augmentation de la solubilité de ~50, 80 et 12 fois est observée pour les isomères cis-nérolidol (1,28 mM) et trans-nérolidol (2,6 mM) (**Figure 39a-c**) et la quercétine (0,24 mM) (**Figure 40**), respectivement, en présence de 10 mM de HP- β -CD.



Figure 39 : Profils de solubilité des isomères cis (a) et trans-nérolidol (b) et de leur mélange racémique (c). Ils représentent la concentration en molécule invitée solubilisée en fonction de la concentration en CD (les expériences de phase de solubilité ont été réalisées deux fois).



Figure 40 : Diagramme de solubilité de la quercétine.

Cette linéarité indique que toutes les courbes de solubilité appartiennent au profil de type A_L , ce qui signifie la formation de complexes d'inclusion solubles. Toutefois, des profils de type B_s ont été obtenus pour les complexes d'inclusion β -CD et γ -CD/Ner à des concentrations supérieures à 1 mM (les courbes de solubilité présentées sont audessous de cette concentration). Ceci est dû à la faible solubilité aqueuse de la β -CD et du nérolidol. En plus, la substitution des molécules d'eau dans la cavité large de la γ -CD par le nérolidol est peu favorable vue la petite taille de cette molécule qui empêche son inclusion dans la CD. Ceci aboutit à l'agrégation des complexes d'inclusion CD/Ner et parfois à la formation des structures micellaires (Del Valle, 2004; Messner et al., 2010; Szejtli, 1997).

En outre, à des concentrations supérieures à 5 mM de SBE- β -CD, la courbe de solubilité de la quercétine n'est plus linéaire, ce qui suggère la formation d'agrégats ou de complexes d'inclusion de stœchiométrie supérieure à 1:1 (2:1 ou 1:2). Par conséquent, le diagramme de solubilité de la quercétine est représenté à des concentrations inferieures à 5 mM (**Figure 40**).

Une pente inférieure à l'unité est obtenue pour tous les profils A_L et pour la portion linéaire des profils de type B_s , ce qui confirme la formation des complexes de stœchiométrie 1:1 (CD/Ner et CD/Quer) (Thorsteinn Loftsson & Duchêne, 2007).

D'autre part, les K_f ont été calculées à partir de la valeur de la pente des profils A_L et de la portion linéaire des profils B conformément à l'équation 3 (Chapitre 2, paragraphe II.3.5.2.2). Tous les résultats sont présentés dans le **Tableau 10**.

Tableau 10 : Valeurs de K_f (M⁻¹), gain de solubilité S_t/S_0 et CE obtenues à partir des diagrammes de phase de solubilité.

		α-CD	β-	γ-CD	HP-β-	RAMEB	CRYSMEB	SBE-β-
			CD		CD			CD
cis- nérolidol	K _f (M ⁻¹)	81	769	1866	5540	8149	8787	9240
	St/So	1,85	1,49	2,76	51,53	72,62	72,77	80,20
	CE	0,002	0,019	0,046	0,137	0,202	0,217	0,229
tranc_	K _f (M ⁻¹)	619	1233	752	9515	15577	14036	13264
nérolidol	St/So	8,80	1,80	1,68	75,37	104,40	98,80	94,66
	CE	0,021	0,043	0,026	0,328	0,537	0,484	0,457
nérolidol	$K_{f}(M^{-1})$	418	1238	1435	10365	19450	15412	17768
	St/So	6,12	2,46	2,96	68,91	95,93	87,61	93,67
	CE	0,0233	0,069	0,080	0,578	1,084	0,859	0,990
quercétine	Kf (M ⁻¹)	44	117	297	1146	1177	294	5335
	St/So	1,45	2,17	4,13	11,73	13,55	4,26	123,47
	CE	0,0008	0,002	0,006	0,023	0,024	0,006	0,107

* S_t et S_0 sont les solubilités de l'invité dans une solution de 10 mM de CD (à l'exception de la β -CD et la γ -CD ou S_t de nérolidol est calculée à partir de 1 mM CD) et dans l'eau, respectivement.

Premièrement, nous pouvons remarquer d'après le **Tableau 10** que les valeurs de K_f du trans-nérolidol sont supérieures à celles du cis-nérolidol. Ceci peut être attribué à la différence dans l'orientation spatiale de ces isomères. En effet, les isomères trans adoptent une conformation linéaire, réduisant ainsi l'encombrement stérique et aboutissant à la formation de complexes d'inclusions plus stables (le trans-nérolidol s'enfonce plus profondément dans la cavité de la CD que le cis-nérolidol). Concernant les isomères cis, la présence de groupes prioritaires du même côté empêche la rotation de la molécule et donc cause une gêne stérique. Néanmoins, une exception est observée pour la γ -CD, où l'affinité de γ -CD envers le cis-nérolidol ceci peut être expliqué par la plus grande

cavité de cette CD. Des résultats similaires ont été obtenus pour le cis- et trans-o-cimène ainsi que pour les isomères du citral (Kfoury et al., 2015; Rungsardthong Ruktanonchai et al., 2011). À notre connaissance, il n'y a pas de données dans la littérature pour les études de phase de solubilité des complexes CD/Ner.

Deuxièmement, l'affinité des CDs vis-à-vis de la guercétine suit la hiérarchie suivante : K_f (SBE- β -CD/Quer) = 5335 M⁻¹ > K_f (RAMEB/Quer) = 1177 M⁻¹ > K_f (HP- β -CD/Ouer) = 1146 $M^{-1} > K_f (\gamma - CD/Ouer) = 297 M^{-1} \approx K_f (CRYSMEB/Ouer) = 294 M^{-1} > K_f (\beta - CD/Ouer) = 294 M^{-1} > K_f (\beta - CD/Ouer) = 297 M^{-1} \approx K_f (\gamma - CD/Ouer) = 294 M^{-1} \approx K_f (\gamma - CD/Ouer) = 297 M^{-1} \approx K_f (\gamma - CD/Ouer) = 294 M^{-1} \approx K_f ($ CD/Quer) = 117 $M^{-1} > K_f (\alpha$ -CD/Quer) = 44 M^{-1} . Nous pouvons constater que l'interaction entre la quercétine et la SBE-β-CD est la meilleure par rapport aux autres CDs. Cela peut être expliqué par le fait que la SBE-β-CD est hautement soluble dans l'eau et que la présence des chaînes butyle augmente l'hydrophobicité de sa cavité, résultant alors d'une meilleure complexation avec des invités hydrophobes. La complexation de la quercétine avec la β-CD et la HP-β-CD est bien étudiée dans la littérature, toutefois les valeurs de Kf obtenues sont souvent divergentes (Alvarez-Parrilla et al., 2005; Borghetti et al., 2009; Calabrò et al., 2004 ; Dias et al., 2008 ; Jullian et al., 2007 ; Lucas-Abellán et al., 2008 ; Pralhad & Rajendrakumar, 2004 ; Sri et al., 2007). Nos résultats sont cohérents avec ceux obtenus par Calabro et al. (2004) pour la β-CD et avec Lucas-Abellan et al. (2008) pour l'HP-β-CD. De même, des études menées avec l'α, la γ et la SBE-β-CD (Calabrò et al., 2004; Jullian et al., 2007; Lucas-Abellán et al., 2008) ont donné des valeurs de Kf dans le même ordre que les valeurs déterminées dans ce travail.

Les études de phase de solubilité permettent également de déterminer le CE des CDs vis-à-vis des invités. Le CE, paramètre évaluant le potentiel solubilisant des CDs, est calculé soit à partir de la pente des courbes de solubilité soit en divisant la concentration de CD sous sa forme complexée ([CD/Ner] ou [CD/Quer]) sur sa concentration sous forme libre (chapitre 2, paragraphe II.3.5.2.2, équation 4).

D'après le **Tableau 10**, nous pouvons remarquer que les CDs modifiées possèdent un meilleur potentiel solubilisant que les CDs natives. Par exemple, les valeurs de CE de HP- β -CD, RAMEB et SBE- β -CD vis-à-vis du trans-nérolidol sont de 0,328 ; 0,537 et 0,457 ; respectivement, alors que la CE de β -CD est de 0,043 (**Tableau 10**). Le faible pouvoir solubilisant de la β -CD peut être dû au fait qu'elle peut former des complexes insolubles ou bien que les quantités d'invités solubilisées soient faibles et donc non détectables. De plus, les résultats montrent que la RAMEB possède le meilleur potentiel de solubilisation, ce qui est tout

à fait cohérent avec la littérature (Badr-Eldin et al., 2008; Loftsson & Duchêne, 2007; Kfoury et al., 2014).

La capacité de solubilisation des CDs a été aussi évaluée en termes de gain de solubilité (S_t/S_0) (**Tableau 10**). Une augmentation de la solubilité du nérolidol et de la quercétine de ~104 et ~14 fois, respectivement, a été observée en présence de 10 mM de RAMEB, ce qui confirme de nouveau que cette CD possède le meilleur potentiel de solubilisation.

IV.1.1.1.2 Carbone Organique Total

Des mesures par TOC ont été menées afin de déterminer la capacité de l'HP- β -CD à solubiliser l'HE de Cabreuva, contenant majoritairement du trans-nérolidol. Le profil de phase de solubilité a été établi à partir de la solubilité apparente de l'HE de Cabreuva, exprimée en g.L⁻¹, en fonction de la concentration en CD (**Figure 41**).

Comme l'illustre la **Figure 41**, la solubilité aqueuse apparente de l'HE de Cabreuva augmente de 0,63 (S₀) à 1,7 g/L en présence de 10 mM HP- β -CD. Ces résultats montrent la capacité de la CD à accroître la solubilité de l'huile contenant le nérolidol. Les études de la littérature ont démontré également la capacité des CDs à solubiliser des HEs et leur composants (Ciobanu et al., 2012; Decock et al., 2006; Samperio et al., 2010).



Figure 41 : Diagramme de phase de solubilité de l'HE de Cabreuva obtenu par TOC montrant la concentration massique de l'huile en fonction de la concentration de HP-β-CD.

IV.1.1.1.3 Méthode directe

Afin de vérifier la stœchiométrie des complexes d'inclusion SBE- β -CD/Quer, la méthode directe a été employée. La **Figure 42** illustre la variation de l'absorbance de la quercétine en fonction de la concentration en CD. Nous pouvons observer, d'après **Figure 42** que les points expérimentaux collent bien avec la courbe théorique du modèle 1:1 ce qui confirme que le complexe étudié est bien de stœchiométrie 1:1.

En effet, il a été démontré que la SBE- β -CD ne peut former que des complexes 1:1 en vue de la répulsion électrostatique entre les molécules de CDs chargées négativement (Loftsson et al., 2004). La K_f a été calculée et une valeur de 5477 M⁻¹ est obtenue. Cette valeur est presque égale à celle donnée par les études de phase de solubilité (5335 M⁻¹).



Figure 42 : Tracé des variations de l'absorbance de la quercétine en fonction de la concentration de SBE-β-CD.

IV.1.1.1.4 Méthode par compétition

Deux CDs natives (α -CD et β -CD) et deux CDs modifiées (HP- β -CD et SBE- β -CD) ont été choisies afin de confirmer les valeurs de K_f obtenues par les études de phase de solubilité.

L'étude par spectroscopie UV-visible en appliquant la méthode par compétition a été alors appliquée. Les K_f des complexes d'inclusion CD/MO ont été déterminées par la méthode de titration directe et sont présentées dans le **Tableau 11**.

Tableau 11 : Valeurs de K_f (M⁻¹) obtenues par spectroscopie UV-visible en comparaison avec des valeurs de phase de solubilité.

K _f (M ⁻¹)		a-CD	β-CD	ΗΡ-β-CD	SBE-β-CD
Phase de solubilité	Nérolidol	418	1238	10365	17768
IW visible	MO	11233	1942	7429	3626
U V - VISIDIE	Nérolidol	410	1081	8168	20553

Les valeurs de K_f pour les complexes CD/MO sont en accord avec les valeurs observées dans la littérature (Decock et al., 2006; Kfoury et al., 2014).

D'après le **Tableau 11**, nous pouvons observer que les valeurs de K_f obtenues par cette méthode pour les complexes d'inclusion CD/Ner sont en bon accord avec celles obtenues par phase de solubilité (**Tableau 10**). Néanmoins, les valeurs issues de la phase de solubilité sont généralement surestimées. Ceci peut être expliqué par l'existence de phénomènes de micellisation et d'agrégation des molécules insolubles observés en plus de la formation des complexes d'inclusion (Messner et al., 2010).

IV.1.1.2 RMN

La spectroscopie RMN (¹H et 2D) a été menée afin d'élucider la formation de complexes d'inclusion CD/Ner et d'établir l'orientation possible du nérolidol dans la cavité de la CD.

Les interactions entre la cavité de la CD et le trans-nérolidol ont été confirmées par ¹H RMN en suivant les variations des déplacements chimiques de chaque espèce. Les variations touchent généralement les protons internes de la cavité de la CD (H₃, H₅) et le proton H₆ localisé au niveau de l'entrée étroite de la cavité au cas où il y a eu formation de complexes d'inclusion, alors que les protons situés à l'extérieur de la CD (H₁, H₂, H₄) subissent très peu de variations. Vu que les dérivés de la β -CD constituent un mélange d'isomères, la RMN a été réalisée uniquement avec la β -CD native. De plus, le spectre RMN du proton du trans-nérolidol n'a pas pu être obtenu vue la faible solubilité aqueuse de ce composé.

Les spectres ¹H RMN et les variations des déplacements chimiques ($\Delta\delta$) de la β -CD sous forme libre ou complexée sont présentés dans la **Figure 43**. Des valeurs négatives ou positives montrent une variation du déplacement chimique vers les hauts ou bas champs, respectivement.



β-CD ¹	н	$\delta_{(libre)}$ (ppm)	$\delta_{(\text{complexe})} \left(ppm \right)$	∆δ (ppm)
	\mathbf{H}_{1}	5,11	5,08	-0,03
Protons	H_2	3,70	3,67	-0,03
externes	H_4	3,62	3,61	-0,01
	H3	4,00	3,93	-0,07
Protons	H ₅	3,89	3,77	-0,12
internes	H_6	3,91	3,83	-0,08

Figure 43 : Etude par ¹H RMN de la complexation entre le trans-nérolidol et la β-CD : déplacement chimique des protons de la β-CD en absence et en présence du trans-nérolidol
(a) et récapitulatif des variations de déplacements chimiques (Δδ) des protons de la β-CD sous forme libre et complexée (b).

Nous pouvons remarquer d'après la **Figure 43** que la présence du trans-nérolidol a induit des variations du déplacement chimique des protons H_3 , H_5 et H_6 plus importantes que celles des protons H_1 , H_2 et H_4 . Ceci est cohérent avec l'inclusion du nérolidol dans la cavité de la CD. En plus, les déplacements des protons de la CD ont été observés vers les hauts champs ce qui suggère la présence d'interactions hydrophobes entre le trans-nérolidol et la cavité apolaire de la CD (Ribeiro et al., 2005). La variation du déplacement chimique du proton H_5 (-0,12 ppm) est la plus élevée parmi les autres protons (**Figure 43**). Cela permet de supposer que le nérolidol pénètre dans la cavité par la face la plus large de la CD (Fernandes et al., 2003).

À la vue de ces résultats, deux possibilités peuvent être proposées : (a) la présence simultanée de deux types de complexes de stœchiométrie 1:1 où le groupement hydroxyle est localisé soit au côté le plus large soit à la face étroite de la CD, (b) la formation de complexes d'inclusion de stœchiométrie 2:1 (CD:trans-nérolidol). Néanmoins, la structure chimique du transnérolidol et les résultats obtenus par phase de solubilité et par UV-visible excluent l'hypothèse de la formation d'un complexe 2:1.

La 2D ROESY a été ensuite utilisée pour mieux comprendre l'interaction du transnérolidol avec la cavité de la β -CD et de trouver la structure tridimensionnelle du complexe d'inclusion formé. La carte ROESY du complexe β -CD/trans-nérolidol est présentée dans la **Figure 44**.



Figure 44 : Carte 2D ROESY du complexe β-CD/Ner.

Nous pouvons observer à partir de la carte ROESY, une corrélation NOE montrant les interactions intermoléculaires entre les protons H_3 et H_5 de la β -CD et les protons des groupements méthyles du trans-nérolidol (H-1, H-4, H-14 et H-16). Nous pouvons également remarquer que le proton H-16 du trans-nérolidol interagit uniquement avec le proton H_3 de la β -CD. De plus, cette carte démontre une forte corrélation entre les protons H-14 du transnérolidol avec les protons de la cavité interne de la CD plus particulièrement avec H_5 . Toutefois, aucune interaction n'est observée entre les protons H-1 et H-4 du trans-nérolidol et les protons de la cavité de la CD (**Figure 44**).

Ces résultats confirment de nouveau la présence du nérolidol dans la cavité de la CD avec le groupement hydroxyle orienté vers le côté le plus large de la CD et les groupements méthyles (position 1 et 4) à l'extérieur de la face étroite de la CD.

IV.1.2 Modélisation moléculaire

Dans un second temps, une étude théorique de caractérisation structurale des complexes d'inclusion a été menée dans le but de comprendre le mécanisme de complexation et de conforter nos observations expérimentales obtenues par RMN. Les conformations les plus stables des complexes d'inclusion β -CD/cis-nérolidol et β -CD/trans-nérolidol sont présentées dans la **Figure 45**.



Figure 45 : Représentation des conformères les plus stables des complexes d'inclusion CD/cis- et trans-nérolidol.

La conformation la plus stable du complexe est obtenue à partir du paramètre théorique ΔE (kJ/mol) qui permet d'évaluer l'énergie de complexation. Plus le ΔE est faible, meilleure est l'inclusion de l'invité à l'intérieur de la CD. Cette différence de l'énergie totale ΔE est calculée entre celle du complexe d'inclusion et la somme des énergies des partenaires libres (CD et nérolidol) du complexe dans leur forme minimisée ($\Delta E = E_{CD/Ner} - (E_{CD} + E_{Ner})$).

D'après la **Figure 45**, nous pouvons déduire que les conformères les plus stables des complexes d'inclusion β -CD/cis- et trans-nérolidol correspondent à la structure où le groupe hydroxyle est exposé à la face la plus large de la CD. En effet, la solvatation du groupement hydroxyle du nérolidol exposé à l'extérieur de la cavité aboutit à la stabilisation du complexe. Par contre, son inclusion dans la cavité de la CD déstabilise le complexe. Ces observations sont en bon accord avec celles obtenues par RMN pour le complexe d'inclusion CD/trans-nérolidol.

En outre, en vue des valeurs de ΔE , on peut remarquer que l'énergie d'interaction de CD/trans-nérolidol (ΔE = -48,14 kJ/mol) est plus faible que celle de CD/cis-nérolidol (ΔE = -34,34 kJ/mol). Ceci indique que l'isomère trans interagit plus favorablement avec la cavité de la CD que l'isomère cis. Ces observations sont bien cohérentes avec les résultats obtenus précédemment par phase de solubilité (K_f de trans-nérolidol est plus élevée que celle de cis-nérolidol).

IV.2 Caractérisation des complexes d'inclusion à l'état solide

L'EE_{CD} ainsi que la teneur en nérolidol dans le complexe d'inclusion HP- β -CD/Ner ont été déterminées en présence de différentes concentrations en CD (10, 25, 50 et 100 mM) afin d'examiner l'effet du rapport molaire CD:Ner sur ces paramètres. À la vue de la **Figure 46**, une nette augmentation a été observée avec l'augmentation de la concentration en CD dans la solution. Au plus faible rapport molaire (CD/Ner 1:1), une valeur de EE de 36 % est obtenue, alors qu'en variant le rapport molaire à 2,5:1 une augmentation brutale de EE est observée (93 %). Au-delà de ce rapport molaire (à 5:1 et 10:1 CD/Ner) une encapsulation totale du nérolidol est atteinte.



Figure 46 : Histogrammes montrant les valeurs d'EE % des complexes d'inclusion CD/Ner (a) et la teneur en nérolidol (b) à différents rapports molaires CD:Ner.

Nous avons également étudié l'effet du rapport molaire sur la teneur finale en nérolidol dans les complexes d'inclusion. Il est intéressant de noter que la teneur en nérolidol diminue avec l'augmentation de l' EE_{CD} sur toute la plage de rapports étudiée. La teneur en nérolidol passe de 50 mg/g de complexe au rapport molaire 1:1 jusqu'à 0,020 mg/g de complexe au rapport molaire 10:1. Ceci signifie qu'une quantité importante de complexes d'inclusion est nécessaire pour atteindre une concentration voulue en nérolidol encapsulé.

Ainsi en modifiant la concentration de CD dans le milieu de préparation nous pouvons moduler les quantités encapsulées d'invité et donc l'EE. Toutefois, pour des considérations toxicologiques et économiques surtout en industrie alimentaire, il est nécessaire de préparer des complexes avec une teneur en nérolidol satisfaisante et une quantité tolérée en CD.

IV.3 Conclusion

Dans cette première partie expérimentale, l'interaction du nérolidol et de la quercétine avec différentes CDs a été étudiée à l'aide de plusieurs techniques spectroscopiques et chromatographiques.

Nous avons mis en évidence, pour la première fois, la formation de complexes d'inclusion CD/Ner et nous avons confirmé les résultats de la littérature obtenus pour les complexes CD/Quer. Ceci a été évalué à travers le calcul des K_f , le CE et le gain de solubilité des deux composés en présence de CDs. La solubilité du nérolidol présent dans l'HE de Cabreuva a été également déterminée suivant une nouvelle méthode utilisant la mesure par TOC.

Des études au niveau structural (¹H RMN et 2D ROESY RMN) ont été menées et ont confirmé l'inclusion du nérolidol dans la cavité de la CD suivant une orientation bien précise. Cela a été par la suite confirmé par des études théoriques de modélisation moléculaire.

D'autre part, l'encapsulation du nérolidol dans les CDs sous forme solide a démontré la capacité des CDs à inclure efficacement le nérolidol. L'efficacité d'encapsulation des CDs a été trouvée dépendante du rapport molaire CD:Ner (EE augmente avec l'augmentation du rapport molaire).

Les résultats obtenus dans cette partie se révèlent importants et sont considérés pour la suite du travail dans le développement des formulations liposomiales encapsulant les complexes d'inclusion (DCLs).
V. Encapsulation du nérolidol et de la quercétine dans les LCs et DCLs

Avant de procéder à la caractérisation des formulations liposomiales, la méthode de quantification par CLHP a été optimisée pour le nérolidol et la quercétine.

V.1 Mise au point de la méthode chromatographique pour le dosage du nérolidol et de la quercétine

V.1.1 Spectres UV-visible

Les spectres du nérolidol et de la quercétine ont été déterminés pour définir la longueur d'onde d'absorption maximale (λ_{max}) de chaque composé pour les analyses par CLHP. De ce fait, des solutions du nérolidol et de la quercétine ont été préparées dans le méthanol à une concentration finale de 10 µg/mL et la mesure de l'absorbance a été menée entre 200 et 800 nm à l'aide d'un spectromètre U-2900 Hitachi (Tokyo, Japan). Les spectres UV-visible du nérolidol et de la quercétine sont présentés dans la **Figure 47**.



Figure 47 : Spectres UV-visible du nérolidol (a) et de la quercétine (b) montrant les λ_{max} .

L'examen des spectres UV montre que le maximum d'absorption du nérolidol est situé à une longueur d'onde de 212 nm alors que la quercétine présente deux λ_{max} à 256 et 370 nm. La longueur d'onde d'absorption maximale égale à 256 nm a été choisie pour la quantification de la quercétine par CHLP.

V.1.2 Dosage par CLHP

Le nérolidol (mélange d'isomères cis et trans) et la quercétine ont été dosés par chromatographie CLHP en utilisant une colonne phase inverse C18 et un mode isocratique (eau/méthanol). Le thymol et l'anéthole ont été utilisés comme étalon interne pour la quantification du nérolidol et de la quercétine, respectivement. Les chromatogrammes de ces deux composés sont représentés dans la **Figure 48**.

Les temps de rétention de cis-nérolidol, trans-nérolidol et du thymol sont respectivement de $20,6 \pm 0,07$; $22,8 \pm 0,13$ et $5,2 \pm 0,01$ min. Les temps de rétention de la quercétine et de l'anéthole sont de $2,9 \pm 0,01$ et $13,0 \pm 0,12$ min, respectivement. Les limites de détection du nérolidol et de la quercétine sont de 0,25 et $0,05 \mu g/mL$. À noter que la quantification du nérolidol dans les différentes formulations liposomiales a été menée uniquement pour le mélange cis et trans-nérolidol vu qu'on ne peut pas prévoir l'affinité de chacun des isomères vis-à-vis des liposomes pour pouvoir calculer leur concentration totale dans le milieu.



Figure 48 : Chromatogrammes obtenus par CLHP pour le nérolidol (10 μ g/mL) (a) et la quercétine (10 μ g/mL) (b).

Plusieurs gammes d'étalonnage ont été préparées pour assurer la répétabilité et la reproductibilité des analyses par CLHP. Les courbes d'étalonnage des deux composés sont linéaires (**Figure 49**). Les moyennes des équations des courbes d'étalonnages obtenues par la méthode des moindres carrés sont : y = 0,033x - 0,005 pour le nérolidol et y = 0,025x - 0,049 pour la quercétine. Les coefficients de corrélation varient entre 0,998 et 0,999.



Figure 49 : Courbes d'étalonnage utilisées pour le dosage du nérolidol (a) et de la quercétine (b).

V.2 Optimisation de la formulation lipidique

La quercétine a été choisie comme molécule modèle pour trouver la formulation liposomiale adéquate pour l'encapsulation du nérolidol. Nous avons utilisé les phospholipides insaturés (Lipoid E80, Lipoid S100) et un phospholipide saturé (Phospholipon 90H) en association avec le cholestérol afin de déterminer l'effet de la composition des phospholipides sur les caractéristiques des liposomes obtenus.

V.2.1 Effet du type de phospholipide sur la taille des liposomes

La taille des liposomes encapsulant la quercétine a été évaluée par granulométrie laser pour les trois types de phospholipides choisis (Lipoid E80, Lipoid S100 et Phospholipon 90H). La **Figure 50** montre des graphes représentatifs de la distribution de taille et la taille des différentes formulations liposomiales.



Figure 50 : Graphes représentatifs des différentes formulations liposomiales montrant la distribution de la taille des vésicules par granulométrie.

Tout d'abord, nous pouvons remarquer qu'il existe deux populations en solution : une population ayant une taille nanométrique (population 1) et une autre micrométrique (population 2) (**Figure 50**).

En comparant les trois liposomes témoins, nous pouvons observer que les Lipoid E80liposomes possèdent une meilleure distribution de taille que les Lipoid S100- et les Phospholipon 90H-liposomes (**Figure 50**, **Tableau 12**). Le pourcentage de la population micrométrique est de 5, 14 et 28 % pour Lipoid E80-, Lipoid S100- et Phospholipon 90Hliposomes, respectivement (**Tableau 12**). Cette différence peut être reliée à la différence de la surface de charge de ces liposomes. En effet, il a été démontré que la surface de charge est d'autant plus négative que le diamètre des vésicules est plus faible. Il en résulte alors une meilleure stabilité physique des liposomes en solution (Gentine et al., 2012; Morini et al., 2015 ; Srisuk et al., 2012). Des études précédentes ont montré que la surface de charge des Lipoid E80 est supérieure à celle des Lipoid S100 et Phospholipon 90H, qui possède la plus faible valeur (Gharib et al., 2017; Sebaaly et al., 2016). Ceci peut être attribué à la présence de la phosphatidyléthanolamine dans les Lipoid E80 qui confère aux liposomes une surface de charge négative additionnelle (Roy et al., 1998; Sebaaly et al., 2016). Par conséquent, les Lipoid E80liposomes sont moins susceptibles à l'agrégation que les deux autres types de lipides et donc possèdent une meilleure distribution de taille.

Ces résultats sont en accord avec les résultats de la littérature qui montrent que le taille des liposomes formés par des lipides de jaune d'œuf ou de soja varie entre 100 et 300 nm et que la taille des Phospholipon 90H est la plus élevée (Alexopoulou et al., 2006; Goniotaki et al., 2004; Landi-Librandi et al., 2012 ; Sebaaly et al., 2016; Shaji & Iyer, 2012).

En outre, l'ajout de la quercétine aux différentes formulations liposomiales a entrainé des modifications de la distribution de taille des vésicules et ceci en fonction du type de lipide. À la vue de la **Figure 50**, nous pouvons observer une légère augmentation de la population 2 pour les liposomes constitués de Lipoid E80 en présence de la quercétine. Toutefois, la présence de la quercétine dans les liposomes formés des deux autres types de lipides (Lipoid S100 et Phospholipon 90H) a abouti à une augmentation significative de la population micrométrique et donc à l'obtention de larges liposomes (**Figure 50, Tableau 12**). Le pourcentage de la population 1 des liposomes témoins constitués de Phospholipon 90H était de 72,05 \pm 4,84 % alors qu'après insertion de la quercétine, le pourcentage a diminué de façon significative jusqu'à 22,62 \pm 6,68 % (**Tableau 12**).

Tableau 12 : Caractéi	ristiques des différente	s formulations	liposomiales	(pourcentage et taille
des deux populations	de liposomes).			

Formulations	Popula	tion 1	Population 2		
Formulations	(%)	Taille (nm)	(%)	Taille (µm)	
Lipoid E80:Chol (100:98)	$92,56 \pm 3,44$	$131 \pm 0,00$	$4,98 \pm 0,66$	$7,44 \pm 3,44$	
Lipoid E80:Chol:Quer (100:98:20)	87,52 ± 4,18	$150^* \pm 0,00$	$12,48 \pm 4,18$	$3,94* \pm 0,75$	
Lipoid S100:Chol (100:117)	$86,03 \pm 8,00$	$123 \pm 0,00$	$13,96 \pm 7,32$	$5,80 \pm 1,89$	
Lipoid S100:Chol:Quer (100:117:20)	$62,28* \pm 4,55$	$131 \pm 0,00$	37,72* ± 4,55	$7,37 \pm 0,56$	
Phospholipon 90H:Chol (100:98)	$72,05 \pm 4,84$	$150 \pm 0,00$	$27,94 \pm 4,85$	$5,68 \pm 0,37$	
Phospholipon 90H:Chol:Quer (100:98:20)	22,62* ± 6,68	$226* \pm 0,00$	77,38* ± 6,68	14,21* ±1,36	

*P<0,05 par rapport aux liposomes témoins.

Cette distribution de taille relativement large peut être attribuée à la formation de vésicules géantes ou d'agrégats de liposomes (Domazou & Luisi, 2002). En effet, les Lipoid E80, Lipoid S100 et les Phospholipon 90H contiennent diverses quantités de phosphatidylcholine (entre 80 et 94 %) et diffèrent par leur teneur en phosphatidyléthanolamine. Ce dernier n'entre pas dans la composition du Phospholipon 90H. Par conséquent, la nature des groupements des têtes polaires des phospholipides peut affecter d'une manière significative la courbure de la membrane et par la suite la taille des vésicules (McMahon & Gallop, 2005). Ce résultat est en accord avec ceux de Sebaaly et al. (2015) qui ont obtenu une distribution de taille très large (PDI > 0,5) pour les Phospholipon 90H-liposomes encapsulant l'eugénol.

D'autre part, les mesures de taille ont révélé que les liposomes encapsulant la quercétine possèdent une taille supérieure à celle des liposomes témoins (**Tableau 12**). Par exemple, la taille des liposomes témoins constitués de Lipoid E80, Lipoid S100 et Phospholipon 90H est de 131, 123 et 150 nm, respectivement. Toutefois, la taille des liposomes encapsulant la quercétine sont respectivement de 150, 131 et 226 nm (**Tableau 12**). Cette augmentation de taille peut être due à l'insertion de la quercétine, molécule hautement hydrophobe, dans la bicouche lipidique. Ceci perturbe ainsi les interactions entre les chaînes d'acides gras ce qui conduit à l'augmentation du volume de la bicouche lipidique (Sikkema et al., 1995).

Les résultats obtenus dans cette étude sont cohérents avec les résultats rapportés dans la littérature (Goniotaki et al., 2004 ; Huang et al., 2017 ; Landi-Librandi et al., 2012 ; Moretti et al., 2016 ; Shaji & Iyer, 2012; Tefas et al., 2015). En effet, une étude menée par Sinha et al. (2011) a confirmé par la spectroscopie RMN l'insertion de la quercétine dans la membrane lipidique : les groupements hydroxyles forment des liaisons hydrogènes avec les groupements polaires des phospholipides alors que les noyaux aromatiques sont présents à l'intérieur de la partie hydrophobe de la bicouche lipidique. Ces résultats expliquent alors l'effet de la quercétine sur la taille des liposomes.

V.2.2 Effet du type de phospholipide sur l'efficacité et le rendement d'encapsulation de la quercétine

La concentration en quercétine dans les suspensions liposomiales et leurs surnageants a été déterminée par CLHP comme décrit dans le chapitre 3 (paragraphe III.4).

Comme nous pouvons le constater à partir du **Tableau 13**, l'EE de la quercétine dans les Lipoid E80-liposomes était la meilleure (99,78 \pm 0,026 %) suivie par celle dans les liposomes constitués de Phospholipon 90H (74,80 \pm 4,05 %) et de Lipoid S100 (55,56 \pm 6,09 %). Cette différence observée en termes de EE % entre les lipides provenant du jaune d'œuf et ceux provenant du soja peut être due à la différence dans leur contenu en lipides insaturés, où le pourcentage de lipides insaturés est plus élevé dans les lipides de soja que ceux du jaune d'œuf (Li et al., 2015). En effet, la présence d'insaturation (orientation *cis*) crée un coude dans la chaîne carbonée des lipides et donc espace ces derniers entre eux ce qui diminue ainsi l'interaction de la quercétine avec les chaînes des acide gras (Wang & Sun, 2008).

La valeur élevée de EE % obtenue avec les liposomes à base de Lipoid E80 est en corrélation avec les valeurs obtenues, pour le même type de formulations liposomiales, dans la littérature (Goniotaki et al., 2004; Priprem et al., 2012; Shaji & Iyer, 2012).

En outre, nous pouvons remarquer également que le taux d'incorporation de la quercétine dans les Phospholipon 90H-liposomes (74,80 \pm 4,05 %) est supérieur à celui dans les Lipoid S100-liposomes (55,56 \pm 6,09 %) (**Tableau 13**). Cela montre que les phospholipides saturés participent davantage à la formation des liposomes que les phospholipides insaturés (Sebaaly et al., 2016).

Formulations	EE %	RE %
Lipoid E80:Chol:Quer (100:98:20)	$99,78\pm0,03$	$71,03 \pm 2,01$
Lipoid S100:Chol:Quer (100:117:20)	$55,56 \pm 6,09$	$39,69 \pm 6,08$
Phospholipon 90H:Chol:Quer (100:98:20)	$74,80 \pm 4,05$	$14,20 \pm 0,77$

Tableau 13 : Les valeurs de EE dans la suspension liposomiale et de RE de la quercétine dans les liposomes constitués des trois types de lipides.

En ce qui concerne le rendement d'encapsulation, la valeur de RE % de Lipoid E80:Chol:Quer (71,03 \pm 2,01 %) était largement plus élevée que celle de Lipoid S100:Chol:Quer (39,69 \pm 6,08 %) et de Phospholipon 90H:Chol:Quer (14,20 \pm 0,77 %) (**Tableau 13**). La différence entre les deux lipides de soja peut être expliqué par le fait que les bicouches lipidiques constituées de Lipoid S100 insaturés en présence du cholestérol deviennent plus rigides que celles constituées de phospholipides saturés (Phospholipon 90H) (Hsieh et al., 2002; Raudino et al., 2011; Takechi-Haraya et al., 2016) et donc retiennent plus efficacement la quercétine dans la membrane conduisant à une incorporation plus élevée. De plus, une température plus élevée (T \approx 55 °C) est exigée pendant la préparation des liposomes constitués de Phospholipon 90H aboutissant probablement à la dégradation de la quercétine (Aditya et al., 2014; Buchner et al., 2006) et ainsi à un très faible rendement.

V.2.3 Effet du type de phospholipide sur la stabilité chimique des liposomes

Dans un second temps, nous avons évalué l'effet des trois types de phospholipides sur la stabilité chimique et physique des liposomes encapsulant la quercétine. Pour cela, des études de photostabilité, de stabilité de stockage à 4 °C après 1 an ainsi que des mesures de rigidité ont été menées.

V.2.3.1 Photostabilité de la quercétine en solution aqueuse et dans les liposomes

La photostabilité de la quercétine libre ou sous forme encapsulée dans les différents types de liposomes a été examinée après exposition aux rayons UVC (λ =254 nm). Le pourcentage de la quercétine restant a été déterminé en fonction du temps par CLHP. Les résultats sont présentés dans la **Figure 51**.



Figure 51 : Photostabilité de la quercétine libre en solution aqueuse et encapsulée dans les liposomes après irradiation aux rayons UV.

Nous pouvons observer à partir de la **Figure 51**, qu'au bout de 8 h d'irradiation, seulement 25 % de la quercétine sous forme libre restent en solution aqueuse. La dégradation de la quercétine par les rayons UV est généralement liée à l'oxydation des groupements OH ou à l'ouverture du noyau C (Dall'Acqua et al., 2012; Fahlman & Krol, 2009; Zvezdanovic et al., 2012). La **Figure 52** représente les mécanismes d'oxydation possible de la quercétine.



Figure 52 : Mécanisme générale d'oxydation de la quercétine (Dangles, 2012).

Le radical aryloxyle est généré par l'arrachement d'un atome d'hydrogène sur l'un des OH les plus labiles de la quercétine (en position 3, 3'-H et 4'). L'arrachage d'un second atome H ou la dismutation des radicaux aryloxyles conduit à une o-quinone et trois p-méthylènequinone. Deux voies distinctes sont alors possibles selon le nucléophile (eau ou quercétine). Selon une voie, une molécule d'eau est additionnée sur l'intermédiaire p-méthylènequinone pour former un composé de type benzopyranone, rapidement converti en une forme plus stable de structure benzofuranone. La coupure oxydante de celle-ci conduit aux acides protocatéchique (3,4-dihydroxybenzoïque) et 2,4,6-trihydroxyphényleglyoxylique (Krishnamachari et al., 2002). La deuxième voie implique que la quercétine, à fortes concentrations, puisse elle-même jouer le rôle du nucléophile. Son addition via le noyau catéchol sur la p-méthylènequinone entraine la formation d'un dimère (**Figure 52**).

Néanmoins, l'encapsulation dans les liposomes a protégé la quercétine contre la dégradation induite par les rayons UVC. L'effet protecteur des liposomes varie selon le type de lipide. Ainsi, le pourcentage de la quercétine restant après 8 h d'irradiation était de 76,41 ; 64,79 et 59,77 % pour les liposomes constitués de Lipoid E80, Lipoid S100 et Phospholipon 90H, respectivement (**Figure 51**). À noter qu'après 72 h d'exposition, les liposomes composés de Lipoid E80 ont retenu plus de 40 % de la quercétine.

Ces résultats montrent que les liposomes composés de Lipoid E80 assurent la meilleure protection de la quercétine vis-à-vis des rayons UV par rapport aux deux autres types de formulations. Cette différence peut être due à la quantité élevée de la quercétine présente dans la bicouche lipidique des Lipoid E80-liposomes (EE % = 99 %). De plus, l'insertion de la quercétine dans la membrane peut masquer les groupements réactifs et donc ralentir sa photodégradation (Scalia & Mezzena, 2009). Il a été également démontré que l'effet protecteur des liposomes varie selon la composition lipidique, la concentration en cholestérol ainsi que la rigidité membranaire (Anderson & Omri, 2004; Briuglia et al., 2015 ; Monteiro et al., 2014 ; Yadav et al., 2011). En ce qui concerne l'effet de la composition lipidique, les liposomes formés de lipides provenant du jaune d'œuf (Lipoid E80) contiennent un taux d'insaturation inférieur à ceux formés de lipides de soja (Lipoid S100) (Budai, 2013; Hager et al., 1993 ; Terao et al., 1981). Ceci confère aux Lipoid E80-liposomes une meilleure stabilité oxydative par rapport aux Lipoid S100-liposomes vu que les lipides insaturés sont plus susceptibles à l'oxydation que ceux saturés (Palacios & Wang, 2005; Shahidi & Zhong, 2010).

D'autre part, les Lipoid S100-liposomes ont montré un meilleur effet protecteur que les Phospholipon 90H-liposomes (**Figure 51**). Des résultats similaires ont été obtenus pour l'eugénol et l'anéthole (Sebaaly et al., 2015; Gharib et al., 2016).

V.2.3.2 Stabilité physico-chimique des liposomes encapsulant la quercétine à 4 °C

La stabilité des liposomes témoins et encapsulant la quercétine a été évaluée en déterminant la taille et le pourcentage de la quercétine restant après 1 an de stockage à 4 °C pour les trois types de phospholipides. Le **Tableau 14** montre que les liposomes témoins sont stables et ont conservé leur taille durant leur stockage à 4 °C. Concernant les liposomes encapsulant la quercétine, on remarque que ceux constitués de Lipoid E80 et de Phospholipon 90H ont montré une meilleure stabilité que ceux constitués du Lipoid S100. En effet, une augmentation de la taille des Lipoid S100-liposomes est observée (de 131 nm à 237 nm) (**Tableau 14**).

Liposomes		Рорі	Population 1		Population 2	
		(%)	Taille (nm)	(%)	Taille (µm)	
Lipoid E80:Chol (100:98)	t= 1 an	$73,78 \pm 4,31$	$131 \pm 0,00$	$26,21 \pm 4,31$	$7,69 \pm 0,00$	
	t= 0	$92,56 \pm 3,44$	$131 \pm 0,00$	$4,98 \pm 0,66$	$7,44 \pm 3,44$	
Lipoid E80:Chol:Quer	t= 1an	84,86 ± 3,52	150 ± 0.34	$15,13 \pm 3,52$	$4,74 \pm 1,00$	
(100:98:20)	t= 0	$87,52 \pm 4,18$	$150* \pm 0,00$	$12,48 \pm 4,18$	$3,94* \pm 0,75$	
Lipoid S100:Chol	t= 1 an	$61,87 \pm 4,00$	$131 \pm 3,05$	$38,12 \pm 4,00$	$11,56 \pm 2,05$	
(100:117)	t= 0	$86,03 \pm 8,00$	$123 \pm 0,00$	$13,96 \pm 7,32$	$5,80 \pm 1,89$	
Lipoid S100:Chol:Quer	t= 1an	$32,05 \pm 5,16$	$237 \pm 1,56$	$67,94 \pm 5,16$	$11,63 \pm 1,57$	
(100:117:20)	t= 0	$62,28* \pm 4,55$	$131 \pm 0,00$	$37,72* \pm 4,55$	$7,37 \pm 0,56$	
Phospholipon 90H:Chol	t= 1 an	$59,89 \pm 4,23$	$150 \pm 0,96$	$40,10 \pm 4,23$	$5,86 \pm 0,00$	
(100:98)	t= 0	$72,05 \pm 4,84$	$150 \pm 0,00$	$27,94 \pm 4,85$	$5,68 \pm 0,37$	
Phospholipon	t= 1 an	$26,93 \pm 9,35$	$206 \pm 1,74$	$73,06 \pm 9,35$	$13,96 \pm 2,08$	
90H:Chol:Quer (100:98:20)	t= 0	$22,62* \pm 6,68$	$226* \pm 0,00$	77,38*±6,68	14,21* ±1,36	

Tableau 14 : Distribution de taille des liposomes après 1 an de stockage des formulations à 4 °C.

De même, le pourcentage de la quercétine restant en solution après 1 an de stockage était élevé (>80 %) (**Figure 53**), ce qui montre la capacité des liposomes à protéger cette molécule durant le stockage. Les Lipoid E80-liposomes ont présenté de nouveau une capacité élevée de protection vis-à-vis de la quercétine par rapport aux autres formulations (**Figure 53**).



an de stockage à 4 °C.

V.2.3.3 Observation morphologique et mesure de la rigidité

Afin d'expliquer les variations observées entre les différents types de lipides sur la stabilité des liposomes encapsulant la quercétine, des mesures de rigidité ont été menées par la technique de l'AFM. Elle permet de visualiser morphologiquement les liposomes ainsi que de mesurer les propriétés mécaniques de la bicouche lipidique telle que la rigidité (Carvalho & Santos, 2012; Delorme & Fery, 2006; Lal et al., 2010; Sirghi, 2010). La morphologie et la rigidité des liposomes témoins avant et après leur exposition aux rayons UV ont été examinées. Afin de réaliser les mesures, des échantillons (non irradiés et irradiés) sont préparés par fixation des liposomes sur un support mica.

Les images de la **Figure 54** révèlent la présence de vésicules de formes sphériques dont leurs diamètres varient en fonction du type de phospholipide. Le diamètre des Lipoid E80-, Lipoid S100-, et Phospholipon 90H-liposomes varie entre 35 et 122 nm, 36 et 53 nm et 47 et 80 nm, respectivement. D'après ces résultats, nous pouvons déduire que la taille des liposomes est dans le même ordre que celle obtenue par granulométrie laser (Lipoid S100-liposomes > Lipoid E80 > Phospholipon 90H). Toutefois, les valeurs issues de la technique de granulométrie sont plus élevées. En effet, l'analyse par granulométrie est réalisée sur une large gamme de mesure et permet donc de quantifier toutes les populations liposomiales présentes en solution alors que les mesures de taille par AFM sont effectuées sur une surface de balayage bien précise (5 μ m × 5 μ m) avec un petit volume d'échantillonnage (6 μ L).



Figure 54 : Images bidimensionnelles obtenues par AFM montrant les liposomes constitués de Lipoid E80 (a), Lipoid S100 (b) et Phospholipon 90H (c) avant irradiation par les rayons UVC.

Le module d'élasticité d'Young (E) a été calculé par AFM afin de déterminer l'effet du type de phospholipide sur la rigidité de la bicouche lipidique. À la vue de la **Figure 55**, nous pouvons remarquer que les liposomes constitués de Lipoid E80 possèdent la valeur de E la plus élevée (2965,81 ± 102,98 kPa) suivie par les Lipoid S100-liposomes (1754,69 ± 111,47 kPa) et enfin par les Phospholipon 90H-liposomes (1450,30 ± 92,44 kPa). Nous pouvons alors constater que les membranes des liposomes formées par les lipides insaturés sont plus rigides que celles composées de lipides saturés, plus particulièrement celle des Lipoid E80-liposomes.

134



Figure 55 : Histogramme montrant les valeurs du module d'Young (E) obtenues pour les trois types de liposomes avant irradiation UV.

Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus par Takechi-Haraya et al. (2016) qui ont montré que l'incorporation du cholestérol dans les bicouches lipidiques module différemment la rigidité membranaire à température ambiante. Ainsi, la rigidité des membranes formées de lipides saturés diminue suite à l'addition du cholestérol alors que l'effet contraire est observé au niveau des liposomes formés de lipides insaturés. En effet, la rigidité est un paramètre déterminant dans la stabilité des vésicules lipidiques (Liang et al., 2004). Plus les membranes sont rigides plus la capacité des liposomes à retenir les molécules augmente. Cela explique le fait que les Lipoid E80-liposomes fournissent une meilleure stabilité (photostabilité ou stabilité de stockage) de la quercétine vu qu'ils possèdent une rigidité membranaire élevée par rapport aux deux autres types de lipides. Les résultats rapportés dans la littérature ont démontré également que l'addition du cholestérol (à un pourcentage molaire de 50 %) à des membranes de phosphatidylcholine de jaune d'œuf (EggPC), augmente le module d'Young de 40-fois par rapport aux liposomes sans cholestérol (Liang et al., 2004).

Par la suite, les liposomes témoins ont été irradiés par les rayons UVC pendant 48 h. Leur topographie ainsi que leur rigidité membranaire ont été ainsi déterminées par AFM (**Figure 56**). Nous pouvons remarquer une légère modification de la taille de toutes les formulations liposomiales après irradiation (**Figure 56**).





Concernant les valeurs de rigidité, une augmentation des valeurs de E a été observée : $E_{E80:Chol} = 3125,96 \pm 242,43 \text{ kPa}$; $E_{S100:Chol} = 2145,08 \pm 55,40 \text{ kPa}$ et $E_{90H:Chol} = 1728,26 \pm 33,62$ kPa (**Figure 56**). Il est bien connu dans la littérature que l'irradiation a tendance à rigidifier les membranes lipidiques. Cet effet peut être dû à la rupture des chaînes d'acides gras suivie par la formation d'hydroperoxydes en présence de molécules d'oxygène singulet (¹O₂). Ceci permet la formation de liaisons hydrogènes entre les hydroperoxydes aboutissant ainsi à une membrane plus rigide (Kölling et al., 1994; Sakanashi et al., 1988).

Ces résultats confirment de nouveau l'effet protecteur élevé des Lipoid E80-liposomes envers la quercétine en comparaison avec les autres types de lipides.

V.3 Caractérisation des LCs et des DCLs encapsulant le nérolidol et la quercétine

À partir des résultats obtenus, on constate que le meilleur type de lipide à partir duquel nous pouvons produire un système d'encapsulation adéquat pour le nérolidol et la quercétine est le Lipoid E80. Les liposomes produits à partir de ce type de lipide ont les caractéristiques suivantes : des vésicules majoritairement nanométriques présentant une distribution de taille relativement homogène (faible pourcentage de la population micrométrique ; **Tableau 12**) ; une EE et un RE élevés (**Tableau 13**) et enfin, une stabilité physicochimique accrue (**Figure 51**, **Tableau 14**). Afin d'augmenter davantage la stabilité et le RE des composés actifs, des complexes d'inclusion d'HP- β -CD/Ner et SBE- β -CD/Quer ont été incorporés dans des liposomes constitués de Lipoid E80 formant ainsi le système mixte DCLs.

V.3.1 Choix des CDs pour la formation des DCLs

Le choix de la HP- β -CD et la SBE- β -CD repose sur leur capacité de complexation élevée vis-à-vis des deux composés, leur solubilité accrue dans l'eau (>500 mg/mL) ainsi que leur faible toxicité envers les membranes biologiques par rapport aux CDs méthylées (Loftsson & Duchêne, 2007 ; Piel et al., 2007 ; Stella & He, 2008 ; Yuan et al., 2008; Miranda et al., 2011). De plus, ces deux CDs sont citées dans la liste FDA et sont largement utilisées dans le domaine agroalimentaire et pharmaceutique (Loftsson & Brester, 2010 ; Miranda et al., 2011 ; Ren et al., 2014; Fenyvesi et al., 2016 ; Kurkov & Loftsson, 2013).

La concentration totale solubilisée du nérolidol et de la quercétine en présence de différents rapports molaires CD:invité (0:1; 2,5:1 ; 5:1 et 10:1) a été déterminée par CLHP ou par spectroscopie UV-visible (**Figure 57**). La solubilité intrinsèque du nérolidol et de la quercétine a été précédemment obtenue par phase de solubilité (V.1.1.1). Nous pouvons constaté d'après la **Figure 57** que la présence d'HP- β -CD et de SBE- β -CD a abouti à une augmentation de la solubilité du nérolidol et de la quercétine de 170 et de 381 fois, respectivement. En passant du rapport molaire CD:invité 1:1 au rapport molaire 2,5:1, une augmentation de la concentration en nérolidol de 3,12 à 7,59 mM et de 1,86 à 5,70 mM en quercétine a été observée (**Figure 57**). Toutefois, aux rapports molaires élevés (5:1 et 10:1), la concentration des deux molécules a augmenté légèrement. Ainsi, les complexes d'inclusion SBE- β -CD/Quer à un rapport molaire 5:1 et les complexes d'inclusion HP- β -CD/Ner à tous les rapports molaires ont été utilisés pour former les DCLs.



Figure 57 : Histogramme montrant la concentration du nérolidol et de la quercétine solubilisée en présence de différents rapports molaires CD:invité.

V.3.2 Détermination de la taille des LCs et DCLs encapsulant le nérolidol et la quercétine

La distribution de la taille des LCs et DCLs (témoins et encapsulant le nérolidol et la quercétine) a été déterminée par granulométrie laser. Deux populations liposomiales ont été obtenues : une nanométrique (87-150 nm, population 1) et une autre micrométrique (5-7 μ m, population 2) (**Tableau 15**). Le pourcentage des deux populations varie en fonction des formulations.

En premier lieu, nous pouvons observer que la taille des Lipoid E80-liposomes témoins formés sans cholestérol (87 nm, **Tableau 15**) est plus faible que celle de ceux formés avec du cholestérol (131 nm, **Tableau 12**). L'effet du cholestérol sur la taille des liposomes a été reporté dans la littérature, montrant une augmentation de la taille de ces vésicules en présence du cholestérol à une certaine concentration (Cagdas et al., 2011; Lee et al., 2005; Szoka & Papahadjopoulos,1980 ; Tseng et al., 2007).

Nous pouvons remarquer également que l'ajout du nérolidol à différents rapports molaires Lipoid E80:Ner diminue de façon significative le pourcentage de la population 1 et

donc augmente celui de la population 2 en comparaison avec les liposomes témoins (**Figure 58**, **Tableau 15**). Par exemple, le pourcentage de la population 1 des liposomes témoins est de $89,33 \pm 5,13$ % alors que celui des liposomes Lipoid E80:Ner au rapport molaire 100:1 diminue à $64,66 \pm 4,73$ %. Ceci peut être attribué à la perturbation de l'assemblage des phospholipides lors de la préparation des liposomes aboutissant ainsi à la formation de vésicules plus larges. En effet, vu que le nérolidol est une molécule hautement hydrophobe, son insertion dans la bicouche lipidique est favorisée.





Figure 58 : Graphes représentatifs des différentes formulations liposomiales : a) LCs, b) CDs libres encapsulées dans les liposomes, c) DCLs montrant la distribution de taille des vésicules obtenue par granulométrie laser.

Tableau 15 : Caractéristiques des LCs et DCLs témoins et encapsulant le nérolidol et la quercétine (pourcentage et taille des deux populations de liposomes).

Formulations	Rapport molaire Lipoid	Popula	ation 1	Population 2		
	E80:Chol:CD:molécules	(%)	Taille (nm)	(%)	Taille (μm)	
Liposomes témoins	100:0:0:0	89,33 ± 5,13	$87 \pm 0,00$	10,66 ± 5,13	$4,94 \pm 1,87$	
	100:0:0:1	64,66 ± 4,73*	$131* \pm 0,00$	35,33 ± 4,73*	$5,68 \pm 1,34$	
Linoid F80·Ner	100:0:0:2.5	63,33 ± 5,77*	$131* \pm 0,00$	36,66 ± 5,77*	$6,72 \pm 0,00$	
	100:0:0:5	58,00 ± 4,24*	$131* \pm 0,00$	$42,00 \pm 4,24*$	$5,97 \pm 1,29$	
	100:0:0:10	63,66 ± 6,02*	$131^* \pm 0,00$	$36,33 \pm 6,02*$	$6,50 \pm 1,30$	
Lipoid E80:HP-β-CD	100:0:30:0	96,66 ± 1,53	$87 \pm 0,00$	$3,33 \pm 1,53$	$2,38 \pm 1,04$	
	100:0:30:30	67,93 ± 6,32*	$150* \pm 0,00$	32,07 ± 6,32*	$5,49 \pm 0,53$	
Lpoid E80:HP-β-CD/Ner	100:0:75:30	67,18 ± 4,72*	$150* \pm 0,00$	$32,82 \pm 4,72*$	$5,37 \pm 0,43$	
	100:0:150:30	83,36 ± 5,89	$150* \pm 0,00$	$20,03 \pm 0,62*$	$3,65 \pm 0,97$	
	100:0:303:30	93,70 ± 1,37	$150* \pm 0,00$	$6,30 \pm 1,37$	$2,64 \pm 0,57$	
Lipoid E80:Chol	100:98:0:0	92,56 ± 3,44	$131 \pm 0,00$	$4,98 \pm 0,66$	$7,44 \pm 3,44$	
Lipoid E80:Chol:Quer	100:98:20	87,52 ± 4,18	$150* \pm 0,00$	$12,48 \pm 4,18$	$3,94* \pm 0,75$	
Lipoid E80:Chol:SBE-β-CD	100:98:190	$94,25 \pm 2,60$	$131 \pm 0,00$	$5,75 \pm 2,60$	$5,12 \pm 0,00$	
Lipoid E80:Chol:SBE-β-CD/Quer	100:98:190:38	68,45 ± 8,39	$172 \pm 0,00$	31,54 ± 8,69	$5,49 \pm 0,52$	

*P<0,05 par rapport aux liposomes temoins

D'autre part, nous pouvons observer que la distribution de taille des liposomes n'est pas modifiée par la présence de la CD libre dans la cavité aqueuse des liposomes en comparaison avec les liposomes témoins (**Tableau 15**). Ceci peut être dû au fait que la HP- β -CD est hautement soluble dans l'eau ce qui minimise l'effet de la CD sur l'assemblage des lipides. En ce qui concerne les DCLs, nous pouvons remarquer que la distribution de taille des DCLs dépend du rapport molaire CD:Ner. En effet, le pourcentage des liposomes de taille nanométrique a été significativement diminué aux rapports molaires 1:1 et 2,5:1 HP- β -CD:Ner (67,93 ± 6,32 et 67,18 ± 4,72 %, respectivement) alors qu'aux rapports molaires 5:1 et 10:1, le pourcentage de la population 1 a été proche de celui des liposomes témoins (83,36 ± 5,89 et 93,70 ± 1,37 %, respectivement) (**Tableau 15**). Les résultats obtenus avec les DCLs à des rapports molaires CD:Ner élevés (5:1 et 10:1) peuvent être expliqués par l'incorporation complète du nérolidol à l'intérieur de la cavité hydrophobe de l'HP- β -CD, empêchant ainsi l'interaction de ce dernier avec les chaînes d'acides gras des phospholipides dans la bicouche, réduisant ainsi l'effet du nérolidol sur la membrane.

La taille moyenne de la population nanométrique des LCs et des DCLs varie entre 87 et 200 nm (**Tableau 15**). Ceci est tout à fait en corrélation avec les valeurs obtenues dans la littérature (autour de 100 nm) pour des liposomes préparés par la méthode d'injection éthanolique (Sebaaly et al., 2015; Pons et al., 1993).

D'après le **Tableau 15**, nous pouvons constater que toutes les formulations liposomiales (LCs et DCLs) présentent une taille moyenne (150 nm) supérieure à celle des liposomes témoins (87 nm). Les études de la littérature montrent également une augmentation de la taille des LCs encapsulant des HEs et leurs constituants comme Eucalyptus camaldulensis (Moghimipour et al., 2012) et l'eugénol (Sebaaly et al., 2015). De même, des études menées sur les DCLs ont trouvé un effet similaire des complexes d'inclusion CD/invité sur la taille des liposomes (Cavalcanti et al., 2011 ; Maestrelli et al., 2006, 2005).

En outre, nous pouvons remarquer que les DCLs formés à partir des complexes d'inclusion SBE- β -CD/Quer présentent une taille moyenne (172 nm) supérieure à celle des liposomes témoins (131 nm). De plus, le pourcentage de la population 1 a diminué considérablement avec les DCLs (68,45 ± 8,39 %) par rapport aux liposomes témoins et LCs (92,56 ± 3,44 % et 87,52 ± 4,18 %, respectivement) (**Tableau 15**). Ceci peut être attribué à la présence des complexes d'inclusion CD/Quer à la surface des liposomes vue la solubilité élevée de la SBE- β -CD ou à la charge négative de cette CD. En effet, les Lipoid E80-liposomes possèdent une charge de surface négative élevée (Karn et al., 2013) ce qui crée une répulsion

avec la CD chargée négativement. Cela empêche son encapsulation dans la cavité aqueuse et perturbe alors la formation de la bicouche lipidique. À notre connaissance, peu d'études existent sur la caractérisation des liposomes encapsulant les complexes d'inclusion SBE- β -CD/invité. Deux études menées par Shaji & Iyer. (2012) et Zhang et al. (2015) ont montré une augmentation de la taille des DCLs encapsulant la quercétine par rapport aux liposomes témoins à des rapports molaires CD/invité (1:1 et 1:2) inférieurs à ceux utilisés dans notre étude.

V.3.3 Détermination de l'efficacité et du rendement d'encapsulation

L'EE et le RE du nérolidol et de la quercétine dans les LCs et DCLs ont été déterminés par CLHP. Les LCs présentent des taux d'encapsulation très élevés (>95 %) quel que soit le rapport molaire Lipoid E80:Ner (**Tableau 16**). Ceci s'explique par l'hydrophobicité élevée du nérolidol qui permet son insertion dans la bicouche lipidique.

Tableau 16 : Valeurs d'efficacité et de rendement d'encapsulation du nérolidol et de la quercétine dans les LCs et DCLs.

Formulations	Rapport molaire Lipoid E80:Chol:CD:molécules	EE %	RE %
	100:0:1	$97,28 \pm 0,01$	$95,46 \pm 3,90$
	100:0:2,5	$98,21 \pm 0,29$	$94,78 \pm 5,87$
Lipoid E80:Ner	100:0:5	$99,25 \pm 0,21$	$63,92 \pm 5,68$
	100:0:10	$99,61 \pm 0.05$	$66,09 \pm 0,37$
Lipoid E80:HP-β- CD/Ner	100:0:30:30	$97,18 \pm 1,28$	$17,65 \pm 0,74$
	100:0:75:30	$92,54 \pm 2,97$	$70,76 \pm 4,40*$
	100:0:150:30	$63,15 \pm 0,64*$	$57,49 \pm 0,27*$
	100:0:303:30	56,57 ± 0,31*	$45,50 \pm 0,16*$
Lipoid E80:Chol:Quer	100:98:20	$99,78 \pm 0,03$	$71,03 \pm 2,01$
Lipoid E80:Chol:SBE-β- CD/Quer	100:98:190:38	44,48* ± 0,22	27,96* ± 6,72

*p<0,05 en comparaison avec Lipoid E80:HP-β-CD/Ner au rapport molaire 100:0:30:30.

D'autre part, le nérolidol a été incorporé efficacement dans les liposomes sous forme de complexes d'inclusion HP- β -CD/Ner, précisément dans les DCLs formés à partir de faibles rapports molaires HP- β -CD/Ner. En effet, au rapport molaire CD:Ner 1:1 et 2,5:1, l'EE était de 97,18 ± 1,28 % et 92,54 ± 2,97 %, respectivement. Toutefois, en augmentant le rapport molaire CD:Ner, EE diminue de façon significative jusqu'à atteindre des valeurs de 63,15 ± 0,64 % et

56,57 ± 0,31 % pour des rapports molaires 5:1 et 10:1, respectivement. Cela peut être dû à la faible capacité d'incorporation par les liposomes de quantités élevées de CDs dans leur cavité aqueuse. Des résultats similaires ont été rapportés dans la littérature pour les DCLs encapsulant la prednisolone et le kétoprofène en présence de concentrations élevées de HP-β-CD/PA (Fatouros et al., 2001 ; Maestrelli et al., 2006).

En ce qui concerne le RE, nous pouvons remarquer qu'à des faibles rapports molaires E80:Ner (100:1 et 100:2,5), le RE était supérieur à 90 %, montrant de nouveau la capacité élevée des liposomes à incorporer le nérolidol. Néanmoins, le RE diminue avec l'augmentation du rapport molaire E80:Ner (par exemple, RE = $63,92 \pm 5,68$ % pour le rapport molaire 5:1). Ce résultat est en corrélation avec l'augmentation de la population micrométrique des liposomes (**Tableau 15**).

En outre, en augmentant le rapport molaire du complexe d'inclusion CD:Ner de 1:1 à 2,5:1 ; le RE du nérolidol dans les DCLs augmente de façon remarquable de 17,65 \pm 0,74 % à 70,76 \pm 4,40 % (**Tableau 16**). La solubilisation accrue du nérolidol en présence de 25 mM de CD permettrait ainsi sa meilleure incorporation dans la phase aqueuse des vésicules lipidiques. Cependant, à des rapports molaires supérieurs à 2,5:1, le RE du nérolidol dans les DCLs diminue, ce qui confirme la capacité limitée des liposomes à encapsuler des quantités élevées de complexes d'inclusion CD/Ner.

Ainsi, nous pouvons constater que le meilleur système d'encapsulation du nérolidol est le DCL préparé à un rapport molaire HP- β -CD:Ner de 2,5:1 vu qu'il assure une incorporation élevée du nérolidol dans les liposomes.

Les valeurs de EE et de RE de la quercétine dans les DCLs sont inférieures à celles obtenues dans les LCs (**Tableau 16**). Ceci peut être dû au fait que l'encapsulation des complexes d'inclusion SBE- β -CD/Quer est peu favorable dans la petite cavité aqueuse des liposomes. Une faible valeur de EE a été également obtenue pour les liposomes encapsulant le complexe d'inclusion SBE- β -CD/flurbiprofène (Zhang et al., 2015). À noter qu'il n'existe pas de littérature sur les DCLs produits à partir du complexe d'inclusion SBE- β -CD/Quer.

V.4 Effet de l'encapsulation sur les propriétés physicochimiques du nérolidol et de la quercétine

Dans cette troisième partie, nous nous sommes intéressées à étudier l'effet de l'encapsulation par les CDs et les liposomes sur les propriétés physicochimiques et biologiques du nérolidol et de la quercétine telles que i) la cinétique de libération in vitro ; ii) la photostabilité contre les irradiations UV ; iii) la stabilité de stockage pendant 1 an à 4 °C ; vi) la stabilité dans les milieux biologiques ; v) l'activité antioxydante de ces composés.

V.5 Etude de libération in vitro du nérolidol

L'un des facteurs primordiaux qui doit être considéré en industrie agroalimentaire est d'assurer une libération contrôlée d'ingrédients alimentaires afin de maintenir les propriétés organoleptiques et sensorielles des aliments ainsi que de prolonger l'effet bénéfique de ces molécules bioactives. De ce fait, l'encapsulation dans les nanoparticules a été conçue dans le but de retenir ces ingrédients pour une longue durée (Rodríguez-Casado, 2016). L'effet de l'encapsulation par les CDs, LCs et DCLs sur la libération in vitro du nérolidol a été évalué par dialyse. La **Figure 59** illustre le pourcentage du nérolidol libéré au cours du temps à partir des CDs pour tous les rapports molaires CD:Ner (**Figure 59a**) et les formulations liposomiales (**Figure 59b**).



Figure 59 : Profils de libération du nérolidol à partir des CDs (a) et des formulations liposomiales (b) en solution au cours du temps.

La **Figure 59** montre une libération rapide du nérolidol à partir de toutes les formulations (CDs, LCs et DCLs) au bout de 8 h (phase 1) suivie d'une libération plus lente pour une semaine (phase 2). Durant les 8 h, plus que 45 % du nérolidol sont libérés dans le milieu, alors que le taux de libération diminue dans la deuxième phase jusqu'à atteindre une libération totale au bout de 166 h (7 jours).

Comme prévu, les DCLs ont prolongé la libération du nérolidol plus efficacement que les complexes d'inclusion CD/Ner et les LCs. Plus précisément, les DCLs de formulation Lipoid E80:HP-β-CD:Ner 100:303:30 ont abouti à une libération du nérolidol moins prononcée par rapport aux autres formulations (CDs et LCs) durant les 8 h. Par exemple, la quantité libérée du nérolidol était de 57 % pour les LCs au rapport molaire Lipoid E80:Ner 100:10 tandis que seulement 39 % du nérolidol sont libérés des DCLs au plus grand rapport molaire (Figure 59b). La première phase peut être due à la libération du nérolidol présent dans la partie externe de la bicouche lipidique ; toutefois la deuxième phase de libération peut être expliquée par la libération du nérolidol incorporé dans la bicouche interne des vésicules ou sous forme de complexes d'inclusion CD/Ner dans la cavité aqueuse des liposomes. De plus, nous pouvons observer que durant la deuxième phase, la libération du nérolidol à partir des DCLs était plus lente que celle à partir des LCs. En effet, la molécule doit franchir plus de barrières dans les DCLs (CDs et la bicouche lipidique) que dans les LCs pour qu'elle soit libérée (Chen et al., 2014). Ces observations corrèlent bien avec les résultats de la littérature démontrant une libération plus lente à travers les DCLs que les LCs (Chakraborty & Naik, 2003; Chen et al., 2007; Zhang et al., 2015).

On remarque également qu'en augmentant le rapport molaire CD:Ner, le taux de libération à travers les DCLs diminue. En effet, 82, 79, 74 et 60 % du nérolidol sont libérés dans le milieu pour les rapports molaires 1:1 ; 2,5:1 ; 5:1 et 10:1, respectivement (**Figure 59b**). Cela est dû au fait qu'avec l'augmentation du rapport molaire CD:Ner, la présence du nérolidol sous forme de complexe d'inclusion augmente dans la cavité aqueuse des liposomes.

Nos résultats montrent que l'encapsulation dans les DCLs offre un intérêt majeur en industrie agroalimentaire, pour prolonger efficacement la libération du nérolidol.

V.6 Etude de la photostabilité des composés actifs sous forme libre et encapsulé

V.6.1 Photostabilité du nérolidol

Nérolidol est sensible à la lumière ce qui peut entrainer sa dégradation, son isomérisation ou autres altérations (Turek & Stintzing, 2013). Néanmoins, le processus de dégradation du nérolidol par les rayons UV n'a pas encore été élucidé. On suppose que la présence de trois doubles liaisons dans sa structure peut indiquer sa susceptibilité à être dégrader (Hayashi et al., 2004). Ainsi, dans ce travail, nous avons étudié la stabilité du nérolidol sous forme libre ou encapsulé dans les CDs, LCs et DCLs au cours du temps sous irradiation UVB.

V.6.1.1 Photostabilité du nérolidol par les CDs

Dans un premier temps, nous avons évalué l'effet de la concentration de la HP- β -CD sur la photostabilité du nérolidol (cis, trans et le mélange racémique) au cours du temps sous irradiation UVB. Ensuite, nous avons suivi la photostabilité de cis, trans et le mélange racémique du nérolidol libre et en présence de différents types de CDs (α -CD, β -CD, HP- β -CD et SBE- β -CD) en solution. La photodégradation de l'HE de Cabreuva sous forme libre ou encapsulée a été également effectuée. À chaque intervalle de temps d'irradiation, la quantité du nérolidol restante intacte est déterminée par CLHP. La **Figure 60** montre les profils de photodégradation du nérolidol libre ou encapsulé.



Figure 60 : Profils de photodégradation de : a) cis-nérolidol, b) trans-nérolidol, c) nérolidol libre ou en présence d'une solution de HP-β-CD à différentes concentrations et d) de l'HE de Cabreuva libre ou complexée avec 1 mM HP-β-CD. Les résultats sont exprimés en pourcentage de nérolidol restant en solution à chaque intervalle de temps.

Les profils de photodégradation du nérolidol sous forme libre ou complexé suivent une cinétique du premier ordre. Cela nous permet de calculer les constantes de vitesse de dégradation K (min⁻¹) regroupées dans le **Tableau 17**. Nous pouvons observer que le nérolidol libre a été dégradé au bout de 180 min d'irradiation, où il ne reste que 15,10 et 12 % de cis, trans et le mélange intacts en solution (**Figure 60a-c**).

K (min ⁻¹)		cis-nérolidol	trans-nérolidol	Nérolidol	Facteur de protection
Nérolidol l	ibre	0,0121	0,0145	0,0134	
	0,5 mM	0,0034	0,0028	0,003	4,47
HP-β-CD	1 mM	0,0017	0,0012	0,0014	9,57
	10 mM	0,0005	0,0002	0,0003	44,66
α-CD		0,0051	0,0051	0,0051	2,62
β-CD		0,0019	0,0010	0,0013	10,31
SBE-β-CD		0,0012	0,0007	0,0009	14,88

Tableau 17 : Vitesse de dégradation K (min⁻¹) du nérolidol libre ou complexé en solution sous irradiation UVB.

Une valeur élevée de K indique une sensibilité plus importante du composé. L'analyse des valeurs de K dans le **Tableau 17** permet de conclure que le trans-nérolidol sous forme libre est plus sensible à la photodégradation que le cis-nérolidol. Ceci peut être lié à la conversion des isomères trans en leurs isomères cis sous l'effet de l'irradiation par UV (Ahmad et al., 2016 ; Turek & Stintzing, 2013). Ce processus d'isomérisation cis/trans est fréquemment rencontré en photochimie organique (Castro et al., 2010). Notons que les isomères cis sont généralement plus toxiques que les isomères trans et qu'ils possèdent des odeurs et saveurs fortes et désagréables (Turek & Stintzing, 2013).

Toutefois, l'encapsulation l'HP-β-CD dans ralentit considérablement la photodégradation du nérolidol (Figure 60; Tableau 17). Cet effet devient plus important lorsque la concentration en CD augmente. Après 120 min d'irradiation, 60 et 90 % du nérolidol restent intactes en présence de 0,5 et 10 mM de CDs, respectivement (notons que même après 8 h d'irradiation plus que 30 % du nérolidol restent en solution) (Figure 60). En comparant les vitesses de dégradation, nous remarquons que l'encapsulation en présence de 0,5 ; 1 et 10 mM de CD permet d'accroître la stabilité du nérolidol de 5, 10 et de 45 fois, respectivement (Tableau 17). Ces résultats montrent clairement l'effet protecteur de l'HP-β-CD vis-à-vis du nérolidol. La concentration du nérolidol complexé augmente en présence d'une quantité élevée de CDs ce qui explique la photostabilité la plus prononcée du nérolidol à 10 mM d'HP-β-CD.

En outre, la photodégradation de l'HE de Cabreuva contenant majoritairement du transnérolidol a été suivie en présence de 1 mM de HP- β -CD (**Figure 60d**). Nous pouvons observer que le trans-nérolidol dans l'huile a été rapidement dégradé après 180 min d'irradiation (8 % de nérolidol sont restés en solution) alors que la complexation de l'HE de Cabreuva avec l'HP- β -CD accroît la photostabilité de trans-nérolidol (seulement 40 % sont dégradés après 180 min d'irradiation UV) (**Figure 60d**). En comparant la photostabilité du trans-nérolidol sous sa forme pure ou dans l'huile, nous pouvons constater que la dégradation du nérolidol pur est légèrement plus rapide (K = 0,0145 min⁻¹) que celle dans l'huile (K = 0,0127 min⁻¹). Ceci peut être attribué à la présence d'autres constituants dans l'huile qui peuvent retarder la dégradation du nérolidol.

Par la suite, nous avons comparé l'effet de différents types de CDs à une concentration fixe (1 mM) sur la photostabilité du nérolidol. D'après le **Tableau 17**, nous pouvons constater que la photodégradation de trans-nérolidol est plus lente que celle de cis-nérolidol suite à leur complexation dans les CDs. Par exemple, la constante de dégradation de cis et de transnérolidol en présence de SBE- β -CD est de 0,0012 et 0,0007 min⁻¹, respectivement. Ceci peut être dû à la meilleure complexation de la CD vis-à-vis de l'isomère trans que l'isomère cis (**Tableau 10**). Cette différence peut être également reliée aux valeurs de K_f correspondantes des complexes (K_f (cis-nérolidol) = 9240 M⁻¹ et K_f (trans-nérolidol) = 13264 M⁻¹). Nous pouvons, aussi, déduire que plus la valeur de K_f est élevée meilleur est l'effet protecteur de la CD : SBE-β-CD (K_f = 17768 M⁻¹) > HP-β-CD (K_f = 10365 M⁻¹) > β-CD (K_f = 1238 M⁻¹) > α -CD (K_f = 418 M⁻¹) (**Tableau 17**).

Des résultats similaires ont été reportés dans la littérature montrant l'effet protecteur des CDs envers d'autres composés actifs (Hădărugă et al., 2014 ; Kfoury et al., 2016; Villaverde et al., 2007).

V.6.1.2 Photostabilité du nérolidol par les LCs et les DCLs

Dans un second temps, la photostabilité du nérolidol (en tant que mélange) par les LCs et DCLs a été examinée au cours du temps après irradiation UVB. Le pourcentage du nérolidol restant en solution après irradiation est présenté dans la **Figure 61**.



Figure 61 : Photostabilité du nérolidol libre en solution aqueuse et encapsulé dans les liposomes (CLs et DCLs) après irradiation aux rayons UVB.

À la vue de la **Figure 61**, nous pouvons constater que l'encapsulation dans les LCs ou DCLs a ralenti la dégradation du nérolidol par les rayons UV en comparaison à celle du

nérolidol libre en solution. En effet, le nérolidol a été dégradé rapidement au bout de 180 min alors qu'il reste plus que 40 % dans les différentes formulations liposomiales (**Figure 61a**).

Nous pouvons remarquer également que les DCLs présentent un effet protecteur vis-àvis du nérolidol plus élevé que les LCs (**Figure 61b**). Par exemple, le pourcentage du nérolidol restant dans les LCs varie entre 40 et 50 %, cependant celui des DCLs varie entre 65 et 85 % après 180 min d'irradiation (**Figure 61a**). Cette différence peut être attribuée au fait que les rayons UV doivent premièrement traverser la bicouche lipidique ensuite les CDs avant d'atteindre le nérolidol.

En outre, les valeurs de K montrent que le DCL au rapport molaire 100:75:30 confère au nérolidol la meilleure photostabilité en comparaison avec les autres formulations (**Tableau 18**). En effet, l'efficacité d'encapsulation et le rendement du nérolidol dans ces DCLs étaient très élevés ($EE = 92,54 \pm 2,97$ % et $RE = 70,76 \pm 4,40$ %) par rapport aux autres DCLs ; cela signifie que le nérolidol encapsulé dans les liposomes ou bien sous forme de complexes d'inclusion sera hautement protégé des rayons UV.

La photoprotection des molécules photosensibles comme l'anéthole et la barnidipine par les DCLs a été également trouvée supérieure en comparaison aux LCs (Gharib et al., 2017; Ioele et al., 2014).

Tableau 18 : Constantes de vitesse de dégradation K (min⁻¹) du nérolidol libre ou encapsulédans les liposomes sous irradiation UVB.

Échantillons		K (min ⁻¹)	Facteur de protection
Nérolidol libre		0,013	
	100:1	0,004	3,35
Lipoid E80:Ner	100:2,5	0,004	3,35
	100:5	0,004	3,35
	100:10	0,005	2,68
	100:30:30	0,004	3,35
Lipoid E80:HP-β-CD:Ner	100:75:30	0,001	13,40
	100:150:30	0,004	3,35
	100:303:30	0,003	4,47

Nos résultats montrent l'importance de l'encapsulation dans la réduction de la photodégradation du nérolidol et sa protection contre les rayons UVB. Cela est dû au fait que ces différents systèmes constituent une barrière physique pour les composés actifs ce qui empêche l'attaque directe des rayons UV. Cet effet protecteur est généralement recherché par les industries alimentaires afin de garantir la qualité et la sécurité des produits alimentaires.

V.6.2 Photostabilité de la quercétine par les CDs, LCs et DCLs

Nous avons également évalué la stabilité de la quercétine suite à son encapsulation dans les CDs, LCs et DCLs au cours du temps et sous irradiation UVC (**Figure 62**).



Figure 62 : Photostabilité de la quercétine libre en solution aqueuse et encapsulée dans les liposomes (LCs et DCLs) après irradiation aux rayons UVC.

Nous pouvons observer que l'encapsulation ralentit la photodégradation de la quercétine: le pourcentage la quercétine restant était de 24, 76 et 90 % pour la quercétine libre, la quercétine encapsulée dans les LCs et dans les DCLs, respectivement après 8 h d'irradiation. Ceci montre l'efficacité élevée des DCLs en comparaison aux CLs dans la protection de la quercétine. De plus, nous pouvons remarquer que les complexes d'inclusion SBE- β -CD/Quer ont montré le même effet protecteur que les DCLs au bout de 24 h d'irradiation. Toutefois, la photostabilité de la quercétine dans les CDs était légèrement supérieure que dans les DCLs après 24 h d'irradiation. Ceci peut être dû à l'oxydation des lipides par les rayons UV après une longue durée d'exposition (Briuglia et al., 2015; Hsieh et al., 2002).

En comparant les deux molécules, on remarque que la photostabilité de la quercétine libre et encapsulée était meilleure que celle du nérolidol et ceci même suite à son exposition à un rayonnement UV plus fort. Cela peut être expliqué par le fait que la quercétine possède une activité antioxydante supérieure à celle du nérolidol (présence de nombreux groupements hydroxyles dans la structure de la quercétine) (Wang et al., 2016).

V.7 Stabilité physico-chimique des liposomes encapsulant le nérolidol

La taille des liposomes et leur capacité à retenir le nérolidol a été examinée après 1 an de stockage à 4 °C. Les valeurs de la taille et le pourcentage du nérolidol restant dans les liposomes sont présentés dans le **Tableau 19**.

Les liposomes encapsulant le nérolidol ont conservé leur taille durant leur stockage à 4 °C, néanmoins, la distribution de taille a été modifiée où le pourcentage de la population nanométrique a été diminué et celui de la population micrométrique a été donc augmenté (**Tableau 19**). Ceci peut être dû au fait que les liposomes peuvent subir une agrégation/fusion en solution au cours du temps (Anderson & Omri, 2004).

D'autre part, nous pouvons constater d'après le **Tableau 19** que plus de 98 % du nérolidol sont retenus dans les LCs et DCLs à des faibles rapports molaires CD:Ner. La capacité des DCLs diminue au rapport molaire CD:Ner élevée : 86 et 65 % du nérolidol restent dans les DCLs aux rapports molaires E80:HP- β -CD:Ner 100:150:30 et 100:303:30, respectivement (**Tableau 19**). Ceci peut être lié à la perturbation de la membrane lipidique en présence de quantités élevées de CDs ce qui aboutit à la libération du nérolidol au cours du stockage.

	Rapport molaire Lipoid	Popula	tion 1	Рори	lation 2	Nérolidol restant
Formulations	$\begin{array}{ c c c c c c } \hline \mbox{Rapport molaire Lipoid}\\ \hline \mbox{E80:CD:Ner} & \hline \mbox{Population 1} & \mbox{Population 2} \\ \hline \mbox{(\%)} & \mbox{Taille (nm)} & \mbox{(\%)} & \mbox{Taille (\mum)} \\ \hline \mbox{(\%)} & \mbox{Taille (nm)} & \mbox{(\%)} & \mbox{Taille (\mum)} \\ \hline \mbox{100:0:0} & 87,33 \pm 0,35 & 87 \pm 0,00 & 12,67 \pm 0,35 & 5,94 \pm 1,63 \\ \hline \mbox{100:0:0:1} & 45,10 \pm 0,87 & 131 \pm 1,35 & 54,89 \pm 0,87 & 7,692 \pm 2,35 \\ \hline \mbox{100:0:2,5} & 58,40 \pm 1,56 & 226 \pm 0,24 & 41,6 \pm 1,56 & 8,81 \pm 0,87 \\ \hline \mbox{100:0:5} & 76,18 \pm 0,22 & 131 \pm 0,00 & 23,82 \pm 0,22 & 5,12 \pm 1,65 \\ \hline \mbox{100:0:10} & 69,34 \pm 0,24 & 131 \pm 0,00 & 30,66 \pm 0,24 & 5,12 \pm 0,43 \\ \hline \mbox{100:30:30} & 40,76 \pm 1,03 & 150 \pm 0,05 & 59,24 \pm 1,03 & 4,472 \pm 0,54 \\ \hline \mbox{100:150:30} & 59,20 \pm 0,68 & 150 \pm 0,00 & 40,80 \pm 0,68 & 3,409 \pm 0,78 \\ \hline \end{array}$	(%)				
Liposomes témoins	100:0:0	$87,33 \pm 0,35$	87 ± 0.00	$12,67 \pm 0,35$	$5,94 \pm 1,63$	
	100:0:1	$45,10 \pm 0,87$	$131 \pm 1,35$	$54,89 \pm 0,87$	$7,692 \pm 2,35$	$99,99 \pm 0,53$
Lineid F90-Nor	100:0:2,5	$58,40 \pm 1,56$	226 ± 0.24	$41,6 \pm 1,56$	$8,81 \pm 0,87$	$99,79 \pm 1,08$
Lipoid E80:mer	100:0:5	$76,18 \pm 0,22$	$131 \pm 0,00$	$23,82 \pm 0,22$	$5,12 \pm 1,65$	$99,83 \pm 1,30$
	100:0:10	$69,34 \pm 0,24$	$131 \pm 0,00$	$30,66 \pm 0,24$	$5,12 \pm 0,43$	$99,85 \pm 0,75$
	100:30:30	$40,76 \pm 1,03$	150 ± 0.05	$59,24 \pm 1,03$	$4,472 \pm 0,54$	98,61 ± 1,05
Lipoid E80:HP-β-CD/Ner	100:75:30	$44,80 \pm 0,40$	150 ± 0.08	$55,20 \pm 0,40$	$4,472 \pm 1,35$	$98,67 \pm 2,12$
· ·	100:150:30	$59,20 \pm 0,68$	150 ± 0.00	$40,80 \pm 0,68$	$3,409 \pm 0,78$	85,92 ± 5,23
	100:303:30	46,21 ± 1,25	150 ± 0.00	53,79 ± 1,25	$6,72 \pm 2,85$	$65,03 \pm 0,94$

Tableau 19 : Caractéristiques des liposomes après un an de stockage à 4 °C (taille et pourcentage du nérolidol restant dans les liposomes).

V.8 Etude de la stabilité de la quercétine dans les milieux biologiques

La quercétine possède d'importantes activités biologiques dont l'activité antioxydante, anticancéreuse et anti-inflammatoire (Maalik et al., 2014). Son application dans le secteur pharmaceutique comme agent thérapeutique ou en industrie agroalimentaire comme nutraceutique est toutefois limité par sa faible solubilité et sa biodisponibilité réduite (Erlund et al., 2002; Graefe et al., 2001; Gugler et al., 1975; Hollman et al., 1997; Khaled et al., 2003). Les voies d'administration les plus couramment utilisées pour l'administration des PA sont la voie orale et parentérale. Cependant, le pH et les enzymes présentes dans les fluides biologiques ainsi que l'absorption restreinte de certains PA à travers la barrière gastro-intestinale diminuent leur biodisponibilité. De ce fait, afin d'améliorer l'absorption de la quercétine dans l'organisme, sa solubilité et sa stabilité sous forme encapsulée dans les CDs, LCs et DCLs a été comparée à sa forme libre dans les milieux gastrique et intestinale au cours du temps. La concentration de la quercétine restante en solution est illustrée dans la **Figure 63**.



Figure 63 : Graphes montrant la concentration de la quercétine restante au cours du temps dans les milieux gastrique (a) et intestinal (b).

Nous pouvons remarquer d'après la **Figure 63**, que la quercétine a été fortement solubilisée après son inclusion dans la SBE- β -CD ou son encapsulation dans les LCs et DCLs, vu que sa concentration a varié entre 100 et 500 µg/mL, en comparaison avec la quercétine libre. Dans les deux milieux, les Lipoid E80-liposomes ont augmenté efficacement la solubilité de la quercétine par rapport aux Lipoid S100 et Phospholipon 90H -liposomes.

En outre, nous pouvons observer que la quercétine libre a été dégradée après 4 h d'incubation dans le milieu SGF où il ne reste que 5 μ g/mL en solution par rapport à 10 μ g/mL à t=0 (**Figure 63**). Par contre, la quercétine a été démontrée presque stable dans le SIF.

L'encapsulation de la quercétine dans les CDs, CLs et DCLs accroît sa stabilité dans le SGF (**Figure 63**). Par exemple, la concentration à t=0 de la quercétine dans les Phospholipon 90H, Lipoid E80 et Lipoid S100-liposomes était de 150, 280 et 86 μ g/mL ; alors que la concentration était de 80, 230 and 80 μ g/mL, respectivement, après 4 h d'incubation (**Figure 63**). Ceci peut être dû au fait que les Phospholipon 90H-liposomes possèdent une membrane moins rigide et donc la libération de la quercétine de la membrane lipidique sera plus rapide dans le milieu par rapport aux autres formulations.

D'autre part, la stabilité des formulations dans le milieu SIF par rapport au SGF, peut être expliquée par le fait qu'en milieu acide les liposomes peuvent être dégradés par hydrolyse de leurs groupements ester. De plus, la présence de la phosphatidyléthanolamine dans les membranes stabilise les liposomes à un pH basique (Yang et al., 1997), ce qui explique l'efficacité élevée des Lipid E80 dans le milieu SIF.

Des études précédentes ont également montré la désintégration de la membrane lipidique en milieu acide suite à l'hydrolyse des phospholipides (Hu et al., 2013 ; Jain et al., 2013; Tang et al., 2017).De plus, l'effet protecteur offert par l'encapsulation peut être attribué à l'incorporation de la quercétine dans la membrane lipidique ou son inclusion dans la cavité de la SBE-β-CD qui empêche l'interaction directe de la quercétine avec les milieux biologiques.

Les résultats obtenus dans cette étude sont tout à fait en corrélation avec d'autres études montrant la stabilité élevée de la quercétine encapsulée dans les CDs, nanoparticules lipidiques, poloxamères et chitosanes par rapport à sa forme libre (Ahmad et al., 2016 ; Anandam & Selvamuthukumar, 2014 ; Caddeo et al., 2017; Fang et al., 2011; Fraile et al., 2014).

Ces résultats montrent que les CDs et les liposomes peuvent être des systèmes efficaces de transport de la quercétine à travers le tractus gastro-intestinal en augmentant ainsi son absorption intestinale.

VI. Etude de l'activité antioxydante

Enfin, nous avons examiné l'effet de l'encapsulation par les CDs sur le pouvoir de piégeage du DPPH[•] par le nérolidol et la quercétine. À noter que l'activité antioxydante des deux composés n'a pas pu être évaluée en présence des formulations liposomiales à cause de l'absorbance des liposomes dans la même plage de mesure du DPPH[•]. L'activité antioxydante (AA %) a été calculée en absence et en présence de CDs selon l'équation 19 (Chapitre 3). Les valeurs de AA % obtenues sont illustrées dans la **Figure 64**.



Figure 64 : Diagrammes montrant l'activité antioxydante du nérolidol (a) et de la quercétine (b) en l'absence et en présence de CDs.

En comparant l'activité antioxydante des deux molécules, la quercétine s'est montrée le composé le plus actif (**Figure 64**), ce qui confirme les données de la littérature (Arts et al., 2004 ; Kim et al., 2013 ; Kukongviriyapan et al., 2012 ; Luangaram et al., 2007). Les valeurs de AA% sont de 11 % et 90 % pour le nérolidol et la quercétine, respectivement. En effet, l'activité anti-radicalaire potentielle de la quercétine est attribuée : i) au motif catéchol dans le noyau B, ii) à la double liaison en position 2,3 en conjugaison avec la fonction carbonyle dans le noyau C (le radical formé suite à la réaction de la quercétine avec le DPPH• est stabilisé par la résonnance de la double liaison avec la fonction carbonyle), iii) aux groupements OH en positions 3 et 5 de l'hétérocycle (Heijnen et al., 2001; Silva et al., 2002). D'autre part, nous pouvons remarquer que la complexation par les dérivés de la β -CD a entrainé une augmentation de l'activité n'est observée en présence de CDs natives (**Figure 64**). Ceci peut être dû au fait que la solubilisation des deux composés par les dérivés de la β -CD est meilleure que celle par les CDs natives. En
conséquent, l'interaction du nérolidol et de la quercétine avec le DPPH[•] sera favorisée vue la présence d'une quantité plus élevée de ces composés en solution. De plus, nous pouvons constater qu'après la complexation par les CDs, les groupements actifs restent disponibles et peuvent ainsi réagir avec le DPPH[•]. Toute augmentation observée dans l'activité antioxydante est due probablement aux liaisons hydrogènes intermoléculaires entre le nérolidol ou la quercétine et les hydroxyles des CDs. Parmi les dérivés de la β -CD, les complexes d'inclusion RAMEB/composés actifs possèdent l'activité antioxydante la plus élevée par rapport aux autres complexes (**Figure 64**).

En conclusion, ces résultats montrent que les CDs permettent de conserver ou augmenter l'activité antioxydante du nérolidol et de la quercétine. Des résultats similaires sont reportés dans la littérature pour la quercétine (Alvarez-Parrilla et al., 2005; Calabrò et al., 2004; Jullian et al., 2007). À notre connaissance, c'est la première fois que l'effet de l'encapsulation par les CDs a été évalué pour le nérolidol.

Conclusion générale et perspectives

Conclusions et Perspectives

Ce travail de thèse s'intègre dans le contexte du développement de nouveaux systèmes d'encapsulation mixtes à base de CDs et de liposomes afin de lever les verrous technologiques limitant l'incorporation des composés bioactifs dans l'alimentation.

L'objectif de ce travail était de trouver la formulation adéquate pour l'encapsulation du nérolidol et de la quercétine dans les CDs, LCs et DCLs. Le choix de ces molécules a été guidé par leurs propriétés biologiques intéressantes, leur abondance dans de nombreux produits alimentaires et leur non-toxicité. De plus, à notre connaissance, aucune étude n'avait été menée sur l'encapsulation du sesquiterpene nérolidol dans les CDs et les liposomes.

Dans la première phase de caractérisation physico-chimique des complexes d'inclusion, nous avons mis en évidence pour la première fois la formation de complexes d'inclusion entre les CDs natives et leurs dérivés et le nérolidol (pur ou dans l'HE de Cabreuva) en solution et à l'état solide. De plus, nous avons confirmé les résultats de la littérature concernant la complexation de la quercétine par les CDs. Pour chacun des complexes d'inclusion, les paramètres suivants ont été déterminés : K_f, CE et augmentation de la solubilité. La teneur en nérolidol et l'efficacité d'encapsulation pour les complexes d'inclusion CD/Ner solide ont été également obtenues. Enfin, des études expérimentales et théoriques révélant les orientations possibles du nérolidol dans la cavité des CDs ont été menées.

Ces études ont montré l'existence de complexes d'inclusion (CD/Ner ou CD/Quer) stables de stœchiométrie 1:1 ainsi qu'une capacité accrue des CDs à augmenter la solubilité de ces molécules. En effet, les dérivés de la β -CD ont démontré une meilleure capacité de solubilisation que les CDs natives, ce qui est reliée principalement à leur solubilité aqueuse élevée. D'autre part, nous avons observé une corrélation entre la K_f et la géométrie de l'invité où l'isomère trans du nérolidol était plus efficacement incorporé dans la cavité des CDs que l'isomère cis. De plus, des analyses par TOC ont montré la capacité de l'HP- β -CD à solubiliser l'HE de Cabreuva contenant majoritairement du trans-nérolidol. La spectroscopie RMN et les études de modélisation moléculaire ont permis d'élaborer la structure du nérolidol dans la cavité de la CD. Cette étude a également mis en évidence une dépendance de l'efficacité d'encapsulation et la teneur en nérolidol en fonction du rapport molaire CD:Ner durant la préparation des complexes d'inclusion à l'état solide.

La deuxième phase de ce travail a porté sur la préparation et la caractérisation des LCs encapsulant la quercétine à partir de différents types de phospholipides (Lipoid E80, Lipoid S100 et Phospholipon 90H) afin de trouver le meilleur phospholipide répondant aux caractéristiques des liposomes visés. Les liposomes formés à partir du Lipoid E80 ont assuré une meilleure distribution de taille, une EE et un RE élevés et une stabilité physicochimique supérieure en comparaison avec les autres types de liposomes. Les Lipoid E80-liposomes encapsulant la quercétine présentent majoritairement une taille de l'ordre du nanomètre alors qu'une population liposomiale de taille micrométrique a été généralement observée pour le Lipoid S100 et Phospholipon 90H. En outre, le RE de la quercétine dans les liposomes composés de phospholipides insaturés a été supérieur à ceux composés de phospholipides saturés. Ceci peut être dû à la température élevée utilisée pendant la préparation des liposomes constitués de Phospholipon 90H aboutissant probablement à la dégradation de la quercétine sous l'effet de la chaleur. Les résultats de photostabilité ont montré que les Lipoid E80 liposomes protègent plus efficacement la quercétine contre les irradiations UV que les deux autres types de liposomes. De même, les liposomes formés de Lipoid E80 se sont avérés plus stables à 4 °C pendant 12 mois de stockage que ceux constitués de Lipoid S100 et Phospholipon 90H. Ces études ont prouvé que la composition lipidique et la présence du cholestérol peut influencer les caractéristiques des liposomes. La présence de la phosphatidyléthanolamine uniquement dans la composition des Lipoid E80 joue un rôle important dans la stabilité de ces derniers. En effet, ce type de phospholipides confère à la membrane une surface de charge négative élevée ce qui diminue la possibilité d'agrégation des liposomes et donc leur assure une meilleure distribution de taille par rapport au deux autres types de formulations. Par la suite, des études de rigidité par AFM ont été réalisées afin d'expliquer l'effet de la composition sur la stabilité des liposomes. Les résultats de rigidité ont montré que la stabilité des vésicules lipidiques pourrait dépendre de la présence de la phosphatidyléthanolamine, du degré de saturation des chaînes d'acide gras et du cholestérol. Grâce aux liaisons hydrogènes qui se forment entre les petites têtes polaires de la phosphatidyléthanolamine, la membrane des Lipoid E80-liposomes a été démontrée la plus rigide suivie par celle des Lipoid S100- et Phospholipon 90H-liposomes. La présence du cholestérol dans les liposomes formés par les lipides insaturés pourrait rendre la membrane plus rigide que celle composée de lipides saturés. Ceci révèle l'influence de la rigidité sur la stabilité des liposomes : plus la membrane est rigide, meilleure est la stabilité.

Dans la troisième phase de notre étude, le nérolidol et la quercétine ont été encapsulés dans les LCs et les DCLs composés de Lipoid E80. Afin d'obtenir un système DCL adéquat

pour les deux composés, les complexes d'inclusion HP-β-CD/Ner (à différents rapports molaires CD:Ner) et SBE-β-CD/Quer (au rapport molaire 5:1 CD:Quer) ont été choisis pour être incorporer dans la phase aqueuse des liposomes. Le choix de ces CDs repose sur leur capacité de complexation élevée vis-à-vis des deux composés, leur solubilité accrue dans l'eau (>500 mg/mL) ainsi que leur faible toxicité envers les membranes biologiques par rapport aux CDs méthylées. La caractérisation de ces systèmes a été ensuite menée en termes de taille, d'efficacité et de rendement d'encapsulation. Les résultats ont montré que l'incorporation du nérolidol et de la quercétine a augmenté la taille des LCs ou DCLs qui leurs constituent, vue l'insertion de ces molécules hydrophobes dans la bicouche lipidique. De plus, l'ajout du nérolidol à différents rapports molaires Lipoid E80:Ner a diminué de façon significative le pourcentage de la population nanométrique en comparaison avec les liposomes témoins. La distribution de taille des DCLs encapsulant le nérolidol a été affectée par le rapport molaire CD:Ner. Aux rapports molaires élevés (5:1 et 10:1), une distribution de taille des DCLs proche de celle des liposomes témoins a été observée alors qu'une distribution plus large est obtenue aux faibles rapports molaires (1:1 et 2,5:1). Ceci peut être attribué à une meilleure solubilisation du nérolidol en présence de concentrations élevées de HP-β-CD. Concernant la quercétine, l'encapsulation du complexe d'inclusion SBE-\beta-CD/Quer dans les liposomes a abouti à une augmentation de la taille et du pourcentage de la population micrométrique des liposomes, à cause de la charge négative de cette CD qui perturbe l'assemblage des lipides.

Par ailleurs, les LCs ont présenté des valeurs d'EE et de RE du nérolidol et de la quercétine les plus élevées (> 97 %). Les DCLs formés à partir de faibles rapports molaires HP- β -CD:Ner ont encapsulé très efficacement le nérolidol (des valeurs supérieures à 92 % ont été obtenues). Toutefois cette capacité a diminué aux rapports molaires élevés du fait de la faible capacité d'incorporation de quantités élevées de complexes d'inclusion par les liposomes au sein de la cavité aqueuse. Les mêmes résultats ont été obtenus pour la quercétine.

Dans la dernière partie de ce travail, nous avons évalué, in vitro, l'influence de l'encapsulation sur la libération, la photostabilité, la stabilité dans les milieux gastrointestinaux ainsi que sur l'activité antioxydante du nérolidol et de la quercétine. L'encapsulation par les CDs, LCs et DCLs a permis de prolonger efficacement la libération du nérolidol en solution aqueuse. Les DCLs ont été les plus efficaces parmi les autres systèmes et ceci en fonction du rapport molaire CD:Ner : en augmentant le rapport molaire , le taux de libération du nérolidol a diminué. Les études de photostabilité ont également prouvé que l'encapsulation ralentissait la dégradation du nérolidol suite à son exposition aux rayonnement UV. En effet, les résultats ont

montré qu'en augmentant la concentration en CD, l'effet protecteur vis-à-vis du nérolidol augmentait. De plus, la photodégradation du trans-nérolidol est plus lente que celle de cisnérolidol, vue la meilleure complexation de l'isomère trans par les CDs que l'isomère cis. Concernant les formulations liposomiales, les DCLs ont conféré au nérolidol une photostabilité plus élevée par rapport aux LCs vu qu'ils assurent une double encapsulation des composés. L'encapsulation dans les DCLs a assuré également une meilleure photoprotection de la quercétine que les LCs.

D'autre part, la stabilité de la quercétine dans le milieu gastrique a été améliorée efficacement suite à son encapsulation dans les CDs, LCs et DCLs. Cela permettrait d'augmenter la biodisponibilité de la molécule et donc son effet biologique.

Toutes les formulations liposomiales encapsulant le nérolidol ont été démontrées comme stables durant leur stockage à 4 °C pendant 1 an (plus de 65 % de nérolidol sont encore incorporés dans les liposomes). Enfin, les CDs ont conservé, voire amélioré, les propriétés antioxydantes du nérolidol et de la quercétine.

À partir de ces résultats, l'encapsulation permet d'envisager des systèmes de libération contrôlée ainsi que des systèmes de stockage et de conservation des molécules labiles leur permettant ainsi d'être incorporer dans les aliments.

Comme perspectives de ce travail, des études supplémentaires peuvent être envisagées :

- Nous proposons encapsuler l'HE de Cabreuva dans les LCs et DCLs afin d'étudier l'effet des constituants sur la taille des vésicules, l'efficacité d'encapsulation du trans-nérolidol (forme présente uniquement dans l'huile) ainsi que la stabilité de l'huile dans ces systèmes.

-Il serait important de suivre la libération des molécules à partir des systemes d'encapsulation dans le plasma humain à 37 °C.

-Afin d'augmenter la durée de vie des formulations liposomiales, il serait nécessaire de réaliser la lyophilisation des LCs et DCLs et d'étudier la stabilité des lyophilisats à long terme.

-Il serait intéressant de tester l'activité antimicrobienne du nérolidol et de la quercétine sous forme de complexe d'inclusion, encapsulés dans les LCs ou DCLs et de les comparer avec celle des molécules sous forme libres. Ceci dans le but de pouvoir utiliser ces molécules comme alternatives naturelles aux antioxydants et/ou antimicrobiens synthétiques.

-Des études in vivo peuvent être envisagées afin d'évaluer la toxicité du système DCL avant son incorporation dans les aliments.

Liste des travaux

Liste des travaux

Publications

Azzi, J., Danjou, P.E., Landy, D. Ruellan, S., Auezova, L., Greige-Gerges, H., Fourmentin, S. (2017). Effect of cyclodextrins complexation on solubility and photostability of nerolidol as pure compound and as main constituent of Cabreuva essential oil. Beilstein J. Org. Chem, 13, 835-844.

Azzi, J., Auezova, L., Danjou, P.E., Fourmentin, S., Greige-Gerges, H. (2017). "First evaluation of drug-in-cyclodextrin-in-liposomes as encapsulating system for nerolidol. Food Chemistry, révisé.

Azzi, J., Auezova, L., Fourmentin, S., Greige-Gerges, H. (2017). Novel findings on the effect of egg and soybean lecithin on quercetin photostability and membrane rigidity. En cours.

Communications orales

Azzi, J., Auezova, L., Danjou, P.E., Fourmentin, S., Greige-Gerges, H. : Effet de l'encapsulation dans un système mixte cyclodextrines-liposomes sur la solubilité et la libération de sesquiterpènes, 17^{ème} journées de Cyclodextrines, 6-7 Octobre 2016, Nancy, France.

Azzi, J., Jraij, A., Auezova, L., Gharib, R., Sebaaly, C., Fourmentin, S., Greige-Gerges, H.: Effect of liposomal fatty acyl chains saturation on the photostability of encapsulated biomolecules, Symposium in Phospholipids in Pharmaceutical research, 18-19 septembre 2017, Heidelberg, Germany.

Communications par affiche

Azzi, J., Auezova, L., Danjou, P.E., Fourmentin, S., Greige-Gerges, H.: Encapsulation of bioactive molecules in cyclodextrins to improve food organoleptic and nutritional properties, 4th European Conference on Cyclodextrins, Lille, France, 6-9 octobre 2015.

Azzi, J., Auezova, L., Danjou, P.E., Fourmentin, S., Greige-Gerges, H. : Amélioration des qualités nutritionnelles et organoleptiques des aliments par encapsulation de composés actifs. Les troisiemes journées Franco-Libanaise, Hadath, Liban, 29-30 octobre 2015.

Azzi, J., Auezova, L., Danjou, P.E., Fourmentin, S., Greige-Gerges, H.: Isomers of nerolidolin-cyclodextrin-in-lipid vesicles: preparation and characterization, 22nd Scientific International Conference: The Social Avenues of the Research, 14-15 Avril 2016, Kaslik, Liban.

Azzi, J., Auezova, L., Danjou, P.E., Fourmentin, S., Greige-Gerges, H.: Liposomes encapsulating nerolidol-cyclodextrin complexes as novel delivery system for sesquiterpenes, 18th international cyclodextrin symposium, 18-21 Mai 2016, Florida, Etats-Unis.

Azzi, J., Auezova, L., Danjou, P.E., Fourmentin, S., Greige-Gerges, H.: Comparison between conventional liposomes and drug-in-cyclodextrin-in-liposomes: application to flavonoids'', 18th IUFoST – World Congress of Food Science and Technology, 21-25 Aout 2016, Dublin, Ireland.

Azzi, J., Auezova, L., Danjou, P.E., Fourmentin, S., Greige-Gerges, H.: Improvement of the photostability of quercetin by encapsulation into liposomes and drug-in-cyclodextrin-in-liposomes, 23th Scientific International Conference: « La Science et la Recherche au Service de l'Homme », 6-7 Avril 2017, Hadath, Liban.

Azzi, J., Jraij, A., Auezova, L., Gharib, R., Sebaaly, C., Fourmentin, S., Greige-Gerges, H.: Effect of liposomal fatty acyl chains saturation on the photostability of encapsulated biomolecules, Symposium in Phospholipids in Pharmaceutical research, 18-19 septembre 2017, Heidelberg, Germany.

Azzi, J., Auezova, L., Fourmentin, S., Greige-Gerges, H.: Improvement of quercetin physicochemical properties by encapsulation into cyclodextrins, liposomes and the combined system DCL, 5th European Conference on Cyclodextrins, 3-6 Octobre, 2017, Lisbon, Portugal.

Références

Références

- Aalinkeel, R., Bindukumar, B., Reynolds, J. L., Sykes, D. E., Mahajan, S. D., Chadha, K. C., & Schwartz, S. A. (2008). The dietary bioflavonoid, quercetin, selectively induces apoptosis of prostate cancer cells by down-regulating the expression of heat shock protein 90. The Prostate, 68 (16), 1773–1789.
- Aditya, N. P., Macedo, A. S., Doktorovova, S., Souto, E. B., Kim, S., Chang, P.-S., & Ko, S. (2014). Development and evaluation of lipid nanocarriers for quercetin delivery: A comparative study of solid lipid nanoparticles (SLN), nanostructured lipid carriers (NLC), and lipid nanoemulsions (LNE). LWT Food Science and Technology, 59 (1), 115–121.
- Agashe, H., Sahoo, K., Lagisetty, P., & Awasthi, V. (2011). Cyclodextrin-mediated entrapment of curcuminoid 4-[3,5-bis(2-chlorobenzylidene-4-oxo-piperidine-1-yl)-4-oxo-2butenoic acid] or CLEFMA in liposomes for treatment of xenograft lung tumor in rats. Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces, 84 (2), 329–337.
- Agrawal, A. D. (2011). Pharmacological Activities of Flavonoids: A Review. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology, 4, 1394–1398.
- Aherne, S. A., & O'Brien, N. M. (2002). Dietary Flavonols: Chemistry, Food Content, and Metabolism. Nutrition, 18, 75–81.
- Ahmad, N., Banala, V. T., Kushwaha, P., Karvande, A., Sharma, S., Tripathi, A. K., ... Mishra, P. R. (2016). Quercetin-loaded solid lipid nanoparticles improve osteoprotective activity in an ovariectomized rat model: a preventive strategy for post-menopausal osteoporosis. RSC Advances, 6 (100), 97613–97628.
- Aires, A., Fernandes, C., Carvalho, R., Bennett, R. N., Saavedra, M. J., & Rosa, E. A. S. (2011). Seasonal effects on bioactive compounds and antioxidant capacity of six economically important brassica vegetables. Molecules, 16 (8), 6816–6832.
- Akbarieh, M., Besner, J. G., Galal, A., & Tawashi, R. (1992). Liposomal delivery system for the targeting and controlled release of praziquantel. Drug Development and Industrial Pharmacy, 18 (3), 303–317.
- Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y.,
 ... Kouhi, M. (2013). Liposome: classification, preparation, and applications.
 Nanoscale Research Letters, 8, 1–9.
- Al Khalaf, W., Piard, J.-C., Soda, M., Gripon, J.-C., & Desmazeaud, M. (1988). Liposomes as Proteinase Carriers for the Accelerated Ripening of Saint-Paulin Type Cheese. Journal of Food Science, 53, 1674–1679.
- Alcaro, S., Battaglia, D., & Ortuso, F. (2003). Docking experiments showing similar recognition patterns of paclitaxel when interacting with different macromolecular targets. Farmaco, 58 (9), 691–698.
- Alcaro, S., Battaglia, D., & Ortuso, F. (2004). Molecular modeling of β-cyclodextrin inclusion complexes with pharmaceutical compounds. Arkivoc, 2004 (5), 107.
- Alexopoulou, E., Georgopoulos, A., Kagkadis, K. A., & Demetzos, C. (2006). Preparation and Characterization of Lyophilized Liposomes with Incorporated Quercetin. Journal of Liposome Research, 16 (1), 17–25.
- Allen SJ, Okoko B, Martinez E, Gregorio G, & Dans LF. (2004). Probiotics for treating infectious diarrhoea. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2, 1–34.
- Allred, C. D., Allred, K. F., Ju, Y. H., Goeppinger, T. S., Doerge, D. R., & Helferich, W. G. (2004). Soy processing influences growth of estrogen-dependent breast cancer tumors. Carcinogenesis, 25 (9), 1649–1657.

- Alonso, L., Cuesta, P., Fontecha, J., Juarez, M., & Gilliland, S. E. (2009). Use of betacyclodextrin to decrease the level of cholesterol in milk fat. Journal of Dairy Science, 92 (3), 863–869.
- Alonso, L., Fontecha, F. J., Cuesta, P., Juárez, M., & Gilliland, S. E. (2010). Industrial application of β-cyclodextrin for manufacturing low cholesterol butter. Milchwissenschaft-Milk science international, 65 (1), 36-37.
- Alvarez-Parrilla, E., Rosa, L.A.D.L., Torres-Rivas, F., Rodrigo-Garcia, J., & González-Aguilar, G. A. (2005). Complexation of Apple Antioxidants: Chlorogenic Acid, Quercetin and Rutin by β-Cyclodextrin (β-CD). Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 53 (1–2), 121–129.
- Amorati, R., Foti, M. C., & Valgimigli, L. (2013). Antioxidant activity of essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61 (46), 10835–10847.
- Anandam, S., & Selvamuthukumar, S. (2014). Fabrication of cyclodextrin nanosponges for quercetin delivery: physicochemical characterization, photostability, and antioxidant effects. Journal of Materials Science, 49 (23), 8140–8153.
- Anderson, M., & Omri, A. (2004). The Effect of Different Lipid Components on the In Vitro Stability and Release Kinetics of Liposome Formulations. Drug Delivery, 11 (1), 33– 39.
- Antony, M. L., & Singh, S. V. (2011). Molecular mechanisms and targets of cancer chemoprevention by garlic-derived bioactive compound diallyl trisulfide. Indian Journal of Experimental Biology, 49 (11), 805–816.
- Anwekar, H., Patel, S., & Singhai, A. (2011). Liposome as drug carriers. International Journal of Pharmacy & Life Sciences, 2, 945–951.
- Arts, M., Sebastiaan Dallinga, J., Voss, H.-P., Haenen, G., & Bast, A. (2004). A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. Food Chemistry, 88, 567– 570.
- AS Truswell. (2002). Cereal grains and coronary heart disease. European Journal of Clinical Nutrition, 1, 1–14.
- Ashour, M., Wink, M., & Gershenzon, J. (2010). Biochemistry of Terpenoids: Monoterpenes, Sesquiterpenes and Diterpenes. Annual Plant Reviews, 40, 258–303.
- Astray, G., Gonzalez-Barreiro, C., Mejuto, J. C., Rial-Otero, R., & Simal-Gandara, J. (2009). A review on the use of cyclodextrins in foods. Food Hydrocolloids, 23, 1631–1640.
- Aune, D., Chan, D. S. M., Vieira, A. R., Rosenblatt, D. A. N., Vieira, R., Greenwood, D. C., & Norat, T. (2012). Fruits, vegetables and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. Breast Cancer Research and Treatment, 134 (2), 479–493.
- Awad, A. C., Bennink, M. R., & Smith, D. M. (1997). Composition and functional properties of cholesterol reduced egg yolk. Poultry Science, 76 (4), 649–653.
- Badr-Eldin, S. M., Elkheshen, S. A., & Ghorab, M. M. (2008). Inclusion complexes of tadalafil with natural and chemically modified β-cyclodextrins. I: Preparation and in-vitro evaluation. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 70 (3), 819– 827.
- Bais, H. P., L.Weir, T., Perry, L. G., Gilroy, S., & Vivanco, J. M. (2006). The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. The Annual Review of Plant Biology, 57, 233–266.
- Bancirova, M. (2015). Changes of the Quercetin Absorption Spectra in Dependence on Solvent. Chemistry Journal, 1 (2), 31–34.
- Bangham, A. D. (1993). Liposomes: the Babraham connection. Chemistry and Physics of Lipids, 64, 275–285.

- Barsby, T. L., Donald, A. M., & Frazier, P. J. (2001). Starch: Advances in Structure and Function. The Royal Society of Chemistry, 27-44.
- Belarbi, M., Bendimerad, S., Sour, S., Soualem, Z., Baghdad, C., Hmimed, S., ... Visioli, F. (2011). Oleaster oil positively modulates plasma lipids in humans. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59 (16), 8667–8669.
- Benshitrit, R. C., Levi, C. S., Tal, S. L., Shimoni, E., & Lesmes, U. (2012). Development of oral food-grade delivery systems: current knowledge and future challenges. Food & Function, 3 (1), 10–21.
- Berthelot, K., Estevez, Y., Deffieux, A., & Peruch, F. (2012). Isopentenyl diphosphate isomerase: A checkpoint to isoprenoid biosynthesis. Biochimie, 94, 1621–1634.
- Bigliardia, B., & Galati, F. (2013). Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. Trends in Food Science & Technology, 31, 118–129.
- Bilia, A. R., Guccione, C., Isacchi, B., Righeschi, C., Firenzuoli, F., & Bergonzi, M. C. (2014). Essential Oils Loaded in Nanosystems: A Developing Strategy for a Successful Therapeutic Approach. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2014, 1–14.
- Bischoff, S. C. (2008). Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care, 11 (6), 733–740.
- Blach, P., Fourmentin, S., Landy, D., Cazier, F., & Surpateanu, G. (2008). Cyclodextrins: a new efficient absorbent to treat waste gas streams. Chemosphere, 70 (3), 374–380.
- Boligon, A. A. (2014). Technical Evaluation of Antioxidant Activity. Medicinal Chemistry, 4 (7).
- Boots, A. W., Balk, J. M., Bast, A., & Haenen, G. R. M. M. (2005). The reversibility of the glutathionyl-quercetin adduct spreads oxidized quercetin-induced toxicity. Biochemical and Biophysical Research Communications, 338 (2), 923–929.
- Boots, A. W., Haenen, G. R. M. M., & Bast, A. (2008). Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. European Journal of Pharmacology, 585 (2–3), 325–337.
- Borghetti, G. S., Lula, I. S., Sinisterra, R. D., & Bassani, V. L. (2009). Quercetin/β-Cyclodextrin Solid Complexes Prepared in Aqueous Solution Followed by Spray-drying or by Physical Mixture. AAPS PharmSciTech, 10 (1), 235–242.
- Boris, R., Elena, T., Erich, S., Walter, J., & Gerhard, B. (2011). Cytotoxic Properties of Selected Sesquiterpene Alcohols on Human Cervix Carcinoma Cell Lines. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 14, 316–319.
- Botterweck, A. A., Verhagen, H., Goldbohm, R. A., Kleinjans, J., & van den Brandt, P. A. (2000). Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands Cohort Study. Food and Chemical Toxicology, 38 (7), 599–605.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT Food Science and Technology, 28 (1), 25–30.
- Brehm-Stecher, B. F., & Johnson, E. A. (2003). Sensitization of Staphylococcus aureus and Escherichia coli to Antibiotics by the Sesquiterpenoids Nerolidol, Farnesol, Bisabolol, and Apritone. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 47, 3357–3360.
- Breitmaier, E. (2006). Terpenes: Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.).
- Bridson, R. H., Santos, R. C. D., Al-Duri, B., McAllister, S. M., Robertson, J., & Alpar, H. O. (2006). The preparation of liposomes using compressed carbon dioxide: strategies, important considerations and comparison with conventional techniques. The Journal of Pharmacy and Pharmacology, 58 (6), 775–785.

- Briuglia, M.-L., Rotella, C., McFarlane, A., & Lamprou, D. A. (2015). Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. Drug Delivery and Translational Research, 5 (3), 231–242.
- Bucher, H. C., Hengstler, P., Schindler, C., & Meier, G. (2002). N-3 polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. The American Journal of Medicine, 112 (4), 298–304.
- Buchner, N., Krumbein, A., Rohn, S., & Kroh, L. W. (2006). Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 20 (21), 3229–3235.
- Budai, L. (2013). Liposomes for Topical Use: A Physico-Chemical Comparison of Vesicles Prepared from Egg or Soy Lecithin. Scientia Pharmaceutica, 81 (4), 1151–1166.
- Buer, C. S., Imin, N., & Djordjevic, M. A. (2010). Flavonoids: New Roles for Old Molecules. Journal of Integrative Plant Biology, 52, 98–111.
- Bureau, G., Longpré, F., & Martinoli, M.-G. (2008). Resveratrol and quercetin, two natural polyphenols, reduce apoptotic neuronal cell death induced by neuroinflammation. Journal of Neuroscience Research, 86 (2), 403–410.
- Burt, S. A., van der Zee, R., Koets, A. P., de Graaff, A. M., van Knapen, F., Gaastra, W., ... Veldhuizen, E. J. A. (2007). Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in Escherichia coli O157:H7. Applied and Environmental Microbiology, 73 (14), 4484–4490.
- Caddeo, C., Pons, R., Carbone, C., Fernàndez-Busquets, X., Cardia, M. C., Maccioni, A. M., ... Manconi, M. (2017). Physico-chemical characterization of succinyl chitosanstabilized liposomes for the oral co-delivery of quercetin and resveratrol. Carbohydrate Polymers, 157, 1853–1861.
- Cagdas, F. M., Ertugral, N., Bucak, S., & Atay, N. Z. (2011). Effect of preparation method and cholesterol on drug encapsulation studies by phospholipid liposomes. Pharmaceutical Development and Technology, 16 (4), 408–414.
- Calabrò, M. ., Tommasini, S., Donato, P., Raneri, D., Stancanelli, R., Ficarra, P., ... Gamberini, G. (2004). Effects of α- and β-cyclodextrin complexation on the physico-chemical properties and antioxidant activity of some 3-hydroxyflavones. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 35 (2), 365–377.
- Cappellani, A., Cavallaro, A., Di Vita, M., Zanghi, A., Piccolo, G., Lo Menzo, E., ... Berretta, M. (2012). Diet and pancreatic cancer: many questions with few certainties. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 16 (2), 192–206.
- Carvalho, F. A., & Santos, N. C. (2012). Atomic force microscopy-based force spectroscopy biological and biomedical applications. IUBMB Life, 64 (6), 465–472.
- Casey, P. J., Solski, P. A., Der, C. J., & Buss, J. E. (1989). p2lras is modified by a farnesyl isoprenoid. Proceedings of the National Academy of Sciences, 86, 8323–8327.
- Castro, H. T., Martínez, J. R., & Stashenko, E. (2010). Anethole Isomerization and Dimerization Induced by Acid Sites or UV Irradiation. Molecules, 15 (7), 5012–5030.
- Cavalcanti, I. M. F., Mendonça, E. A. M., Lira, M. C. B., Honrato, S. B., Camara, C. A., Amorim, R. V. S., ... Santos-Magalhães, N. S. (2011). The encapsulation of βlapachone in 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin inclusion complex into liposomes: A physicochemical evaluation and molecular modeling approach. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 44 (3), 332–340.
- Chakraborty, K. K., & Naik, S. R. (2003). Therapeutic and hemolytic evaluation of in-situ liposomal preparation containing amphotericin-beta complexed with different chemically modified beta- cyclodextrins. Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, 6 (2), 231–237.

- Chan, J. M., Wang, F., & Holly, E. A. (2005). Vegetable and fruit intake and pancreatic cancer in a population-based case-control study in the San Francisco bay area. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 14 (9), 2093–2097.
- Chan, W.-K., Tan, L. T.-H., Chan, K.-G., Lee, L.-H., & Goh, B.-H. (2016). Nerolidol: A Sesquiterpene Alcohol with Multi-Faceted Pharmacological and Biological Activities. Molecules, 21 (5), 529.
- Chen, H., Gao, J., Wang, F., & Liang, W. (2007). Preparation, Characterization and Pharmacokinetics of Liposomes-Encapsulated Cyclodextrins Inclusion Complexes for Hydrophobic Drugs. Drug Delivery, 14 (4), 201–208.
- Chen, J., Lu, W.-L., Gu, W., Lu, S.-S., Chen, Z.-P., Cai, B.-C., & Yang, X.-X. (2014). Drugin-cyclodextrin-in-liposomes: a promising delivery system for hydrophobic drugs. Expert Opinion on Drug Delivery, 11(4), 565–577.
- Chen, W., Sun, S., cao, W., Liang, Y., & Song, J. (2009). Antioxidant property of quercetin– Cr(III) complex: The role of Cr(III) ion. Journal of Molecular Structure, 918, 194–197.
- Cheynier, V., Comte, G., Lattanzio, V., & Martens, S. (2013). Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. Plant Physiology and Biochemistry, 72, 1–20.
- Chiva-Blanch, G., & Visioli, F. (2012). Polyphenols and health: Moving beyond antioxidants. Journal of Berry Research, 2, 63–71.
- Chizzola, R. (2013). Regular Monoterpenes and Sesquiterpenes (Essential Oils). Natural Products, 2973–3008.
- Chonn, A., & Cullis, P. R. (1998). Recent advances in liposome technologies and their applications for systemic gene delivery. Advanced Drug Delivery Reviews, 30, 73–83.
- Christianson, D. W. (2008). Unearthing the roots of the terpenome. Current Opinion in Chemical Biology, 12, 141–150.
- Ciobanu, A., Mallard, I., Landy, D., Brabie, G., Nistor, D., & Fourmentin, S. (2013). Retention of aroma compounds from Mentha piperita essential oil by cyclodextrins and crosslinked cyclodextrin polymers. Food Chemistry, 138 (1), 291–297.
- Ciobanu, A., Mallard, I., Landy, D., Brabie, G., Nistor, D., & Fourmentin, S. (2012). Inclusion interactions of cyclodextrins and crosslinked cyclodextrin polymers with linalool and camphor in Lavandula angustifolia essential oil. Carbohydrate Polymers, 87, 1963–1970.
- Cirri, M., Maestrelli, F., Mennini, N., & Mura, P. (2009). Influence of the preparation method on the physical-chemical properties of ketoprofen-cyclodextrin-phosphatidylcholine ternary systems. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 50 (5), 690–694.
- Clare M. Hasler. (1998). Functional Foods: Their role in disease prevention and health promotion. Food Thechnology, 52.
- Clare M. Hasler. (2002). Functional Foods: Benefits, Concerns and Challenges—A Position Paper from the American Council on Science and Health. The Journal of Nutrition, 132, 3772–3781.
- Claudine J. Kavanaugh, Paula R. Trumbo and Kathleen C. Ellwood. (2007). The U.S. Food and Drug Administration's Evidence-Based Review for Qualified Health Claims: Tomatoes, Lycopene, and Cancer. Journal of the National Cancer Institute, 99, 1074–1085.
- Comalada, M., Camuesco, D., Sierra, S., Ballester, I., Xaus, J., Gálvez, J., & Zarzuelo, A. (2005). In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF-kappaB pathway. European Journal of Immunology, 35 (2), 584–592.
- Concepcioä N Romero, Eduardo Medina, Julio Vargas, & Manuel Brenes, and Antonio De Castro. (2007). In Vitro Activity of Olive Oil Polyphenols against Helicobacter pylori. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 680–686.

Cordell, G. A. (1976). Biosynthesis of sesquiterpenes. Chemical Reviews, 76, 425–460.

- Cornwell, P. A., Barry, B. W., Bouwstra, J. A., & Gooris, G. S. (1996). Modes of action of terpene penetration enhancers in human skin; Differential scanning calorimetry, smallangle X-ray diffraction and enhancer uptake studies. International Journal of Pharmaceutics, 127 (1), 9–26.
- Costa, E. V., Menezes, L. R. A., Rocha, S. L. A., Baliza, I. R. S., Dias, R. B., Rocha, C. A. G., & Soares, M. B. P. (2015). Antitumor Properties of the Leaf Essential Oil of Zornia brasiliensis. Planta Med, 81, 563–567.
- Cramer, F. (1954). Einschlussverbindungen. Springer-Verlag.
- Crinia, G., & Morcellet, M. (2002). Synthesis and applications of adsorbents containing cyclodextrins. Journal of Separation Science, 25, 789–813.
- Dajas, F. (2012). Life ordeath: Neuroprotectiveandanticancereffectsofquercetin. Journal of Ethnopharmacology, 143, 383–396.
- Dall'Acqua, S., Miolo, G., Innocenti, G., & Caffieri, S. (2012). The Photodegradation of Quercetin: Relation to Oxidation. Molecules, 17 (12), 8898–8907.
- Dangles, O. (2012). Antioxidant Activity of Plant Phenols: Chemical Mechanisms and Biological Significance. Current Organic Chemistry, 16, 692–714.
- DanMi, Y., SuYao, X., ChunYi, T., Lin, C., & XuanMing, L. (2007). Dialdehyde starch nanoparticles: Preparation and application in drug carrier. Chinese Science Bulletin, 52, 2913–2918.
- Davis, M. E., & Brewster, M. E. (2004). Cyclodextrin-based pharmaceutics: past, present and future. Nature Reviews. Drug Discovery, 3 (12), 1023–1035.
- Day, L., Seymour, R. B., Pitts, K. F., Konczak, I., & Lundin, L. (2009). Incorporation of functional ingredients into foods. Trends in Food Science & Technology, 20 (9), 388– 395.
- Decock, G., Fourmentin, S., Surpateanu, G. G., Landy, D., Decock, P., & Surpateanu, G. (2006). Experimental and Theoretical Study on the Inclusion Compounds of Aroma Components with β-Cyclodextrins. Supramolecular Chemistry, 18, 477–482.
- Dehghan, G., & Khoshkam, Z. (2012). Tin(II)-quercetin complex: Synthesis, spectral characterisation and antioxidant activity. Food Chemistry, 131, 422–426.
- Del Valle, E. M. M. (2004). Cyclodextrins and their uses: A Review. Process Biochemistry, 39, 1033–1046.
- Delorme, N., & Fery, A. (2006). Direct method to study membrane rigidity of small vesicles based on atomic force microscope force spectroscopy. Physical Review E, 74 (3).
- Desai, K. G. H., & Park, H. J. (2005). Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. Drying Technology, 23, 1361–1394.
- De Vrese, M., Stegelmann, A., Richter, B., Fenselau, S., Laue, C., & Schrezenmeir, J. (2001). Probiotics—compensation for lactase insufficiency. American Journal of Clinical Nutrition, 73, 421–429.
- Dewick, P. M. (2002). The biosynthesis of C5–C25 terpenoid compounds. Natural Product Reports, 19, 181–222.
- Dhule, S. S., Penfornis, P., Frazier, T., Walker, R., Feldman, J., Tan, G., … Pochampally, R. (2012). Curcumin-loaded γ-cyclodextrin liposomal nanoparticles as delivery vehicles for osteosarcoma. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 8 (4), 440– 451.
- Dias, K., Nikolaou, S., & De Giovani, W. F. (2008). Synthesis and spectral investigation of Al(III) catechin/β-cyclodextrin and Al(III) quercetin/β-cyclodextrin inclusion compounds. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 70 (1), 154–161.

- Dihal, A. A., Woutersen, R. A., van Ommen, B., Rietjens, I. M. C. M., & Stierum, R. H. (2006). Modulatory effects of quercetin on proliferation and differentiation of the human colorectal cell line Caco-2. Cancer Letters, 238 (2), 248–259.
- Dinesh Kumar, V., Verma, P. R. P., & Singh, S. K. (2015). Development and evaluation of biodegradable polymeric nanoparticles for the effective delivery of quercetin using a quality by design approach. LWT - Food Science and Technology, 61 (2), 330–338.
- Dini, C., Islan, G. A., & Castro, G. R. (2014). Characterization and stability analysis of biopolymeric matrices designed for phage-controlled release. Applied Biochemistry and Biotechnology, 174 (6), 2031–2047.
- Domazou, A. S., & Luigi Luisi, P. (2002). Size distribution of spontaneously formed liposomes by the alcohol injection method. Journal of Liposome Research, 12 (3), 205–220.
- Dorman, H. J., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology, 88 (2), 308–316.
- Doyon, M., & Labrecque, J. (2008). Functional foods: a conceptual definition. British Food Journal, 110, 1133–1149.
- D'Souza, AL., Chakravarthi Rajkumar, Jonathan Cooke, & Christopher J Bulpitt. (2002). Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. British Medical Journal, 324, 1–6.
- Dua, J. S., Rana, A. C., & Bhandari, A. K. (2012). Liposome: Methods of Preparation and Applications. International Journal of Pharmaceutical Studies and Research, 3, 14–20.
- Duchêne, D., Bochot, A., & Loftsson, T. (2009). Cyclodextrins and their use in pharmacy and cosmetology. S.T.P. Pharma Pratiques, 19, 15–27.
- Dufour, V., Stahl, M., & Baysse, C. (2015). The antibacterial properties of isothiocyanates. Microbiology, 161 (2), 229–243.
- Dulińska, I., Targosz, M., Strojny, W., Lekka, M., Czuba, P., Balwierz, W., & Szymoński, M. (2006). Stiffness of normal and pathological erythrocytes studied by means of atomic force microscopy. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 66 (1–3), 1–11.
- Durak, I., Kavutcu, M., Aytaç, B., Avci, A., Devrim, E., Ozbek, H., & Oztürk, H. S. (2004). Effects of garlic extract consumption on blood lipid and oxidant/antioxidant parameters in humans with high blood cholesterol. The Journal of Nutritional Biochemistry, 15 (6), 373–377.
- Düzgüneş, N. (2003). Fluorescence assays for liposome fusion. Methods in Enzymology, 372, 260–274.
- Eastburn, S. D., & Tao, B. Y. (1994). Applications of Modified Cyclodextrins. Biothecnology Advances, 12, 325–339.
- Edward Giovannucci, Eric B. Rimm, Yan Liu, Meir J. Stampfer, Walter C. Willett. (2002). A Prospective Study of Tomato Products, Lycopene, and Prostate Cancer Risk. Journal of the National Cancer Institute, 94, 391–398.
- Eid, E. E. M., Abdul, A. B., Suliman, F. E. O., Sukari, M. A., Rasedee, A., & Fatah, S. S. (2011). Characterization of the inclusion complex of zerumbone with hydroxypropylβ-cyclodextrin. Carbohydrate Polymers, 83 (4), 1707–1714.
- El-Kattan, A. F., Asbill, C. S., Kim, N., & Michniak, B. B. (2001). The effects of terpene enhancers on the percutaneous permeation of drugs with different lipophilicities. International Journal of Pharmaceutics, 215 (1–2), 229–240.
- El Sohaimy, S. A. (2012). Functional Foods and Nutraceuticals-Modern Approach to Food Science. World Applied Sciences Journal, 20, 691–708.
- Emily Waterman, & Brian Lockwood. (2007). Active Components and Clinical Applications of Olive Oil. Alternative Medicine Review, 12, 331–342.

- Erdman, J. W. (2000). AHA Science Advisory: Soy protein and cardiovascular disease: A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the AHA. Circulation, 102 (20), 2555–2559.
- Erlund, I., Silaste, M., Alfthan, G., Rantala, M., Kesaniemi, Y., & Aro, A. (2002). Plasma concentrations of the flavonoids hesperetin, naringenin and quercetin in human subjects following their habitual diets, and diets high or low in fruit and vegetables. European Journal of Clinical Nutrition, 56, 891–898.
- Etminan, M., Takkouche, B., & Caamaño-Isorna, F. (2004). The role of tomato products and lycopene in the prevention of prostate cancer: a meta-analysis of observational studies. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 13 (3), 340–345.
- Fahey, J. W., Haristoy, X., Dolan, P. M., Kensler, T. W., Scholtus, I., Stephenson, K. K., ... Lozniewski, A. (2002). Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibioticresistant strains of Helicobacter pylori and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. Proceedings of the National Academy of Sciences, 99 (11), 7610–7615.
- Fahlman, B. M., & Krol, E. S. (2009). UVA and UVB radiation-induced oxidation products of quercetin. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 97 (3), 123–131.
- Fang, J.-Y., Hong, C.-T., Chiu, W.-T., & Wang, Y.-Y. (2001). Effect of liposomes and niosomes on skin permeation of enoxacin. International Journal of Pharmaceutics, 219, 61–72.
- Fang, R., Hao, R., Wu, X., Li, Q., Leng, X., & Jing, H. (2011). Bovine Serum Albumin Nanoparticle Promotes the Stability of Quercetin in Simulated Intestinal Fluid. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59 (11), 6292–6298.
- Farzi, A. (2012). 'Synthèse et caracterisation de nouveaux phospholipides fluorescents et electroactifs'', 2012.
- Fathi, M., Mozafari, M. R., & Mohebbi, M. (2012). Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. Trends in Food Science & Technology, 23 (1), 13– 27.
- Fathia, M., Martin, A., & McClements, D. J. (2014). Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. Trends in Food Science & Technology, 39, 18–39.
- Fatouros, D. G., Hatzidimitriou, K., & Antimisiaris, S. G. (2001). Liposomes encapsulating prednisolone and prednisolone-cyclodextrin complexes: comparison of membrane integrity and drug release. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 13 (3), 287– 296.
- Favier, V., Canova, G. R., Chanzy, H., Dufresne, A., & Gauthie, C. (1995). Nanocomposite Materials from Latex and Cellulose Whiskers. Polymers for Advanced Technologies, 6, 351–355.
- Fen-Jin He and Jin-Qiang Chen. (2013). Consumption of soybean, soy foods, soy isoflavones and breast cancer incidence: Differences between Chinese women and women in Western countries and possible mechanisms. Food Science and Human Wellness, 146– 161.
- Fenyvesi, É., Vikmon, M., & Szente, L. (2016). Cyclodextrins in Food Technology and Human Nutrition: Benefits and Limitations. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 56 (12), 1981–2004.
- Fernandes, C. M., Carvalho, R. A., Pereira da Costa, S., & Veiga, F. J. B. (2003). Multimodal molecular encapsulation of nicardipine hydrochloride by β-cyclodextrin, hydroxypropyl-β-cyclodextrin and triacetyl-β-cyclodextrin in solution. Structural studies by 1H NMR and ROESY experiments. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 18 (5), 285–296.

- Ferreyra, M. L. F., Rius, S., & Casati, P. (2012). Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. Frontiers in Plant Science, 3, 1–15.
- Ferry, D. R., Smith, A., Malkhandi, J., Fyfe, D. W., deTakats, P. G., Anderson, D., ... Kerr, D. J. (1996). Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research, 2 (4), 659–668.
- Fielding, R. M. (1991). Liposomal drug delivery. Advantages and limitations from a clinical pharmacokinetic and therapeutic perspective. Clinical Pharmacokinetics, 21 (3), 155–164.
- Fleischauer, A. T., & Arab, L. (2001). Garlic and cancer: a critical review of the epidemiologic literature. The Journal of Nutrition, 131 (3), 1032S–1040S.
- Fourmentin, S., Outirite, M., Blach, P., Landy, D., Ponchel, A., Monflier, E., & Surpateanu, G. (2007). Solubilisation of chlorinated solvents by cyclodextrin derivatives: a study by static headspace gas chromatography and molecular modelling. Journal of Hazardous Materials, 141 (1), 92–97.
- Fourmentin, Sophie, Ciobanu, A., Landy, D., & Wenz, G. (2013). Space filling of βcyclodextrin and β-cyclodextrin derivatives by volatile hydrophobic guests. Beilstein Journal of Organic Chemistry, 9, 1185–1191.
- Fraga, B. M. (2007). Natural sesquiterpenoids. Natural Product Reports, 24, 1350-1381.
- Fraile, M., Buratto, R., Gómez, B., Martín, Á., & Cocero, M. J. (2014). Enhanced Delivery of Quercetin by Encapsulation in Poloxamers by Supercritical Antisolvent Process. Industrial & Engineering Chemistry Research, 53 (11), 4318–4327.
- Frederiksen, L., Anton, K., Hoogevest, P. van, Keller, H. R., & Leuenberger, H. (1997). Preparation of liposomes encapsulating water-soluble compounds using supercritical carbon dioxide. Journal of Pharmaceutical Sciences, 86 (8), 921–928.
- French, D. (1957). The Schardinger dextrins. Advances in Carbohydrate Chemistry, 12, 189–260.
- Freudenberg, K., Cramer, F., Plieninger, H. 1953. Verfahren zur Herstellung von Einschlusverbindungen physiologisch wirksamer organischer Verbindungen. Knoll A.-G. Chemische Fabriken, Germany, Patent No. 895,769, 5.
- Freudenberg, k., Schaaf, E., Dumpert, G., & Ploetz, T. (1939). Neue ansichten uber die starke. Naturwiss, 27, 850–853.
- Frézard, F. (1999). Liposomes: from biophysics to the design of peptide vaccines. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 32 (2), 181–189.
- Gao, Y., Wang, Y., Ma, Y., Yu, A., Cai, F., Shao, W., & Zhai, G. (2009). Formulation optimization and in situ absorption in rat intestinal tract of quercetin-loaded microemulsion. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 71 (2), 306–314.
- 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 (1), 18–30.
- Geraets, L., Moonen, H. J. J., Brauers, K., Wouters, E. F. M., Bast, A., & Hageman, G. J. (2007). Dietary flavones and flavonoles are inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in pulmonary epithelial cells. The Journal of Nutrition, 137 (10), 2190–2195.
- Gertsch, J., Leonti, M., Raduner, S., Racz, I., Chen, J.-Z., Xie, X.-Q., ... Karsak, M. (2008). Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105, 9099–9104.
- Gharib, R., Auezova, L., Charcosset, C., & Greige-Gerges, H. (2017). Drug-in-cyclodextrin-inliposomes as a carrier system for volatile essential oil components: Application to anethole. Food Chemistry, 218, 365–371.

- Gharib, R., Greige-Gerges, H., Fourmentin, S., Charcosset, C., & Auezova, L. (2015). Liposomes incorporating cyclodextrin-drug inclusion complexes: Current state of knowledge. Carbohydrate Polymers, 129, 175–186.
- Gharib, R., Greige-Gerges, H., Jraij, A., Auezova, L., & Charcosset, C. (2016). Preparation of drug-in-cyclodextrin-in-liposomes at a large scale using a membrane contactor: Application to trans-anethole. Carbohydrate Polymers, 154, 276–286.
- Giampieri, F., Tulipani, S., Alvarez-Suarez, J. M., Quiles, J. L., Mezzetti, B., & Battino, M. (2012). The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health. Nutrition, 28 (1), 9–19.
- Gibellini, L., Pinti, M., Nasi, M., Montagna, J. P., De Biasi, S., Roat, E., ... Cossarizza, A. (2011). Quercetin and Cancer Chemoprevention, Evid Based Complement Alternat Med., 2011, 1-15.
- Gillet, A., Grammenos, A., Compère, P., Evrard, B., & Piel, G. (2009). Development of a new topical system: drug-in-cyclodextrin-in-deformable liposome. International Journal of Pharmaceutics, 380 (1–2), 174–180.
- Giovannucci, E., Ascherio, A., Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., & Willett, W. C. (1995). Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. Journal of the National Cancer Institute, 87 (23), 1767–1776.
- Gómez-Hens, A., & Fernández-Romero, J. M. (2006). Analytical methods for the control of liposomal delivery systems. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 25 (2), 167–178.
- Goncalves, O., Pereira, R., alves, F. G., Mendo, S., & Coimbra, M. A. (2011). Evaluation of the mutagenicity of sesquiterpenic compounds and their influence on the susceptibility towards antibiotics of two clinically relevant bacterial strains. Mutation Research, 723, 18–25.
- Goniotaki, M., Hatziantoniou, S., Dimas, K., Wagner, M., & Demetzos, C. (2004). Encapsulation of naturally occurring flavonoids into liposomes: physicochemical properties and biological activity against human cancer cell lines. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 56 (10), 1217–1224.
- González, C. A., Pera, G., Agudo, A., Bueno-de-Mesquita, H. B., Ceroti, M., Boeing, H., ... Riboli, E. (2006). Fruit and vegetable intake and the risk of stomach and oesophagus adenocarcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-EURGAST). International Journal of Cancer, 118 (10), 2559–2566.
- Gould, G. W. (1996). Industry Perspectives on the Use of Natural Antimicrobials and Inhibitors for Food Applications. Journal of Food Protection, 59, 82–86.
- Grabmann, J. (2005). Terpenoids as Plant Antioxidants. Vitamins and Hormones, 72, 505–535.
- Graefe, E. U., Wittig, J., Mueller, S., Riethling, A. K., Uehleke, B., Drewelow, B., ... Veit, M. (2001). Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. Journal of Clinical Pharmacology, 41 (5), 492–499.
- Gregoriadis, G. (1995). Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. Trends in Biotechnology, 13 (12), 527–537.
- Griffiths, G., Trueman, L., Crowther, T., Thomas, B., & Smith, B. (2002). Onions-a global benefit to health. Phytotherapy Research, 16 (7), 603–615.
- Groppo, F. C., Ramacciato, J. C., Motta, R. H. L., Ferraresi, P. M., & Sartoratto, A. (2007). Antimicrobial activity of garlic against oral streptococci. International Journal of Dental Hygiene, 5 (2), 109–115.
- Gugler, R., Leschik, M., & Dengler, H. J. (1975). Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses. European Journal of Clinical Pharmacology, 9 (2–3), 229– 234.

- Guha, S. K., Ansari, S., Anand, S., Farooq, A., Misro, M. M., & Sharma, D. N. (1985). Contraception in male monkeys by intra-vas deferens injection of a pH lowering polymer. Contraception, 32 (1), 109–118.
- Ha, H.-K., Kim, J. W., Lee, M.-R., & Lee, W.-J. (2013). Formation and characterization of quercetin-loaded chitosan oligosaccharide/β-lactoglobulin nanoparticle. Food Research International, 52 (1), 82-90.
- Hada, T., Shiraishi, Y. A., Furuse, S., Inoue, Y., & Hamashima, H. (2003). Inhibitory effects of terpenes on the growth of Staphylococcus aureus. Natural Medicines, 57, 64–67.
- Hădărugă, D. I., Hădărugă, N. G., Costescu, C. I., David, I., & Gruia, A. T. (2014). Thermal and oxidative stability of the Ocimum basilicum L. essential oil/β-cyclodextrin supramolecular system. Beilstein Journal of Organic Chemistry, 10, 2809–2820.
- Hager, A. A., De Paoli, T., Ihlo, J. E., Farach, H. A., & Poole, C. P. (1993). Stability study of lecithin liposomes during storage using ESR. Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy, 49 (13), 1999–2005.
- Hagiwara, Y., Arima, H., Hirayama, F., & Uekama, K. (2006). Prolonged Retention of Doxorubicin in Tumor Cells by Encapsulation of γ-Cyclodextrin Complex in Pegylated Liposomes. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 56 (1–2), 65– 68.
- Hamilton, R. L., Goerke, J., Guo, L. S., Williams, M. C., & Havel, R. J. (1980). Unilamellar liposomes made with the French pressure cell: a simple preparative and semiquantitative technique. Journal of Lipid Research, 21 (8), 981–992.
- Hans-Peter Keiss, Verena M. Dirsch, Thomas Hartung, Thomas Haffner, & Laurence Trueman, Jacques Auger, Re´mi Kahane and Angelika M. Vollmar. (2003). Garlic (Allium sativum L.) Modulates Cytokine Expression in Lipopolysaccharide-Activated Human Blood Thereby Inhibiting NF-B Activity. The Journal of Nutrition, 133, 2171–2175.
- Hara, K., Mikuni, K., Hara, K., & Hashimoto, H. (2002). Effects of Cyclodextrins on Deodoration of "Aging Odor". Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 44, 241–245.
- Hasler, C. M. (1998). Functional Foods: Their role in disease prevention and health promotion. Food Thechnology, 52, 146-149.
- Hatzi, P., Mourtas, S., Klepetsanis, P. G., & Antimisiaris, S. G. (2007). Integrity of liposomes in presence of cyclodextrins: effect of liposome type and lipid composition. International Journal of Pharmaceutics, 333 (1–2), 167–176.
- Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacology & Therapeutics, 96, 67–202.
- Hayashi, N., Nakata, Y., & Yazaki, A. (2004). New Findings on the Structure-Phototoxicity Relationship and Photostability of Fluoroquinolones with Various Substituents at Position 1. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48 (3), 799–803.
- Hazra, M., Dasgupta Mandal, D., Mandal, T., Bhuniya, S., & Ghosh, M. (2015). Designing polymeric microparticulate drug delivery system for hydrophobic drug quercetin. Saudi Pharmaceutical Journal, 23 (4), 429–436.
- Hedges, A. R. (1998). Industrial Applications of Cyclodextrins. Chemical Reviews, 98 (5), 2035–2044.
- Heijnen, C. G., Haenen, G. R. M., Vekemans, J. A. J., & Bast, A. (2001). Peroxynitrite scavenging of flavonoids: structure activity relationship. Environmental Toxicology and Pharmacology, 10 (4), 199–206.
- Heller, K. J. (2001). Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. The American Journal of Clinical Nutrition, 73, 374S–379S.

- Henriksen, J., Rowat, A. C., Brief, E., Hsueh, Y. W., Thewalt, J. L., Zuckermann, M. J., & Ipsen, J. H. (2006). Universal Behavior of Membranes with Sterols. Biophysical Journal, 90, 1639–1649.
- Hermansen, K., Dinesen, B., Hoie, L. H., Morgenstern, E., & Gruenwald, J. (2003). Effects of soy and other natural products on LDL:HDL ratio and other lipid parameters: a literature review. Advances in Therapy, 20 (1), 50–78.
- Higuchi, T., & Connors, K. A. (1965). Phase Solubility Techniques. Advanced Analytical Chemistry of Instrumentation, 4, 117–212.
- Hollman, P. C., van Trijp, J. M., Buysman, M. N., van der Gaag, M. S., Mengelers, M. J., de Vries, J. H., & Katan, M. B. (1997). Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. FEBS Letters, 418 (1–2), 152–156.
- Holzapfel, N. P., Holzapfel, B. M., Champ, S., Feldthusen, J., Clements, J., Hutmacher, D. W. (2013). The Potential Role of Lycopene for the Prevention and Therapy of Prostate Cancer: From Molecular Mechanisms to Clinical Evidence. International Journal of Molecular Sciences, 14, 14620–14646.
- Hsieh, Y.-F., Chen, T.-L., Wang, Y.-T., Chang, J.-H., & Chang, H.-M. (2002). Properties of Liposomes Prepared with Various Lipids. Journal of Food Science, 67 (8), 2808–2813.
- Hsing, A. W., Chokkalingam, A. P., Gao, Y.-T., Madigan, M. P., Deng, J., Gridley, G., & Fraumeni, J. F. (2002). Allium vegetables and risk of prostate cancer: a populationbased study. Journal of the National Cancer Institute, 94 (21), 1648–1651.
- Hu, S., Niu, M., Hu, F., Lu, Y., Qi, J., Yin, Z., & Wu, W. (2013). Integrity and stability of oral liposomes containing bile salts studied in simulated and ex vivo gastrointestinal media. International Journal of Pharmaceutics, 441 (1–2), 693–700.
- Huang, M., Su, E., Zheng, F., & Tan, C. (2017). Encapsulation of flavonoids in liposomal delivery systems: the case of quercetin, kaempferol and luteolin. Food & Funcion, 8 (9), 3198–3208.
- Igual, M., García-Martínez, E., Camacho, M. M., & Martínez-Navarrete, N. (2011). Changes in flavonoid content of grapefruit juice caused by thermal treatment and storage. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 12, 153–162.
- Immordino, M. L., Dosio, F., & Cattel, L. (2006). Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. International Journal of Nanomedicine, 1, 297–315.
- Ingrid Herr, and Markus W. Büchler. (2010). Dietary constituents of broccoli and other cruciferous vegetables: Implications for prevention and therapy of cancer. Cancer Treatment Reviews, 36, 377–383.
- Inoue, Y., Shiraishi, A., Hada, T., Hirose, K., & Hamashima, H. (2004). The antibacterial effects of terpene alcohols on Staphylococcus aureus and their mode of action. FEMS Microbiology Letters, 237, 325–331.
- Ioele, G., De Luca, M., & Ragno, G. (2014). Photostability of barnidipine in combined cyclodextrin-in-liposome matrices. Future Medicinal Chemistry, 6 (1), 35–43.
- Itthisoponkul, T., Mitchell, J. R., Taylor, A. J., & Farhat, I. A. (2007). Inclusion complexes of tapioca starch with Xavour compounds. Carbohydrate Polymers, 69, 106–115.
- 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 (3), 228–243.
- Jain, Akhlesh Kumar, Khar, R. K., Ahmed, F. J., & Diwan, P. V. (2008). Effective insulin delivery using starch nanoparticles as a potential trans-nasal mucoadhesive carrier. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 69 (2), 426–435.

- Jain, Amit K., Thanki, K., & Jain, S. (2013). Co-encapsulation of Tamoxifen and Quercetin in Polymeric Nanoparticles: Implications on Oral Bioavailability, Antitumor Efficacy, and Drug-Induced Toxicity. Molecular Pharmaceutics, 10 (9), 3459–3474.
- Jain, R., Dandekar, P., Loretz, B., Melero, A., Stauner, T., Wenz, G., ... Lehr, C.-M. (2011). Enhanced cellular delivery of idarubicin by surface modification of propyl starch nanoparticles employing pteroic acid conjugated polyvinyl alcohol. International Journal of Pharmaceutics, 420 (1), 147–155.
- Jain, S. K., Gupta, Y., Jain, A., & Bhola, M. (2007). Multivesicular liposomes bearing celecoxib-beta-cyclodextrin complex for transdermal delivery. Drug Delivery, 14 (6), 327–335.
- Jangde, R., & Singh, D. (2016). Preparation and optimization of quercetin-loaded liposomes for wound healing, using response surface methodology. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 44 (2), 635–641.
- Jeffery, E. H., & Keck, A.-S. (2008). Translating knowledge generated by epidemiological and in vitro studies into dietary cancer prevention. Molecular Nutrition & Food Research, 52 (Suppl 1), S7-17.
- Jenkins, A. L., Jenkins, D. J. A., Zdravkovic, U., Würsch, P., & Vuksan, V. (2002). Depression of the glycemic index by high levels of beta-glucan fiber in two functional foods tested in type 2 diabetes. European Journal of Clinical Nutrition, 56 (7), 622–628.
- Jeon, Y.-J., Vasanthan, T., Temellib, F., & Song, B.-K. (2003). The suitability of barley and corn starches in their native and chemically modified forms for volatile meat flavor encapsulation. Food Research International, 36, 349–355.
- Jeong, J.-H., An, J. Y., Kwon, Y. T., Rhee, J. G., & Lee, Y. J. (2009). Effects of low dose quercetin: cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. Journal of Cellular Biochemistry, 106 (1), 73–82.
- Joguparthi, V., & Anderson, B. D. (2008). Effect of cyclodextrin complexation on the liposome permeability of a model hydrophobic weak Acid. Pharmaceutical Research, 25 (11), 2505–2515.
- John L. Harwood, & Parveen Yaqoob. (2002). Nutritional and health aspects of olive oil. European Journal of Lipid Science and Technology, 104, 685–697.
- Johnson, S. M., Bangham, A. D., Hill, M. W., & Korn, E. D. (1971). Single bilayer liposomes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 233 (3), 820–826.
- Joye, I. J., & McClements, D. J. (2014). Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 19 (5), 417–427.
- Juge, N., Mithen, R. F., & Traka, M. (2007). Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS, 64 (9), 1105–1127.
- Jullian, C., Moyano, L., Yañez, C., & Olea-Azar, C. (2007). Complexation of quercetin with three kinds of cyclodextrins: An antioxidant study. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 67 (1), 230–234.
- Justo, O. R., & Moraes, A. M. (2005). Kanamycin incorporation in lipid vesicles prepared by ethanol injection designed for tuberculosis treatment. The Journal of Pharmacy and Pharmacology, 57 (1), 23–30.
- Kale, R., Saraf, M., Juvekar, A., & Tayade, P. (2006). Decreased B16F10 melanoma growth and impaired tumour vascularization in BDF1 mice with quercetin-cyclodextrin binary system. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 58 (10), 1351–1358.
- Kamper, S. L., & Fennema, O. (1984). Water Vapor Permeability of Edible Bilayer Films. Journal of Food Science, 49, 1478–1481.

- Karn, P. R., Cho, W., Park, H.-J., Park, J.-S., & Hwang, S.-J. (2013). Characterization and stability studies of a novel liposomal cyclosporin A prepared using the supercritical fluid method: comparison with the modified conventional Bangham method. International Journal of Nanomedicine, 8, 365-377.
- Kaschula, C. H., Hunter, R., Hassan, H. T., Stellenboom, N., Cotton, J., Zhai, X. Q., & Parker, M. I. (2011). Anti-proliferation activity of synthetic ajoene analogues on cancer celllines. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 11 (3), 260–266.
- Kawaguchi, K., Matsumoto, T., & Kumazawa, Y. (2011). Effects of antioxidant polyphenols on TNF-alpha-related diseases. Current Topics in Medicinal Chemistry, 11 (14), 1767– 1779.
- Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., & Skarmoutsou, N. (2012). Health Benefits of probiotics: A Review. Nutrition, 2013.
- Kfoury, M., Auezova, L., Fourmentin, S., & Greige-Gerges, H. (2014). Investigation of monoterpenes complexation with hydroxypropyl-β- cyclodextrin. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 80, 51–60.
- Kfoury, M., Auezova, L., Greige-Gerges, H., & Fourmentin, S. (2016). Development of a Total Organic Carbon method for the quantitative determination of solubility enhancement by cyclodextrins: Application to essential oils. Analytica Chimica Acta, 918, 21–25.
- Kfoury, M., Auezova, L., Greige-Gerges, H., Ruellan, S., & Fourmentin, S. (2014). Cyclodextrin, an efficient tool for trans-anethole encapsulation: chromatographic, spectroscopic, thermal and structural studies. Food Chemistry, 164, 454–461.
- Kfoury, M., Balan, R., Landy, D., Nistor, D., & Fourmentin, S. (2015). Investigation of the complexation of essential oil components with cyclodextrins. Supramolecular Chemistry, 27 (9), 620–628.
- Kfoury, M., Landy, D., Auezova, L., Greige-Gerges, H., & Fourmentin, S. (2014). Effect of cyclodextrin complexation on phenylpropanoids' solubility and antioxidant activity. Beilstein Journal of Organic Chemistry, 10, 2322–2331.
- Khaled, K. A., El-Sayed, Y. M., & Al-Hadiya, B. M. (2003). Disposition of the Flavonoid Quercetin in Rats After Single Intravenous and Oral Doses. Drug Development and Industrial Pharmacy, 29 (4), 397–403.
- Kim, B.-H., Choi, J. S., Yi, E. H., Lee, J.-K., Won, C., Ye, S.-K., & Kim, M.-H. (2013). Relative antioxidant activities of quercetin and its structurally related substances and their effects on NF-κB/CRE/AP-1 signaling in murine macrophages. Molecules and Cells, 35 (5), 410–420.
- Kim, Haesung, Seo, E.-M., Sharma, A. R., Ganbold, B., Park, J., Sharma, G., ... Nam, J.-S. (2013). Regulation of Wnt signaling activity for growth suppression induced by quercetin in 4T1 murine mammary cancer cells. International Journal of Oncology, 43 (4), 1319–1325.
- Kim, Hyunmyung, Jeong, K., Lee, S., & Jung, S. (2002). Molecular dynamics simulation of cyclosophoroheptadecaose (Cys-A). Journal of Computer-Aided Molecular Design, 16 (8–9), 601–610.
- Kimura, T., Fujisawa, M., Nakano, Y., Kamiyama, T., Otsu, T., Maeda, M., & Takagi, S. (2007). Calorimetric study on inclusion of some alcohols into α-cyclodextrin cavities. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 90 (2), 581–585.
- Kirby, C., & Gregoriadis, G. (1983). The effect of lipid composition of small unilamellar liposomes containing melphalan and vincristine on drug clearance after injection into mice. Biochemical Pharmacology, 32 (4), 609–615.
- Kogen, H., Tago, K., Arai, M., Minami, E., Masuda, K., & Akiyama, T. (1999). A Highly Stereoselective Synthesis of Plaunotol and Its Thiourea Derivatives as Potent

Antibacterial Agents against Helicobacter Pylori. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 9, 1347–1350.

- Kojuri, J., Vosoughi, A. R., & Akrami, M. (2007). Effects of anethum graveolens and garlic on lipid profile in hyperlipidemic patients. Lipids in Health and Disease, 6.
- Kölling, A., Maldonado, C., Ojeda, F., & Diehl, H. A. (1994). Membrane fluidity of microsomal and thymocyte membranes after X-ray and UV irradiation. Radiation and Environmental Biophysics, 33 (4), 303–313.
- Kook, S., Kim, G.-H., & Choi, K. (2009). The antidiabetic effect of onion and garlic in experimental diabetic rats: meta-analysis. Journal of Medicinal Food, 12 (3), 552–560.
- Korkina, L. G. (2007). Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. Cellular and Molecular Biology, 53, 15–25.
- Kremer, J. M., Esker, M. W., Pathmamanoharan, C., & Wiersema, P. H. (1977). Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection method. Biochemistry, 16 (17), 3932–3935.
- Krishnamachari, V., Levine, L. H., & Paré, P. W. (2002). Flavonoid Oxidation by the Radical Generator AIBN: A Unified Mechanism for Quercetin Radical Scavenging. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50 (15), 4357–4363.
- Kubo, I., & Morimitsu, Y. (1995). Cytotoxicity of Green Tea Flavor Compounds against Two Solid Tumor Cells. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43, 1626–1628.
- Kudou, S., Fleury, Y., Welti, D., Magnolato, D., Uchida, T., Kitamura, K., & Okubo, K. (1991). Malonyl Isoflavone Glycosides in Soybean Seeds (Glycine max Merrill). Agricultural and Biological Chemistry 55, 2227–2233.
- Kukongviriyapan, U., Sompamit, K., Pannangpetch, P., Kukongviriyapan, V., & Donpunha, W. (2012). Preventive and therapeutic effects of quercetin on lipopolysaccharideinduced oxidative stress and vascular dysfunction in mice. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 90 (10), 1345–1353.
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. The Scientific World Journal, 2013, 1–16.
- Kunastitchai, S., Pichert, L., Sarisuta, N., & Müller, B. W. (2006). Application of aerosol solvent extraction system (ASES) process for preparation of liposomes in a dry and reconstitutable form. International Journal of Pharmaceutics, 316 (1–2), 93–101.
- Kurkov, S. V., & Loftsson, T. (2013). Cyclodextrins. International Journal of Pharmaceutics, 453 (1), 167–180.
- Kyrikou, I., Georgopoulos, A., Hatziantoniou, S., & Mavromoustakos, T. (2005). A comparative study of the effects of cholesterol and sclareol, a bioactive labdane type diterpene, on phospholipid bilayers. Chemistry and Physics of Lipids, 133, 125–134.
- Lal, R., Ramachandran, S., & Arnsdorf, M. F. (2010). Multidimensional Atomic Force Microscopy: A Versatile Novel Technology for Nanopharmacology Research. The AAPS Journal, 12 (4), 716–728.
- Landi-Librandi, A. P., Chrysostomo, T. N., Caleiro Seixas Azzolini, A. E., Marzocchi-Machado, C. M., de Oliveira, C. A., & Lucisano-Valim, Y. M. (2012). Study of quercetin-loaded liposomes as potential drug carriers: in vitro evaluation of human complement activation. Journal of Liposome Research, 22 (2), 89–99.
- Landy, D., Fourmentin, S., Salome, M., & Surpateanu, G. (2000). Analytical Improvement in Measuring Formation Constants of Inclusion Complexes between β-Cyclodextrin and Phenolic Compounds. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 38, 187–198.
- Landy, D., Tetart, F., Truant, E., Blach, P., Fourmentin, S., & Surpateanu, G. (2007). Development of a competitive continuous variation plot for the determination of

inclusion compounds stoichiometry. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 57 (1–4), 409–413.

- Lange, B. M., & Ahkami, A. (2013). Metabolic engineering of plant monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes—current status and future opportunities. Plant Biotechnology Journal, 11, 169–196.
- Laouini, A., Jaafar-Maalej, C., Limayem-Blouza, I., Sfar, S., Charcosset, C., & Fessi, H. (2012). Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. Journal of Colloid Science and Biotechnology, 1, 147–168.
- Lapczynski, A., Bhatia, S. P., Letizia, C. S., & Api, A. M. (2008). Fragrance material review on nerolidol (isomer unspecified). Food and Chemical Toxicology, 46, 247–250.
- Larocca, L. M., Teofili, L., Sica, S., Piantelli, M., Maggiano, N., Leone, G., & Ranelletti, F. O. (1995). Quercetin inhibits the growth of leukemic progenitors and induces the expression of transforming growth factor-beta 1 in these cells. Blood, 85 (12), 3654– 3661.
- Lasic, D. D. (1998). Novel applications of liposomes. Trends in Biotechnology, 16, 307–321.
- Latté, K. P., Appel, K.-E., & Lampen, A. (2011). Health benefits and possible risks of broccoli an overview. Food and Chemical Toxicology, 49 (12), 3287–3309.
- Laura Rubió, Maria-José Motilva & Maria-Paz Romero. (2013). Recent Advances in Biologically Active Compounds in Herbs and Spices: A Review of the Most Effective Antioxidant and Anti-Inflammatory Active Principles. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 53, 943–953.
- Law, B. A., & King, J. S. (1985). Use of liposomes for proteinase addition to Cheddar cheese. Journal of Dairy Research, 52, 183–188.
- Leaf, A., Kang, J. X., Xiao, Y.-F., & Billman, G. E. (2003). Clinical prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids and mechanism of prevention of arrhythmias by n-3 fish oils. Circulation, 107 (21), 2646–2652.
- Lee, K., Lee, J.-H., Kim, S.-I., Cho, M. H., & Lee, J. (2014). Anti-biofilm, anti-hemolysis, and anti-virulence activities of black pepper, cananga, myrrh oils, and nerolidol against Staphylococcus aureus. Applied Microbiology and Biotechnology, 98 (22), 9447–9457.
- Lee, S.-C., Lee, K.-E., Kim, J.-J., & Lim, S.-H. (2005). The Effect of Cholesterol in the Liposome Bilayer on the Stabilization of Incorporated Retinol. Journal of Liposome Research, 15 (3–4), 157–166.
- Lesmes, U., Cohen, S. H., Shener, Y., & Shimoni, E. (2009). Effects of long chain fatty acid unsaturation on the structure and controlled release properties of amylose complexes. Food Hydrocolloids, 23, 667–675.
- Lesyng, B., & McCammon, J. A. (1993). Molecular modeling methods. Basic techniques and challenging problems. Pharmacology & Therapeutics, 60 (2), 149–167.
- Li, H., Zhao, X., Ma, Y., Zhai, G., Li, L., & Lou, H. (2009). Enhancement of gastrointestinal absorption of quercetin by solid lipid nanoparticles. Journal of Controlled Release, 133 (3), 238–244.
- Li, J., Wang, X., Zhang, T., Wang, C., Huang, Z., Luo, X., & Deng, Y. (2015). A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 10 (2), 81–98.
- Li, L., Liu, R., Han, L., Jiang, Y., Liu, J., Li, Y., ... Huang, X. (2016). Structure determination of two new nerolidol-type sesquiterpenoids from the soil actinomycete Streptomyces scopuliridis. Magnetic Resonance in Chemistry: MRC, 54 (7), 606–609.
- Li, Z., Zhang, Y., Wurtz, W., Lee, J. K., Malinin, V. S., Durwas-Krishnan, S., ... Perkins, W. R. (2008). Characterization of nebulized liposomal amikacin (Arikace) as a function of droplet size. Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery, 21 (3), 245– 254.

- Liang, X., Mao, G., & Ng, K. Y. S. (2004). Mechanical properties and stability measurement of cholesterol-containing liposome on mica by atomic force microscopy. Journal of Colloid and Interface Science, 278 (1), 53–62.
- Lin, H. J., Probst-Hensch, N. M., Louie, A. D., Kau, I. H., Witte, J. S., Ingles, S. A., ... Haile, R. W. (1998). Glutathione transferase null genotype, broccoli, and lower prevalence of colorectal adenomas. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 7 (8), 647–652.
- Lino, A. C. S., Takahata, Y., & Jaime, C. (2002). α- and β-cyclodextrin complexes with n-alkyl carboxylic acids and n-alkyl p-hydroxy benzoates. A molecular mechanics study of 1:1 and 1:2 associations. Journal of Molecular Structure, 594 (3), 207–213.
- Lipinski, B. (2011). Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2011, 1–9.
- Liu, Lei, & Guo, Q.-X. (2001). The Driving Forces in the Inclusion Complexation of Cyclodextrins. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 42, 1–14.
- Liu, Liang, Tang, Y., Gao, C., Li, Y., Chen, S., Xiong, T., ... Yao, P. (2014). Characterization and biodistribution in vivo of quercetin-loaded cationic nanostructured lipid carriers. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 115, 125–131.
- Loftsson, T., & Brewster, M. E. (1996). Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. Journal of Pharmaceutical Sciences, 85 (10), 1017–1025.
- Loftsson, T., & Brewster, M. E. (2010). Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. The Journal of Pharmacy and Pharmacology, 62 (11), 1607–1621.
- Loftsson, T., & Brewster, M. E. (2012). Cyclodextrins as functional excipients: methods to enhance complexation efficiency. Journal of Pharmaceutical Sciences, 101 (9), 3019–3032.
- Loftsson, T., & Duchêne, D. (2007). Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. International Journal of Pharmaceutics, 329 (1-2), 1-11.
- Loftsson, T., Jarho, P., Másson, M., & Järvinen, T. (2005). Cyclodextrins in drug delivery. Expert Opinion on Drug Delivery, 2 (2), 335–351.
- Loftsson, T., Másson, M., & Brewster, M. E. (2004). Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. Journal of Pharmaceutical Sciences, 93 (5), 1091–1099.
- Lopez-Berestein, G., Fainstein, V., Hopfer, R., Mehta, K., Sullivan, M. P., Keating, M., ... Hersh, E. M. (1985). Liposomal amphotericin B for the treatment of systemic fungal infections in patients with cancer: a preliminary study. The Journal of Infectious Diseases, 151 (4), 704–710.
- Lorin, A., Flore, C., Thomas, A., & Brasseur, R. (2004). Les liposomes : description, fabrication et applications. Biotechnology, Agronomy, Society and Environment, 8, 163–176.
- Loukas, Y. L., Jayasekera, P., & Gregoriadis, G. (1995). Novel liposome-based multicomponent systems for the protection of photolabile agents. International Journal of Pharmaceutics, 117 (1), 85–94.
- Loukas, Y., Vraka, V., & Gregoriadis, G. (1998). Drugs, in cyclodextrins, in liposomes: A novel approach to the chemical stability of drugs sensitive to hydrolysis. International Journal of Pharmaceutics, 162, 137–142.
- Lu, L. J., Anderson, K. E., Grady, J. J., Kohen, F., & Nagamani, M. (2000). Decreased ovarian hormones during a soya diet: implications for breast cancer prevention. Cancer Research, 60 (15), 4112–4121.
- Lu, Y., Guo, T., Qi, J., Zhang, J., & Wu, W. (2012). Enhanced Dissolution and Stability of Lansoprazole by Cyclodextrin Inclusion Complexation: Preparation, Characterization, and Molecular Modeling. AAPS PharmSciTech, 13 (4), 1222–1229.

- Lu, Z., Lu, C., & Meng, Q. (2008). An inclusion complex of b-cyclodextrin with mnt anion (mnt = maleonitriledithiolate) studied by induced circular dichroism. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 61, 101–106.
- Luangaram, S., Kukongviriyapan, U., Pakdeechote, P., Kukongviriyapan, V., & Pannangpetch, P. (2007). Protective effects of quercetin against phenylhydrazine-induced vascular dysfunction and oxidative stress in rats. Food and Chemical Toxicology, 45 (3), 448– 455.
- Lucas-Abellán, C., Fortea, I., Gabaldón, J. A., & Núñez-Delicado, E. (2008). Encapsulation of Quercetin and Myricetin in Cyclodextrins at Acidic pH. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56 (1), 255–259.
- Maalik, A., Khan, F., Mumtaz, A., Mehmood, A., Azhar, S., Atif, M., ... Tariq, I. (2014). Pharmacological Applications of Quercetin and its Derivatives: A Short Review. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 13 (9), 1561.
- MacNee, W. (2001). Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. European Journal of Pharmacology, 429 (1–3), 195–207.
- Maestrelli, F., González-Rodríguez, M. L., Rabasco, A. M., & Mura, P. (2006). Effect of preparation technique on the properties of liposomes encapsulating ketoprofencyclodextrin complexes aimed for transdermal delivery. International Journal of Pharmaceutics, 312 (1–2), 53–60.
- Maestrelli, F., Gonzalez-Rodriguez, M. L., & Rabasco, A. M. (2005). Preparation and characterisation of liposomes encapsulating ketoprofen–cyclodextrin complexes for transdermal drug delivery. International Journal of Pharmaceutics, 298, 55–67.
- Magalhães, B., Peleteiro, B., & Lunet, N. (2012). Dietary patterns and colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. European Journal of Cancer Prevention, 21(1), 15–23.
- Maitani, Y., Soeda, H., Junping, W., & Takayama, K. (2001). Modified Ethanol Injection Method for Liposomes Containing Beta-Sitosterol Beta-D-Glucoside. Journal of Liposome Research, 11 (1), 115–125.
- Malet-Martino, M., & Holzgrabe, U. (2011). NMR techniques in biomedical and pharmaceutical analysis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 55 (1), 1–15.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. The American Journal of Clinical Nutrition, 79 (5), 727– 747.
- Marques, H. M. C. (2010). A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. Flavour and Fragance Journal, 25, 313–326.
- Martínez-Cañavate, A., Sierra, S., Lara-Villoslada, F., Romero, J., Maldonado, J., Boza, J., ... Olivares, M. (2009). A probiotic dairy product containing L. gasseri CECT5714 and L. coryniformis CECT5711 induces immunological changes in children suffering from allergy. Pediatric Allergy and Immunology, 20 (6), 592–600.
- Martins, S., Sarmento, B., Ferreira, D. C., & Souto, E. B. (2007). Lipid-based colloidal carriers for peptide and protein delivery-liposomes versus lipid nanoparticles. International Journal of Nanomedicine, 2 (4), 595–607.
- Martirosyan, D. M., & Singh, J. (2015). A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique? Functional Foods in Health and Disease, 5, 209–223.
- Mathesius, U. (2001). Flavonoids induced in cells undergoing nodule organogenesis in white clover are regulators of auxin breakdown by peroxidase. Journal of Experimental Botany, 52, 419–426.

- McCormack, B., & Gregoriadis, G. (1994). Entrapment of cyclodextrin-drug complexes into liposomes: potential advantages in drug delivery. Journal of Drug Targeting, 2 (5), 449–454.
- McGinty, D., Letizia, C. S., & Api, A. M. (2010). Addendum to Fragrance material review on Nerolidol (isomer unspecified). Food and Chemical Toxicology, 48, 43–45.
- McMahon, H. T., & Gallop, J. L. (2005). Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. Nature, 438 (7068), 590–596.
- Hara, M., Hanaoka, T., Kobayashi, M., Otani, T., Adachi, HY., Montani, A., Natsukawa, S., Shaura, K., Koizumi, Y., Kasuga, Y., Matsuzawa, T., Ikekawa, T., Sasaki, S., Tsugane, S. (2003). Cruciferous Vegetables, Mushrooms, and Gastrointestinal Cancer Risks in a Multicenter, Hospital-Based Case-Control Study in Japan. Nutrition and Cancer, 46, 138–147.
- Mendonça, E. A. M., Lira, M. C. B., Rabello, M. M., Cavalcanti, I. M. F., Galdino, S. L., Pitta, I. R., ... Santos-Magalhães, N. S. (2012). Enhanced antiproliferative activity of the new anticancer candidate LPSF/AC04 in cyclodextrin inclusion complexes encapsulated into liposomes. AAPS PharmSciTech, 13 (4), 1355–1366.
- Mense, S. M., Hei, T. K., Ganju, R. K., & Bhat, H. K. (2008). Phytoestrogens and breast cancer prevention: possible mechanisms of action. Environmental Health Perspectives, 116 (4), 426–433.
- Messina, M., & Messina, V. (2000). Soyfoods, soybean isoflavones, and bone health: a brief overview. Journal of Renal Nutrition, 10 (2), 63–68.
- Messner, M., Kurkov, S. V., Jansook, P., & Loftsson, T. (2010). Self-assembled cyclodextrin aggregates and nanoparticles. International Journal of Pharmaceutics, 387 (1–2), 199–208.
- Meure, L. A., Knott, R., Foster, N. R., & Dehghani, F. (2009). The depressurization of an expanded solution into aqueous media for the bulk production of liposomes. Langmuir, 25 (1), 326–337.
- Mierziak, J., Kostyn, K., & Kulma, A. (2014). Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. Molecules, 19 (10), 16240–16265.
- Mills, T. T., Huang, J., Feigenson, G. W., & Nagle, J. F. (2009). Effects of cholesterol and unsaturated DOPC lipid on chain packing of saturated gel-phase DPPC bilayers. General Physiology and Biophysics, 28 (2), 126–139.
- Miranda, J. C. de, Martins, T. E. A., Veiga, F., & Ferraz, H. G. (2011). Cyclodextrins and ternary complexes: technology to improve solubility of poorly soluble drugs. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 47 (4), 665–681.
- Moghimipour, E., Aghel, N., Zarei Mahmoudabadi, A., Ramezani, Z., & Handali, S. (2012). Preparation and Characterization of Liposomes Containing Essential Oil of Eucalyptus camaldulensis Leaf. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products, 7 (3), 117–122.
- Mohamed, M. H., Wilson, L. D., Headley, J. V., & Peru, K. M. (2009). A spectral displacement study of cyclodextrin/naphthenic acids inclusion complexes. Canadian Journal of Chemistry, 87, 1747–1756.
- Mohammed, A. R., Weston, N., Coombes, A. G. A., Fitzgerald, M., & Perrie, Y. (2004). Liposome formulation of poorly water-soluble drugs: optimisation of drug loading and ESEM analysis of stability. International Journal of Pharmaceutics, 285 (1), 23–34.
- Monteiro, N., Martins, A., Reis, R. L., & Neves, N. M. (2014). Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. Journal of The Royal Society Interface, 11, 1–24.
- Moon, Y. J., Wang, L., DiCenzo, R., & Morris, M. E. (2008). Quercetin pharmacokinetics in humans. Biopharmaceutics & Drug Disposition, 29 (4), 205–217.

- Moretti, E., Mazzi, L., Bonechi, C., Salvatici, M. C., Iacoponi, F., Rossi, C., & Collodel, G. (2016). Effect of Quercetin-loaded liposomes on induced oxidative stress in human spermatozoa. Reproductive Toxicology, 60, 140–147.
- Morini, M. A., Sierra, M. B., Pedroni, V. I., Alarcon, L. M., Appignanesi, G. A., & Disalvo, E. A. (2015). Influence of temperature, anions and size distribution on the zeta potential of DMPC, DPPC and DMPE lipid vesicles. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 131, 54–58.
- Mozafari, M. R., Flanagan, J., Matia-Merino, L., Awati, A., Omri, A., Suntres, Z. E., & Singh, H. (2006). Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. Journal of the Science of Food and Agriculture, 86 (13), 2038–2045.
- Mozafari, M. R., Khosravi-Darani, K., Borazan, G. G., Cui, J., & Pardakhty, A. (2008). Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology. International Journal of Food Properties, 11, 833–844.
- Mozafari, M. R., Johnson, C., Hatziantoniou, S., & Demetzos, C. (2008). Nanoliposomes and Their Applications in Food Nanotechnology. Journal of Liposome Research, 18 (4), 309–327.
- Müller, R., Maassen, S., Schwarz, C., & Mehnert, W. (1997). Solid lipid nanoparticles (SLN) as potential carrier for human use: interaction with human granulocytes. Journal of Controlled Release, 47 (3), 261–269.
- Nair, P. N. R. (2006). On the causes of persistent apical periodontitis: a review. International Endodontic Journal, 39 (4), 249–281.
- Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., & Bugarsk, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. Procedia Food Science, 1.
- Needham, D., & Nunn, R. S. (1990). Elastic deformation and failure of lipid bilayer membranes containing cholesterol. Biophysical Journal, 58, 997–1009.
- Neuhouser, M. L. (2004). Dietary Flavonoids and Cancer Risk: Evidence from Human Population Studies. Nutrition and Cancer, 50, 1–7.
- Neves, M. A., Hashemi, J., & Prentice, C. (2015). Development of novel bioactives delivery systems by micro/nanotechnology. Current Opinion in Food Science, 1, 7–12.
- Nijveldt, R. J., van Nood, E., van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., van Norren, K., & van Leeuwen,
 P. A. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. The American Journal of Clinical Nutrition, 74 (4), 418–425.
- Nishino, H., Murakoshi, M., Mou, X. Y., Wada, S., Masuda, M., Ohsaka, Y., ... Jinno, K. (2005). Cancer prevention by phytochemicals. Oncology, 69, 38–40.
- Nogueira Neto, J. D., de Almeida, A. A., da Silva Oliveira, J., Dos Santos, P. S., de Sousa, D. P., de Freitas, R. M. (2013). Antioxidant Effects of Nerolidol in Mice Hippocampus After Open Field Test. Neurochem Res, 38, 1861–1870.
- Obe, M. A. (2001). Functional foods: a simple scheme for establishing the scientific validity for all claims. Public Health Nutrition, 4 (3), 859–862.
- Otake, K., Imura, T., Sakai, H., & Abe, M. (2001). Development of a New Preparation Method of Liposomes Using Supercritical Carbon Dioxide. Langmuir, 17 (13), 3898–3901.
- Owen, R. W., Giacosa, A., Hull, W. E., Haubner, R., Würtele, G., Spiegelhalder, B., & Bartsch, H. (2000). Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. The Lancet. Oncology, 1, 107–112.
- Ozdemir, N., & Erkin, J. (2012). Enhancement of dissolution rate and bioavailability of sulfamethoxazole by complexation with β -cyclodextrin. Drug Development and Industrial Pharmacy, 38 (3), 331–340.

- Paduch, R., Kandefer–Szerszeń, M., Trytek, M., & Fiedurek, J. (2007). Terpenes: substances useful in human healthcare. Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis, 55, 315–327.
- Palacios, L. E., & Wang, T. (2005). Egg-yolk lipid fractionation and lecithin characterization. Journal of the American Oil Chemists' Society, 82 (8), 571–578.
- Palzer, S. (2009). Food structures for nutrition, health and wellness. Trends in Food Science & Technology, 20, 194–200.
- Pan, S. Y., Litscher, G., Gao, S. H., Zhou, S. F., Yu, Z. L., Chen, H. Q., Zhang, S.F., Tang M. K., Sun, J. N., Ko, K. M. (2014). Historical Perspective of Traditional Indigenous Medical Practices: The Current Renaissance and Conservation of Herbal Resources. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, 1-20.
- Park, M. J., Gwak, K. S., Yang, I., Kim, K. W., Jeung, E. B., Chang, J. W., Choi, I.G. (2009). Effect of citral, eugenol, nerolidol and α-terpineol on the ultrastructural changes of Trichophyton mentagrophytes. Fitoterapia, 80, 290–296.
- Park, E. J. & Pezzuto, J. M. (2002). Botanicals in cancer chemoprevention. Cancer and Metastasis Reviews, 21, 231–255.
- Patel, A.R., & Velikov, K. P. (2011). Colloidal delivery systems in foods: A general comparison with oral drug delivery. Food Science and Technology, 44, 1958–1964.
- Patel, Ashok R., Heussen, P. C. M., Hazekamp, J., Drost, E., & Velikov, K. P. (2012). Quercetin loaded biopolymeric colloidal particles prepared by simultaneous precipitation of quercetin with hydrophobic protein in aqueous medium. Food Chemistry, 133 (2), 423– 429.
- Patel, S. S. (2006). Liposome: A versatile platform for targeted delivery of drugs. Pharmainfo.net, 4 (5), 1-5.
- Pathak, S. K., Mishra, R., Kumar, S., Prakash, G., & Parthasarthy, R. (2012). Effect of cholesterol concentration on size of liposome. Journal of Pharmacy and Biological Sciences, 1, 50–53.
- Patil, S. G., Surana, S. J., Gattani, S. G., Dewani, S. P., & Mahajan, H. S. (2005). Liposomes an overview-a novel trend in the drug delivery. The Pharma Review, 18, 53–58.
- Paxton, R. J., Garcia-Prieto, C., Berglund, M., Hernandez, M., Hajek, R. A., Handy, B., ... Jones, L. A. (2012). A randomized parallel-group dietary study for stages II-IV ovarian cancer survivors. Gynecologic Oncology, 124 (3), 410–416.
- Peer, W. A., & Murphy, A. S. (2007). Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? Trends in Plant Science, 12, 556–563.
- Pereira-Lachataignerais, J., Pons, R., Panizza, P., Courbin, L., Rouch, J., & López, O. (2006). Study and formation of vesicle systems with low polydispersity index by ultrasound method. Chemistry and Physics of Lipids, 140 (1–2), 88–97.
- Phan, T. N. T., Bacquet, M., & Morcellet, M. (2002). The removal of organic pollutants from water using new silicasupported β-cyclodextrin derivatives. Reactive & Functional Polymers, 52, 117–125.
- Phillips, M. A., & Croteau., R. B. (1999). Resin-based defenses in conifers. Trends Plant Science, 4, 184–190.
- Piel, G., Piette, M., Barillaro, V., Castagne, D., Evrard, B., & Delattre, L. (2007). Study of the relationship between lipid binding properties of cyclodextrins and their effect on the integrity of liposomes. International Journal of Pharmaceutics, 338 (1–2), 35–42.
- Piel, G., Piette, M., Barillaro, V., Castagne, D., Evrard, B., & Delattre, L. (2006). Betamethasone-in-cyclodextrin-in-liposome: the effect of cyclodextrins on encapsulation efficiency and release kinetics. International Journal of Pharmaceutics, 312 (1–2), 75–82.

- Pinto, L. M. A., de Jesus, M. B., Paula, E. de, Lino, A. C. S., Alderete, J. B., Duarte, H. A., & Takahata, Y. (2004). Elucidation of inclusion compounds between β-cyclodextrin/local anaesthetics structure: a theoretical and experimental study using differential scanning calorimetry and molecular mechanics. Journal of Molecular Structure, 678 (1), 63–66.
- Pons, M., Foradada, M., & Estelrich, J. (1993). Liposomes obtained by the ethanol injection method. International Journal of Pharmaceutics, 95 (1), 51–56.
- Popovici, C., Saykova, I., & Tylkowski, B. (2010). 'Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH''.
- Poulter, C. D., (1990). Biosynthesis of Non-Head-to-Tail Terpenes. Formation of 1'-1 and 1'-3 Linkages. Accounts of Chemical Research, 23, 70–77.
- Poznansky, M. J. & Weglicki, W. B. (1974). Lysophospholipid induced volume changes in lysosomes and in lysosomal lipid dispersions. Biochemical and Biophysical Research Communications, 58, 1016–1021.
- Pralhad, T., & Rajendrakumar, K. (2004). Study of freeze-dried quercetin–cyclodextrin binary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffraction and SEM analysis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 34 (2), 333–339.
- Prasanthi, D., & Lakshmi, P. K. (2012). Terpenes: Effect of lipophilicity in enhancing transdermal delivery of alfuzosin hydrochloride. Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research, 3, 216–223.
- Priprem, A., Sutthiparinyanont, S., Na, H.-K., Surh, Y.-J., & Chulasiri, M. (2012). Effect of Formulations of Nanosized Quercetin Liposomes on COX-2 and NF-κB in MCF-10A Cells. Pharmaceutical Nanotechnology, 1, 26–34.
- Puglisi, G., Fresta, M., & Ventura, C. A. (1996). Interaction of Natural and Modified β-Cyclodextrins with a Biological Membrane Model of Dipalmitoylphosphatidylcholine. Journal of Colloid and Interface Science, 180 (2), 542–547.
- Puskas, I., Barcza, L., Szente, L., & Csempesz, F. (2006). Features of the Interaction between Cyclodextrins and Colloidal Liposomes. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 54, 89–93.
- Qi, Z. H., & Xu, A. (1999). Starch based ingredients for flow encapsulation. Cereal Food World, 44, 460–465.
- Qiu, N., Cai, L., Wang, W., Wang, G., Cheng, X., Xu, Q., ... Chen, L. (2015). Barbigerone-inhydroxypropyl-β-cyclodextrin-liposomal nanoparticle: preparation, characterization and anti-cancer activities. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 82 (3–4), 505–514.
- Raederstorff, D. (2009). Antioxidant activity of olive polyphenols in humans: a review. International Journal for Vitamin and Nutrition Research. Internationale Zeitschrift Fur Vitamin- Und Ernahrungsforschung. Journal International De Vitaminologie Et De Nutrition, 79 (3), 152–165.
- Ranilla, L. G., Genovese, M. I., & Lajolo, F. M. (2009). Effect of different cooking conditions on phenolic compounds and antioxidant capacity of some selected Brazilian bean (Phaseolus vulgaris L.) cultivars. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57 (13), 5734–5742.
- Raudino, A., Sarpietro, M., & Pannuzzo, M. (2011). The thermodynamics of simple biomembrane mimetic systems. Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences, 3 (1), 15.
- Redziniak, G. (2003). Liposomes and skin: past, present, future. Pathologie-Biologie, 51 (5), 279–281.
- Ren, L., Zhou, Y., Wei, P., Li, M., & Chen, G. (2014). Preparation and Pharmacokinetic Study of Aprepitant–Sulfobutyl Ether-β-Cyclodextrin Complex. AAPS PharmSciTech, 15 (1), 121–130.

- Ribeiro, L., Carvalho, R. A., Ferreira, D. C., & Veiga, F. J. B. (2005). Multicomponent complex formation between vinpocetine, cyclodextrins, tartaric acid and water-soluble polymers monitored by NMR and solubility studies. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 24 (1), 1–13.
- Roberfroid, M. B. (2000). Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. The American Journal of Clinical Nutrition, 71 (6), 1660S–1664S.
- Rodríguez, J., Martín, M. J., Ruiz, M. A., & Clares, B. (2016). Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives. Food Research International, 83, 41–59.
- Rodríguez-Casado, A. (2016). The Health Potential of Fruits and Vegetables Phytochemicals: Notable Examples. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 56 (7), 1097–1107.
- Rongen, H. A., Bult, A., & Bennekom, W. van. (1997). Liposomes and immunoassays. Journal of Immunological Methods, 204, 105–133.
- Roy, M. T., Gallardo, M., Estelrich, J. (1998). Influence of Size on Electrokinetic Behavior of Phosphatidylserine and Phosphatidylethanolamine Lipid Vesicles. Journal of Colloid and Interface Science, 206 (2), 512–517.
- Ruma, K., Sunil, K., & Prakash, H. S. (2013). Antioxidant, Anti-inflammatory, Antimicrobial and cytotoxic properties of fungal endophytes from Garcina species. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 5, 889–897.
- Rungsardthong Ruktanonchai, U., Srinuanchai, W., Saesoo, S., Sramala, I., Puttipipatkhachorn, S., Soottitantawa,t A. (2011). Encapsulation of citral isomers in extracted lemongrass oil with cyclodextrins: molecular modeling and physicochemical characterizations. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 75 (12), 2340–2345.
- Sachdeva, A., & Nagpal, J. (2009). Effect of fermented milk-based probiotic preparations on Helicobacter pylori eradication: a systematic review and meta-analysis of randomizedcontrolled trials. European Journal of Gastroenterology & Hepatology, 21 (1), 45–53.
- Sacks, F. M., Lichtenstein, A., Van Horn, L., Harris, W., Kris-Etherton, P., Winston, M., & American Heart Association Nutrition Committee. (2006). Soy protein, isoflavones, and cardiovascular health: an American Heart Association Science Advisory for professionals from the Nutrition Committee. Circulation, 113 (7), 1034–1044.
- Sah, S. P., Tirkey, N., Kuhad, A., & Chopra, K. (2011). Effect of quercetin on lipopolysaccharide induced-sickness behavior and oxidative stress in rats. Indian Journal of Pharmacology, 43 (2), 192–196.
- Saito, A. Y., Sussmann, R. A. C., Kimura, E. A., Casserab, M. B., & Katzin, A. M. (2015). Quantification of nerolidol in mouse plasma using gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 111, 100–103.
- Sakanashi, T., Sugiyama, M., Suematsu, T., Nakagawa, T., Hidaka, T., & Ogura, R. (1988). UV exposure alters the membrane lipid composition and cell membrane fluidity of intact cultured B-16 melanoma cells. The Kurume Medical Journal, 35 (4), 159–169.
- Salami, M., Galli, C., De Angelis, L., & Visioli, F. (1995). Formation of F2-isoprostanes in oxidized low density lipoprotein: inhibitory effect of hydroxytyrosol. Pharmacological Research, 31 (5), 275–279.
- Samperio, C., Boyer, R., Eigel, W. N., Holland, K. W., McKinney, J. S., O'Keefe, S. F., ... Marcy, J. E. (2010). Enhancement of Plant Essential Oils' Aqueous Solubility and Stability Using Alpha and Beta Cyclodextrin. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58 (24), 12950–12956.
- Sanchez, S. A., Gunther, G., Tricerri, M. A., & Gratton, E. (2011). Methyl-β-Cyclodextrins Preferentially Remove Cholesterol from the Liquid Disordered Phase in Giant Unilamellar Vesicles. The Journal of Membrane Biology, 241 (1), 1–10.

- Sapino, S., Ugazio, E., Gastaldi, L., Miletto, I., Berlier, G., Zonari, D., & Oliaro-Bosso, S. (2015). Mesoporous silica as topical nanocarriers for quercetin: characterization and in vitro studies. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 89, 116–125.
- Scalia, S., & Mezzena, M. (2009). Incorporation of quercetin in lipid microparticles: Effect on photo- and chemical-stability. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 49 (1), 90–94.
- Scambia, G., Ranelletti, F. O., Benedetti Panici, P., Bonanno, G., De Vincenzo, R., Piantelli, M., & Mancuso, S. (1990). Synergistic antiproliferative activity of quercetin and cisplatin on ovarian cancer cell growth. Anti-Cancer Drugs, 1 (1), 45–48.
- Scambia, G., Ranelletti, F. O., Benedetti Panici, P., Piantelli, M., Bonanno, G., De Vincenzo, R., ... Mancuso, S. (1992). Inhibitory effect of quercetin on primary ovarian and endometrial cancers and synergistic activity with cis-diamminedichloroplatinum (II). Gynecologic Oncology, 45 (1), 13–19.
- Schardinger, F. (1903). Uber Thermophile Bakterien aus verschiedenen Speisen und Milch, sowie uber einige Umsetzungsprodukte derselben in kohlenhydrathaltigen Nahrlosungen, darunter krystallisierte Polysaccharide (Dextrine) aus Starke. Z. Untersuch. Nahr. u. Genussm, 6, 865–880.
- Schardinger, F. (1911). Bildung kristallisierter polysaccharide (Dextrine) aus Starkekleister durch Microben. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Abt. II, 29, 188–197.
- Schneider, H.-J., Hacket, F., Rüdiger, V., & Ikeda, H. (1998). NMR Studies of Cyclodextrins and Cyclodextrin Complexes. Chemical Reviews, 98 (5), 1755–1786.
- Schroeder, A., Kost, J., & Barenholz, Y. (2009). Ultrasound, liposomes, and drug delivery: principles for using ultrasound to control the release of drugs from liposomes. Chemistry and Physics of Lipids, 162, 1–16.
- Sebaaly, C., Charcosset, C., Stainmesse, S., Fessi, H., & Greige-Gerges, H. (2016). Clove essential oil-in-cyclodextrin-in-liposomes in the aqueous and lyophilized states: From laboratory to large scale using a membrane contactor. Carbohydrate Polymers, 138, 75– 85.
- Sebaaly, C., Greige-Gerges, H., Stainmesse, S., Fessi, H., & Charcosset, C. (2016). Effect of composition, hydrogenation of phospholipids and lyophilization on the characteristics of eugenol-loaded liposomes prepared by ethanol injection method. Food Bioscience, 15, 1–10.
- Sebaaly, C., Jraij, A., Fessi, H., Charcosset, C., Greige-Gerges, H. (2015). Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes. Food Chemistry, 178, 52–62.
- Shaheen, S. M., Ahmed, F. R. S., Hossen, M. N., Ahmed, M., Amran, M. S., & Anwar-UL-Islam, M. (2006). Liposome as a Carrier for Advanced Drug Delivery. Pakistan Journal of Biological Sciences, 9, 1181–1191.
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. Journal of Functional Foods, 18, 820–897.
- Shahidi, F., & Han, X.-Q. (1993). Encapsulation of Food ingredients. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 33, 501–547.
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2010). Lipid oxidation and improving the oxidative stability. Chemical Society Reviews, 39 (11), 4067.
- Shaji, J., & Iyer, S. (2012). Double-loaded liposomes encapsulating Quercetin and Quercetin beta-cyclodextrin complexes: Preparation, characterization and evaluation. Asian Journal of Pharmaceutics, 6 (3), 218.
- Shashi, K., Satinder, K., & Bharat, P. (2012). A complete review on: liposomes. International Research Journal of Pharmacy, 3, 10–16.

- Shen, X. L., Zhao, T., Zhou, Y., Shi, X., Zou, Y., & Zhao, G. (2016). Effect of Oat β-Glucan Intake on Glycaemic Control and Insulin Sensitivity of Diabetic Patients: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. Nutrients, 8 (1).
- Shi, J.-H., & Ye, Y. (2010). Separation of Enantiomers of sec-Butyl Carboxylicates on β-Cyclodextrin Derivatives and Chiral Recognization Mechanism. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 38 (10), 1450–1456.
- Shukla, R. K., & Tiwari, A. (2012). Carbohydrate polymers: Applications and recent advances in delivering drugs to the colon. Carbohydrate Polymers, 88, 399–416.
- Sikkema, J., de Bont, J. A., & Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiological Reviews, 59 (2), 201–222.
- Silva, M. M., Santos, M. R., Caroço, G., Rocha, R., Justino, G., & Mira, L. (2002). Structureantioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination. Free Radical Research, 36 (11), 1219–1227.
- Simões, M., Rocha, S., Coimbra, M. A., & Vieira, M. J. (2008). Enhancement of Escherichia coli and Staphylococcus aureus Antibiotic Susceptibility Using Sesquiterpenoids. Medicinal Chemistry, 4, 616–623.
- Singhal, R. L., Yeh, Y. A., Praja, N., Olah, E., Sledge, G. W., & Weber, G. (1995). Quercetin down-regulates signal transduction in human breast carcinoma cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, 208 (1), 425–431.
- Sinha, R., Gadhwal, M., Joshi, U., Srivastava, S., Govil, G., Parade, C. (2011). Interaction of quercetin with DPPC model membrane: Molecular dynamic simulation, DSC and multinuclear NMR studies. Indian Chemical Society, 88, 1203–1210.
- Sirghi, L. (2010). Atomic Force Microscopy indentation of living cells (Vol. 1).
- Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B., & Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance--a review. Appetite, 51 (3), 456–467.
- Skalko-Basnet, N., Pavelic, Z., & Becirevic-Lacan, M. (2000). Liposomes containing drug and cyclodextrin prepared by the one-step spray-drying method. Drug Development and Industrial Pharmacy, 26 (12), 1279–1284.
- Smith, B. L., Marcotte, M., & Harrison, G. (1997). A Comparative Analysis of the Regulatory Framework Affecting Functional Food Development and Commercialization in Canada, Japan, the European Union and the United States of America. Journal of Nutraceuticals, Functional & Medical Foods, 1 (2), 45–87.
- Sobenin, I. A., Pryanishnikov, V. V., Kunnova, L. M., Rabinovich, Y. A., Martirosyan, D. M., & Orekhov, A. N. (2010). The effects of time-released garlic powder tablets on multifunctional cardiovascular risk in patients with coronary artery disease. Lipids in Health and Disease, 9, 119.
- Sohn, D. W., Han, C. H., Jung, Y. S., Kim, S. I., Kim, S. W., & Cho, Y.-H. (2009). Antiinflammatory and antimicrobial effects of garlic and synergistic effect between garlic and ciprofloxacin in a chronic bacterial prostatitis rat model. International Journal of Antimicrobial Agents, 34 (3), 215–219. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.02.012
- Sonar, S., D'Souza, S. E., & Mishra, K. P. (2008). A simple one-step protocol for preparing small-sized doxorubicin-loaded liposomes. Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology, 27 (3), 181–189.
- Song, J., Shi, F., Zhang, Z., Zhu, F., Xue, J., Tan, X., ... Jia, X. (2011). Formulation and evaluation of celastrol-loaded liposomes. Molecules, 16 (9), 7880–7892.
- Soo, E., Thakur, S., Qu, Z., Jambhrunkar, S., Parekh, H. S., & Popat, A. (2016). Enhancing delivery and cytotoxicity of resveratrol through a dual nanoencapsulation approach. Journal of Colloid and Interface Science, 462, 368–374.

- Speciale, A., Chirafisi, J., Saija, A., & Cimino, F. (2011). Nutritional antioxidants and adaptive cell responses: an update. Current Molecular Medicine, 11 (9), 770–789.
- Spyratou, E., Mourelatou, E. A., Makropoulou, M., & Demetzos, C. (2009). Atomic force microscopy: a tool to study the structure, dynamics and stability of liposomal drug delivery systems. Expert Opinion on Drug Delivery, 6 (3), 305–317.
- Sri, K. V., Kondaiah, A., Ratna, J. V., & Annapurna, A. (2007). Preparation and Characterization of Quercetin and Rutin Cyclodextrin Inclusion Complexes. Drug Development and Industrial Pharmacy, 33 (3), 245–253.
- Srisuk, P., Thongnopnua, P., Raktanonchai, U., & Kanokpanont, S. (2012). Physico-chemical characteristics of methotrexate-entrapped oleic acid-containing deformable liposomes for in vitro transepidermal delivery targeting psoriasis treatment. International Journal of Pharmaceutics, 427 (2), 426–434.
- Stella, V. J., Rao, V. M., Zannou, E. A. & Zia, V. (1999). Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes. Advanced Drug Delivery Reviews, 36 (1), 3–16.
- Steevens, J., Schouten, L. J., Goldbohm, R. A. and van den Brandt, P. A. (2011). Vegetables and fruits consumption and risk of esophageal and gastric cancer subtypes in the Netherlands Cohort Study. International Journal of Cancer, 129, 2681–2693.
- Story, E. N., Kopec, R. E., Schwartz, S. J., & Harris, G. K. (2010). An update on the health effects of tomato lycopene. Annual Review of Food Science and Technology, 1, 189–210.
- Sui, H., Gao, F., Cao, X., & Li, X. (2013). Remediation of PAHs and heavy metals in cocontaminated sites with cyclodextrin. Fresenius Environmental Bulletin, 22 (5), 1452– 1457.
- Sun, M., Nie, S., Pan, X., Zhang, R., Fan, Z., & Wang, S. (2014). Quercetin-nanostructured lipid carriers: Characteristics and anti-breast cancer activities in vitro. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 113, 15–24.
- Sun, M.-M., Teng, Y., Luo, Y.-M., Li, Z.-G., Jia, Z.-J., & Zhang, M.-Y. (2013). Ex-situ remediation of PAHs contaminated site by successive methyl-beta-cyclodextrin enhanced soil washing. Huan Jing Ke Xue, 34 (6), 2428–2435.
- Szejtli, J. (1985). Cyclodextrins: a new group of industrial basic materials. Die Nahrung, 29 (9), 911–924.
- Szejtli, J., Bolla-Pusztai, E., & Kajtar, M. (1982). The β-cyclodextrin inclusion complex of menadione (vitamin K3). Pharmazie, 37, 725–728.
- Szejtli, J., & Szente, L. (2005). Elimination of bitter, disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 61(3).
- Szejtli, J. (1997). Utilization of cyclodextrins in industrial products and processes. Journal of Materials Chemistry, 7, 575–587.
- Szejtli, J. (2004). Past, present, and future of cyclodextrin research. Pure and Applied Chemistry, 76, 1825–1845.
- Szente, L., & Szejtli, J. (1999). Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties, and trends in development. Advanced Drug Delivery Reviews, 36 (1), 17–28.
- Szente, Lajos, & Szejtli, J. (2004). Cyclodextrins as food ingredients. Trends in Food Science & Technology, 15, 137–142.
- Szoka, F., & 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 (9), 4194–4198.
- Szoka, F., & Papahadjopoulos, D. (1980). Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). Annual Review of Biophysics and Bioengineering, 9, 467– 508.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. Cell, 131 (5), 861–872.
- Takechi-Haraya, Y., Sakai-Kato, K., Abe, Y., Kawanishi, T., Okuda, H., & Goda, Y. (2016). Atomic Force Microscopic Analysis of the Effect of Lipid Composition on Liposome Membrane Rigidity. Langmuir, 32 (24), 6074–6082.
- Takino, T., Konishi, K., Takakura, Y., & Hashida, M. (1994). Long circulating emulsion carrier systems for highly lipophilic drugs. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 17 (1), 121– 125.
- Taku, K., Melby, M. K., Nishi, N., Omori, T., & Kurzer, M. S. (2011). Soy isoflavones for osteoporosis: an evidence-based approach. Maturitas, 70 (4), 333–338.
- Tan, L. T. H., Lee, L. H., Yin, W. F., Chan, C. K., Abdul Kadir, H., Chan, K. G., & Goh, B. H. (2015). Traditional Uses, Phytochemistry, and Bioactivities of Cananga odorata (Ylang-Ylang). Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015.
- Tanaka, S., Haruma, K., Kunihiro, M., Nagata, S., Kitadai, Y., Manabe, N., ... Chayama, K. (2004). Effects of aged garlic extract (AGE) on colorectal adenomas: a double-blinded study. Hiroshima Journal of Medical Sciences, 53 (3–4), 39–45.
- Tanaka, Y., Sasaki, N., & Ohmiya, A. (2008). Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. The Plant Journal, 54, 733–749.
- Tanemura, I., Saito, Y., Ueda, H., & Sato, T. (1998). Solubility Method Using Static Head-Space Gas Chromatography for Determination of the Stability Constants of Fragrance Materials with 2-Hydroxypropyl-β-cyclodextrin. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 46, 540–541.
- Tang, W.-L., Tang, W.-H., Chen, W. C., Diako, C., Ross, C. F., & Li, S.-D. (2017). Development of a Rapidly Dissolvable Oral Pediatric Formulation for Mefloquine Using Liposomes. Molecular Pharmaceutics, 14 (6), 1969–1979.
- Tapola, N., Karvonen, H., Niskanen, L., Mikola, M., & Sarkkinen, E. (2005). Glycemic responses of oat bran products in type 2 diabetic patients. Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases, 15 (4), 255–261.
- Taylor, L. P., & Grotewold, E. (2005). Flavonoids as developmental regulators. Current Opinion in Plant Biology, 8, 317–323.
- Taylor, T. M., Davidson, P. M., Bruce, B. D., & Weiss, J. (2005). Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 45 (7–8), 587–605.
- Tefas, L. R., Muntean, D.-M., Vlase, L., Porfire, A. S., Achim, M., & Tomuta, I. (2015). Quercetin-loaded liposomes: Formulation Optimization through a D-optimal experimental design. Farmacia, 63 (1), 26–33.
- Terao, J., Hirota, Y., Kawakatsu, M., & Matsushita, S. (1981). Structural analysis of hydroperoxides formed by oxidation of phosphatidylcholine with singlet oxygen. Lipids, 16 (6), 427–432.
- Tessari, P., & Lante, A. (2017). A Multifunctional Bread Rich in Beta Glucans and Low in Starch Improves Metabolic Control in Type 2 Diabetes: A Controlled Trial. Nutrients, 9 (3).
- Tholl, D. (2006). Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. Current Opinion in Plant Biology, 9, 297–304.
- Thuy, T. T., Porzel, A., Ripperger, H., Sung, T. V., & Adam, G. (1998). Chalcones and ecdysteroids from Vitex leptobotrys. Phytochemistry, 49 (8), 2603–2605.
- Togashi, N., Hamashima, H., Inoue, Y., & Takano, A. (2010). Antibacterial Activities Against Staphylococcus aureus of Terpene Alcohols With Aliphatic Carbon Chains. Journal of Essential Oil Research, 22, 263–269.

- Traka, M. H., & Mithen, R. F. (2011). Plant science and human nutrition: challenges in assessing health-promoting properties of phytochemicals. The Plant Cell, 23 (7), 2483–2497.
- Treutter, D. (2005). Significance of Flavonoids in Plant Resistance and Enhancement of Their Biosynthesis. Plant Biology, 7, 581–591.
- Trichopoulou, A., & Lagiou, P. (1997). Healthy traditional Mediterranean diet: an expression of culture, history, and lifestyle. Nutrition Reviews, 55 (11), 383–389.
- Trock, B. J., Hilakivi-Clarke, L., & Clarke, R. (2006). Meta-analysis of soy intake and breast cancer risk. Journal of the National Cancer Institute, 98 (7), 459–471.
- Tseng, L. P., Liang, H. J., Chung, T. W., Huang, Y. Y., & Liu, D. Z. (2007). Liposomes incorporated with cholesterol for drug release triggered by magnetic field. Journal of Medical and Biological Engineering, 27 (1), 29–34.
- Turek, C., & Stintzing, F. C. (2013). Stability of Essential Oils: A Review: Stability of essential oils. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 12 (1), 40–53.
- Uekama, K., Hirayama, F., & Irie, T. (1998). Cyclodextrin Drug Carrier Systems. Chemical Reviews, 98, 2045–2076.
- Uhumwangho, M., & Okor, R. (2005). Current trends in the production and biomedical applications of liposomes: a review. A Peer-Review Journal of Biomedical Sciences, 4, 9–21.
- Unlu, N. Z., Bohn, T., Francis, D. M., Nagaraja, H. N., Clinton, S. K., & Schwartz, S. J. (2007). Lycopene from heat-induced cis-isomer-rich tomato sauce is more bioavailable than from all-trans-rich tomato sauce in human subjects. The British Journal of Nutrition, 98 (1), 140–146.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-Biological Interactions, 160 (1), 1–40
- Valle, E. M. M. D. (2004). Cyclodextrins and their uses: A review. Process Biochemistry, 39, 1033–1046.
- Van Ee, J. H. (2009). Soy constituents: modes of action in low-density lipoprotein management. Nutrition Reviews, 67 (4), 222–234.
- Van Niel, C. W., Feudtner, C., Garrison, M. M., & Christakis, D. A. (2002). Lactobacillus therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. Pediatrics, 109 (4), 678–684.
- Varona, S., Martín, Á., & Cocero, M. J. (2011). Liposomal Incorporation of Lavandin Essential Oil by a Thin-Film Hydration Method and by Particles from Gas-Saturated Solutions. Industrial & Engineering Chemistry Research, 50 (4), 2088–2097.
- Verhoeven, D. T., Goldbohm, R. A., van Poppel, G., Verhagen, H., & van den Brandt, P. A. (1996). Epidemiological studies on brassica vegetables and cancer risk. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 5 (9), 733–748.
- Verschuren, P. M. (2002). Functional foods: scientific and global perspectives. The British Journal of Nutrition, 88 (Suppl. 2), S125-130.
- Victor M. Montori, Peter C. Wollan, Andrew Farmer and Sean F. Dinneen. (2000). Fish Oil Supplementation in Type 2 Diabetes: a quantitative systematic review. Diabetes care, 23 (9), 1407-1415.
- Viglianti, C., Hanna, K., De Brauer, C., & Germain, P. (2006). Use of Cyclodextrins as An Environmentally Friendly Extracting Agent in Organic Aged-contaminated Soil Remediation. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 56, 275– 280.

- Villaverde, J., Maqueda, C., Undabeytia, T., & Morillo, E. (2007). Effect of various cyclodextrins on photodegradation of a hydrophobic herbicide in aqueous suspensions of different soil colloidal components. Chemosphere, 69 (4), 575–584.
- Villiers, A. (1891). Sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyrique, 112, 536– 538.
- Vinholes, J., Gonçalves, P., Martel, F., Coimbra, M. A., & Rocha, S. M. (2014). Assessment of the antioxidant and antiproliferative effects of sesquiterpenic compounds in in vitro Caco-2 cell models. Food Chemistry, 156, 204–211.
- Visioli, F., Poli, A., & Gall, C. (2002). Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. Medicinal Research Reviews, 22 (1), 65–75.
- Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. Molecular Plant, 3 (1), 2–20.
- Wagner, A., Vorauer-Uhl, K., & Katinger, H. (2002). Liposomes produced in a pilot scale: production, purification and efficiency aspects. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 54 (2), 213–219.
- Wang, J., & Sun, Y.-Z. (2008). The Relationship Between Drug Carrying Ability of Liposomes and Phosphatidylcholines. Fine Chemicals.
- Wang, L., & Bohn, T. (2012). Health-Promoting Food Ingredients and Functional Food Processing. Nutrition, Well-Being and Health.
- Wang, W., Sun, C., Mao, L., Ma, P., Liu, F., & Yang, J. (2016). The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. Trends in Food Science & Technology, 56, 21–38.
- Wang, X., Deng, L., Cai, L., Zhang, X., Zheng, H., Deng, C., ... Chen, L. (2011). Preparation, characterization, pharmacokinetics, and bioactivity of honokiol-in-hydroxypropyl-βcyclodextrin-in-liposome. Journal of Pharmaceutical Sciences, 100 (8), 3357–3364.
- Wattenberg, L. W. (1991). Inhibition of azoxymethane-induced neoplasia of the large bowel by 3-hydroxy-3,7,11-trimethyl-1,6,10-dodecatriene (nerolidol). Carcinogenesis, 12, 151–152.
- Watson, W. G., M Beaver, L., E Williams, D., H Dashwood, R., & Ho, E. (2013). Phytochemicals from cruciferous vegetables, epigenetics, and prostate cancer prevention. The AAPS Journal, 15 (4), 951–961.
- Watwe, R. M., & Bellare, J. R. (1995). Manufacture of liposomes: A review. Current Science, 68, 715–724.
- Weiner, N., Williams, N., Birch, G., Ramachandran, C., Shipman, C., & Flynn, G. (1989). Topical delivery of liposomally encapsulated interferon evaluated in a cutaneous herpes guinea pig model. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 33 (8), 1217–1221.
- 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, 8, 1102–1107.
- Weng, J.-R., Tsai, C.-H., Kulp, S. K., & Chen, C.-S. (2008). Indole-3-carbinol as a chemopreventive and anti-cancer agent. Cancer Letters, 262 (2), 153–163.
- Winterhaltera, M., & Lasic, D. D. (1993). Liposome stability and formation: experimental parameters and theories on the size distribution. Chemistry and Physics of Lipids, 64, 35–43.
- Xing, J., Zhang, D., & Tan, T. (2007). Studies on the oridonin-loaded poly(d,l-lactic acid) nanoparticles in vitro and in vivo. International Journal of Biological Macromolecules, 40 (2), 153–158.
- Xing-Gang, Z., Melby, M. K. & Watanabe, S. (2004). Soy Isoflavone Intake Lowers Serum LDL Cholesterol: A Meta-Analysis of 8 Randomized Controlled Trials in Humans. The Journal of Nutrition, 134, 2395–2400.

- Yadav, A. V., Murthy, M. S., Shete, A. S., & Sakhare, S. (2011). Stability aspects of liposome. Indian. J. Pharm. Educ., 45, 402–413.
- Yanaka, A., Fahey, J. W., Fukumoto, A., Nakayama, M., Inoue, S., Zhang, S., ... Yamamoto, M. (2009). Dietary sulforaphane-rich broccoli sprouts reduce colonization and attenuate gastritis in Helicobacter pylori-infected mice and humans. Cancer Prevention Research, 2 (4), 353–360.
- Yang, Q., Guo, Y., Li, L., & Hui, S. W. (1997). Effects of lipid headgroup and packing stress on poly(ethylene glycol)-induced phospholipid vesicle aggregation and fusion. Biophysical Journal, 73 (1), 277–282.
- Yang, Y., Kapalavavi, B., Gujjar, L., Hadrous, S., Marple, R., & Gamsky, C. (2012). Industrial application of green chromatography – II. Separation and analysis of preservatives in skincare products using subcritical water chromatography. International Journal of Cosmetic Science, 34 (5), 466–476.
- Yao, L. H., Jiang, Y. M., Shi, J., Tomas-Barberan, F. A., Datta, N., Singanusong, R., & Chen, S. S. (2004). Flavonoids in Food and Their Health Benefits. Plant Foods for Human Nutrition, 59, 113–122.
- Yoshida, M., Sakai, T., Hosokawa, N., Marui, N., Matsumoto, K., Fujioka, A., ... Aoike, A. (1990). The effect of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells. FEBS Letters, 260 (1), 10–13.
- Yuan, C., Jin, Z., & Li, X. (2008). Evaluation of complex forming ability of hydroxypropyl-βcyclodextrins. Food Chemistry, 106 (1), 50–55.
- Yudiarto, A., Dewi, E., & Kokugan, T. (2000). Separation of isomers by ultrafiltration using modified cyclodextrins. Separation and Purification Technology, 19, 103–112.
- Zabar, S., Lesmes, U., Katz, I., Shimoni, E., & Bianco-Peled, H. (2009). Studying different dimensions of amylose–long chain fatty acid complexes: Molecular, nano and micro level characteristics. Food Hydrocolloids, 23, 1918–1925.
- Zafrilla, P., Ferreres, F., & Toma's-Barbera'n, F. A. (2001). Effect of Processing and Storage on the Antioxidant Ellagic Acid Derivatives and Flavonoids of Red Raspberry (Rubus idaeus) Jams. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 3651–3655.
- Zhan, H., Jiang, Z.-T., Wang, Y., Li, R., & Dong, T.-S. (2008). Molecular microcapsules and inclusion interactions of eugenol with b-cyclodextrin and its derivatives. European Food Research and Technology, 227, 1507–1513.
- Zhang, J., & Ma, P. X. (2013). Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: recent progress and future perspective. Advanced Drug Delivery Reviews, 65 (9), 1215–1233.
- Zhang, L., Zhang, Q., Wang, X., Zhang, W., Lin, C., Chen, F., ... Pan, W. (2015). Drug-incyclodextrin-in-liposomes: A novel drug delivery system for flurbiprofen. International Journal of Pharmaceutics, 492 (1–2), 40–45.
- Zhang, Y., Talalay, P., Cho, C. G., & Posner, G. H. (1992). A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 89 (6), 2399– 2403.
- Zhao, D., Qi, Y., Zheng, Z., Wang, Y., Zhang, X.-Y., Li, H.-J., ... Liu, J. (2011). Dietary factors associated with hypertension. Nature Reviews. Cardiology, 8 (8), 456–465.
- Zheng, W., Dai, Q., Custer, L. J., Shu, X. O., Wen, W. Q., Jin, F., Franke, A. A. (1999). Urinary Excretion of Isoflavonoids and the Risk of Breast Cancer. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 8, 35–40.
- Zhou, H., & Wang, X. (2015). Spectrometric study on the interaction of sodium cholate aggregates with quercetin. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 481, 31–37.

- Zhou, W., Kallifatidis, G., Baumann, B., Rausch, V., Mattern, J., Gladkich, J., ... Herr, I. (2010). Dietary polyphenol quercetin targets pancreatic cancer stem cells. International Journal of Oncology, 37 (3), 551–561.
- Zou, J., Dong, J., & Yu, X. (2009). Meta-analysis: Lactobacillus containing quadruple therapy versus standard triple first-line therapy for Helicobacter pylori eradication. Helicobacter, 14 (5), 97–107.
- Zvezdanovic, J., Stanojevic, J., Markovic, D., & Cvetkovic, D. (2012). Irreversible UV-induced quercetin and rutin degradation in solution, studied by UV-spectrophotometry and HPLC chromatography. Journal of the Serbian Chemical Society, 77 (3), 297–312.



The effect of cyclodextrin complexation on the solubility and photostability of nerolidol as pure compound and as main constituent of cabreuva essential oil

Joyce Azzi^{1,2}, Pierre-Edouard Danjou², David Landy², Steven Ruellan², Lizette Auezova¹, Hélène Greige-Gerges¹ and Sophie Fourmentin^{*2}

Full Research Paper	Open Access
Address: ¹ Bioactive Molecules Research Group, Doctoral School of Sciences and Technologies. Faculty of Sciences. Jdaidet El-Matn. Lebanese	<i>Beilstein J. Org. Chem.</i> 2017, <i>13,</i> 835–844. doi:10.3762/bjoc.13.84
University, Lebanon and ² Unité de Chimie Environnementale et	Received: 05 December 2016
Interactions sur le Vivant (UCEIV, EA 4492), SFR Condorcet FR	Accepted: 07 April 2017
CNRS 3417, ULCO, F-59140 Dunkerque, France	Published: 05 May 2017
Email: Sophie Fourmentin [*] - lamotte@univ-littoral.fr	This article is part of the Thematic Series "Superstructures with cyclodextrins: Chemistry and applications IV".
* Corresponding author	Guest Editor: G. Wenz
Keywords: cabreuva essential oil; cyclodextrins; nerolidol; photostability; solubility	© 2017 Azzi et al.; licensee Beilstein-Institut. License and terms: see end of document.

Abstract

Nerolidol (Ner), a major component of many plant essential oils, is known for its various biological properties. However, the low solubility of Ner in water and its susceptibility to degradation limit its application. The aim of our study was to improve the solubility and photostability of Ner through its encapsulation in different cyclodextrins (CDs). The formation constants of *cis-*, *trans*-Ner and their commercial mixture with various CDs (α -CD, β -CD, γ -CD, HP- β -CD, RAMEB, CRYSMEB and SBE- β -CD) were determined by phase solubility studies and confirmed by the spectral displacement UV-visible method. The solubility of cabreuva essential oil (EO) rich in *trans*-Ner was also evaluated by total organic carbon (TOC) analysis. The encapsulation efficiency (EE %) of Ner in HP- β -CD solid complexes was assessed by HPLC. The structural characterization of CD/*trans*-Ner inclusion complex was then conducted by NMR spectroscopy followed by molecular modelling studies. The effect of encapsulation on the Ner photostability was also carried out over time under UVB irradiation. A_L-type phase-solubility diagrams were obtained, suggesting the formation of 1:1 CD/Ner inclusion complexes. The solubility of Ner was enhanced by approximately 70-fold in the presence of 10 mM HP- β -CD. Moreover, high EE % values were obtained for 5:1 and 10:1 HP- β -CD:Ner molar ratios. NMR and molecular modelling studies revealed the most stable structure for *trans*-Ner inside the CD cavity with the OH group oriented towards the wider rim of the CD. Finally, CD encapsulation of Ner as pure compound or as main component of the cabreuva EO, protected it from degradation. This effect was more pronounced as the concentration of CD increased. These findings suggested that CDs are promising encapsulating carriers for Ner by enhancing its solubility and stability and thereby its application in food industry.

Introduction

Nerolidol (Ner, 3,7,11-trimethyl-1,6,10-dodecatrien-3-ol), an acyclic sesquiterpene obtained from fresh flowers of bitter orange and found in many other plants [1], is extensively used in perfumery. It was also approved by the U.S. Food and Drug Administration as a food flavoring agent and included by the Council of Europe in the list of substances granted A [2]. In nature, Ner occurs as a mixture of two isomers: cis and trans, with trans being the most abundant. The two isomers are distributed differently in various plant parts and among species. trans-Ner is present in high percentage (58-80%) in cabreuva essential oil (EO) (Myrocarpus fastigiatus) [3]. Due to its antimicrobial effects against a wide range of microorganisms such as Staphylococcus aureus, Salmonella enterica and Aspergillus niger [4], Ner can be employed as natural alternative to traditional synthetic food preservatives. To achieve this goal, Ner should be dissolved partially or totally in aqueous media to provide an efficient interaction with the pathogens [5]. However, Ner is poorly soluble in water and is also subject to degradation during storage. Nanoencapsulation techniques may improve Ner solubility and stability allowing to produce functional foods with enhanced functionality and stability [6]. Various encapsulation materials are used for food applications such as liposomes, phytosomes, cyclodextrins, dendrimers and many others [7-9]. The use of cyclodextrins (CDs) in food industry is currently flourishing due to their high potential to solubilize, stabilize and protect flavors and food ingredients [10-13]. CDs are non-toxic water-soluble cyclic oligosaccharides composed of six, seven or eight α -(1 \rightarrow 4) glucopyranose units giving rise, respectively, to α -, β - and γ -CDs [14]. Their most notable characteristic is their ability to form inclusion complexes with poorly soluble guest molecules which are entrapped in the hydrophobic cavity of CDs. Chemical modifications of the hydroxy groups of CDs can be performed to obtain water-soluble CD derivatives like hydroxypropyl-\beta-CD (HP- β -CD), methylated CDs (randomly methylated β -CD, RAMEB, or a low 2-O-methylated-β-CD, CRYSMEB) and sulfobutylether-β-CD (SBE-β-CD) (Figure 1). Molecular complexation in CDs has been widely proposed for EOs to limit their degradation during processing and storage and to offer a good dispersion of compounds in the aqueous media thus enhancing their biological properties [15,16].

To the best of our knowledge, no literature data reported the encapsulation of Ner in CDs. In this study, for the first time, CD/ Ner inclusion complexes were characterized in solution and in solid state. Formation constants (K_f) were determined for Ner with seven CDs: α -CD, β -CD, γ -CD, HP- β -CD, RAMEB, CRYSMEB and SBE-β-CD using phase solubility studies coupled to HPLC. The $K_{\rm f}$ values were determined for the separate isomers and their commercial mixture. To confirm the $K_{\rm f}$ values obtained for the isomeric mixture, UV-visible spectroscopy was employed using a competition method. The solubility of cabreuva EO rich in trans-Ner was also assessed with HP-β-CD using the total organic carbon method developed in our laboratory [17]. In addition, ¹H and 2D ROESY NMR experiments and molecular modelling were performed to investigate the orientations of trans-Ner inside the CD cavity. Next, the effect of encapsulation on the Ner photodegradation rate under UVB irradiation was examined. Solid HP-β-CD/Ner complexes were also prepared and the encapsulation efficiency (EE %) was determined.

Results and Discussion Phase solubility studies

Considering the low aqueous solubility of Ner, phase-solubility studies were conducted to examine the ability of different CDs (α -CD, β -CD, γ -CD, HP- β -CD, RAMEB, CRYSMEB and SBE- β -CD) to solubilize Ner. All concentrations were determined for each isomer from their commercial mixture by HPLC. The mean intrinsic solubility (S₀) of *cis*- and *trans*-Ner in water at room temperature was estimated to be about 5 and 7 µg/mL, respectively. The phase-solubility diagrams showed that the solubility of both isomers increased linearly with CD concentration. Thus, an about 60- and 80-fold increase in solubility is



achieved, in the presence of 10 mM HP-β-CD, for cis- and trans-Ner (284 µg/mL and 578 µg/mL, respectively). Moreover, the curves obtained for all CDs/Ner inclusion complexes followed an A_L-type profile except for β and γ -CD where B_s-type profiles were obtained (Figure 2). For AL-type phase solubility diagrams, the slope was less than unity which indicates the formation of 1:1 inclusion complexes [18]. The $K_{\rm f}$ values (Table 1) were then calculated as indicated in Equation 1 (experimental part). For β-CD and γ-CD, precipitation occurred at concentrations above 1 mM.

We can notice from Table 1, that the $K_{\rm f}$ values of CD/cis-Ner were generally lower than those of CD/trans-Ner. This is evidently attributed to the different spatial orientations of the isomers: trans-Ner adopts a linear conformation while cis-Ner has a more twisted one. Consequently, the interaction with the CD cavity is more favorable for the trans-Ner isomer leading to a more stable inclusion complex [16]. An exception is observed for γ -CD, where *cis*-Ner is better encapsulated than *trans*-Ner, owing to the larger cavity of this CD.

Phase-solubility studies also allow the determination of the complexation efficiency (CE) permitting to evaluate the solubilizing potential of CDs. CE is obtained either from the slope of phase solubility curve or by dividing the concentration of CD in its complexed form ([CD/Ner]) by its concentration in its free



Figure 2: Phase solubility diagrams of CD/trans-Ner inclusion complexes.

Table 1: Formation constants (K_f), solubility enhancement ratio (S_f/S_0) (in the presence of 10 mM CD, except for β -CD and γ -CD, 1mM) and complexation efficiency (CE) of cis and trans-Ner with different CDs

		cis-Ner ⁻¹) S _t /S ₀ CE ^a			trans-Ner		Ner ^b
CDs	$K_{\rm f}$ (M ⁻¹)		$K_{\rm f}({ m M}^{-1})$	St/S0	CE	$K_{\rm f} ({ m M}^{-1})$	
α-CD	81	1.85	0.002	619	8.80	0.021	418
β-CD	769	1.49	0.019	1233	1.80	0.043	1238
γ-CD	1866	2.76	0.046	752	1.68	0.026	1435
HP-β-CD	5540	51.53	0.137	9515	75.37	0.328	10365
RAMEB	8149	72.62	0.202	15577	104.40	0.537	19450
CRYSMEB	8787	72.77	0.217	14036	98.80	0.484	15412
SBE-β-CD	9240	80.20	0.229	13264	94.66	0.457	17768

^bNer: formation constant for the commercial mixture

form ([CD]) (Equation 2) [19]. For both isomers, the CE values of CD derivatives were higher than those of native CDs. For instance, the CE values of *trans*-Ner for HP- β -CD, RAMEB and SBE- β -CD were, respectively, 0.328, 0.537 and 0.457 versus 0.043 for β -CD (Table 1). These results showed that RAMEB is the best solubilizer among the studied CDs. The solubility enhancement of this CD towards many compounds has been reported in the literature [20-22]. However, HP- β -CD is the only β -CD derivative cited in the FDA's list of Inactive Pharmaceutical Ingredients among the studied derivatives, therefore, further studies will focus on this CD.

UV-visible spectroscopy

Formation constants between Ner (mixture of cis and trans isomers) and HP-β-CD was also evaluated by a UV-visible competition method with methyl orange (MO) as a competitor [23]. Before starting the competition experiment, the $K_{\rm f}$ value of the HP-β-CD/MO inclusion complex was determined by direct titration; the data were consistent with those reported in the literature [24]. The competition method measures the spectral variation of MO upon the addition of Ner to a solution containing HP-β-CD and MO. The addition of Ner induced an increase in MO absorbance, which indicates the formation of inclusion complex between Ner and HP-β-CD. The obtained spectral variations revealed once again the formation of 1:1 inclusion complexes (data not shown). The $K_{\rm f}$ values of HP- β -CD/Ner inclusion complexes (Table 2) were in good agreement with the phase solubility results. However, a slight increase was observed in $K_{\rm f}$ values obtained from the phase solubility studies. Indeed, formation constants determined by this method are generally overestimated since several effects are combined and not only complexation [25].

Table 2: Formation constants (K_f) of HP- β -CD inclusion complexes with Ner obtained by phase solubility and UV-visible competition method.			
Formation constants (M ⁻¹)	HP-β-CD	
Phase solubility	Ner	10365	
UV-visible	MO	7429	
	Ner	8168	

Phase solubility studies of cabreuva essential oil

Phase solubility studies were also performed for the cabreuva EO, an EO rich in *trans*-Ner (64.54%), at different HP- β -CD concentrations (0, 1.25, 2.5, 5, 7.5 and 10 mM). The phase solubility profile was obtained by the Total Organic Carbon (TOC) method [17]. The mass concentration of EO (g/L) obtained from the EO standard calibration curves, was plotted against CD con-

centration (Figure 3). As illustrated in Figure 3, the intrinsic solubility of EO was found to be of about 0.63 g/L. A linear increase in EO solubility was observed with HP- β -CD concentration (R² = 0.996). The solubility of cabreuva EO increased from 0.63 to 1.7 g/L in the presence of 10 mM HP- β -CD (\approx 3-fold increase). These results showed that HP- β -CD is able to enhance the aqueous solubility of cabreuva EO. Other studies have also demonstrated that CD could significantly increase the solubility of EO components [26].



Figure 3: Phase solubility profile of cabreuva EO obtained by the TOC method.

Characterization of solid inclusion complexes

HP- β -CD/Ner mixture was prepared as a solid inclusion complex by the freeze-drying method in the presence of 50 and 100 mM CD and a fixed Ner concentration (10 mM). The encapsulation efficiency (EE %) of the Ner mixture in CD at 5:1 and 10:1 CD/Ner molar ratios was evaluated by HPLC. A high EE % was obtained for both HP- β -CD/Ner molar ratios (99 and 100% for 5:1 and 10:1, respectively) in good agreement with phase solubility results. The Ner contents were equal to 0.032 and 0.020 mg_{Ner}/mg_{solid complex} for 5:1 and 10:1 molar ratios, respectively. These results showed that a 5:1 ratio is enough to have a high EE %.

NMR study

In order to elucidate the possible orientations of *trans*-Ner within the CD cavity, NMR spectroscopy was used. Because HP- β -CD is a heterogeneous mixture of isomers, NMR was conducted only with β -CD. ¹H NMR and ROESY spectra were recorded for β -CD and β -CD/*trans*-Ner solutions in D₂O. The induced shift ($\Delta\delta$) which is the difference between chemical shifts of β -CD protons in the presence and absence of *trans*-Ner, was calculated as follows: $\Delta\delta = \delta_{(complex)} - \delta_{(free)}$. Positive and negative signs showed downfield and upfield displace-

ment, respectively. The inclusion of the guest into the CD cavity is generally proved by the chemical shift variations of the guest or the CD. Particularly, a shielding of inner protons of the CD is induced after inclusion of a guest into the CD cavity while protons of the outside are generally unchanged [27]. It should be noted that in our study, the NMR spectra of trans-Ner alone in D₂O could not be obtained due to its low aqueous solubility. The proton chemical shifts of β -CD and β -CD/*trans*-Ner inclusion complex solutions are shown in Table 3. As expected, the presence of trans-Ner shifted upfield the protons located inside the CD hydrophobic cavity (H₃, H₅ and H₆) more effectively than those located at the surface $(H_1, H_2 \text{ and } H_4)$. These observations confirmed that trans-Ner is included into the CD cavity without evidence for outside complexation. Besides, the higher upfield shift value of 0.12 ppm was assigned to H₅ (Table 3). This probably means that the complexation of trans-Ner within the CD cavity involves hydrophobic interactions and that Ner penetrates the cavity from the wider side [28].

Furthermore, a ROESY experiment was performed to gain further insight into the dynamic structure of the β -CD/*trans*-Ner inclusion complex. The two-dimensional spectrum indicates a strong intermolecular cross-peaks between H₃ and H₅ protons

Table 3: ¹ H NMR chemical shifts (δ , ppm) for free β -CD and β -CD/
trans-Ner inclusion complex solutions in D ₂ O in the presence of
0.5 mM β-CD and 3.28 mM <i>trans</i> -Ner.

$\delta_{(\text{free})} (\text{ppm})$	$\delta_{(complex)}$ (ppm)	Δ δ (ppm)
5.11	5.08	-0.03
3.70	3.67	-0.03
3.62	3.61	-0.01
4.00	3.93	-0.07
3.89	3.77	-0.12
3.91	3.83	-0.08
	δ _(free) (ppm) 5.11 3.70 3.62 4.00 3.89 3.91	$\begin{array}{c c} \delta_{(\text{free})} \ (\text{ppm}) & & \delta_{(\text{complex})} \ (\text{ppm}) \\ \hline 5.11 & 5.08 \\ 3.70 & 3.67 \\ 3.62 & 3.61 \\ 4.00 & 3.93 \\ 3.89 & 3.77 \\ 3.91 & 3.83 \\ \end{array}$

of β -CD and the protons of *trans*-Ner's methyl groups (Figure 4a). As can be seen in Figure 4a, the H-16 proton of *trans*-Ner interacted only with H₃ proton of β -CD. Additionally, H-14 proton signals of *trans*-Ner showed intense cross-peaks with the inner CD protons, in particular with H₅. However, H-1 and H-4 of *trans*-Ner did not interact with any of CD interior protons. Based on these data, we suggested that *trans*-Ner is included in the β -CD cavity where the hydroxy group is oriented towards the wider rim of β -CD and the methyl groups located at positions 1 and 4 are present outside the narrow side of CD.



Molecular modelling

The theoretical molecular modelling is useful to illustrate the most energetically favorable three-dimensional structure of the inclusion complex in solution. The inclusion complex conformer that presents the weakest relative binding energies (ΔE) (i.e., the most stable conformer) is represented in Figure 4b. The results showed that the formation of the β -CD/*trans*-Ner inclusion complex is an energetically favorable process and that the inclusion mode is coherent with the experimental NMR results.

Photodegradation studies of Ner

To the best of our knowledge, no studies were performed on the photodegradation of Ner under UV-light. Nonetheless, we can assume that the presence of three C=C double bonds may indicate the susceptibility of Ner to be photodegradable [29]. Therefore, the photostability of Ner was carried out in aqueous solution, in the absence and the presence of different CDs (α -CD,

 β -CD, HP- β -CD and SBE- β -CD) after its irradiation with UVB light. The concentration of each isomer was determined by HPLC. The effect of HP-β-CD on the photostability of *trans*-Ner in the cabreuva EO was also assessed upon UVB exposure. The photodegradation reaction of all samples followed a firstorder kinetics. First, a constant concentration of Ner (0.1 mM) was added to various concentrations of HP- β -CD (0.1, 1 and 10 mM). Figure 5 represents the percentage of cis, trans-Ner and the mixture remaining in the solution after irradiation in function of time. It can be observed that Ner was rapidly degraded in the absence of CD; after 120 min of UVB exposure, only about 17% of Ner remained in the solution (Figure 5a). However, its degradation was slowed down as the HP-β-CD concentration increased. For example, after 120 min of irradiation, about 60 and 90% of Ner was still remaining in the solution in the presence of 0.5 and 10 mM HP- β -CD, respectively. The inclusion of Ner into the CD cavity exhibited a protective effect against photodegradation. This effect was more impor-



Figure 5: Photodegradation kinetics of *cis*-Ner (a), *trans*-Ner (b), the isomer mixture Ner (c) in the absence and presence of increasing concentrations of HP-β-CD (0.5, 1 and 10 mM) and of *trans*-Ner in cabreuva EO (d) in the absence and presence of 1 mM HP-β-CD under UV light irradiation.

Beilstein J. Org. Chem. 2017, 13, 835-844.

tant as the concentration of HP-\beta-CD increased, due to the larger amount of complexed Ner. Furthermore, the photostability of trans-Ner in the cabreuva EO was investigated with 1 mM HP-β-CD (Figure 5b). We can observe that *trans*-Ner in cabreuva EO was totally degraded after 180 min of irradiation; whereas the complexation of EO with HP-B-CD enhanced the stability of trans-Ner (only 40% of trans-Ner was degraded in HP-β-CD solution after 180 min, Figure 5b). The existing literature also showed the protective effect of CD towards other guests [13,30-33]. When comparing the photostability of trans-Ner in its pure form and in the EO, it can be noted that the degradation of *trans*-Ner alone ($K = 0.0145 \text{ min}^{-1}$) was slightly different than *trans*-Ner in EO ($K = 0.0127 \text{ min}^{-1}$). This finding could be explained by the presence of other chemical compounds in the EO that may be influence the degradation of trans-Ner [34].

Then, we compared the effect of different CDs at a fixed concentration (1 mM) on the photostability of Ner upon UVB irradiation. From Table 4, we can notice that in the absence of CD, trans-Ner is more rapidly degraded than cis-Ner $(K = 0.0145 \text{ min}^{-1} \text{ and } K = 0.0121 \text{ min}^{-1} \text{ for trans and cis}$ isomers, respectively). The main reason behind its instability is that trans-Ner isomerizes to its cis form during irradiation [34,35]. However, the presence of CD improved the photostability of trans-Ner more efficiently compared to cis-Ner (Table 4). This could be explained by the fact that trans-Ner is better encapsulated in CD than cis-Ner (Table 1). For example, in the presence of SBE- β -CD, the K value of *trans*-Ner was 0.0007 min⁻¹ while that of *cis*-Ner was 0.0012 min⁻¹. This difference could be attributed to the difference in $K_{\rm f}$ values between the two isomers ($K_{f cis-Ner} = 9240 \text{ M}^{-1}$ and $K_{f trans-Ner} =$ 13264 M^{-1}). It is worth noting that the higher the $K_{\rm f}$ value, the higher the photoprotective effect of CD; thus, SBE- β -CD (K_f = 17768 M^{-1}) > HP-β-CD (K_f = 10365 M^{-1}) > β-CD (K_f = 1238 M^{-1}) > α -CD ($K_f = 418 M^{-1}$).

Table 4: Photodegradation rate constants (K , min ⁻¹ , Equation 5) of CD/Ner inclusion complexes upon UVB irradiation.				
K (min ⁻¹)	cis-Ner	trans-Ner	Ner	
No CD	0.0121	0.0145	0.0134	
α-CD	0.0051	0.0051	0.0051	
β-CD	0.0019	0.0010	0.0013	
HP-β-CD	0.0017	0.0012	0.0014	
SBE- β-CD	0.0012	0.0007	0.0009	

Conclusion

In this study, inclusion complexes of Ner (*cis*, *trans* and the isomer mixture) with seven CDs were successfully formed in

aqueous solution. All inclusion complexes exhibited an 1:1 (CD:Ner) stoichiometry, with Kf values of CD/trans-Ner superior to those of CD/cis-Ner. The solubility of Ner and of the cabreuva EO (containing 64.54% of trans-Ner) was greatly enhanced in the presence of CDs. Moreover, solid HP- β -CD/Ner inclusion complexes were obtained with a high encapsulation efficiency (EE %). Structural characterization by NMR and molecular modelling confirmed once again the formation of the inclusion complex between *trans*-Ner and β -CD. The most stable structure was obtained for the hydroxy group oriented towards the wide rim of the CD. Finally, the photostability of Ner and of trans-Ner in cabreuva EO was remarkably improved upon CD complexation, thereby proving the protective effect of CD. From the above results, we could conclude that CDs are effective encapsulating agents for Ner, able to enhance its solubility and photostability.

Experimental Materials

Nerolidol (98%, mixture of *cis* (40%) and *trans* (60%) isomers), *trans*-nerolidol (\geq 85%, analytical standard) and thymol (>99%) were purchased from Sigma-Aldrich (Missouri, United States). Cabreuva (*Myrocarpus fastigiatus*) essential oil (64.54% of *trans*-Ner) was purchased from Herbes et Traditions (Comines, France). Methylorange (MO) was provided by Acros Organics (Massachusetts, United States). α -CD, β -CD, HP- β -CD (DS = 5.6) and RAMEB (DS = 12.6) were purchased from Wacker-Chemie (Lyon, France). CRYSMEB (DS = 4.9) was provided from Roquette Frères (Lestrem, France). SBE- β -CD (DS = 6.5, Captisol[®]) was donated by Ligand Pharmaceuticals Incorporated (La Jolla, USA). Methanol HPLC-grade was purchased from VWR Chemicals (Atlanta, United States).

Methods

HPLC assay

Chromatographic analysis was performed with a Waters 600E multisolvent delivery system HPLC. The method development for estimation of Ner quantity in CD was carried out using the analytical column Xterra RP C18 (150×4.6 mm, 5 µm). The column temperature was maintained at 25 °C. The mobile phase consisted of methanol/water (70:30 v/v). The flow rate was set at 1 mL/min. The injection volume was 20 µL. The wavelength of UV detector was set at 212 nm. Stock solutions of Ner (1 mg/mL) and thymol (1 mg/mL) were prepared in methanol. Then, diluted concentrations of Ner ranged from 5 to 250 µg/mL and 100 µg/mL thymol, used as internal standard, were prepared in methanol. For HPLC measurement, 100 µL of each sample was added to thymol (100 µL) and methanol (200 μ L). The mixture was then sonicated at 4 °C and centrifuged at 15000 rpm at 4 °C. The HPLC method was validated in terms of linearity, repeatability and limit of detection.

Formation constants determination

UV-visible spectroscopy The UV-visible competition method described by Landy et al. [23] was used to determine the formation constants (K_f) of HP-β-CD/Ner inclusion complexes. Methylorange (MO), an azo dye, was used as a competitor. First, the $K_{\rm f}$ of the HP- β -CD/MO inclusion complex was calculated by a direct titration method. Then, a spectral displacement method was performed by adding Ner to a solution containing constant concentrations of HP-β-CD and MO. The expulsion of MO from HP-β-CD cavity induced an absorbance increment. The spectrum of MO solution (0.1 mM) was recorded between 520 and 530 nm. In this range of wavelengths, there was an optimal difference in absorbance between the free and encapsulated forms of MO. The HP-β-CD/ Ner $K_{\rm f}$ values were calculated by an algorithmic treatment to minimize the difference between the experimental and theoretical values of the peak area. The $K_{\rm f}$ calculation is based on 1:1 stoichiometry for HP-\beta-CD/MO and HP-β-CD/Ner. All measurements were done using a UV-visible dual-beam spectrophotometer with a 1 cm thick quartz cuvette (Perkin Elmer Lambda 2S).

Phase solubility studies

Phase solubility studies were performed according to Higuchi and Connors [36]. Excess amounts of Ner were added to 2 mL of CD solution (a-CD, RAMEB, CRYSMEB, HP-β-CD or SBE-β-CD) at concentrations varying from 0 to 10 mM, except for γ - and β -CD where lower concentrations were used (0-1 mM). The mixtures were shaken for 24 h at 25 °C. After the equilibrium was reached, the solution was filtered through a 0.45 µm filter. The concentrations of cis and trans-Ner were determined using the HPLC method described above. The solubility of Ner was plotted against CD concentration. Formation constant (K_f) values of CD:Ner inclusion complexes were calculated from phase-solubility diagrams using the following equation:

$$K_{\rm f} = \frac{slope}{S_0 \ (1-slope)} \tag{1}$$

where S_0 is the intrinsic solubility of Ner in aqueous solution without CD.

The solubilizing effect of CD was also determined by calculating complexation efficiency (CE) parameter which is the concentration ratio between CD in a complex and free CD:

$$CE = S_0 \times K_{1:1} = \frac{[CD / Ner]}{[CD]} = \frac{slope}{1 - slope}$$
(2)

Total organic carbon (TOC) analysis

Phase solubility studies of cabreuva EO with HP-β-CD were investigated by TOC analysis using a Shimadzu TOC-VCSH analyzer. It is based on the production of carbon dioxide (CO₂) following oxidation of organic compounds. CO2 is then detected using a high-sensitivity infrared gas analyzer (NDIR). First, TOC was measured for the CD solution (TOC_{CD}). Then, the amount of EO in the filtrate was calculated using the following equation: $TOC_{EO} = TOC_T - TOC_{CD}$, where TOC_T is the TOC value obtained for the filtrate by the TOC analyzer. Results were reported in g/L of organic carbon. The solubility of EO was determined from standard curves constructed with known EO concentrations.

Preparation of the solid inclusion complex by freeze-drving

Ner (10 mM) was added to different HP-B-CD (50 and 100 mM) aqueous solutions. Solutions were stirred at 300 rpm for 24 h at 25 °C. After equilibrium was reached, the suspensions were filtered, frozen at -20 °C for 24 h and lyophilized. The lyophilization process was carried out at -85 °C and 0 Pa in a Christ Alpha 2-4 LD Freeze dryer until all moisture had been sublimated.

Encapsulation efficiency

Encapsulation efficiency (EE %) of Ner as a mixture (10 mM) into HP-B-CD (50 and 100 mM CD) was carried out by dissolving 10 mg of solid inclusion complexes in ethanol (10 mL). An aliquot of each sample was taken and analyzed by the HPLC method described above.

The EE % was calculated as follows:

$$EE \% = \frac{m_{\exp} (\text{mg})}{m_{t} (\text{mg})}$$
(3)

where m_{exp} and m_t are the experimental and theoretical (amount of Ner initially added to prepare the solid inclusion complex) quantities of Ner in the solid inclusion complexes, respectively.

Molecular modelling studies

Molecular mechanics simulation was done using the Macromodel-MMFFs force field in the presence of water (GB/SA implicit model) as implemented in the Schrodinger software (release 2014). The CD hosts were based on a non-distorted monomeric β -CD with C7 symmetry. *trans*-Ner were constructed manually. Fifty conformations of trans-Ner/CD complexes were selected (Monte Carlo conformational searches: Mixed torsional/low mode sampling, 10000 structures generated, FMNR conjugate gradient minimization, convergence fixed to 0.01 kJ Å⁻¹ mol⁻¹). The total energy difference (ΔE , kJ/mol) between the inclusion complex and the sum of their individual components in their optimized fundamental states was calculated ($\Delta E = E_{\text{CD/Ner}} - (E_{\text{CD}} + E_{\text{Ner}})$) and used as the theoretical parameter to evaluate the complexation energy of the inclusion complex.

NMR spectroscopy

NMR experiments were realized for β -CD/*trans*-Ner inclusion complex solution. ¹H NMR spectra were acquired on a 400 MHz Bruker Avance III spectrometer at room temperature equipped with a multinuclear z-gradient PABBO probe head capable of producing magnetic field pulse gradients in the z-direction of 48.15 G·cm⁻¹. *trans*-Ner and β -CD were dissolved in 99.98% D₂O. Two-dimensional (2D) ROESY off resonance spectra were acquired at 25 °C with presaturation of the residual water resonance and a mixing (spin-lock) time of 600 ms, using the States-TPPI method with a 2048 K time domain in F2 and 512 experiments in F1. Sixty-four scans were recorded to obtain a good resolution 2D ROESY spectra.

Photostability study

The Ner photodegradation experiment was realized under an artificial UV source (UVB, 310 nm) in a 100 mL quartz reactor, with continuous stirring, using a Multirays apparatus (Heliosquartz, Italy). The photostability of Ner, cabreuva EO and their inclusion complexes with CDs was investigated under UVB irradiation as a function of time.

Ner (0.1 mM) was added to solutions of various HP- β -CD concentrations (0.5, 1 and 10 mM) and to 1 mM solutions of α -, β and SBE- β -CD. Cabreuva EO (1.27 μ L) was also added to 1 mM HP- β -CD aqueous solution. Ner and cabreuva EO aqueous solutions without CD were also prepared. Irradiated aliquots were withdrawn every 60 min, over 8 h of total irradiation and the remaining Ner concentration was then determined by HPLC.

The percentage of Ner remaining was calculated as follows:

%Ner remaining =
$$\frac{C_{\rm t}}{C_{\rm i}} \times 100$$
 (4)

where C_t is Ner concentration in solution after irradiation at time t and C_i is Ner concentration before irradiation.

The photodegradation constant (K, \min^{-1}) was also calculated using the following equation:

$$\ln\left[\operatorname{Ner}\right] = -Kt + b \tag{5}$$

Supporting Information

Supporting Information File 1 ¹H NMR spectra. [http://www.beilstein-journals.org/bjoc/content/ supplementary/1860-5397-13-84-S1.pdf]

Acknowledgments

Authors are grateful to the Lebanese University and the Université du Littoral Côte d'Opale for the financial support of J. Azzi's PhD thesis. The study was supported by the Agence Universitaire de la Francophonie (Projet de Coopération Scientifique Inter-universitaire 2015-2017).

References

- Mc Ginty, D.; Letizia, C. S.; Api, A. M. Food Chem. Toxicol. 2010, 48 (Suppl. 3), S43–S45. doi:10.1016/j.fct.2009.11.008
- Lapczynski, A.; Bhatia, S. P.; Letizia, C. S.; Api, A. M. Food Chem. Toxicol. 2008, 46 (Suppl. 11), S247–S250. doi:10.1016/j.fct.2008.06.063
- Schubert, V.; Dietrich, A.; Ulrich, T.; Mosandl, A. Z. Naturforsch., C: J. Biosci. 1992, 47, 304–307.
- Tao, R.; Wang, C.-Z.; Kong, Z.-W. *Molecules* 2013, *18*, 2166–2182. doi:10.3390/molecules18022166
- Nardello-Rataj, V.; Leclercq, L. Beilstein J. Org. Chem. 2014, 10, 2603–2622. doi:10.3762/bjoc.10.273
- Sekhon, B. S. Nanotechnol., Sci. Appl. 2010, 3, 1–15. doi:10.2147/NSA.S8677
- Mozafari, R. M.; Khosravi-Darani, K.; Borazan, G. G.; Cui, J.; Pardakhty, A.; Yurdugul, S. *Int. J. Food Prop.* 2008, *11*, 833–844. doi:10.1080/10942910701648115
- Nedovic, V.; Kalusevic, A.; Manojlovic, V.; Levic, S.; Bugarski, B. *Procedia Food Sci.* 2011, *1*, 1806–1815. doi:10.1016/j.profoo.2011.09.265
- Rodríguez, J.; Martín, M. J.; Ruiz, M. A.; Clares, B. Food Res. Int. 2016, 83, 41–59. doi:10.1016/j.foodres.2016.01.032
- Astray, G.; Gonzalez-Barreiro, C.; Mejuto, J. C.; Rial-Otero, R.; Simal-Gándara, J. *Food Hydrocolloids* **2009**, *23*, 1631–1640. doi:10.1016/j.foodhyd.2009.01.001
- Kfoury, M.; Landy, D.; Auezova, L.; Greige-Gerges, H.; Fourmentin, S. Beilstein J. Org. Chem. 2014, 10, 2322–2331. doi:10.3762/bjoc.10.241
- 12. Wang, X.; Yuan, Y.; Yue, T. *Starch/Staerke* **2015**, *67*, 225–236. doi:10.1002/star.201400163
- Kfoury, M.; Lounès-Hadj Sahraoui, A.; Bourdon, N.; Laruelle, F.; Fontaine, J.; Auezova, L.; Greige-Gerges, H.; Fourmentin, S. Food Chem. 2016, 196, 518–525. doi:10.1016/j.foodchem.2015.09.078
- 14. Szejtli, J. Chem. Rev. 1998, 98, 1743–1754. doi:10.1021/cr970022c
- Marques, H. M. C. Flavour Fragrance J. 2010, 25, 313–326. doi:10.1002/ffj.2019
- Kfoury, M.; Balan, R.; Landy, D.; Nistor, D.; Fourmentin, S. Supramol. Chem. 2015, 27, 620–628. doi:10.1080/10610278.2015.1051977
- Kfoury, M.; Auezova, L.; Greige-Gerges, H.; Fourmentin, S. Anal. Chim. Acta 2016, 918, 21–25. doi:10.1016/j.aca.2016.03.013
- Del Valle, E. M. M. Process Biochem. 2004, 39, 1033–1046. doi:10.1016/S0032-9592(03)00258-9

- Loftsson, T.; Hreinsdóttir, D.; Másson, M.
 J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem. 2007, 57, 545–552. doi:10.1007/s10847-006-9247-2
- Mathiron, D.; Marçon, F.; Dubaele, J.-M.; Cailleu, D.; Pilard, S.; Djedaïni-Pilard, F. J. Pharm. Sci. 2013, 102, 2102–2111. doi:10.1002/jps.23558
- Kfoury, M.; Auezova, L.; Greige-Gerges, H.; Ruellan, S.; Fourmentin, S. *Food Chem.* **2014**, *164*, 454–461. doi:10.1016/j.foodchem.2014.05.052
- Fenyvesi, E.; Szemán, J.; Csabai, K.; Malanga, M.; Szente, L. J. Pharm. Sci. 2014, 103, 1443–1452. doi:10.1002/jps.23917
- Landy, D.; Fourmentin, S.; Salome, M.; Surpateanu, G. J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem. 2000, 38, 187–198. doi:10.1023/A:1008156110999
- 24. Decock, G.; Fourmentin, S.; Surpateanu, G. G.; Landy, D.; Decock, P.; Surpateanu, G. Supramol. Chem. 2006, 18, 477–482. doi:10.1080/10610270600665749
- 25. Messner, M.; Kurkov, S. V.; Jansook, P.; Loftsson, T. *Int. J. Pharm.* **2010**, *387*, 199–208. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.11.035
- Samperio, C.; Boyer, R.; Eigel, W. N., III; Holland, K. W.; McKinney, J. S.; O'Keefe, S. F.; Smith, R.; Marcy, J. E. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 12950–12956. doi:10.1021/jf103275a
- Schneider, H.-J.; Hacket, F.; Rüdiger, V. Chem. Rev. 1998, 98, 1755–1786. doi:10.1021/cr970019t
- 28. Fernandes, C. M.; Carvalho, R. A.; Pereira da Costa, S.; Veiga, F. J. B. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2003**, *18*, 285–296. doi:10.1016/S0928-0987(03)00025-3
- 29. Hayashi, N.; Nakata, Y.; Yazaki, A. Antimicrob. Agents Chemother. **2004**, *48*, 799–803. doi:10.1128/AAC.48.3.799-803.2004
- Villaverde, J.; Maqueda, C.; Undabeytia, T.; Morillo, E. Chemosphere 2007, 69, 575–584. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.03.022
- 31. Fir, M. M.; Smidovnik, A.; Milivojevic, L.; Zmitek, J.; Prosek, M. J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem. 2009, 64, 225–232. doi:10.1007/s10847-009-9555-4
- Carlotti, M. E.; Sapino, S.; Ugazio, E.; Caron, G. J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem. 2011, 70, 81–90. doi:10.1007/s10847-010-9864-7
- Hădărugă, D. I.; Hădărugă, N. G.; Costescu, C. I.; David, I.; Gruia, A. T. Beilstein J. Org. Chem. 2014, 10, 2809–2820. doi:10.3762/bjoc.10.298
- 34. Turek, C.; Stintzing, F. C. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 2013, 12, 40–53. doi:10.1111/1541-4337.12006
- 35. Ahmad, I.; Ahmad, S.; Anwar, Z.; Sheraz, M. A.; Sikorski, M. Int. J. Photoenergy 2016, No. 8135608. doi:10.1155/2016/8135608
- Higuchi, T.; Connors, A. K. Phase solubility techniques. In Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation; Reilly, C. N., Ed.; Wiley-Interscience: New York, 1965; Vol. 4, pp 117–212.

License and Terms

This is an Open Access article under the terms of the Creative Commons Attribution License (<u>http://creativecommons.org/licenses/by/4.0</u>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The license is subject to the *Beilstein Journal of Organic Chemistry* terms and conditions: (http://www.beilstein-journals.org/bjoc)

The definitive version of this article is the electronic one which can be found at: doi:10.3762/bjoc.13.84

First evaluation of drug-in-cyclodextrin-in-liposomes as an encapsulating system for nerolidol

Joyce Azzi^{1, 2}, Lizette Auezova¹, Pierre-Edouard Danjou², Sophie Fourmentin² and Hélène

Greige-Gerges^{1*}

¹Bioactive Molecules Research Group, Doctoral School of Sciences and Technologies,

Faculty of Sciences, Lebanese University, Lebanon.

²Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV, EA 4492), SFR

Condorcet FR CNRS 3417, ULCO, F-59140 Dunkerque, France.

Email: greigegeorges@yahoo.com; hgreige@ul.edu.lb

Abstract

Nerolidol, a naturally occurring sesquiterpene with antimicrobial activities, is a promising candidate as a natural alternative for food synthetic preservatives. However, its application is limited by its low aqueous solubility and stability. In this study, conventional liposomes and drug-in-cyclodextrin-in-liposomes (DCLs) were evaluated for the first time as encapsulating materials for nerolidol. The size, encapsulation efficiency (EE%), loading rate (LR%), and photo- and storage stabilities of both systems were characterized. Moreover, the in vitro release of nerolidol from liposomes and DCLs was investigated over time. Nerolidol was efficiently entrapped in both carriers with high EE% and LR% values. In addition, DCLs prolonged the release of nerolidol over one week and enhanced the photostability more effectively than conventional liposomes. Finally, all formulations were stable after 12 months of storage at 4 °C (> 60% incorporated nerolidol). Therefore, DCLs are promising carriers for new applications of sesquiterpenes in the pharmaceutical and food industries.

Keywords: drug-in-cyclodextrin-in-liposomes; liposomes; nerolidol; photostability; release.

1. Introduction

Currently, the primary concern of the food industry is to produce and provide safe food products with added functionality and extended shelf-lives. Therefore. research is directed toward replacing synthetic carcinogenic preservatives with natural, non-toxic molecules (Palzer, 2009). Nerolidol is an acyclic sesquiterpene alcohol (Fig. 1) that is naturally found in the essential oils of citronella, neroli, lemongrass, ginger and rose. Nerolidol has a wide range of important biological functions, such as antimicrobial (Brehm-Stecher & Johnson, 2003; Tao, Wang, & Kong, 2013) anticancer (Sun et al., 2010) and anti-inflammatory (Ku & Lin, 2013) activities. In addition, nerolidol is considered safe by the European Food Safety authority (EFSA) and classified as generally recognized as safe (GRAS) by the Food and Drug Administration (Lapczynski, Bhatia, Letizia, & Api, 2008). Therefore, its incorporation into food products may be a promising strategy for food preservation. Nevertheless, several factors limit the use of nerolidol, such as low water solubility and susceptibility to photodegradation (Brehm-Stecher & Johnson, 2003; McGinty, Letizia, & Api, 2010). Hence, a promising approach to enable more widespread use of nerolidol is the development of encapsulating systems that could improve its physicochemical properties.

Liposomes, cyclodextrins (CDs) and, more recently, drug-in-cyclodextrin-in-liposomes (DCLs) are promising encapsulating systems that can enhance both the solubility and photostability of various compounds, such as aromatics, essentials oils and hydrophobic drugs (Aloisio, Antimisiaris, & Longhi, 2017; Astray, Gonzalez-Barreiro, Mejuto, Rial-Otero, & Simal-Gándara, 2009; Gharib, Auezova, Charcosset, & Greige-Gerges, 2017; Kfoury et al., 2016; Laouini et al., 2012; Szente &Szejtli, 2004).

Liposomes are spherical vesicles with concentric phospholipid bilayers that spontaneously form in aqueous solution. A lipid bilayer membrane encloses an aqueous core where hydrophilic drugs may be encapsulated, while lipophilic drugs can be trapped within the membrane (Rodríguez, Martín, Ruiz, & Clares, 2016). Nevertheless, the incorporation of highly hydrophobic molecules into liposomes can destabilize the lipid membrane, causing the rapid release of the drug from the bilayer. To circumvent this problem, a combined system of CDs and liposomes was developed by McCormack and Gregoriadis (1994). The so-called drug-in-cyclodextrin-in-liposomes (DCLs) system entraps the CD/drug inclusion complex into liposomes.

CDs are natural oligosaccharides obtained by the enzymatic degradation of starch; they belong to the family of cage molecules due to their structure, which is composed of a hydrophobic cavity that can encapsulate a variety of hydrophobic compounds through host-guest interactions. The native and most common CDs are composed of six (α -CD), seven (β -CD) and eight (γ -CD) glycosyl units (Szejtli, 1998). Numerous CD derivatives with increased solubility are commercially available. Hydroxypropyl- β -CD (HP- β -CD), an FDA-approved β -CD derivative, is widely used in the food industry due to high solubility (>500 mg/mL) and low toxicity toward biological membranes (Miranda, Martins, Veiga & Ferraz, 2011; Piel et al., 2007; Yuan, Jin, & Li, 2008). The presence of CD in the aqueous compartments of liposomes do not affect liposome characteristics and preserve membrane integrity (Hatzi, Mourtas, Klepetsanis, & Antimisiaris, 2007; Maestrelli, González-Rodríguez, Rabasco, Ghelardini, & Mura, 2010).

DCLs combine the advantages of both carriers and thereby provide a controlled drug release (Chen et al., 2014; Gharib, Greige-Gerges, Fourmentin, Charcosset, & Auezova, 2015). The DCL system was applied to encapsulate a variety of lipophilic drugs (Bragagni, Maestrelli, Mennini, Ghelardini, & Mura, 2010; Fatouros, Hatzidimitriou, & Antimisiaris, 2001; Maestrelli, Gonzalez-Rodriguez, Rabasco, & Mura, 2005; Gharib, Auezova, Charcosset, & Greige-Gerges, 2017; Sebaaly, Charcosset, Stainmesse, Fessi, & Greige-Gerges, 2016). In this study, nerolidol was encapsulated into liposomes and DCLs. Then, the size, encapsulation efficiency and storage stability of both systems were characterized. The effects of encapsulation on the solubility, photostability and release kinetics of nerolidol were also assessed.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Nerolidol (98%, mixture of cis and trans isomers), thymol (>99%), absolute ethanol, and HPLC-grade methanol were purchased from Sigma Aldrich (St Louis, Missouri, United States). Hydroxypropyl- β -CD (HP- β -CD, DS = 5.6) was a kind gift from Roquette (Lestrem, France). Lipoid E80 (80-85% egg phosphatidylcholine, 7-9.5% phosphatidylethanolamine, 2% water, and 0.2% ethanol) was obtained from Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany). Dialysis membranes (MWCO 0.5-1 kDa and 8-10 kDa) were purchased from Spectrum Laboratories (California, United States). All products were analytical grade and used as received. Distilled deionized water was used all over the study.

2.2. HPLC analysis

The concentration of nerolidol in all formulations was determined using a Hitachi LaChrom Elite® HPLC system (pump L-2130, autosampler L-2200) coupled to a diode array detector (L-2455). Thymol was used as an internal standard. Stock solutions of nerolidol (1 mg/mL) and thymol (1 mg/mL) were prepared in methanol. The nerolidol stock solution was then diluted to obtain final concentrations in the range of 1-250 µg/mL. The standard solution of thymol (100 µg/mL) was also prepared in methanol. To determine nerolidol concentration, 100 µL of the sample and 100 µL of the thymol standard solution were added to 200 µL of methanol. The mixture was then sonicated at 4 °C and centrifuged at 15000 rpm at 4 °C. The supernatant (20 µL) was then injected into a reverse-phase C18 Supelco column (15 cm x 4.6 mm, 5 µm). HPLC analysis was achieved in an isocratic mode consisting of water and methanol (75:25) at a flow rate of 1 mL/min. The column temperature was maintained at 25 °C. The wavelength of the UV detector was 212 nm. The HPLC method was validated with respect to linearity, repeatability and limit of detection.

2.3. Preparation of aqueous solutions of CD/nerolidol inclusion complexes

Nerolidol (44.47 mg) was added to 20 mL of water or 20 mL of HP- β -CD aqueous solutions (10, 25, 50 and 100 mM) and agitated at a stirring rate of 300 rpm for 24 h at 25 °C. The solutions were then filtered using a 0.45- μ m filter, and the amount of nerolidol solubilized in the filtrate was determined by HPLC. The filtrates, containing the HP- β -CD/nerolidol inclusion complexes, were later used as the aqueous phase in the DCLs preparations, while the filtrate without CD was used to determine the aqueous solubility of nerolidol.

2.4. Preparation of liposomes

Liposomes were prepared with the ethanol injection method (Sebaaly, Jraij, Fessi, Charcosset, & Greige-Gerges, 2015b). An ethanol solution (10 mL) containing E80 phospholipids (50 mg/mL) was injected into an aqueous solution (20 mL) using a syringe pump (Fortuna optima, GmbH-Germany) at an injection flow rate of 1 mL/min under magnetic stirring (400 rpm) at room temperature. The obtained liposomal suspension was maintained for 15 min while stirring (400 rpm). Ethanol was finally removed using a rotary evaporator under reduced pressure at 40 °C (Heidolph GmbH, Germany).

The same procedure was applied to prepare nerolidol-loaded liposomes except that, in this case, the organic phase contained nerolidol at various E80 to nerolidol molar ratios (100:1; 100:2.5; 100:5 or 100:10).

DCLs were prepared using the different HP- β -CD/nerolidol inclusion complex solutions as the aqueous phase. The obtained DCLs were maintained at 4 °C for further characterization. Each preparation was performed in triplicate.

2.5. Characterization of liposomes

2.5.1. Particle size measurements

The diameter and size distribution of the particles were determined by laser granulometry using a Partica LA-950V2 laser diffraction particle size distribution analyzer (Horiba, Japan). This

instrument enables the measurement of particles ranging from 0.01 μ m to 3000 μ m and is suitable for liposomes.

2.5.2. Determination of encapsulation efficiency and loading rate

The liposomal suspensions were centrifuged at 15000 rpm for 1 h at 4 °C using Vivaspin 500 centrifugal concentrators (Sartorius Stedim Biotech, Germany, MWCO = 10 kDa) to recover the free nerolidol present in the filtrate. The concentration was then determined by HPLC, as described in Section 2.2.

The EE% of nerolidol in liposomes and DCLs was calculated according to the following formula:

$$EE (\%) = \frac{[nerolidol]_{liposomes}}{[nerolidol]_{total}} \times 100 (1)$$

where $[nerolidol]_{liposomes} = [nerolidol]_{total} - [nerolidol]_{free}$.

The LR% of nerolidol in conventional liposomes was calculated as follows:

LR (%)=
$$\frac{m_{\text{liposomes}}}{m_{\text{initial}}} \times 100 (2)$$

where $m_{liposomes}$ stands for nerolidol amount incorporated in the vesicles and determined by HPLC, and $m_{initial}$ is the initial mass of nerolidol added in the organic phase to prepare the liposomes.

The LR% for nerolidol in DCLs was calculated as follows:

$$LR_{DCL}(\%) = \frac{m_{DCL}}{m_{initial}} \times 100 (3)$$

where m_{DCL} is the nerolidol amount incorporated in the vesicles in the presence of CD and determined by HPLC, and $m_{initial}$ is the initial mass of nerolidol used to prepare the CD/nerolidol inclusion complex.

2.5.3. In vitro release kinetics of nerolidol

The in vitro release of nerolidol from CD/nerolidol inclusion complexes, conventional liposomes and DCLs was assessed in distilled water using dialysis tubing. For liposomes and DCLs, 5 mL from each liposomal preparation was centrifuged at 15000 rpm for 1 h to remove unretained molecules. The pellet was resuspended in distilled water (5 mL) and placed in the dialysis membrane. The filtrates containing CD/nerolidol inclusion complexes, prepared as described above, were also placed in the dialysis tubes. The dialysis membranes (MWCO 0.5-1 kDa for CD/nerolidol complexes and MWCO 8-10 kDa for liposomes and DCLs) were first soaked in water for 30 min at room temperature, then rinsed thoroughly in distilled water. The dialysis tubing was placed in a 500 mL beaker containing distilled water, and the dialysate was stirred at 200 rpm. The exterior media was replaced with fresh media every 2 h. Then, 100 μ L was withdrawn from the dialysis tube at the specified time intervals and analyzed by HPLC, as described previously.

The results were expressed as the percentage of nerolidol released from suspensions using the following equation:

Released nerolidol (%) =
$$\frac{[\text{nerolidol}]_{t_0} - [\text{nerolidol}]_t}{[\text{nerolidol}]_{t_0}} \times 100 \text{ (4)}$$

where $[nerolidol]_{t_0}$ is the initial concentration of nerolidol in the dialysis tube and $[nerolidol]_t$ is the concentration of nerolidol in the dialysis tube at time t.

2.5.4. Photostability study

Aqueous solutions of nerolidol (0.045 mM), nerolidol-loaded conventional liposomes and DCLs were exposed to UVB light (310 nm, 15 W each) using a Multirays apparatus (Heliosquartz, Italy). The irradiation was performed in a 100-mL quartz reactor under magnetic stirring over 7 h. At different time intervals (0, 60, 120, 180, 240, 330, 390 and 450 min),

aliquots were removed and the concentration of nerolidol remaining in solution was determined by HPLC.

The percentage of remaining nerolidol was calculated as follows:

Remaining nerolidol (%) =
$$\frac{[\text{nerolidol}]_{t}}{[\text{nerolidol}]_{t_0}} \times 100 (5)$$

where $[nerolidol]_t$ is the concentration of remaining nerolidol determined after irradiation at time t and $[nerolidol]_{t_0}$ is the initial nerolidol concentration.

The degradation rate constant (K, min⁻¹) was calculated using the following equation:

$$Ln [nerolidol] = -Kt + b (6)$$

2.5.5. Storage stability of liposomes

The remaining nerolidol concentration in liposomes and DCLs was determined after 12 months of storage at 4 °C by HPLC. The percentage of remaining nerolidol was determined by the following equation:

Remaining nerolidol (%) after storage =
$$\frac{[\text{nerolidol}]_t}{[\text{nerolidol}]_{t_0}} \times 100 (7)$$

where [nerolidol]_t and [nerolidol]_{t₀} are the concentrations of incorporated nerolidol in the formulations obtained after one year of storage at 4 $^{\circ}$ C and at time t₀, respectively. All experiments were performed in triplicate.

2.6. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the two-sample Student's t-tests. The results are expressed as the mean values \pm SD. Statistical significance was reported when the p-value was ≤ 0.05 .

3. Results and discussion

3.1. Determination of nerolidol concentration in HP- β -CD/nerolidol aqueous solution

The amount of solubilized nerolidol in water or in the presence of different HP-β-CD concentrations (10, 25, 50 and 100 mM) was determined by HPLC. The water solubility of nerolidol was equal to 0.055 mM. The addition of HP-β-CD leads to an enhancement of nerolidol solubility up to 170 times. Increasing the CD:nerolidol molar ratio from 1:1 to 2.5:1 increased the nerolidol concentration from 3.12 to 7.59 mM (approximately 2.4-fold). A slight increase in nerolidol concentration was then obtained at a CD:nerolidol molar ratio of 5:1 (8.95 mM) and 10:1 (9.25 mM). Previous studies have shown that increased solubility of natural antimicrobials, by CD, enhanced antimicrobial effects in bacterial culture media (Arana-Sánchez et al., 2010; Corciova et al., 2015; Kamimura, Santos, Hill, & Gomes, 2014; Pinho, Soares, & Henriques, 2015; Santos, Kamimura, Hill, & Gomes, 2015) and in food matrices, such as fresh-cut tomatoes (Ayala-Zavala & González-Aguilar, 2010). Therefore, our results could enable enhancements of the antimicrobial activity of nerolidol in food matrices.

3.2. Characterization of nerolidol-loaded liposomes

3.2.1. Particle size determination

The particle size distribution of the liposomal formulations was assayed by laser granulometry. Two distinct liposomal populations are obtained in nanometric (87-150 nm, population 1) and micrometric (5-7 μ m, population 2) sizes (Fig. 1 in supplementary material). Table 1 demonstrates the percentage distribution of nanometric and micrometric particles (populations 1 and 2) in each formulation. The percentages of the two populations varied among the various formulations.

First, the addition of nerolidol significantly reduced the percentage of nanometric liposomes (and accordingly increased that of micrometric liposomes) compared to the blank batches (Table 1). Nerolidol could induce modifications in the lipid assembly, leading to the formation

of larger nanoparticles. Moreover, the distribution of HP- β -CD/nerolidol-loaded liposomes was affected by the CD:nerolidol molar ratio. Thus, the percentage of nanometric liposomes was significantly decreased at 1:1 and 2.5:1 HP- β -CD:nerolidol molar ratios, while at 5:1 and 10:1 molar ratios, the results were close to those with the blank liposomes. Notably, the presence of free HP- β -CD in the aqueous phase did not modify the percentage of each population. This is evidently due to the high solubility of this CD, which does not impact liposome formation. Hence, the relative increase of the level of nanometric liposomes at higher HP- β -CD:nerolidol ratios may be attributed to nerolidol incorporation into the HP- β -CD cavity, resulting in a reduced pool of free nerolidol in the lipid bilayers.

The mean particle size of nanometric liposomes varied between 87 and 150 nm. This is in agreement with the expected value (approximately 100 nm) for liposomes prepared by the ethanol injection method (Pons, Foradada, & Estelrich, 1993; Sebaaly, Greige-Gerges, Agusti, Fessi, & Charcosset, 2015a, 2015b). Compared to the blank liposomes, nerolidol- and CD/nerolidol-loaded liposomes generally had larger mean particles size. Many essential oils and their components, such as Eucalyptus camaldulensis essential oil (Moghimipour, Aghel, Mahmoudabadi, Ramezani, & Handali, 2012) and eugenol (Sebaaly, Greige-Gerges, Agusti, Fessi, & Charcosset, 2015a), were reported to increase liposome vesicle size and swelling of the bilayer. Our findings also agree with those obtained with CD/ketoprofen-loaded liposomes, where an increase in size was observed with increasing complex concentration (Maestrelli, Gonzalez-Rodriguez, Rabasco, & Mura, 2006).

3.2.2. Encapsulation efficiency and loading rate

The encapsulation efficiency (EE%) and the loading rate (LR%) of nerolidol into liposomes and DCLs were determined by HPLC. Very high EE% values (> 97%) of nerolidol into conventional liposomes were obtained for all E80:nerolidol molar ratios (100:1; 100:2.5; 100:5

or 100:10) (Table 2). This is due to the hydrophobic nature of nerolidol, which was apparently incorporated in the bilayer.

Nerolidol was also efficiently encapsulated into liposomes as HP- β -CD/nerolidol complexes. For HP- β -CD:nerolidol molar ratios of 1:1 and 2.5:1, EE% values were very high (~97% and 93%, respectively); however, they markedly decreased with further increases of the CD:nerolidol molar ratio (~63% and 57% for 5:1 and 10:1 ratios, respectively). This could be due to the reduction of the entrapment capacity of liposomes at high CD concentrations. Similar results were reported for EE% in DCLs for prednisolone and ketoprofen using high HP- β -CD/drug concentrations (Maestrelli, Gonzalez-Rodriguez, Rabasco, & Mura, 2006; Fatouros, Hatzidimitriou, & Antimisiaris, 2001).

The LR% values of nerolidol at E80:nerolidol molar ratios of 100:1 and 100:2.5 were above 90%, demonstrating high incorporation of nerolidol into the lipid vesicles. Nevertheless, further increases of the E80:nerolidol molar ratio resulted in the reduction of LR% (Table 2). This result was concomitant with an increase in the percentage of the micrometric liposome population (Table 1). Regarding the DCL system, when CD:nerolidol molar ratio was increased from 1:1 to 2.5:1, the LRDCL improved significantly from to 17.65 \pm 0.74% to 70.76 \pm 4.40% (Table 2). This result could be explained by the notable increase of nerolidol concentration in the presence of 25 mM HP- β -CD. This effect was not concentration-dependent, since the best LR% value was obtained at the CD:nerolidol molar ratio 2.5:1. At HP- β -CD:nerolidol molar ratios higher than 2.5:1, the LRDCL values of nerolidol decreased, suggesting a limited entrapment capacity of liposomes of the CD/nerolidol complex.

From the above results, the best system for nerolidol encapsulation is the DCL prepared at the HP- β -CD:nerolidol molar ratio of 2.5:1. The presence of nerolidol in the CD/nerolidol inclusion complex improves incorporation into liposomes, as evidenced by the high EE% and LR% values.

3.2.3. In vitro release study

Release from carriers is one of the most important criteria to be considered in food application. By extending their release, the action of the active compounds and their effects will be maintained (Rodríguez, Martín, Ruiz, & Clares, 2016).

The in vitro release of nerolidol from CD/nerolidol inclusion complexes, conventional liposomes and DCLs was studied over time at room temperature, using dialysis. Figure 2 demonstrates the percentage of nerolidol released from the dialysis tubes as a function of time. All formulations exhibited rapid release of nerolidol during the first 8 h (first phase), which was followed by a slow release over the next 7 days (second phase). The complexes prepared at different CD/nerolidol molar ratios demonstrated similar release patterns, and more than 45% of nerolidol was released within 8 h from all complexes (Fig. 2a). As expected, DCLs delayed the nerolidol release compared to CD/nerolidol inclusion complexes, regardless of the CD/nerolidol molar ratio (Fig. 2a). The release rate of nerolidol in the first phase was less pronounced for the DCLs at E80:HP-β-CD:nerolidol ratio of 100:303:30 than the other formulations (Fig. 2). For liposomes and DCLs, the first phase may be caused by the release of nerolidol that is incorporated in the external monolayer of the membrane; nerolidol at the internal monolayer of liposomes or in the aqueous compartment as the CD/nerolidol inclusion complex may be released in the second phase. Moreover, the release rate is slower in the second phase for DCLs compared to conventional liposomes. In the DCLs, compounds must overcome more barriers to be released from the system (Chen et al., 2014). The release was more delayed with increasing CD:nerolidol molar ratios, likely owing to the presence of more complexed nerolidol in the aqueous compartment of the liposomes. Our results agree with previous research comparing the sustained drug release of DCLs to conventional liposomes (Chakraborty & Naik, 2003; Chen, Gao, Wang, & Liang, 2007, 2014; Zhang et al., 2015).

3.2.4. Photostability study

Encapsulation systems such as CDs, liposomes or DCLs provide a molecular shield for photolabile molecules, thereby delaying their photodegradation (Tønnesen, 2001; Ragno et al., 2003). Therefore, the photostability of aqueous solutions of nerolidol and nerolidol-loaded liposomes (conventional and DCLs) was investigated after exposure to UVB light. Aliquots were removed at different time intervals and analyzed by HPLC. The results are expressed as the percentage of nerolidol remaining in the solution as a function of time (Fig. 3). For all formulations, the degradation of nerolidol remained in the solution after 180 min of UVB irradiation (Fig. 3). Nonetheless, after 180 min, between 40% and 90% of nerolidol still remained in the suspension of conventional liposomes and DCLs, respectively, indicating that the photostability of nerolidol was increased by encapsulation (Fig. 3). Two DCLs formulations demonstrated greater protection of nerolidol when compared to conventional liposomes (Table 1 in Supplementary Material). The higher protection by DCLs was reported for other photolabile drugs, such as anethole (Gharib, Auezova, Charcosset, & Greige-Gerges, 2017) and barnidipine (Ioele, De Luca, & Ragno, 2014).

3.2.5. Storage stability

The amount of incorporated nerolidol in liposomes and DCLs was determined after one year of storage at 4 °C, and the values were compared to those obtained at t_0 . The percentage of remaining nerolidol was above 98% for conventional liposomes and DCLs at low CD concentrations. CDs, at high concentration, may perturb the membrane, leading to the leakage of nerolidol from the vesicles (Table 3). This demonstrated again that DCL at E80:CD:nerolidol molar ratio of 100:75:30 is the best formulation for nerolidol encapsulation.

4. Conclusion

In this study, nerolidol was successfully encapsulated into liposomes and DCLs. The size, EE%, LR%, nerolidol photoprotection, nerolidol release and storage stability of the different systems were characterized. The results demonstrated that the incorporation of nerolidol in liposomes was associated with vesicle enlargement, whereas for DCLs, the nerolidol effect on vesicle size was minor. Optimizing the CD:nerolidol molar ratio was crucial to improving the LR% values of nerolidol in DCLs. Moreover, DCL protected nerolidol from photodegradation and extended the release more effectively than conventional liposomes. Finally, liposomes and DCLs were stable after long-term storage at 4 °C. These results are particularly important to the formulations of hydrophobic drugs, including sesquiterpenes, in the cosmetic, pharmaceutical and food industries. It would be valuable to study the antimicrobial effect of nerolidol-loaded well-characterized delivery systems against foodborne pathogens in bacterial culture media and food matrices. Hence, several parameters to be considered in future works are the bacterial growth, effective nerolidol concentration, incubation time, and stability of the delivery systems in the selected media.

Acknowledgments

The authors are grateful to Université du Littoral Côte d'Opale and Lebanese University for the financial support for J. Azzi's PhD thesis. The study was financially supported by Lebanese National Council for scientific research and by Agence Universitaire de la Francophonie (project PCSI 2015/2017).

References

Aloisio, C., Antimisiaris, S. G., & Longhi, M. R. (2017). Liposomes containing cyclodextrins or meglumine to solubilize and improve the bioavailability of poorly soluble drugs. Journal of Molecular Liquids, 229, 106-113.

Arana-Sánchez, A., Estarrón-Espinosa, M., Obledo-Vázquez, E. N., Padilla-Camberos, E., Silva-Vázquez, R., & Lugo-Cervantes, E. (2010). Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (Lippia graveolens H. B. K.) with different composition when microencapsulated in β -cyclodextrin. Letters in Applied Microbiology, 50, 585-590.

Astray, G., Gonzalez-Barreiro, C., Mejuto, J., Rial-Otero, R., & Simal-Gándara, J. (2009). A review on the use of cyclodextrins in foods. Food Hydrocolloids, 23, 1631-1640.

Ayala-Zavala, J. F., & González-Aguilar, G. A. (2010). Optimizing the Use of Garlic Oil as Antimicrobial Agent on Fresh-Cut Tomato through a Controlled Release System. Journal of Food Science, 75, M398-405.

Bragagni, M., Maestrelli, F., Mennini, N., Ghelardini, C., & Mura, P. (2010). Liposomal formulations of prilocaine: effect of complexation with hydroxypropyl-β-cyclodextrin on drug anesthetic efficacy. Journal of Liposome Research, 20, 315-322.

Brehm-Stecher, B., & Johnson, E. (2003). Sensitization of Staphylococcus aureus and Escherichia coli to Antibiotics by the Sesquiterpenoids Nerolidol, Farnesol, Bisabolol, and Apritone. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 47, 3357-3360.

Chakraborty, K. K., & Naik, S. R. (2003). Therapeutic and hemolytic evaluation of in-situ liposomal preparation containing amphotericin - β complexed with different chemically modified β - cyclodextrins. Journal of Pharmaceutical Sciences, 6, 231-237.

Chen, H., Gao, J., Wang, F., & Liang, W. (2007). Preparation, Characterization and Pharmacokinetics of Liposomes-Encapsulated Cyclodextrins Inclusion Complexes for Hydrophobic Drugs. Drug Delivery, 14, 201-208.

Chen, J., Lu, W. L., Gu, W., Lu, S. S., Chen, Z.-P., Cai, B. C., & Yang, X.-X. (2014). Drug-incyclodextrin-in-liposomes: a promising delivery a promising delivery system for hydrophobic drugs. Expert Opinion Drug Delivery, 11, 565-577.

Corciova, A., Ciobanu, C., Poiata, A., Mircea, C., Nicolescu, A., Drobota, M., . . . Marangoci, N. (2015). Antibacterial and antioxidant properties of hesperidin: β-cyclodextrin complexes obtained by different techniques. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 81, 71–84.

Fatouros, D., Hatzidimitriou, K., & Antimisiaris, S. (2001). Liposomes encapsulating prednisolone and prednisolone–cyclodextrin complexes: Comparison of membrane integrity and drug release. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 13, 287-296.

Gharib, R., Auezova, L., Charcosset, C., & Greige-Gerges, H. (2017). Drug-in-cyclodextrin-inliposomes as a carrier system for volatile essential oil components: Application to anethole. Food Chemistry, 218, 365-371.

Gharib, R., Greige-Gerges, H., Fourmentin, S., Charcosset, C., & Auezova, L. (2015). Liposomes incorporating cyclodextrin–drug inclusion complexes: Current state of knowledge. Carbohydrate Polymers, 129, 175-186.

Hatzi, P., Mourtas, S., Klepetsanis, P. G., & Antimisiaris, S. G. (2007). Integrity of liposomes in presence of cyclodextrins: Effect of liposome type and lipid composition. International Journal of Pharmaceutics, 333, 167-176.

Ioele, G., De Luca, M., & Ragno, G. (2014). Photostability of barnidipine in combined cyclodextrin-in-liposome matrices. Future Medicinal Chemistry, 6, 35-43.

Kamimura, J. A., Santos, E. H., Hill, L. E., & Gomes, C. L. (2014). Antimicrobial and antioxidant activities of carvacrol microencapsulated in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. LWT - Food Science and Technology, 57, 701-709.

Kfoury, M., Lounès-Hadj Sahraoui, A., Bourdon, N., Laruelle, F., Fontaine, J., Auezova, L., Greige-Gerges, H. & Fourmentin, S. (2016). Solubility, photostability and antifungal activity of phenylpropanoids encapsulated in cyclodextrins. Food Chemistry, 196, 518-525.

Ku, C. M., & Lin, J. Y. (2013). Anti-inflammatory effects of 27 selected terpenoid compounds tested through modulating Th1/Th2 cytokine secretion profiles using murine primary splenocytes. Food Chemistry, 141, 1104-1113.

Laouini, A., Jaafar-Maalej, C., Limayem-Blouza, I., Sfar, S., Charcosset, C., & Fessi, H. (2012). Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. Journal of Colloid Science and Biotechnology, 1, 147-168.

Lapczynski, A., Bhatia, S., Letizia, C., & Api, A. (2008). Fragrance material review on nerolidol (isomer unspecified). Food and Chemical Toxicology, 46, S247–S250.

Maestrelli, F., González-Rodríguez, M., Rabasco, A., Ghelardini, C., & Mura, P. (2010). New "drug-in cyclodextrin-in deformable liposomes" formulations to improve the therapeutic efficacy of local anaesthetics. International Journal of Pharmaceutics, 395, 222–231.

Maestrelli, F., Gonzalez-Rodriguez, M. L., Rabasco, A. M., & Mura, P. (2005). Preparation and characterization of liposomes encapsulating ketoprofen–cyclodextrin complexes for transdermal drug delivery. International Journal of Pharmaceutics, 298, 55-67.

Maestrelli, F., Gonzalez-Rodriguez, M. L., Rabasco, A. M., & Mura, P. (2006). Effect of preparation technique on the properties of liposomes encapsulating ketoprofen–cyclodextrin complexes aimed for transdermal delivery. International Journal of Pharmaceutics, 312, 53-60.

McCormack, B., & Gregoriadis, G. (1994). Drugs-in-cyclodextrins-in-liposomes: A novel concept in drug delivery. International Journal of Pharmaceutics, 112, 249-258.

McGinty, D., Letizia, C. S., & Api, A. M. (2010). Addendum to Fragrance material review on Nerolidol (isomer unspecified). Food and Chemical Toxicology, 48, 43-45.

Miranda, J. C., Martins, T. E., Veiga, F., & Ferraz, H. G. (2011). Cyclodextrins and ternary complexes: technology to improve solubility of poorly soluble drugs. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 47, 665-680.

Moghimipour, E., Aghel, N., Mahmoudabadi, A. Z., Ramezani, Z., & Handali, S. (2012). Preparation and Characterization of Liposomes Containing Essential Oil of Eucalyptus camaldulensis Leaf. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products, 7, 117-122.

Palzer, S. (2009). Food structures for nutrition, health and wellness. Trends in Food Science & Technology, 20, 194-200.

Piel, G., Piette, M., Barillaro, V., Castagne, D., Evrard, B., & Delattre, L. (2007). Study of the relationship between lipid binding properties of cyclodextrins and their effect on the integrity of liposomes. International Journal of Pharmaceutics, 338, 35-42.

Pinho, E., Soares, G., & Henriques, M. (2015). Evaluation of antibacterial activity of caffeic acid encapsulated by β -cyclodextrins. Journal of Microencapsulation, 32, 804–810.

Pons, M., Foradada, M., & Estelrich, J. (1993). Liposomes obtained by the ethanol injection method. International Journal of Pharmaceutics, 95, 51-56.

Ragno, G., Cione, E., Garofalo, A., Genchi, G., Ioele, G., Risoli, A., & Spagnoletta, A. (2003). Design and monitoring of photostability systems for amlodipine dosage forms. International Journal of Pharmaceutics, 265, 125-132.

Rodríguez, J., Martín, M. J., Ruiz, M. A., & Clares, B. (2016). Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives. Food Research International, 83, 41-59.

Santos, E. H., Kamimura, J. A., Hill, L. E., & Gomes, C. L. (2015). Characterization of carvacrol beta-cyclodextrin inclusion complexes as delivery systems for antibacterial and antioxidant applications. LWT - Food Science and Technology, 60, 583-592.

Sebaaly, C., Charcosset, C., Stainmesse, S., Fessi, H., & Greige-Gerges, H. (2016). Clove essential oil-in-cyclodextrin-in-liposomes in the aqueous and lyophilized states: From laboratory to large scale using a membrane contactor. Carbohydrate Polymers, 138, 75-85.

Sebaaly, C., Greige-Gerges, H., Agusti, G., Fessi, H., & Charcosset, C. (2015a). Large-scale preparation of clove essential oil and eugenol-loaded liposomes using a membrane contactor and a pilot plant. Journal of Liposome Research, 26, 1-13.

Sebaaly, C., Jraij, A., Fessi, H., Charcosset, C., & Greige-Gerges, H. (2015b). Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes. Food Chemistry, 178, 52-62.

Sun, S., Dua, G., Qia, L., Williamsa, S., Wanga, C., & Yuan, C. (2010). Hydrophobic constituents and their potential anticancer activities from Devil's Club Oplopanax horridus. Ethnopharmacology, 132, 280-285.

Szejtli, J. (1998). Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. Chemical Reviews, 98, 1743-1753.

Szente, L., & Szejtli, J. (2004). Cyclodextrins as food ingredients. Trends in Food Science & Technology, 15, 137-142.

Tao, R., Wang, C., & Kong, Z. (2013). Antibacterial/Antifungal Activity and Synergistic Interactions between Polyprenols and Other Lipids Isolated from Ginkgo Biloba L. Leaves. Molecules, 18, 2166-2182.

Tønnesen, H. H. (2001). Formulation and stability testing of photolabile drugs. International Journal of Pharmaceutics, 225, 1-14.

Yuan, C., Jin, Z., & Li, X. (2008). Evaluation of complex forming ability of hydroxypropyl-βcyclodextrins. Food Chemistry, 106, 50-55.

Zhang, L., Zhang, Q., Wang, X., Zhang, W., Lin, C., Chen, F., Yang, X., & Pan, W. (2015). Drug-in-cyclodextrin-in-liposomes: A novel drug delivery system for flurbiprofen. International Journal of Pharmaceutics, 492, 40-45.

Figure Captions:

Figure 1 : Chemical structure of nerolidol.



Figure 2: In vitro release profile of nerolidol from: (a) CD/nerolidol inclusion complexes and DCLs; (b) conventional liposomes and DCLs.



Figure 3: Percentage of nerolidol remaining in the aqueous solution of nerolidol, liposomes and DCLs after UVB light exposure.
Table Captions:

Table 1: Percentage and mean particle size of populations 1 and 2 for blank-, nerolidol- and HP- β -CD-loaded liposomes and DCLs.

Liposomes	E80:CD:nerolidol	Population 1		Population 2	
batches	molar ratios	(%)	Mean size (nm)	(%)	Mean size (µm)
Blank liposomes	100:0:0	89.33 ± 5.13	87 ± 0.00	10.66 ± 5.13	4.94 ± 1.87
	100:0:1	64.66 ± 4.73*	$131^* \pm 0.00$	35.33 ± 4.73*	5.68 ± 1.34
E80:nerolidol	100:0:2.5	$63.33 \pm 5.77*$	$131^* \pm 0.00$	36.66 ± 5.77*	6.72 ± 0.00
	100:0:5	$58.00 \pm 4.24*$	$131* \pm 0.00$	$42.00 \pm 4.24^*$	5.97 ± 1.29
	100:0:10	$63.66 \pm 6.02*$	$131* \pm 0.00$	$36.33 \pm 6.02*$	6.50 ± 1.30
E80:HP-β-CD	100:30:0	96.66 ± 1.53	87 ± 0.00	3.33 ± 1.53	2.38 ± 1.04
Е80:НР-β-	100:30:30	67.93 ± 6.32*	$150^* \pm 0.00$	32.07 ± 6.32*	5.49 ± 0.53
CD/nerolidol	100:75:30	67.18 ± 4.72*	$150* \pm 0.00$	$32.82 \pm 4.72^*$	5.37 ± 0.43
	100:150:30	83.36 ± 5.89	$150^* \pm 0.00$	$20.03 \pm 0.62*$	3.65 ± 0.97
	100:303:30	93.70 ± 1.37	$150^* \pm 0.00$	6.30 ± 1.37	2.64 ± 0.57

*P<0.05 in comparison to blank liposomes

Table 2: Encapsulation efficiency (EE%) and loading rate (LR%) values for nerolidol-loaded

liposomes and DCLs.

Liposomes batches		LR%
E80:nerolidol	100:1	95.46 ± 3.90
	100:2.5	94.78 ± 5.87
	100:5	63.92 ± 5.68
	100:10	66.09 ± 0.37
E80:HP-β-CD/nerolidol	100:30:30	17.65 ± 0.74
	100:75:30	$70.76 \pm 4.40*$
	100:150:30	$57.49 \pm 0.27*$
	100:303:30	$45.50 \pm 0.16*$

*p<0.05 compared to E80:HP- β -CD:nerolidol 100:30:30 molar ratio

Liposomes batches		% nerolidol remaining	
	100:1	99.99 ± 0.53	
E80:nerolidol	100:2.5	99.79 ± 1.08	
	100:5	99.83 ± 1.30	
	100:10	99.85 ± 0.75	
	100:30:30	98.61 ± 1.05	
E80:HP-β-CD:nerolidol	100:75:30	98.67 ± 2.12	
	100:150:30	85.92 ± 5.23	
	100:303:30	65.03 ± 0.94	

Table 3: Percentage of nerolidol remaining after 1 year of storage at 4 °C.

First evaluation of drug-in-cyclodextrin-in-liposomes as an encapsulating system for nerolidol

Joyce Azzi^{1, 2}, Lizette Auezova¹, Pierre-Edouard Danjou², Sophie Fourmentin² and Hélène Greige-Gerges^{1*}

¹Bioactive Molecules Research Group, Doctoral School of Sciences and Technologies,

Faculty of Sciences, Lebanese University, Lebanon.

²Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV, EA 4492), SFR

Condorcet FR CNRS 3417, ULCO, F-59140 Dunkerque, France.

Email: greigegeorges@yahoo.com; hgreige@ul.edu.lb







Figure 1: Histograms of the liposomes size distribution for blank, conventional liposomes (E80:nerolidol molar ratios of 100:1, 100:2.5, 100:5 and 100:10) and DCLs (E80:HP- β -CD:nerolidol molar ratios of 100:30:30, 100:75:30, 100:150:30 and 100:303:30).

Table 1: Degradation rate constants of nerolidol in the aqueous solution of free nerolidol andin nerolidol-loaded liposomes and DCLs suspensions after exposure to UVB.

Samples		Degradation	Protection factor
		constant K (min ⁻¹)	
Nerolidol in aqueous solution		0.013	
	100:1	0.004	3.35
E80:nerolidol	100:2.5	0.004	3.35
	100:5	0.004	3.35
	100:10	0.005	2.68
	100:30:30	0.004	3.35
E80:HP-β-CD:nerolidol	100:75:30	0.001	13.40
	100:150:30	0.004	3.35
	100:303:30	0.003	4.47

1	Novel findings for quercetin encapsulation and preservation with cyclodextrins,
2	liposomes, and drug-in-cyclodextrin-in-liposomes
3	
4	Joyce Azzi ^{1, 2} , Alia Jraij ¹ , Lizette Auezova ¹ , Sophie Fourmentin ² , and Hélène Greige-Gerges ^{1*}
5	
6	¹ Bioactive Molecules Research Laboratory, Doctoral School of Sciences and Technologies,
7	Faculty of Sciences, Lebanese University, Lebanon.
8	² Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV, EA 4492), SFR
9	Condorcet FR CNRS 3417, ULCO, F-59140 Dunkerque, France.
10	
11	

^{*} Corresponding author: greigegeorges@yahoo.com; hgreige@ul.edu.lb; Tel: 961-3 341011; Fax: 961-1 689647.

12 Abstract

13

14 The low solubility, poor bioavailability, and low chemical stability of quercetin (Quer) are the 15 main drawbacks that limit its use as a food nutraceutical. In this study, the encapsulation in 16 cyclodextrins (CDs), conventional liposomes (CLs), and drug-in-cyclodextrin-in-liposomes 17 (DCLs) was conducted in order to improve the physicochemical properties of Quer. Phase 18 solubility studies revealed an enhancement of Quer solubility upon complexation with various 19 CDs. CLs composed of three different types of phospholipids (unsaturated egg Lipoid E80, 20 unsaturated soybean Lipoid S100, and saturated soybean Phospholipon 90H) as well as DCLs 21 were prepared by ethanol injection method and characterized. Liposomes constituted of Lipoid 22 E80 showed small diameter, narrow size distribution, and higher encapsulation efficiency of 23 Quer compared to the two other CLs. The photostability of Quer-loaded liposomes was also 24 evaluated. Results show that liposomes containing unsaturated phospholipids, particularly 25 those from egg source, allow a better protection of Quer against UV than those prepared using 26 saturated lipids. This effect could be explained by their different membrane rigidity as 27 determined by Atomic Force Microscopy (AFM). Moreover, the photostability of Quer was 28 additionally improved when encapsulated in DCLs (SBE-\beta-CD/Quer inclusion complex in 29 Lipoid E80 liposomes), in comparison to CLs. The same trend was obtained regarding the Quer 30 stability in simulated gastrointestinal fluids. Finally, all liposomal formulations were physically 31 stable and retained more than 82 % of Quer when stored for 1 year at 4 °C.

32

33

34 Keywords: cyclodextrin; drug-in-cyclodextrin-in-liposomes; liposomes; quercetin; stability.

36 1. Introduction

37

38 The traditional role of food as a nutrient provider is now changing into that of food with added 39 functionality. In addition to its nutritional value, food can promote human health by preventing 40 or treating life-style diseases like cancer, diabetes and cardiovascular diseases (Khan, Grigor, 41 Winger, & Win, 2013; Day, Seymour, Pitts, Konczak & Lundin, 2009). This is mainly 42 attributed to the presence of secondary metabolites that possess important biological activities 43 (Liu, 2013). For example, polyphenolic compounds have potent antioxidant activity and thus 44 could limit the risk of various degenerative diseases associated with oxidative stress (Hussain 45 et al., 2016; Mileo & Miccadei, 2016).

46 The flavonol quercetin (Quer) is the most abundant flavonoid, occurring in a variety of foods 47 including onion, apple, broccoli, tea, and red wine (Lakhanpal & Rai, 2007). Due to its 48 numerous beneficial effects like anti-obesity (Nabavi, Russo, Daglia, & Nabavi, 2015), 49 antioxidant (Dueñas, González-Manzano, González-Paramás, & Santos-Buelga, 2010), anti-50 inflammatory (Kleemann et al., 2011), and anti-cancer (Gibellini et al., 2011), current 51 researches are directed towards formulating food products by adding Quer. However, low 52 aqueous solubility (about 0.01 mg/mL at 25 °C), bitter taste, and reduced chemical stability are 53 main drawbacks of its use in the food industry (Aditya et al., 2014). Moreover, Quer has low 54 bioavailability in human and short biological half-life (Cai, Fang, Dou, Yu, & Zhai, 2013).

The application of nanocarriers such as cyclodextrins (CDs) and conventional liposomes (CLs) in the food industry has gained a great interest to overcome the drawbacks related to the physicochemical properties of some bioactive compounds (Tamjidi, Shahedi, Varshosaz, & Nasirpour, 2013).

Liposomes are non-toxic lipid-based carriers consisting of phospholipid bilayers that separate
two aqueous compartments. This structure makes liposomes suitable for encapsulating both
hydrophilic and hydrophobic molecules (Anwekar, Patel, & Singhai, 2011).

62 CDs are cyclic oligosaccharides formed from glucose units attached by α -(1 \rightarrow 4) glycosidic 63 bonds. They are obtained from the enzymatic degradation of starch. Three native CDs are 64 known: α -, β -, and γ -CD having six, seven, and eight glycopyranose units, respectively. CDs 65 have truncated cone shape with a hydrophilic outside and an apolar cavity, and are therefore 66 able to form reversible inclusion complexes with non-polar molecules (Szejtli, 1997). To 67 improve the solubility of native CDs, many CDs derivatives were synthesized such as 68 hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HP-β-CD), randomly methylated-β-cyclodextrin (RAMEB), 69 low methylated- β -cyclodextrin (CRYSMEB), and sulfobutylether- β -cyclodextrin (SBE- β -CD) 70 (Szente & Szejtli, 1999).

Liposomes and CDs have been extensively used to solubilize lipophilic compounds, to protect
labile molecules from degradation during food processing, and to achieve a sustained release
of certain food components (Astray, Mejuto, Morales, Rial-Otero, & Simal-Gándara, 2009;
Kfoury, Auezova, Greige-Gerges, Ruellan, & Fourmentin, 2014; Kfoury, Auezova, Ruellan,
Greige-Gerges, & Fourmentin, 2015; McClements, 2015).

DCLs are based on the entrapment of CD/drug inclusion complexes into the internal core of liposomes (Chen et al., 2014; Gharib, Greige-Gerges, Fourmentin, Charcosset, & Auezova, 2015). This system was developed to combine the advantages of both carriers and to limit their disadvantages. Indeed, the incorporation of a highly hydrophobic molecule into the lipid bilayer may lead to the disintegration of the membrane. Besides, the rapid dissociation of CD/drug inclusion complexes could be observed following administration of the inclusion complex in body fluids (dilution or displacement of drug by blood components).

Although many studies have used liposomes or CDs as carriers for encapsulating Quer
(Goniotaki, Hatziantoniou, Dimas, Wagner, & Demetzos, 2004; Jangde & Singh, 2014), few
attempts were done on the DCL system (Shaji & Iyer, 2012).

86 In our study, the capacity of different CDs (α -CD, β -CD, γ -CD, HP- β -CD, RAMEB,

87 CRYSMEB, and SBE- β -CD) to solubilize Quer was first assessed by phase solubility studies.

- 88 Then, Quer was encapsulated into CLs composed of three different types of lipids (Lipoid E80,
- 89 Lipoid S100, and Phospholipon 90H). The best CD and lipid type were later used to produce
- 90 DCLs. All liposomal formulations were characterized in terms of size, encapsulation efficiency,
- 91 and loading rate of Quer. Finally, its storage, photo-stability, and stability in simulated
- 92 gastrointestinal media were evaluated.

93 2. Materials and methods

94

95 2.1. Materials

96

97 Quercetin (\geq 95%), trans-anethole (99%), and cholesterol (95%) were purchased from Sigma 98 Aldrich (Missouri, United States). Alpha-CD, β -CD, and RAMEB (DS = 12.6) were purchased 99 from Wacker-Chemie (Lyon, France). CRYSMEB (DS = 4.9) and HP- β -CD (DS = 5.6) were 100 provided from Roquette Frères (Lestrem, France). SBE- β -CD (DS = 6.5, Captisol®) was 101 donated by Ligand Pharmaceuticals Incorporated (San Diego, USA). Lipoid E80 (80-85 % egg 102 phosphatidylcholine (PC), 7-9.5 % phosphatidylethanolamine (PE), 3 % lysoPC, 0.5 % lysoPE, 103 2-3 % sphingomyelin, 2 % water, 0.2 % ethanol, iodine value 65-69), Phospholipon 90H (90 % 104 soybean PC, 4 % lysoPC, 2 % triglycerides, 2 % water, 0.5 % ethanol, iodine value 1), and 105 Lipoid S100 (94 % soybean PC, 3 % lysoPC, 0.5 % N-acyl-PE, 0.1 % PE, 0.1 % 106 phosphatidylinositol, 2 % water, 0.2 % ethanol, iodine value 97-107) were obtained from Lipoid 107 GmbH (Ludwigshafen, Germany). Pepsin from porcine gastric mucosa (\geq 500 U/mg), 108 pancreatin from porcine pancreas, sodium taurocholate, potassium phosphate monobasic 109 (KH₂PO₄), sodium chloride, hydrogen chloride, sodium hydroxide, and methanol (HPLC-110 grade) were purchased from Sigma Aldrich (St Louis, Missouri, United States).

111

112 2.2. HPLC analysis of quercetin

113

114 A Hitachi LaChrom Elite® HPLC system composed of a pump L-2130, autosampler L-2200, 115 and L-2455 diode array detector was used to quantify Quer in all liposomal formulations. The 116 analytical column was a Zorbax eclipse analytical XDB-C18 column ($4.6 \mu m \times 150 mm, 5 \mu m$). 117 The mobile phase consists of a mixture of methanol/water (70/30, v/v). The flow rate was set 118 to 1 mL/min and the injection volume was 20 μ L. The wavelength of the UV detector was kept

119 at 256 nm. The calibration curve of Quer was linear in the range between 1 and 100 µg/mL. 120 Stock solutions of Ouer (1 mg/mL) and trans-anethole used as internal standard (1 mg/mL) 121 were prepared in methanol. Then, the stock solution of Quer was diluted in methanol to obtain 122 final concentrations of 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, and 100 µg/mL. The standard solution of trans-123 anethole was also prepared in methanol at 10 µg/mL.

124 For HPLC measurement, 100 µL of each sample was added to trans-anethole (100 µL) and 125 methanol (200 µL). The mixture was then sonicated at 4 °C and centrifuged at 15000 rpm at 4 126 °C. The HPLC method was validated in terms of linearity, repeatability, and limit of detection. 127

128 2.3. Phase solubility studies

129

130 Phase solubility studies were carried out according to the method described by Higuchi & 131 Connors (1965). Aqueous CD solutions (α -CD, β -CD, γ -CD, HP- β -CD, CRYSMEB, RAMEB, and SBE-β-CD) were prepared (2 mL) at different concentrations (1.25, 2.5, 5, 7.5, and 10 132 133 mM). Excess amount of Quer (3 mg) was added to CD solutions. The mixtures were shaken 134 overnight in the dark at a stirring rate of 300 rpm at 25 °C. The solutions were then filtered 135 through a 0.45 µm cellulose filter. The concentration of Quer in the filtrates was determined 136 spectrophotometrically at 370 nm using a UV-visible dual-beam spectrophotometer (Perkin 137 Elmer Lambda 2S) with a 1 cm thick quartz cuvette after dilution in ethanol to prevent the effect 138 of CD in the absorption spectra.

139 Phase solubility profiles, illustrating the apparent aqueous solubility of Quer against CD 140 concentrations, were plotted. Formation constant (K_f) values of CD/Quer inclusion complexes 141 were calculated from the linear segment of the phase-solubility diagrams according to the 142 following equation:

143
$$K_{f} = \frac{\text{slope}}{S_{0} (1 - \text{slope})}$$
 Eq. (1)

where, S_0 is the intrinsic solubility of Quer in water and slope is the slope of the phase solubility diagram.

146 The complexation efficiency (CE) parameter was also calculated as follows:

147
$$CE = S_0 \times K_{1:1} = \frac{[CD/Quer]}{[CD]} = \frac{Slope}{1 - slope} Eq. (2)$$

where, [CD/Quer] is the concentration of the solubilized CD/Quer inclusion complex and[CD] is the concentration of the free CD.

150

151 2.4. Preparation of aqueous solutions of SBE- β -CD/quercetin inclusion complexes

152

SBE- β -CD/Quer inclusion complexes were prepared by adding Quer (60.45 mg) to 20 mL of aqueous solutions of SBE- β -CD (10, 25, 50, and 100 mM) yielding different CD:Quer molar ratios of 1:1, 2.5:1, 5:1, and 10:1. The solutions were then shaken at a stirring rate of 300 rpm in the dark for 24 h at 25 °C. They were then filtered using a 0.45 µm cellulose filter and the amount of Quer solubilized in the filtrates was determined by UV-visible spectroscopy as described above. SBE- β -CD/Quer inclusion complex at a molar ratio of 5:1 was later used as the aqueous phase in the DCLs preparation.

160

161 2.5. Preparation of CLs

162

Liposomes preparation was carried out using the ethanol injection method (Sebaaly, Greige-Gerges, Stainmesse, Fessi, & Charcosset, 2016). The appropriate amounts of phospholipids, Cholesterol (Chol), and Quer were first dissolved in absolute ethanol (10 mL). The obtained organic solution was then injected into 20 mL ultrapure water using a syringe pump (Fortuna optima, GmbH-Germany) at an injection flow rate of 1 mL/min and under magnetic stirring

168	(400 rpm). The preparation of Lipoid E80 and Lipoid S100-based liposomes was carried out at
169	25 °C while the preparation of Phospholipon 90H-based liposomes, was performed at a
170	temperature above the transition temperature of the phospholipid (~ 55 $^{\circ}$ C). All obtained
171	liposomal suspensions were then kept for 15 min under stirring (400 rpm) at room temperature.
172	Ethanol was later evaporated under reduced pressure at 40 °C (Heidolph GmbH, Germany).
173	
174	2.5.1. Preparation of Lipoid E80 liposomes
175	
176	For the preparation of Lipoid E80 liposomes (Lipoid E80:Chol molar ratio of 100:98), the
177	phospholipid and Chol dissolved in ethanol were mixed at a concentration of 40 and 20 mg/mL,
178	respectively. For Quer-loaded Lipoid E80 liposomes (Lipoid E80:Chol:Quer molar ratio of
179	100:98:20), the concentration of phospholipid, Chol, and Quer in ethanol were 40, 20, and 3.02,
180	mg/mL, respectively.
181	
181 182	2.5.2. Preparation of Lipoid S100 liposomes
181 182 183	2.5.2. Preparation of Lipoid S100 liposomes
181 182 183 184	2.5.2. Preparation of Lipoid S100 liposomesFor the preparation of blank Lipoid S100 liposomes (Lipoid S100:Chol molar ratio of 100:117),
 181 182 183 184 185 	2.5.2. Preparation of Lipoid S100 liposomesFor the preparation of blank Lipoid S100 liposomes (Lipoid S100:Chol molar ratio of 100:117),the phospholipid and Chol were dissolved in ethanol at a concentration of 10 and 5 mg/mL,
 181 182 183 184 185 186 	2.5.2. Preparation of Lipoid S100 liposomesFor the preparation of blank Lipoid S100 liposomes (Lipoid S100:Chol molar ratio of 100:117),the phospholipid and Chol were dissolved in ethanol at a concentration of 10 and 5 mg/mL,respectively. For Quer-loaded Lipoid S100 liposomes (Lipoid S100:Chol:Quer molar ratio of
 181 182 183 184 185 186 187 	 2.5.2. Preparation of Lipoid S100 liposomes For the preparation of blank Lipoid S100 liposomes (Lipoid S100:Chol molar ratio of 100:117), the phospholipid and Chol were dissolved in ethanol at a concentration of 10 and 5 mg/mL, respectively. For Quer-loaded Lipoid S100 liposomes (Lipoid S100:Chol:Quer molar ratio of 100:117:20), Lipoid S100, Chol, and Quer were mixed in ethanol at a concentration of 10, 5,
 181 182 183 184 185 186 187 188 	 2.5.2. Preparation of Lipoid S100 liposomes For the preparation of blank Lipoid S100 liposomes (Lipoid S100:Chol molar ratio of 100:117), the phospholipid and Chol were dissolved in ethanol at a concentration of 10 and 5 mg/mL, respectively. For Quer-loaded Lipoid S100 liposomes (Lipoid S100:Chol:Quer molar ratio of 100:117:20), Lipoid S100, Chol, and Quer were mixed in ethanol at a concentration of 10, 5, and 0.66 mg/mL, respectively.
 181 182 183 184 185 186 187 188 189 	 2.5.2. Preparation of Lipoid S100 liposomes For the preparation of blank Lipoid S100 liposomes (Lipoid S100:Chol molar ratio of 100:117), the phospholipid and Chol were dissolved in ethanol at a concentration of 10 and 5 mg/mL, respectively. For Quer-loaded Lipoid S100 liposomes (Lipoid S100:Chol:Quer molar ratio of 100:117:20), Lipoid S100, Chol, and Quer were mixed in ethanol at a concentration of 10, 5, and 0.66 mg/mL, respectively.
 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 	 2.5.2. Preparation of Lipoid S100 liposomes For the preparation of blank Lipoid S100 liposomes (Lipoid S100:Chol molar ratio of 100:117), the phospholipid and Chol were dissolved in ethanol at a concentration of 10 and 5 mg/mL, respectively. For Quer-loaded Lipoid S100 liposomes (Lipoid S100:Chol:Quer molar ratio of 100:117:20), Lipoid S100, Chol, and Quer were mixed in ethanol at a concentration of 10, 5, and 0.66 mg/mL, respectively. 2.5.3. Preparation of Phospholipon 90H liposomes
 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 	 2.5.2. Preparation of Lipoid S100 liposomes For the preparation of blank Lipoid S100 liposomes (Lipoid S100:Chol molar ratio of 100:117), the phospholipid and Chol were dissolved in ethanol at a concentration of 10 and 5 mg/mL, respectively. For Quer-loaded Lipoid S100 liposomes (Lipoid S100:Chol:Quer molar ratio of 100:117:20), Lipoid S100, Chol, and Quer were mixed in ethanol at a concentration of 10, 5, and 0.66 mg/mL, respectively. 2.5.3. Preparation of Phospholipon 90H liposomes
 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 	 2.5.2. Preparation of Lipoid S100 liposomes For the preparation of blank Lipoid S100 liposomes (Lipoid S100:Chol molar ratio of 100:117), the phospholipid and Chol were dissolved in ethanol at a concentration of 10 and 5 mg/mL, respectively. For Quer-loaded Lipoid S100 liposomes (Lipoid S100:Chol:Quer molar ratio of 100:117:20), Lipoid S100, Chol, and Quer were mixed in ethanol at a concentration of 10, 5, and 0.66 mg/mL, respectively. 2.5.3. Preparation of Phospholipon 90H liposomes Blank Phospholipon 90H liposomes (Phospholipon 90H:Chol molar ratio of 100:98) were

194	mg/mL, respectively. Quer-loaded Phospholipon 90H liposomes (Phospholipon
195	90H:Chol:Quer molar ratio of 100:98:20) were formed by dissolving the phospholipid, Chol,
196	and Quer in ethanol at a concentration of 10, 5, and 0.79 mg/mL, respectively.
197	
198	2.6. Preparation of DCLs
199	
200	Lipoid E80 (40 mg/mL) and Chol (20 mg/mL) were used for the preparation of DCLs (Lipoid
201	E80:Chol:SBE-β-CD/Quer molar ratio of 100:98:190:38) following the same procedure
202	described above, except that Quer was dissolved in the aqueous solution as SBE-β-CD/Quer
203	inclusion complex. The latter was prepared at a CD:Quer molar ratio of 5:1.
204	
205	All liposomal formulations were maintained at 4°C for further characterization. Each
206	preparation was performed in triplicate.
207	
208	2.7.Characterization of liposomes
209	
210	2.7.1. Particle size analysis
211	
212	Laser granulometry (Horiba Partica LA-950V2, Kyoto, Japan) was used to determine the
213	diameter and size distribution of liposomal formulations.
214	
215	2.7.2. Encapsulation efficiency and loading rate of quercetin
216	
217	The encapsulation efficiency (EE %) and loading rate (LR %) of Quer into CLs and DCLs were
218	determined by HPLC as described previously. The concentration of incorporated Quer
219	([Quer] _{liposomes}) was obtained by subtracting the free Quer ([Quer] _{free}) from the total ([Quer] _{total})

concentration. The free Quer was obtained by centrifugation of liposomal suspensions at 15000
rpm during 1 h at 4 °C using Vivaspin 500 centrifugal concentrator (Sartorius Stedim Biotech,
Germany, MWCO = 10 kDa).

The EE % of Quer in CLs and DCLs was calculated according to the following formula:

EE (%) =
$$\frac{[Quer]_{liposomes}}{[Quer]_{total}} \times 100$$
 Eq. (3)

226 where, $[Quer]_{liposomes} = [Quer]_{total} - [Quer]_{free}$.

227

228 The LR % of Quer in CLs was calculated as follows:

229

230
$$LR (\%) = \frac{m_{liposomes}}{m_{initial}} \times 100 \text{ Eq. (4)}$$

where, m_{liposomes} stands for Quer amount incorporated in the vesicles and m_{initial} is the initial
 mass of Quer added in the organic phase to prepare the liposomes.

233

The LR % of Quer in DCLs was calculated as follows:

235

236
$$LR_{DCL}(\%) = \frac{m_{DCL}}{m_{initial}} \times 100 \text{ Eq.}(5)$$

where, m_{DCL} is the Quer amount incorporated in the vesicles and $m_{initial}$ is the initial mass of Quer used to prepare the CD/Quer inclusion complex.

239

240

242 2.8. Stability studies

243

- 244 2.8.1. Photostability of Quer in free and encapsulated forms
- 245
- The photostability of free Quer, SBE- β -CD/Quer inclusion complex solution (prepared at CD/Quer molar ratio of 5:1), Quer-loaded CLs, and DCLs was evaluated following their exposure to UVC radiation ($\lambda = 254$ nm) during 72 h. Aqueous solution of free Quer was prepared at a concentration of 5 µg/mL. Aliquots (100 µL) were removed from each solution at different time intervals (0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 24, 48, and 72 h) and the concentration of Quer remaining in solution was determined by HPLC.
- 252 The percentage of remaining Quer was calculated as follows:
- 253

254 Remaining Quer (%) =
$$\frac{[Quer]_t}{[Quer]_{t_0}} \times 100$$
 Eq. (6)

where, $[Quer]_t$ is the concentration of remaining Quer at time t and $[Quer]_{t_0}$ is the initial concentration of Quer.

257

- 258 2.8.2. Atomic Force Microscopy
- 259

Atomic force microscopy (AFM) was used to determine the rigidity of various blank liposomal formulations before and after 48 h under UVC radiation. AFM imaging and force measurements were performed at room temperature using an Agilent 5420 microscope (Keysight, California, USA). Pyrex-Nitride Probes PNP-TR (NanoWord Innovative Technologies, Nano And More, Paris, France) integrating oxide sharpened pyramidal tips with a radius < 10 nm and a force constant of 0.08 N/m was used. Samples (6 µL) were deposited on a mica surface (9 mm diameter and 0.1 mm thickness, Nano and More, Paris, France) and air-dried for 20 min before 267 analysis. AFM images were recorded in contact mode with a scan rate of 3 Hz. At least 100 268 force curves were analysed for each liposomal formulation to obtain sufficient data for 269 statistical analysis. The Young's modulus (E) of the sample was calculated by fitting the force 270 curves with the Hertz model for pyramidal tip using the equation below:

271

272
$$F = \frac{E \times \tan \alpha}{(1 - \upsilon^2)\sqrt{2}} \delta^2 \quad \text{Eq. (7)}$$

273 Where, F is the applied force (N), E the Young's modulus (Pa), α the tip half-angle, ν the 274 Poisson's ratio (assumed to be 0.5), and δ (m) the indentation (the difference in the relative 275 changes of the piezo scanner displacement z and cantilever deflection d).

276

277 2.8.3. Stability of Quer in simulated gastro-intestinal fluids

278

279 The stability of aqueous solution of free Quer (10 µg/mL), CD/Quer inclusion complex, and 280 Quer-loaded liposomes (CLs and DCLs) was investigated in simulated gastric (SGF, pH 1.2) 281 and intestinal (SIF, pH 6.8) fluids. The simulated fluids were prepared according to United 282 States Pharmacopeia (USP 37/NF 32, 2014) with some modifications. Briefly, SGF was 283 prepared by dissolving 100 mg NaCl and 160 mg pepsin in 0.35 mL concentrated HCl and 284 sufficient water to make up to 50 mL. The obtained pH was 1.2. SIF was prepared by dissolving 285 340 mg KH₂PO₄ in 10 mL water followed by the addition of 3.85 mL NaOH (0.2 N) and 20 286 mL water. Pancreatin (500 mg) was then added and the pH was adjusted to 6.8 with 0.2 N HCl. 287 To simulate the effect of bile salts, sodium taurocholate at a final concentration of 6 mM was added to SIF and the volume was completed with water (up to 50 mL). 288

Free Quer solution was first prepared in acetonitrile (1 mg/mL) and was then diluted with SGF or SIF to obtain a final concentration of 10 μ g/mL. For CLs and DCLs, aliquots from each liposome suspension were centrifuged at 5000 rpm for 10 min. 500 μ L from the concentrated

incubations were carried out at 37 $^{\circ}\text{C}$ during 4 and 6 h for SGF and SIF, respectively. At
different time intervals, 100 μ L were removed from each incubation medium and the remaining
concentration of Quer was determined by HPLC.
2.8.4. Storage stability of liposomes
CLs and DCLs suspensions were stored at 4 °C for 12 months. The diameter of vesicles and the
percentage of remaining Quer were determined at t ₀ and after 1-year storage.
Remaining Quer (%) after storage = $\frac{[Quer]_{1 \text{ year}}}{[Quer]_{t_0}} \times 100$ Eq. (8)
Where, $[Quer]_{1 year}$ and $[Quer]_{t0}$ are the concentrations of Quer in the formulations at time t ₀ and
after one year of storage at 4 °C, respectively.
2.9. Statistical analysis
Statistical analysis was performed using the two-sample Student's t-test. The results are

- 310 **3. Results and discussion**
- 311
- 312 3.1. Phase solubility studies
- 313

314 The complexation ability of the different CDs (α -CD, β -CD, γ -CD, HP- β -CD, RAMEB, 315 CRYSMEB, and SBE- β -CD) towards Quer was evaluated by phase solubility studies. Phase 316 solubility diagrams for CD/Quer inclusion complexes are shown in **Fig. 1**. A_L- type profiles 317 were obtained for all studied CD, except for SBE- β -CD. The slope of A_L- type profiles was less 318 than unity indicating the formation of 1:1 CD/Quer inclusion complexes. The aqueous intrinsic 319 solubility of Quer was equal to 0.02 mM. As can be seen in Fig. 1, the solubility of Quer 320 increased with increasing the CD concentration. For example, it increased by 12 and 14-fold 321 with 10 mM HP- β -CD and RAMEB solutions, respectively.

322 The formation constants (K_f) of all inclusion complexes were calculated according to equation 323 1 and are presented in **Table 1**. The binding affinity of the CDs towards Quer can be ranged as 324 follows: SBE-β-CD (5335 M⁻¹) > RAMEB (1177 M⁻¹) > HP-β-CD (1146 M⁻¹) > CRYSMEB $(294 \text{ M}^{-1}) > \gamma$ -CD $(297 \text{ M}^{-1}) > \beta$ -CD $(117 \text{ M}^{-1}) > \alpha$ -CD (44 M^{-1}) . The highest K_f value was 325 326 obtained for SBE-β-CD. The latter has excellent water solubility (~ 700 mg/L at 25 °C) and 327 has the advantage of improving the solubility of hydrophobic molecules (Jain, Date, 328 Pissurlenkar, Coutinho, Nagarsenker, 2011; Loftsson, Másson, & Brewster, 2004). The K_f 329 values found in our study for α -, β -, γ -CD, HP- β -CD, and SBE- β -CD/Quer inclusion complexes 330 are in accordance with the literature (Calabrò et al., 2004; Jullian, Moyano, Yañez, & Olea-331 Azar, 2007; Lucas-Abellán, Fortea, Gabaldón, & Núñez-Delicado, 2008).

332 The solubility enhancement capacity of these CDs can also be shown from the complexation 333 efficiency (CE) parameter and the solubility enhancement ratio (S_t/S_0). We can observe that β -334 CD derivatives are better solubilizers than native β -CD and particularly SBE- β -CD which 335 possesses the highest solubilizing capacity towards Quer (CE for SBE- β -CD = 0.107) (**Table** 336 1). Moreover, the solubilizing potential of this CD ($S_t/S_0 = 89.50$) was the most important in 337 comparison to other CDs. This demonstrates the great ability of SBE- β -CD to solubilize 338 hydrophobic molecules like Quer.

339

340 3.2. Determination of quercetin concentration in CD/quercetin inclusion complex solutions341

342According to phase solubility studies, SBE-β-CD was selected for the incorporation of CD/Quer343inclusion complex in the aqueous phase of liposomes in order to produce DCLs. In addition,344SBE-β-CD possessed high safety profiles towards biological membranes which is attributed to345its negligible ability to extract membrane lipids (Piel et al., 2007; Stella & He, 2008).346Different SBE-β-CD:Quer molar ratios (1:1, 2.5:1, 5:1, and 10:1) were prepared. The347concentration of Quer in the SBE-β-CD/Quer inclusion complex solution was determined348spectrophotometrically.

The solubility of Quer in the absence of CD was determined from the phase solubility studies ([Quer]= 0.02 mM). When adding SBE- β -CD at 1:1 CD:Quer molar ratio, a tremendous increase (~110-fold) of Quer solubility was observed (**Fig. 2**). Moreover, the solubility of Quer was greatly enhanced at CD:Quer molar ratio of 2.5:1 compared to the 1:1 molar ratio (about 3-fold increase). However, slight increase was noticed at the highest CD:Quer molar ratios (5:1 and 10:1). Therefore, SBE- β -CD/Quer inclusion complex solution prepared at CD:Quer molar ratio of 5:1 was selected as the aqueous phase for DCLs preparation.

356

357 3.3. Characterization of CLs and DCLs

358

First, Quer-loaded CLs were prepared by the ethanol injection method using different types of
phospholipids: Lipoid E80, Lipoid S100, and Phospholipon 90H. For all the formulations,

361 phospholipid:Quer molar ratio was kept constant (100:20). Preliminary experiments were 362 conducted to optimize the concentration of phospholipids and Chol for Lipoid E80 liposomes 363 preparation. The Lipoid E80 and Chol concentrations were 40 and 20 mg/mL, respectively, as 364 they allowed to obtain vesicles with narrow size distribution values (data not shown). Above 365 these concentrations, aggregates were obtained (data not shown) and this was in accordance 366 with other studies (Jaafar-Maalej, Diab, Andrieu, Elaissari, & Fessi, 2010). In our previous 367 work the optimal conditions for the preparation of liposomes using saturated (Phospholipon 368 80H, Phospholipon 90H) and unsaturated soybean PC (Lipoid S100) in combination with Chol 369 were determined. The optimal phospholipid and Chol concentrations were 10 and 5 mg/mL, 370 respectively (Sebaaly, Greige-Gerges, Stainmesse, Fessi, & Charcosset, 2016).

Earlier, we also showed that DCLs were more effective than CLs in increasing the photostability and prolonging the release of encapsulated molecules (Sebaaly, Jraij, Fessi, Charcosset, & Greige-Gerges, 2015; Gharib, Auezova, Charcosset, & Greige-Gerges, 2017). In addition, DCLs were found to be stable during freeze-drying (Gharib, Greige-Gerges, Fourmentin, & Charcosset, 2017). These findings prompted us to prepare DCLs formulations and to study their protective effect towards Quer. All liposomal formulations were characterized in terms of size, EE %, and LR % of Quer.

378

379 3.3.1. Particle size measurement

380

The mean particle size and size distribution of CLs and DCLs were determined by laser granulometry. For blank- and Quer-loaded liposomes, two distinct populations were obtained with nanometric (population 1) and micrometric (population 2) sizes (**Fig. S1 in supplementary materials**).

Blank Lipoid E80-liposomes showed a narrow size distribution in comparison to blank Lipoid
S100 and Phospholipon 90H liposomes (Fig. S1); where the percentage of micrometric

387 population was 5, 14, and 28 % for Lipoid E80, Lipoid S100, and Phospholipon 90H liposomes, 388 respectively (Table 2). This could be associated with the differences in zeta potential values 389 between these vesicles. Namely, the mean diameter of the particles increases with the 390 decrement of the zeta potential value: liposomes with low zeta potential value are more prone 391 to aggregate in solution (Gentine, Bubel, Crucifix, Bourel-Bonnet, & Frisch, 2012; Morini et 392 al., 2015; Srisuk, Thongnopnua, Raktanonchai, & Kanokpanont, 2012). Previous studies have 393 shown that Lipoid E80 liposomes possess high zeta potential values followed by Lipoid S100 394 and Phospholipon 90H liposomes (Gharib, Auezova, Charcosset, & Greige-Gerges, 2017; 395 Karn, Cho, Park, Park, & Hwang, 2013; Sebaaly, Greige-Gerges, Stainmesse, Fessi, & 396 Charcosset, 2016). This could be due to an additional negative surface charge associated with 397 the presence of PE in Lipoid E80 (Roy, Gallardo, & Estelrich, 1998). As a consequence, Lipoid 398 E80 are less susceptible to aggregate and show a narrow size distribution.

399 In comparison to the blank liposome suspensions, the presence of SBE- β -CD slightly 400 influenced the size distribution of Lipoid E80 liposomes (**Fig. S1**).

401 Concerning Quer-loaded liposomes, Quer modulated differently the size distribution of CLs 402 depending on the lipid type. For instance, the addition of Quer to Lipoid E80-based liposomes 403 slightly influenced their size distribution compared to that of blank liposomes. However, the 404 incorporation of Quer in Phospholipon 90H and Lipoid S100 liposomes shifted the size 405 distribution in favor of the micrometric population (**Fig. S1**). For example, the percentage of 406 population 1 was 72.05 \pm 4.84 % for blank Phospholipon 90H liposomes while it significantly 407 decreased to 22.62 \pm 6.68 % in the presence of Quer (**Table 2**).

- 407 decreased to 22.02 ± 0.08 % in the presence of Quer (Table 2).
- 408 As for Quer-loaded DCLs, we can notice a significant decrease in the percentage of the 409 nanometric population in the presence of SBE- β -CD/Quer inclusion complex when compared 410 to blank Lipoid E80-liposomes (**Fig. S1**).
- 411 The diameters of nanometric blank Lipoid E80, Lipoid S100, and Phospholipon 90H liposomes
- 412 were of 131, 123, and 150 nm, respectively. Likewise, literature studies have showed that the

413 size of blank liposomes made from egg or soybean PC varied between 100 and 300 nm 414 (Alexopoulou, Georgopoulos, Kagkadis, & Demetzos, 2006; Goniotaki et al., 2004; Landi-415 Librandi et al., 2012) while Phospholipon 90H liposomes had the highest mean diameter of 275 416 nm (Sebaaly, Greige-Gerges, Stainmesse, Fessi, & Charcosset, 2016). However, the mean 417 vesicle size of nanometric Quer-loaded CLs was bigger than that of blank liposomes. The sizes 418 of Ouer-loaded Lipoid E80, Lipoid S100, and Phospholipon 90H were 150, 131, and 226 nm, 419 respectively (Table 2). Quer, being hydrophobic, might be incorporated in the bilayer of 420 liposomes and thus it may perturb the interaction between the lipid acyl chains (Sikkema, de 421 Bont, & Poolman, 1995). This phenomenon leads to the formation of liposomes with larger 422 particle sizes. In fact, a study conducted by Sinha, Gadhwal, Joshi, Srivastava, & Govil (2011) 423 confirmed the incorporation of Quer in the lipid bilayer using RMN spectroscopy. The 424 interaction was described as follow: the OH groups of Quer form hydrogen bonds with the polar 425 head group of lipids while the aromatic rings are orientated towards the hydrophobic core of 426 the lipid membrane. The same trend was observed in previous studies that investigated the 427 encapsulation of Quer in liposomes (Goniotaki et al., 2004; Landi-Librandi et al., 2012; Moretti 428 et al., 2016; Shaji & Iyer, 2012; Tefas et al., 2015).

Similarly, compared to CLs, SBE- β -CD-loaded Lipoid E80, and DCLs had higher particle size, which is in agreement with the results of Shaji & Iyer (2012) and (Zhang et al., 2015) who showed that the SBE- β -CD/guest-loaded liposomes possessed a larger diameter than the blank ones. To the best of our knowledge, there is no literature data on the interaction of SBE- β -CD with lipid bilayers. As SBE- β -CD is highly charged, we can assume an incorporation of this CD inside the aqueous compartment of liposomes that may perturb the lipid organization leading to higher particle size.

436

437 3.3.2. Encapsulation efficiency and loading rate values of Quer in CLs and DCLs

439 HPLC method was developed to determine the entrapment efficiency (EE %) and the loading 440 rate (LR %) of Quer in liposomes. The retention times of trans-anethole (internal standard) and 441 Quer were respectively 11.54 ± 0.03 and 2.80 ± 0.05 min. The calibration curve was constructed 442 by plotting the Quer/trans-anethole area ratio against the concentration of Quer in µg/mL. The 443 linear relationships were evaluated by regression analysis with the least-squares method and 444 the correlation coefficient ranged from 0.994 to 0.997.

445 **Table 3** shows that high EE % for Quer was obtained with Lipoid E80-based liposomes (99.78) 446 ± 0.03 %), while EE % values of Quer in Phospholipon 90H and Lipoid S100 liposomes were 447 74.80 ± 4.05 and 55.56 ± 6.09 %, respectively. The highest EE % demonstrated for Lipoid E80 448 liposomes may be due to the presence of PE that may form additional hydrogen bonds with 449 Quer. Moreover, it has been reported that egg PC exhibited lower leakage rate of guests 450 compared to soybean PC liposomes (Li et al., 2015). The high EE % value obtained herein for 451 Quer-loaded Lipoid E80 liposomes correlated well with the EE % values found in the literature, 452 where an EE range of 81-92 % with the same liposomal formulation containing Chol was 453 obtained (Priprem, Sutthiparinyanont, Na, Surh, & Chulasiri, 2012; Shaji & Iyer, 2012).

454 However, DCLs showed a lower EE % value of Quer than CLs. It could be explained by the 455 limited capacity of the aqueous cavity of liposomes to entrap high CD/guest molar ratios. 456 Similar results were found for SBE- β -CD/flurbiprofen inclusion complex encapsulated in 457 Lipoid E80 liposomes (Zhang et al., 2015).

Concerning the loading rate, the best LR % value was obtained with Lipoid E80 followed by Lipoid S100 (39.69 ± 6.08 %) and Phospholipon 90H which gives the lowest LR % value of 14.20 ± 0.77 % (**Table 3**). Unsaturated phospholipids (Lipoid E80 and Lipoid S100) showed a better incorporation of Quer than saturated Phospholipon 90H, in consistence with the literature (Sebaaly, Jraij, Fessi, Charcosset, & Greige-Gerges, 2015; Gharib, Auezova, Charcosset, & Greige-Gerges, 2017). The preparation of Quer-loaded Phospholipon 90H liposomes requires heating (~ 55 °C) that may lead to Quer loss. Indeed, Wang & Zhao (2016) showed an increase in the degradation rate constant (k) of Quer at high temperature (k = 0.0281, 0.245, and 1.42 h⁻¹ at 37, 50, and 65 °C, respectively). The main degradation reactions involve oxidation, hydroxylation and ring-cleavage (Wang et al., 2016).

468

469 3.4. Effect of encapsulation on the photostability of Quer

470

471 It is well-known that light can induce the degradation of photosensitive compounds resulting in 472 a decrease in their effectiveness when added to food products (Calabrò et al., 2004). Flavonols, 473 like Quer are the most reactive molecules, among secondary metabolites, owing to the presence 474 of the free hydroxyl group at C3 (Dall'Acqua, Miolo, Innocenti, & Caffieri, 2012; Vicentini, 475 Georgetti, Jabor, Caris, Bentley, & Fonseca, 2007; Fahlman & Krol, 2009). 476 The photostability of free Quer, SBE-β-CD/Quer inclusion complex solution as well as Quer-477 loaded CLs and DCLs was evaluated upon exposure to UVC light during 72 h. The results are 478 expressed as percentage of Quer remaining in the solution at different time intervals. 479 As shown in Fig. 3, after irradiation of the aqueous solution of free Quer for 8 h, the percentage

480 of remaining Quer was 20 % and it was totally degraded after 72 h of exposure. In contrast, its
481 encapsulation in liposomes or in SBE-β-CD protected Quer from photodegradation.

482 The protective effect of CLs varied with the phospholipid type. In fact, Lipoid E80 liposomes 483 were the most efficient in protecting Quer from UV-light followed by Lipoid S100 and 484 Phospholipon 90H. After 8 h of exposure, the percentage of remaining Quer was 76, 65, and 60 485 % for Lipoid E80, Lipoid S100, and Phospholipon 90H liposomes, respectively. Previously, it 486 was shown that the protective effect of liposomes depends on the lipid composition, Chol 487 concentration, and membrane rigidity (Anderson & Omri, 2004; Monteiro, Martins, Reis, & 488 Neves, 2014; Yadav, Murthy, Shete, & Sakhare, 2011). As for the lipid composition, the highest 489 efficacy exhibited by Lipoid E80 towards Quer protection could be explained by the fact that the oxidative stability of egg yolk lecithin is better than that of soybean counterpart due to the
lowest content of unsaturated lipids (Budai et al., 2013). In addition, Quer is highly incorporated
in Lipoid E80 membranes (EE % > 90 %) compared to Lipoid S100 and Phospholipon 90H;
thus, the reactive 3-OH group of this molecule seems to be less exposed to UV-irradiation.

494 On the other hand, SBE-β-CD/Quer-loaded liposomes showed the highest Quer protective 495 effect: only 10 % of Ouer loaded into DCLs was degraded upon 8 h of irradiation and more 496 than 70 % remained in the solution after 72 h of UVC stress. For DCLs, the UV light should 497 overcome two barriers: first the lipid bilayer then CD wall. Fig. 3 shows that higher protection 498 was also offered by CD/Quer inclusion complexes. The better photoprotective effect of CD 499 compared to liposomal formulations may be due to the oxidation and hydrolysis of lipids 500 following long UV-light exposure (Briuglia, Rotella, McFarlane, & Lamprou, 2015; Hsieh, 501 Chen, Wang, Chang, & Chang, 2002). Our results are in accordance with literature data that 502 showed that Quer was more photostable in its CD complex form (Carlotti, Sapino, Ugazio, & 503 Caron, 2011; Savic et al., 2015) and in lipid carrier (Liu et al, 2013; Scalia & Mezzena, 2009) 504 when compared to free Quer. Besides, literature studies reported a better photoprotection of 505 bioactive molecules when encapsulated in DCLs compared to CLs (Gharib, Auezova, 506 Charcosset, & Greige-Gerges, 2017; Ioele, De Luca, & Ragno, 2014; Loukas, Jayasekera, & 507 Gregoriadis, 1995).

508

509 3.5. Morphological observation and rigidity measurement of blank liposomes

510

511 Membrane rigidity is one of the key parameters that modulate liposome stability (Takechi-512 Haraya et al., 2016). In order to explain the discrepancy in the behaviour of the different types 513 of liposomes towards Quer photoprotection, membrane rigidity was determined by measuring 514 the Young's modulus (E) parameter using AFM spectroscopy. The topography of liposomes was also obtained. The particle size and membrane rigidity were compared for blank liposomes
before and after UVC light exposure.

517 Fig. 4 illustrates representative 2D images of the three types of liposomes obtained before UVC 518 exposure. All liposomes exhibited a spherical shape. The size of the vesicles varied with the 519 lipid composition: for Lipoid E80, Lipoid S100, and Phospholipon 90H liposomes, the particle 520 size ranged from 35 to 122 nm, 36 to 53 nm, and 47 to 80 nm, respectively (Fig. 4A). Values 521 obtained with laser granulometry method were higher than those obtained with AFM. Indeed, 522 granulometry allows a wide range of particle size analysis in comparison to AFM, thus it 523 quantifies the size of all the vesicles present in the solution. Fig. 4B showed also that the 524 spherical shape and the size of liposomes were preserved after UV exposure.

525 Moreover, membrane rigidity of the three liposomal formulations was assessed. The calculation 526 of the Young's modulus (E) parameter was made by fitting the force curves of liposomes to the 527 the Hertz-model following Eq.7. The values constitute the average of 100 force-curves, at least, 528 for each sample. It can be observed from Fig. 5a that before UV irradiation, the rigidity of 529 liposomes composed of unsaturated lipids (Lipoid E80 and Lipoid S100) was higher than that 530 of liposomes composed of saturated ones (Phospholipon 90H): ELipoid E80:Chol (2965.81 ± 102.98 531 kPa) > $E_{\text{Lipoid S100;Chol}}$ (1754.69 ± 111.47 kPa) > $E_{\text{Phospholipon 90H;Chol}}$ (1450.30 ± 92.44 kPa). Chol 532 incorporation was shown to disrupt the lateral order of saturated lipids and decrease the disorder 533 of unsaturated lipids (Ohvo-Rekilä, Ramstedt, Leppimäki, & Slotte, 2002; Raudino, Sarpietro, 534 & Pannuzzo, 2011). Thus, lipid bilayer formed from unsaturated lipids (Lipoid E80 and Lipoid 535 S100) are rigidified by the presence of Chol while those composed from saturated ones tend to 536 be less rigid and thus less stable. These findings are in good agreement with the results of 537 (Takechi-Haraya et al., 2016) who showed that the addition of Chol to saturated lipid 538 membranes reduced their rigidity, while the incorporation of Chol in unsaturated lipid 539 membranes enhanced their rigidity. Also, (Liang, Mao, & Ng, 2004) found that the addition of 540 Chol in EggPC membranes increased the E value by 40-fold at 50 mole % Chol.

Concerning the rigidity of liposomes after 72 h of UV exposure, we can notice that the Young's 541 542 modulus values increased in comparison with non-irradiated samples: ELipoid E80:Chol = 3125.96 543 \pm 242.43 versus 2965.81 \pm 102.98 kPa; E_{Lipoid S100:Chol} = 2145.08 \pm 55.40 versus 1754.69 \pm 544 111.47 kPa, and $E_{Phospholipon 90H:Chol} = 1728.26 \pm 33.62$ versus 1450.30 ± 92.44 kPa (**Fig. 5b**). 545 Previous studies revealed that UV irradiation generally leads to an increase in membrane 546 rigidity (Choe, Jackson, & Yu, 1995; Sakanashi et al., 1988). This can be attributed to the 547 rupture of lipid acyl chains and the formation of hydroperoxides. The latter promotes the 548 formation of hydrogen bonding, hence resulting in a more compact and rigid membranes 549 (Kölling, Maldonado, Ojeda, & Diehl, 1994; Sakanashi et al., 1988). When compared to non-550 irradiated vesicles, the significant increase of the E value for Lipoid S100 liposomes after

irradiation could be due to the high content of unsaturated bonds. Indeed, the iodine value ofLipoid S100 ranged between 97 and 105 while that of Lipoid E80 is between 65 and 69.

Rigidity is one of the key parameters that modulate vesicle stability: when the membrane is rigid the leakage of molecules from liposomes is reduced, thus the stability of the vesicles is enhanced (Briuglia, Rotella, McFarlane, & Lamprou, 2015; Liang, Mao, & Ng, 2004; Nakano, Tozuka, Yamamoto, Kawashima, & Takeuchi, 2008). All these observations explain the highest protective effect of Lipoid E80-liposomes exhibited towards Quer compared to the other liposomes types.

559

560 3.6. Stability of Quer in simulated gastro-intestinal fluids

561

562 Enteral route is the most common for drug administration (Maalik et al., 2014), therefore, the 563 solubility and stability of Quer in free and encapsulated forms was evaluated in SIF and SGF. 564 It is worth noting that when improving solubility and stability, Quer bioavailability is expected 565 to be enhanced. The concentration of remaining Quer was determined after 4 and 6 h of 566 incubation in SGF and SIF, respectively (**Fig. 6**).

It can be observed that Quer was highly solubilized in both media when encapsulated in CD CLs, and DCLs compared to the free Quer, the concentration range of Quer in all formulations being between 100 and 500 μ g/mL. Besides, Lipoid E80 liposomes showed the highest solubilization of Quer compared to Lipoid S100 and Phospholipon 90H liposomes in both fluids; it is due to the higher concentration of this lipid in liposome formulations (40 mg/mL) compared to the two other lipids (10 mg/mL).

573 Moreover, we can notice from **Fig. 6a**, that Quer in its free form was degraded in SGF after 4 574 h of incubation where only 5 μ g/mL of Quer remained in the solution (its initial concentration 575 was 10 μ g/mL). While, it was mostly stable in SIF (**Fig. 6b**).

576 Encapsulation of Quer in CDs, CLs, and DCLs increased the stability of Quer in SGF. For 577 example, the initial Quer concentration in Lipoid E80, Lipoid S100, and Phospholipon 90H 578 liposomes was 280, 86, and 150 µg/mL while it was 230, 80, and 80 µg/mL, respectively after 579 4 h of incubation (Fig. 6a). Thus, it can be deduced that Quer-loaded Phospholipon 90H 580 liposomes were less stable in SGF in comparison to the other formulations. This result can be 581 attributed to the difference in the bilayer elastic properties of these liposomes. In fact, 582 Phospholipon 90H was shown to possess a less rigid membrane which leads to a faster leakage 583 rate of Quer compared to Lipid E80 and Lipoid S100 phospholipids.

The lower stability of all formulations in SGF compared to SIF could be due to the hydrolysis of the ester bonds which link the fatty acids to the glycerol backbone in acidic pH (Hu et al., 2013; Jain, Thanki, & Jain, 2013). It was also shown that bilayers containing a high percentage of PE are stable in media with a pH value of 8 and 9 (Yang, Guo, Li, & Hui, 1997), explaining the highest stability of Lipoid E80 formulations in SIF compared to other formulations. In fact, the head group of PE may increase the electronic density of the liposome surface enhancing liposomes repulsion and thus decreasing the aggregation/fusion processes.

592 3.7. Storage stability of liposomes

593

594 Storage stability of Quer-loaded liposomes was determined in terms of particle size and 595 percentage of remained Quer after 1 year of storage at 4 °C. The mean size of all formulations 596 was maintained after storage except for Quer loaded-Lipoid S100 and DCLs where an increase 597 in size was observed (Table 2). In addition, the total Ouer concentration in the liposomal 598 suspensions was determined by HPLC after 12 months. We can notice that all formulations 599 effectively retained Quer after storage: the percentage of remained Quer was 98, 95, 93, and 82 600 % for DCLs, Quer-loaded Lipoid E80, Phospholipon 90H, and Lipoid S100, respectively. DCL 601 systems were more effective in retaining Quer in comparison to CLs.

602

603 **4.** Conclusion

604

605 Lipoid E80 liposomes were found to be the best encapsulating system for Quer compared to the 606 other formulations. In fact, Quer-loaded Lipoid E80 liposomes were predominantly nanometric 607 and exhibited high EE % and LR % values of Quer. This effect was mainly attributed to the 608 presence of PE that allows a higher membrane rigidity and thus a lower leakage rate. Moreover, 609 encapsulation into CDs, CLs or DCLs enhanced the solubility and the stability of Quer. 610 Compared to CLs, DCLs were more effective in ensuring the protection of Quer under UV-611 light and in simulated gastrointestinal fluids. Physical stability of liposomes incorporating Quer 612 was also proven after 1 year of storage at 4 °C, where more than 80 % of Quer remained in the 613 suspensions.

615 Acknowledgments

- 616 The authors are grateful to Université du Littoral Côte d'Opale and Lebanese University for the
- 617 financial support for J. Azzi's PhD thesis. The study was financially supported by Lebanese
- 618 National Council for scientific research and by Agence Universitaire de la Francophonie
- 619 (project PCSI 2015/2017).

621 References

- 622
- 623 Aditya, N. P., Macedo, A. S., Doktorovova, S., Souto, E. B., Kim, S., Chang, P.-S., & Ko, S.
- 624 (2014). Development and evaluation of lipid nanocarriers for quercetin delivery: a comparative
- 625 study of solid lipid nanoparticles (SLN), nanostructured lipid carriers (NLC), and lipid
- 626 nanoemulsions (LNE). LWT Food Science and Technology, 59(1), 115–121.
- 627 Alexopoulou, E., Georgopoulos, A., Kagkadis, K. A., & Demetzos, C. (2006). Preparation and
- 628 characterization of lyophilized liposomes with incorporated quercetin. Journal of Liposome629 Research, 16(1), 17–25.
- 630 Anderson, M., & Omri, A. (2004). The effect of different lipid components on the in vitro
- 631 stability and release kinetics of liposome formulations. Drug Delivery, 11(1), 33–39.
- Anwekar, H., Patel, S., & Singhai, A. (2011). Liposome as drug carriers. International Journal
 of Pharmacy & Life Sciences, 2, 945–951.
- 634 Astray, G., Mejuto, J. C., Morales, J., Rial-Otero, R., & Simal-Gándara, J. (2009). A review on
- the use of cyclodextrins in foods. Food Hydrocolloids, 23, 1631–1640.
- Briuglia, M.-L., Rotella, C., McFarlane, A., & Lamprou, D. A. (2015). Influence of cholesterol
- on liposome stability and on in vitro drug release. Drug Delivery and Translational Research,
 5(3), 231–242.
- 639 Budai, L. Kaszás, N., Gróf, P., Lenti, K., Maghami, K., Aantal, I., Klebovich, I., Petrikovics,
- 640 I., Budai, M. (2013). Liposomes for topical use: a physico-chemical comparison of vesicles
- 641 prepared from egg or soy lecithin. Scientia Pharmaceutica, 81(4), 1151–1166.
- 642 Cai, X., Fang, Z., Dou, J., Yu, A., & Zhai, G. (2013). Bioavailability of quercetin: problems
- and promises. Current Medicinal Chemistry, 20(20), 2572–2582.
- 644 Calabrò, M., Tommasini, S., Donato, P., Raneri, D., Stancanelli, R., Ficarra, P., Ficarra, R.,
- 645 Costa, C., Catania, S., Rustichelli, C., Gamberini, G. (2004). Effects of α- and β-cyclodextrin

- 646 complexation on the physico-chemical properties and antioxidant activity of some 3-
- 647 hydroxyflavones. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 35(2), 365–377.
- 648 Carlotti, M. E., Sapino, S., Ugazio, E., & Caron, G. (2011). On the complexation of quercetin
- 649 with methyl-β-cyclodextrin: photostability and antioxidant studies. Journal of Inclusion
- 650 Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 70(1–2), 81–90.
- 651 Chen, J., Lu, W.-L., Gu, W., Lu, S.-S., Chen, Z.-P., Cai, B.-C., & Yang, X.-X. (2014). Drug-
- 652 in-cyclodextrin-in-liposomes: a promising delivery system for hydrophobic drugs. Expert 653 Opinion on Drug Delivery, 11(4), 565–577.
- 654 Choe, M., Jackson, C., & Yu, B. P. (1995). Lipid peroxidation contributes to age-related 655 membrane rigidity. Free Radical Biology and Medicine, 18(6), 977–984.
- 656 Dall'Acqua, S., Miolo, G., Innocenti, G., & Caffieri, S. (2012). The photodegradation of
- 657 quercetin: relation to oxidation. Molecules, 17(12), 8898-8907.
- 658 Day, L. Seymour, R. B., Pitts, K. F., Konczak, I., & Lundin, L. (2009). Incorporation of 659 functional ingredients into foods. Trends in Food Science & Technology, 20(9), 388–395.
- 660 Dueñas, M., González-Manzano, S., González-Paramás, A., & Santos-Buelga, C. (2010).
- 661 Antioxidant evaluation of o-methylated metabolites of catechin, epicatechin and quercetin.
- 662 Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 51(2), 443-449.
- 663 Fahlman, B. M., & Krol, E. S. (2009). UVA and UVB radiation-induced oxidation products of 664
- quercetin. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 97(3), 123–131.
- 665 Gentine, P., Bubel, A., Crucifix, C., Bourel-Bonnet, L., & Frisch, B. (2012). Manufacture of 666 liposomes by isopropanol injection: characterization of the method. Journal of Liposome 667 Research, 22(1), 18-30.
- 668 Gharib, R., Auezova, L., Charcosset, C., & Greige-Gerges, H. (2017). Drug-in-cyclodextrin-in-
- 669 liposomes as a carrier system for volatile essential oil components: Application to anethole.
- 670 Food Chemistry, 218, 365-371.
- 671 Gharib, R., Greige-Gerges, H., Fourmentin, S., Charcosset, C., & Auezova, L. (2015).
- 672 Liposomes incorporating cyclodextrin-drug inclusion complexes: Current state of knowledge.
- 673 Carbohydrate Polymers, 129, 175–186.
- 674 Gharib, R., Greige-Gerges, H., Fourmentin, S., & Charcosset, C. (2017). Hydroxypropyl-β-
- 675 cyclodextrin as a membrane protectant during freeze-drying of hydrogenated and non-
- 676 hydrogenated liposomes and molecule-in-cyclodextrin-in-liposomes: application to trans-
- anethole. Food chemistry. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.10.144
- 678 Gibellini, L., Pinti, M., Nasi, M., Montagna, J. P., De Biasi, S., Roat, E., Bertoncelli, L., Cooper,
- E. L., Cossarizza, A. (2011). Quercetin and cancer chemoprevention, Evidence-Based
 Complementary and Alternative Medicine, 2011, 1-15.
- 681 Goniotaki, M., Hatziantoniou, S., Dimas, K., Wagner, M., & Demetzos, C. (2004).
- 682 Encapsulation of naturally occurring flavonoids into liposomes: physicochemical properties
- and biological activity against human cancer cell lines. Journal of Pharmacy and
 Pharmacology, 56(10), 1217–1224.
- Higuchi, T., & Connors, K. A. (1965). Phase solubility techniques. Advanced Analytical
 Chemistry of Instrumentation, 4, 117–212.
- Hsieh, Y.-F., Chen, T.-L., Wang, Y.-T., Chang, J.-H., & Chang, H.-M. (2002). Properties of
- 688 liposomes prepared with various lipids. Journal of Food Science, 67(8), 2808–2813.
- Hu, S., Niu, M., Hu, F., Lu, Y., Qi, J., Yin, Z., & Wu, W. (2013). Integrity and stability of oral
- 690 liposomes containing bile salts studied in simulated and ex vivo gastrointestinal media.
- 691 International Journal of Pharmaceutics, 441(1–2), 693–700.
- Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M. C. B., & Rahu, N. (2016). Oxidative
- 693 stress and inflammation: what polyphenols can do for us? Oxidative Medicine and Cellular
- 694 Longevity, 2016, 1–9.
- 695 Ioele, G., De Luca, M., & Ragno, G. (2014). Photostability of barnidipine in combined
- 696 cyclodextrin-in-liposome matrices. Future Medicinal Chemistry, 6(1), 35–43.

- 697 Jaafar-Maalej, C., Diab, R., Andrieu, V., Elaissari, A., & Fessi, H. (2010). Ethanol injection
- 698 method for hydrophilic and lipophilic drug-loaded liposome preparation. Journal of Liposome
 699 Research, 20(3), 228–243.
- Jain, A. K., Thanki, K., & Jain, S. (2013). Co-encapsulation of tamoxifen and quercetin in
- 701 polymeric nanoparticles: implications on oral bioavailability, antitumor efficacy, and drug-
- induced toxicity. Molecular Pharmaceutics, 10(9), 3459–3474.
- Jain, A. S., Date, A. A., Pissurlenkar, R. R. S., Coutinho, E. C., Nagarsenker, M. S. (2011).
- 704 Sulfobutyl ether₇ β -cyclodextrin (SBE₇ β -CD) carbamazepine complex: preparation,
- characterization, molecular modeling, and evaluation of in vivo anti-epileptic activity. AAPS
- 706 PharmSciTech, 12(4), 1163-1175.
- Jangde, R., & Singh, D. (2014). Preparation and optimization of quercetin-loaded liposomes
- for wound healing, using response surface methodology. Artificial Cells, Nanomedicine, and
 Biotechnology, 44(2), 635–641.
- Jullian, C., Moyano, L., Yañez, C., & Olea-Azar, C. (2007). Complexation of quercetin with
- 711 three kinds of cyclodextrins: an antioxidant study. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and
- Biomolecular Spectroscopy, 67(1), 230–234.
- 713 Karn, P. R., Cho, W., Park, H.-J., Park, J.-S., & Hwang, S.-J. (2013). Characterization and
- stability studies of a novel liposomal cyclosporin A prepared using the supercritical fluid
 method: comparison with the modified conventional Bangham method. International Journal
 of Nanomedicine, 8, 365-377.
- Kfoury, M., Auezova, L., Greige-Gerges, H., Ruellan, S., & Fourmentin, S. (2014).
 Cyclodextrin, an efficient tool for trans-anethole encapsulation: chromatographic,
 spectroscopic, thermal and structural studies. Food Chemistry, 164, 454-461.
- 720 Kfoury, M., Auezova, L., Ruellan, S., Greige-Gerges, H., & Fourmentin, S. (2015).
- 721 Complexation of estragole as pure compound and as main component of basil and tarragon
- essential oils with cyclodextrins. Carbohydrate Polymers, 118, 156-164.

- 723 Khan, R. S., Grigor, J., Winger, R., & Win, A. (2013). Functional food product development –
- opportunities and challenges for food manufacturers. Trends in Food Science & Technology,
 30(1), 27–37.
- 726 Kleemann, R., Verschuren, L., Morrison, M., Zadelaar, S., van Erk, M. J., Wielinga, P. Y., &
- 727 Kooistra, T. (2011). Anti-inflammatory, anti-proliferative and anti-atherosclerotic effects of
- quercetin in human in vitro and in vivo models. Atherosclerosis, 218(1), 44–52.
- 729 Kölling, A., Maldonado, C., Ojeda, F., & Diehl, H. A. (1994). Membrane fluidity of microsomal
- and thymocyte membranes after X-ray and UV irradiation. Radiation and Environmental
 Biophysics, 33(4), 303–313.
- Lakhanpal, P., & Rai, D. K. (2007). Quercetin: a versatile flavonoid. Internet Journal of
 Medical Update, 2(2), 1-16.
- 734 Landi-Librandi, A. P., Chrysostomo, T. N., Caleiro Seixas Azzolini, A. E., Marzocchi-
- Machado, C. M., de Oliveira, C. A., & Lucisano-Valim, Y. M. (2012). Study of quercetinloaded liposomes as potential drug carriers: in vitro evaluation of human complement
 activation. Journal of Liposome Research, 22(2), 89–99.
- Li, J., Wang, X., Zhang, T., Wang, C., Huang, Z., Luo, X., & Deng, Y. (2015). A review on
 phospholipids and their main applications in drug delivery systems. Asian Journal of
 Pharmaceutical Sciences, 10(2), 81–98.
- 741 Liang, X., Mao, G., & Ng, K. Y. S. (2004). Mechanical properties and stability measurement
- of cholesterol-containing liposome on mica by atomic force microscopy. Journal of Colloid
- 743 and Interface Science, 278(1), 53–62.
- Liu, R. H. (2013). Dietary bioactive compounds and their health implications. Journal of Food
 Science, 78(s1), A18–A25.
- Liu, D., Hu, H., Lin, Z., Chen, D., Zhu, Y., Hou, S., Shi, X. (2013). Quercetin deformable
- 747 liposome: preparation and efficacy against ultraviolet B induced skin damages in vitro and in
- vivo. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 127, 8–17.

- Loftsson, T., Másson, M., & Brewster, M. E. (2004). Self-association of cyclodextrins and
 cyclodextrin complexes. Journal of Pharmaceutical Sciences, 93(5), 1091–1099.
- 751 Loukas, Y. L., Jayasekera, P., & Gregoriadis, G. (1995). Characterization and photoprotection
- studies of a model γ -cyclodextrin-included photolabile drug entrapped in liposomes incorporating light absorbers. The Journal of Physical Chemistry, 99(27), 11035–11040.
- Lucas-Abellán, C., Fortea, I., Gabaldón, J. A., & Núñez-Delicado, E. (2008). Encapsulation of
- quercetin and myricetin in cyclodextrins at acidic pH. Journal of Agricultural and FoodChemistry, 56(1), 255–259.
- 757 Maalik, A., Khan, F., Mumtaz, A., Mehmood, A., Azhar, S., Atif, M., Karim, S., Altaf., Y.
- 758 Tariq, I. (2014). Pharmacological applications of quercetin and its derivatives: A short review.
- 759 Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 13(9), 1561-1566.
- McClements, D. J. (2015). Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active
 components: potential and limitations of colloidal delivery systems. Advances in Colloid and
 Interface Science, 219, 27–53.
- 763 McCormack, B., & Gregoriadis, G. (1994). Entrapment of cyclodextrin-drug complexes into
- ⁷⁶⁴ liposomes: potential advantages in drug delivery. Journal of Drug Targeting, 2(5), 449–454.
- 765 Mileo, A. M., & Miccadei, S. (2016). Polyphenols as modulator of oxidative stress in cancer
- 766 disease: new therapeutic strategies. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2016, 1–17.
- 767 Monteiro, N., Martins, A., Reis, R. L., & Neves, N. M. (2014). Liposomes in tissue engineering
- and regenerative medicine. Journal of The Royal Society Interface, 11, 1–24.
- 769 Moretti, E., Mazzi, L., Bonechi, C., Salvatici, M. C., Iacoponi, F., Rossi, C., & Collodel, G.
- 770 (2016). Effect of quercetin-loaded liposomes on induced oxidative stress in human
- 771 spermatozoa. Reproductive Toxicology, 60, 140–147.
- 772 Morini, M. A., Sierra, M. B., Pedroni, V. I., Alarcon, L. M., Appignanesi, G. A., & Disalvo, E.
- A. (2015). Influence of temperature, anions and size distribution on the zeta potential of DMPC,
- 774 DPPC and DMPE lipid vesicles. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 131, 54–58.

- 775 Nabavi, S. F., Russo, G. L., Daglia, M., & Nabavi, S. M. (2015). Role of quercetin as an
- alternative for obesity treatment: you are what you eat! Food Chemistry, 179, 305–310.
- 777 Nakano, K., Tozuka, Y., Yamamoto, H., Kawashima, Y., & Takeuchi, H. (2008). A novel
- method for measuring rigidity of submicron-size liposomes with atomic force microscopy.
- 1779 International Journal of Pharmaceutics, 355(1–2), 203–209.
- 780 Ohvo-Rekilä, H., Ramstedt, B., Leppimäki, P., & Slotte, J. P. (2002). Cholesterol interactions
- with phospholipids in membranes. Progress in Lipid Research, 41(1), 66–97.
- 782 Piel, G., Piette, M., Barillaro, V., Castagne, D., Evrard, B., & Delattre, L. (2007). Study of the
- relationship between lipid binding properties of cyclodextrins and their effect on the integrity
- of liposomes. International Journal of Pharmaceutics, 338(1–2), 35–42.
- 785 Priprem, A., Sutthiparinyanont, S., Na, H.-K., Surh, Y.-J., & Chulasiri, M. (2012). Effect of
- 786 formulations of nanosized quercetin liposomes on COX-2 and NF-κB in MCF-10A Cells.
- 787 Pharmaceutical Nanotechnology, 1, 26–34.
- Raudino, A., Sarpietro, M., & Pannuzzo, M. (2011). The thermodynamics of simple
 biomembrane mimetic systems. Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences, 3(1), 15-38.
- Roy, M. T., Gallardo, M., & Estelrich, J. (1998). Influence of size on electrokinetic behavior of
- phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine lipid vesicles. Journal of Colloid and
 Interface Science, 206(2), 512–517.
- 793 Sakanashi, T., Sugiyama, M., Suematsu, T., Nakagawa, T., Hidaka, T., & Ogura, R. (1988).
- 794 UV exposure alters the membrane lipid composition and cell membrane fluidity of intact
- cultured B-16 melanoma cells. The Kurume Medical Journal, 35(4), 159–169.
- 796 Savic, I. M., Nikolic, V. D., Savic-Gajic, I., Nikolic, L. B., Radovanovic, B. C., & Mladenovic,
- 797 J. D. (2015). Investigation of properties and structural characterization of the quercetin
- 798 inclusion complex with (2-hydroxypropyl)-β-cyclodextrin. Journal of Inclusion Phenomena
- 799 and Macrocyclic Chemistry, 82(3-4), 383–394.

- Scalia, S., & Mezzena, M. (2009). Incorporation of quercetin in lipid microparticles: effect on
 photo- and chemical-stability. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 49(1), 90–
 94.
- Sebaaly, C., Greige-Gerges, H., Stainmesse, S., Fessi, H., & Charcosset, C. (2016). Effect of
 composition, hydrogenation of phospholipids and lyophilization on the characteristics of
- 805 eugenol-loaded liposomes prepared by ethanol injection method. Food Bioscience, 15, 1–10.
- Sebaaly, C., Jraij, A., Fessi, H., Charcosset, C., Greige-Gerges, H. (2015). Preparation and
 characterization of clove essential oil-loaded liposomes. Food Chemistry, 178, 52–62.
- 808 Shaji, J., & Iyer, S. (2012). Double-loaded liposomes encapsulating quercetin and quercetin
- beta-cyclodextrin complexes: preparation, characterization and evaluation. Asian Journal of
 Pharmaceutics, 6(3), 218.
- 811 Sikkema, J., de Bont, J. A., & Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of
 812 hydrocarbons. Microbiological Reviews, 59(2), 201–222.
- 813 Sinha, R., Gadhwal, M., Joshi, U., Srivastava, S., Govil, G., Parade, C. (2011). Interaction of
- 814 quercetin with DPPC model membrane: Molecular dynamic simulation, DSC and multinuclear
- 815 NMR studies. Journal- Indian Chemical Society, 88, 1203–1210.
- 816 Srisuk, P., Thongnopnua, P., Raktanonchai, U., & Kanokpanont, S. (2012). Physico-chemical
- 817 characteristics of methotrexate-entrapped oleic acid-containing deformable liposomes for in
- 818 vitro transepidermal delivery targeting psoriasis treatment. International Journal of
- 819 Pharmaceutics, 427(2), 426–434.
- 820 Stella, V. J., & He, Q. (2008). Cyclodextrins. Toxicologic Pathology, 36(1), 30–42.
- 821 Szejtli, J. (1997). Utilization of cyclodextrins in industrial products and processes. Journal of
- 822 Materials Chemistry, 7, 575–587.
- 823 Szente, L., & Szejtli, J. (1999). Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties,
- and trends in development. Advanced Drug Delivery Reviews, 36(1), 17–28.

- 825 Takechi-Haraya, Y., Sakai-Kato, K., Abe, Y., Kawanishi, T., Okuda, H., & Goda, Y. (2016).
- Atomic force microscopic analysis of the effect of lipid composition on liposome membrane
 rigidity. Langmuir, 32(24), 6074–6082.
- 828 Tamjidi, F., Shahedi, M., Varshosaz, J., & Nasirpour, A. (2013). Nanostructured lipid carriers
- 829 (NLC): a potential delivery system for bioactive food molecules. Innovative Food Science &
- 830 Emerging Technologies, 19, 29–43.
- 831 Tefas, L. R., Muntean, D.-M., Vlase, L., Porfire, A. S., Achim, M., & Tomuta, I. (2015).
- 832 Quercetin-loaded liposomes: formulation optimization through a D-optimal experimental
 833 design. Farmacia, 63(1), 26–33.
- 834 Vicentini, F. T. M. C., Georgetti, S. R., Jabor, J. R. & Caris, J. A., Bentley, M.V. L.B. &
- 835 Fonseca, M. J. V. (2007). Photostability of quercetin under exposure to UV irradiation. Latin
- American Journal of Pharmacy, 26(1), 119–124.
- Wang, J., & Zhao, X.-H. (2016). Degradation kinetics of fisetin and quercetin in solutions
 affected by medium pH, temperature and co-existed proteins. Journal of the Serbian Chemical
 Society, 81(3), 243–253.
- 840 Wang, W., Sun, C., Mao, L., Ma, P., Liu, F., & Yang, J. (2016). The biological activities,
- 841 chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. Trends in Food
- 842 Science & Technology, 56, 21–38.
- 843 Yadav, A. V., Murthy, M. S., Shete, A. S., & Sakhare, S. (2011). Stability aspects of liposome.
- 844 Indian. J. Pharm. Educ., 45, 402–413.
- 845 Yang, Q., Guo, Y., Li, L., & Hui, S. W. (1997). Effects of lipid headgroup and packing stress
- 846 on poly(ethylene glycol)-induced phospholipid vesicle aggregation and fusion. Biophysical
 847 Journal, 73(1), 277–282.
- 848 Zhang, L., Zhang, Q., Wang, X., Zhang, W., Lin, C., Chen, F., Yang, X., Pan, W. (2015). Drug-
- 849 in-cyclodextrin-in-liposomes: a novel drug delivery system for flurbiprofen. International
- 850 Journal of Pharmaceutics, 492(1–2), 40–45.

851 Figure captions

- 852 Fig. 1. Phase solubility diagrams of CD/Quer inclusion complexes. The concentration of
- solubilized Quer was plotted against different CDs concentrations varying from 0 to 10 mM.
- Fig. 2. Quer concentration in SBE-β-CD/Quer inclusion complex solution at different CD:Quer
 molar ratios.
- Fig. 3. Percentage of remaining Quer in aqueous solution, SBE-β-CD/Quer inclusion complex,
 CLs, and DCLs after UVC exposure.

858

- Fig. 4. AFM contact mode 2D images of Lipoid E80 (a), Lipoid S100 (b) and Phospholipon
 90H (c) liposomes before (A) and after (B) UVC irradiation.
- 861
- Fig. 5. Young's modulus values of Lipoid E80, Lipoid S100, and Phospholipon 90H liposomes
 obtained before (a) and after (b) UV irradiation.
- **Fig. 6.** Stability of Quer, CD/Quer inclusion complex, Quer-loaded liposomes, and DCLs during 4 h and 6 h of incubation in SGF (a) and SIF (b), respectively. Results are expressed in
- term of remaining Quer in solution as a function of time.

867

868 **Table 1.** Formation constants (K_f), solubility enhancement ratio (S_t/S_0) at 10 mM, and 869 complexation efficiency (CE) of different CDs with Quer.

	α-CD	β-CD	γ-CD	НР-β-СД	RAMEB	CRYSMEB	SBE-β-CD
$K_{f}\left(M^{-1} ight)$	44	117 (129 ^a)	297 (233°)	1146 (1419 ^b , 1195 ^c)	1177	294	5335 (4032 ^b)
St/So	1.45	2.17	4.13	11.73	13.55	4.26	89.50
CE	0.0008	0.002	0.006	0.023	0.024	0.006	0.107

870

^a Calabrò et al., 2004; ^b Julian et al., 2007; ^c Lucas-Abellan et al., 2008

Table 2. The percentage distribution and the mean particle size of the nanometric and micrometric populations in blank and Quer-loaded liposomes.

872	The values	in italic	are those	obtained a	fter 12	months	of storage	at 4 °C.
							0	

D ()	Population 1			Population 2		
Batch	(%)	Mean size (nm)	Diameter range (nm)	(%)	Mean size (µm)	Diameter range (µm)
	92.56 ± 3.44	131 ± 0.00	51-389	7.44 ± 3.44	4.98 ± 0.66	1.73-11.57
Lipoid E80:Choi (100:98)	73.78 ± 4.31	131 ± 0.00	51-339	26.21 ± 4.31	7.69 ± 0.00	2.59-101.46
Lipoid E80:Chol:SBE-β-CD (100:98:190)	81.05 ± 2.35	$150^* \pm 0.00$	51-389	18.95 ± 2.35	4.47 ± 0.00	1.32-17.37
Lipsid E80, Chalt Quar (100,08,20)	87.52 ± 4.18	$150* \pm 0.00$	51-389	12.48 ± 4.18	$3.94* \pm 0.75$	1.32-7.69
Lipola E80. Choi. Quei (100.98.20)	84.86 ± 3.52	150 ± 0.34	51-389	15.13 ± 3.52	4.74 ± 1.00	1.51-17.37
Lineid E80, Chall SDE β CD: Over (100,08,100,28)	$68.45* \pm 8.39$	$172* \pm 0.00$	58-510	31.54 ± 8.69	5.49 ± 0.52	1.15-116.21
Lipoid E80:Choi:SBE-p-CD:Quer (100:98:190:38)	15.38 ± 6.86	296 ± 0.00	100-510	84.61 ± 6.86	11.85 ± 1.96	1.73-451.55
Lincid \$100, Chol (100, 117)	86.03 ± 7.32	123 ± 0.00	58-172	13.96 ± 7.32	5.80 ± 1.89	5.12-11.57
	61.85 ± 4.00	131 ± 3.05	67-362	38.12 ± 4.00	11.56 ± 2.05	5.87-44.93
Linoid \$100;Chol:Ouer (100;117;20)	$62.28* \pm 4.55$	131 ± 0.00	67-445	37.72* ± 4.55	7.37 ± 0.56	1.51-88.58
Lipola 3100. Choi. Quei (100.117.20)	32.05 ± 5.16	237 ± 1.56	87-445	67.94 ± 5.16	11.63 ± 1.57	2.59-174.62
Phospholinon 00H:Chol (100:08)	72.05 ± 4.84	150 ± 0.00	58-339	27.94 ± 4.85	5.68 ± 0.37	1.73-15.17
Phospholipoli 90H.Choi (100.98)	59.89 ± 4.23	150 ± 0.96	58-339	40.10 ± 4.23	5.87 ± 0.00	1.73-26.11
Phospholipon 90H:Chol:Quer (100:08:20)	$22.62* \pm 6.68$	$226* \pm 0.00$	100-339	77.38* ± 6.68	$14.21* \pm 1.36$	5.12-44.94
r nospholipoli 90r. Choi. Quei (100:98:20)	26.93 ± 9.35	207 ± 1.74	76-339	73.06 ± 9.35	13.96 ± 2.08	3.40-394.22

873 *p<0.05 compared to blank liposomes.

- **Table 3.** Encapsulation efficiency (EE %) and loading rate (LR %) values of Quer-loaded
- 875 liposomes.

Batch	EE %	LR %
Lipoid E80:Chol:Quer (100:98:20)	99.78 ± 0.03	71.03 ± 2.01
Lipoid E80:Chol:SBE-β-CD/Quer (100:98:190:38)	44.48 ± 0.22	27.96 ± 6.72
Lipoid \$100:Chol:Quer (100:117:20)	55.56 ± 6.09	39.69 ± 6.08
Phospholipon 90H:Chol:Quer (100:98:20)	74.80 ± 4.05	14.20 ± 0.77

Novel findings for quercetin encapsulation and preservation with cyclodextrins, liposomes, and drug-in-cyclodextrin-in-liposomes

Joyce Azzi^{1, 2}, Alia Jraij¹, Lizette Auezova¹, Sophie Fourmentin², and Hélène Greige-Gerges¹¹

¹Bioactive Molecules Research Laboratory, Doctoral School of Sciences and Technologies, Faculty of Sciences, Lebanese University, Lebanon.

²Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV, EA 4492), SFR Condorcet FR CNRS 3417, ULCO, F-59140 Dunkerque, France.

¹ Corresponding author: greigegeorges@yahoo.com; hgreige@ul.edu.lb; Tel: 961-3 341011; Fax: 961-1 689647.





















Fig 6.



Novel findings on the effect of egg and soybean lecithin on quercetin photostability and membrane rigidity

Joyce Azzi^{1, 2}, Lizette Auezova¹, Sophie Fourmentin² and Hélène Greige-Gerges^{1*}

¹Bioactive Molecules Research Group, Doctoral School of Sciences and Technologies,

Faculty of Sciences, Lebanese University, Lebanon.

²Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV, EA 4492), SFR

Condorcet FR CNRS 3417, ULCO, F-59140 Dunkerque, France.

Email: greigegeorges@yahoo.com; hgreige@ul.edu.lb









Figure 1: Size distribution graphs of blank liposomes (Lipoid E80:Chol, Lipoid S100:Chol and Phospholipon 90H:Chol). Lipoid E80-loaded SBE-β-CD and Quer-loaded liposomes (Lipoid E80:Chol:Quer, Lipoid S100:Chol:Quer, Phospholipon 90H:Chol:Quer and Lipoid E80:Chol:SBE-β-CD:Quer) obtained by laser granulometry.