

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة الجيلالي بونعاما – خميس مليانة

Université Djilali Bounaama - Khemis Miliana

Faculté des Sciences et de la Technologie

Département de la Technologie



Mémoire du Projet de Fin d'Etude
Pour l'obtention de diplôme Master

En : Génie des Procédés

Spécialité : Génie Pharmaceutique

Thème :

Formulation des liposomes

Devant le jury composé de :

M^r. O. LARBI BOUAMRANE Président

M^{me}. F. RAHMANI Examinatrice

M^{me}. S. BOUDERGUA Encadreur

Présenté par :

- M^{elle}. ABDELMOUEMENE Abir
- M^{elle}. BELAID Tounes

Année Universitaire : 2019/2020

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux qui nous a données la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.

Nous tenons à remercier notre promotrice M^{me} BOUDARGUA Samia pour nous avoir encadrées et conseillées au cours de notre travail et pour l'orientation, la confiance, la patience qui a constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené à bon port. Qu'elle trouve dans ce travail un hommage vivant à sa haute personnalité.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à tous les professeurs de la faculté des Sciences et de la Technologie.

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail

Merci à tous et à toutes.

Dédicace

À toi ma regrettée mère Khalifa Hafida, malgré ton affection incomparable, ma mère, tu as semé ce que tu ne devais pas récolter alors que tu m'as encouragée que j'aie plus loin possible dans mes études mais de qui le sort m'a séparé prématurément avant même mon dernier couronnement universitaire tu es disparue de ce monde Malheureusement. Maintenant j'espère juste que ton âme soit au paradis, que Dieu ait pitié de toi, ma mère.

À mon défunt père Belaid Mustapha qui a sacrifié sa vie pour moi, qui a affronté les difficultés de la vie pour nous faire le chemin du succès, mais le destin a plu et je n'ai pas eu l'occasion de vous montrer que votre travail n'a pas été vain parce que vous avez quitté cette vie seulement. J'espère que vous êtes fier de moi, que Dieu ait pitié de vous, mon cher père.

À mes chers frères Amine, Mouloud et Lotfi.

À mon mari Karim, qui m'a souhaité du succès.

À toute ma famille et mes proches et à ma chère grand-mère.

À mes amis et à tous mes collègues De promotion Gp 2019 / 2020 et surtout à Abir et Souhila.

À Mes professeurs respectés.

« Tounes »

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à:

La lumière de mes yeux et le bonheur de ma vie, à mes chers parents pour leurs soutiens durant le long chemin de mes études, qui ont toujours été là pour moi, et qui ont beaucoup sacrifié pour que j'atteigne ce niveau, qu'ils trouvent ici tous mes profonds remerciements, et j'espère qu'ils sont fières de leur fille et que Dieu vous bénisse pour moi.

A Mes Sœurs Imene Et Kaouther Et Mon Frère Ayoub.

A Mes Grands Parents Dieu ait pitié vous deux, je n'oublierai jamais votre tendresse et votre amabilité.

A Mes oncles Et Mes Tantes.

A Mes cousines et mes cousins.

A Toutes Mes Amies Surtout Dounia, Rania, Tounes, Amina, Souhila, Safaa, Manel et Zineb.

Et Tous Mes Amis Et Les Collègues De Promotion Gp 2019/2020

A Tous mes enseignants au Long de Ma Vie Scolaire.


A tous ceux que j'ai oublié de citer mais Qui existent au fond de Mon cœur et de ma pensée.

« Abir »

Sommaire

Liste des abréviations.....	IV
Nomenclatures	VIII
Liste Des Tableaux	X
Liste Des Figures	XI
Résumé.....	XII
Introduction générale	- 1 -
I.1. Introduction	- 4 -
I.2. Historique	- 4 -
I.3. Définition des liposomes.....	- 5 -
I.4. Composition des liposomes.....	- 5 -
I.4.1. Les phospholipides	- 6 -
I.4.2. Le cholestérol	- 8 -
I.4.3. Les agents antioxydants	- 8 -
I.5. Structure des liposomes	- 9 -
I.6. Propriétés physico-chimiques des liposomes	- 10 -
I.6.1. Taille et forme des liposomes.....	- 10 -
I.6.2. Potentiel des liposomes	- 10 -
I.6.3. Température de transition	- 10 -
I.6.4. Mobilité électrophorétique des liposomes	- 11 -
I.6.5. Miscibilité des phospholipides	- 11 -
I.6.6. Lamellarité	- 12 -
I.7. Classification	- 12 -
I.7.1. Classification de liposomes selon leurs critères morphologique.....	- 12 -
I.7.2. Classification selon des critères technologiques	- 13 -
I.7.3. Classification selon leur composition et leur application in vivo.....	- 14 -

I.8.	Les différents types d'instabilité.....	- 15 -
I.8.1.	Instabilité Chimique (réactions d'oxydation, d'hydrolyse)	- 15 -
I.8.2.	Instabilité physique (agrégation des liposomes, fuite du contenu).....	- 16 -
I.9.	Facteurs influençant la stabilité d'une préparation liposomiale	- 17 -
I.9.1.	La composition qualitative et quantitative de la bicouche phospholipidique	- 17 -
I.9.2.	Le rapport PA/Phospholipide	- 17 -
I.9.3.	La méthode de préparation.....	- 17 -
I.10.	Avantages et inconvénients des liposomes	- 17 -
I.10.1.	Avantages.....	- 17 -
I.10.2.	Inconvénients.....	- 18 -
I.11.	Les méthodes de préparation des liposomes	- 18 -
I.11.1.	Préparation de liposomes par la dispersion mécanique	- 18 -
I.11.2.	Préparation des liposomes par l'élimination du solvant organique.....	- 21 -
I.11.3.	Préparation des liposomes par l'élimination d'un détergent.....	- 23 -
I.12.	Les facteurs influençant la capacité d'encapsulation des liposomes	- 24 -
I.12.1.	Type de substances à encapsuler	- 24 -
I.12.2.	Type de liposome.....	- 25 -
I.13.	Type de liposome.....	- 25 -
I.13.1.	Applications des liposomes en médecine.....	- 25 -
I.13.2.	Applications cosmétologiques.....	- 26 -
I.14.	Conclusion.....	- 26 -
II.	Les antioxydants	- 28 -
II.1.	Introduction	- 28 -
II.2.	Radicaux libres	- 29 -
II.2.1.	Définition	- 29 -
II.2.2.	Stress oxydant.....	- 29 -
II.2.3.	Radicaux libres de l'oxygène (ROS)	- 30 -

II.2.4.	Origines des espèces réactives	- 30 -
II.2.5.	Les cibles biologiques des espèces oxygénées réactives	- 31 -
II.2.6.	Classification des radicaux libres	- 33 -
II.3.	Les antioxydants	- 35 -
II.3.1.	Définition des antioxydants.....	- 35 -
II.3.2.	Classification des antioxydants	- 35 -
II.3.3.	Mécanisme d'action des antioxydants	- 44 -
II.3.4.	Activité des antioxydants	- 45 -
II.4.	Conclusion.....	- 46 -
III.	Travaux antérieurs.....	- 47 -
III.1.	Introduction	- 47 -
III.2.	Préparation.....	- 47 -
III.2.1.	Lois utilisées.....	- 47 -
III.2.2.	Mise en forme liposomale de la vitamine C.....	- 50 -
III.2.3.	Encapsulation de la vitamine E dans des liposomes.....	- 58 -
III.2.4.	Encapsulation de la quercétine dans des liposomes	- 63 -
III.3.	Conclusion.....	- 69 -
	Conclusion générale.....	- 70 -
	 Bibliographie	- 77 -

Liste des abréviations

AAPH: 2, 2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride

ADN: Acide DésoxyriboNucléique

AF : Acide folique.

AO : Acide oléique

AS : Acide stéarique

ATB : Acide thiobarbiturique

BHA: Butylhydroxyanisole.

BHT: Butylhydroxytoluène.

CAT : Catalase.

CCD : Charge-Coupled-Device

CDB : Calorimétrie différentielle à balayage

CR: Céramide-3

Cryo-TEM: Cryogenic electron microscopy

CS, CHOL: Cholestérol

CS-VCFA-Lip: chitosan-coated VC and FA coloaded liposomes.

PDI: Polydispersité

DDL : Diffusion dynamique de la lumière

DLS: Dynamic light scattering.

DOPE : 1,2-di- (9Z-octadécénoyl) -sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine

DOPA : 1,2-dioléoyl-sn- glycéro-3-phosphate

DOTAP : 1,2-dioléoyl-3-triméthylammoniumpropane

DRV: Vesicles made by Dehydration Rehydration method

DSC: Differential scanning calorimetry.

DPPH: 2, 2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate.

ECH: Epichlorhydrine

EDTA: Éthylènediaminetétraacétique

EIV: Vesicles made by Ether Injection method

FPV: Vesicles made by French Press

FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer

FTV: Vesicles made by Freeze – Thaw

GSH: Glutathione.

GUV: Giant unilamellar Vesicle

HAT: Hydrogen Atom Transfer

HPLC: High-performance liquid chromatography.

ICH : Conférence International sur l'harmonisation

IP : Indice de polydispersité

IV: Intraveineuse

GPx : Système des enzymes du glutathion.

LysoPC: Lysophosphatidyl-choline.

LDL: Low-density lipoprotein

LUV: Large unilamellar Vesicle

LUVET: LUV made by ExTrusion

MLV: Multilamellar Vesicle

MPS: Mononuclear phagocyte

MTT: Microtiter plate

NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

ORAK: Oxygen Radical Absorbance Capacity

PA: Acide phosphatidique.

PA: Principe actif.

PBS: Phosphate buffered saline

PC: Phosphatidylcholine.

PCS: Photonic correlation spectroscopy

PCS: Phosphatidylcholine de soja

PE: Phosphatidyléthanolamine.

PG: Phosphatidylglycérol.

PI: Phosphatidylinositol.

PL: Phosphatidylcholine.

POPC: 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

PS: Phosphatidylsérine.

PT : Polyphénols du thé

Q : Quercétine

RMN: Résonance magnétique nucléaire.

REV: Vesicles made by Reverse phase Evaporation

ROS: Reactive Oxygen Species.

ROS: Reactive oxygen species

RL: Radicaux libres

R : Rutine

RN : Rouge neutre

SCa : Stéarate de calcium

SCD : Dédimentation centrifuge différentielle

SOD: Superoxydesdismutases

SRATB : Substances réactives de l'acide thiobarbiturique

SUV: SmallunilamellarVesicle

TEM: Transmission electronmicroscopy

TRX: Thiorédoxine.

UV: Ultraviolet

VML: Vésicules multilamellaires.

VCFA-Lip: VC and FA co-loaded liposomes

VET: Vesicles made by Extrusion

Nomenclatures

A : Surface de peau de lapin pour la pénétration (7.065 cm²).

A0 : Absorbance du contrôle (blanc) (nm).

A1 : Absorbance en présence des échantillons à tester (nm).

A blanc : Absorbance de la solution à blanc (ml).

A échantillon Un échantillon : Absorbance de la solution échantillon (nm).

A échantillon control : Volume de la Solution témoin (ml).

C2 : Concentration de médicament restant (µg / ml).

C1 : Concentration initiale du médicament (µg /ml).

CE : Consommation d'eau (%).

Cn et Ci : Concentration dans l'échantillon (n) ou (i) (g/mol).

D3, 2 : Diamètre moyen de Sauter (mm).

D4, 3 : Diamètre moyen de Brouker (mm).

Di : Diamètre (mm).

DPPH : Pourcentage de piégeage des radicaux DPPH (%).

DL : Charge en médicaments(%).

EE : Efficacité d'encapsulation (%).

F : Libération fractionnée de médicament dans le milieu de dissolution (%).

Fuite : Taux de fuite(%).

Hg : Poids d'hydrogel gonflé (g).

Hs : Poids d'hydrogel séché (g).

IE : Efficacité d'incorporation (%).

Kr : Constante de taux du système d'administration de médicaments (0,5 <Kr <1).

Ks : Constante de stabilité apparente.

M : Quantité totale de médicament (g).

Mt : Montant de médicament libéré au temps t.

ni : Nombre de particules.

nr : Valeurs utilisé pour examiner les mécanismes de transport de la quercétine et de la rutine dans la peau ($0,5 < nr < 1$).

Q : Quantité de pénétration de l'accumulation de PT a pénétré à travers la peau du lapin (g/cm²).

S₀ : Solubilité de la quercétine (mol/l).

Si : Surface de particule (mm²).

V1 : Volume de la solution initiale de liposomes (ml).

V2 : Restant volume de solution de liposomes (ml).

W0 : Quantité de médicaments après 40 jours(g).

W : Quantité de médicaments initiaux (g).

W avant : Quantité de médicaments encapsulés dans des liposomes avant le stockage (g).

W durant : Quantité de médicaments encapsulés pendant la période de stockage(g).

Vi : Volume de prélèvement (ml).

Vn : Volume total (ml).

λ: Longueur d'onde (nm).

Liste Des Tableaux

Tableau I-1: Exemples de groupement chimique associé au phosphate des phospholipides	- 6 -
Tableau I-2: Classification des liposomes selon les procédés de préparation	- 13 -
Tableau II-1: Principales sources des ROS	- 31 -
Tableau II-2: Mode d'action des radicaux libres primaires	- 34 -
Tableau II-3: Principales classes des composés phénoliques	- 38 -
Tableau II-4: Principales classes des flavonoïdes avec quelques exemples	- 40 -
Tableau III-1: Etude comparative de l'encapsulation de la vitamine C	- 56 -
Tableau III-2: Etude comparative de l'encapsulation de la vitamine E	- 62 -
Tableau III-3: Etude comparative de l'encapsulation de la quercétine	- 68 -

Liste Des Figures

Figure I-1: Structure des phospholipides	- 7 -
Figure I-2: Structure de la molécule de cholestérol (C ₂₇ H ₄₆ O).....	- 8 -
Figure I-3: Structure d'un liposome	- 9 -
Figure I-4: Coupe transversale d'un liposome	- 9 -
Figure I-5: Classification des liposomes	- 13 -
Figure I-6: Liposome de première génération	- 14 -
Figure I-7: Liposome de deuxième génération	- 15 -
Figure I-8: Représentation en trois dimensions d'un liposome de troisième génération, on peut remarquer l'endroit où les ligands sont placés. Ceux-ci sont schématisés par des triangles verts	- 15 -
Figure I-9: .Préparation des liposomes par la méthode d'hydratation du film lipidique	- 19 -
Figure I-10: Préparation des liposomes par injection de solvant organique	- 22 -
Figure I-11: Formation des liposomes par évaporation en phase inverse.....	- 23 -
Figure I-12: Préparation des liposomes par la méthode d'élimination de détergent	- 24 -
Figure II-1: Sites d'action des radicaux libres dans la cellule	- 32 -
Figure II-2: Système antioxydant enzymatique	- 37 -
Figure II-3: Structure de base des flavonoïdes	- 39 -
Figure II-4: Structures des tocophérols	- 41 -
Figure II-5: Structure chimique de la vitamine C	- 42 -
Figure II-6: Structure chimique de quelques rétinoïdes.....	- 42 -
Figure II-7: Structure chimique des β- carotènes	- 43 -
Figure II-8: Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH	- 45 -
Figure III-1: Illustration schématique de la cellule agitée avec un simple agitateur à pales au-dessus d'une membrane à disque plat. b) Schéma du dispositif expérimental ...	- 61 -

الملخص

الحويصلات الدهنية هي واحدة من أكثر أنظمة توصيل الجزيئات النشطة استخدامًا لأنها تغلف الجزيئات المحبة للماء، والدهون، والمحبة للدهون والماء معًا. تعتبر الأفضل لأسباب مختلفة، مثل تحسين عملية الذوبان والاستقرار والتوافر البيولوجي، وهذه الجزيئات النشطة محاصرة في طبقات ثنائية الدهون. تعتمد درجة تغليفها على عملية التصنيع (مثلاً: معدل تغليف عملية حقن الإيثانول قد تبلغ 99.87%)، وعلى كمية المادة المراد تعبئتها ونوع المواد المضافة المستخدمة حيث أن الحامض الدهني وستيرات الكالسيوم يعطي أفضل معدل تغليف (86%)، كما يتضح من دراستنا المقارنة للأعمال السابقة والتي كانت أساساً هدف عملنا. نظرًا لتعدد إيجابياتها، يتم استخدام الحويصلات الدهنية في العديد من المجالات الصيدلانية، الزراعية والتجميلية.

الكلمات المفتاحية: الحويصلات الدهنية، مضادات الأكسدة، كفاءة التغليف

Résumé

Les liposomes sont l'un des systèmes de vectorisation de molécules actives les plus utilisés car ils permettent d'encapsuler les molécules hydrophiles, lipophiles et amphiphiles. Ils améliorent leur solubilité, stabilité et biodisponibilité. Ces molécules sont piégées dans les bicouches lipidiques, et leur taux d'encapsulation dépend du procédé de fabrication (eg : Injection d'éthanol peut atteindre une efficacité d'encapsulation de 99.87%) et aussi de la masse à encapsuler et du type d'additifs utilisées, tel que l'utilisation de l'acide stéarique et le stéarate de calcium donne le meilleur taux d'encapsulation (86%). Comme le montre notre étude comparative des travaux antérieurs qui était essentiellement le but de notre travail. Vue leurs avantages, les liposomes sont utilisés dans de nombreux domaines pharmaceutiques, agricoles et cosmétiques.

Mot clés : Liposomes, Activité antioxydants, Efficacité d'encapsulation.

Abstract

Liposomes are one of the most widely used active molecule delivery systems because they encapsulate hydrophilic, lipophilic and amphiphilic molecules. They improve their solubility, stability and bioavailability. These molecules are trapped in the lipid bilayers, and their rate of encapsulation depends on the manufacturing process (eg: Ethanol injection offers the best encapsulation efficiency of 99.87%), as shown by our comparative study of pervious work which was essentially the goal of our work. besides the mass to be packed and the type of additives. The use of stearic acid and calcium stearate gives the best encapsulation rate (86%). Because of their advantages, liposomes are used in many pharmaceutical, agricultural and cosmetic areas.

Keywords: Liposome, Antioxidant activity, Encapsulation efficiency.

Introduction

Introduction générale

Aujourd'hui, grâce aux progrès technologique et scientifique dans le domaine de la santé, certaines maladies qui étaient mortelles auparavant sont devenues curables voire évitables. Les autorités sanitaires veillent et mettent en place des réglementations de plus en plus strictes pour s'assurer que les médicaments commercialisés affichent un rapport bénéfice/risque favorable au patient. Les traitements médicamenteux présentent aussi des effets indésirables pour le patient. Une des causes de ces effets indésirables est l'action des molécules thérapeutiques sur les cellules saines de l'organisme.

Un médicament administré subit des transformations par l'organisme humain avant d'arriver à son site d'action. Ces transformations ne sont pas toujours favorables à l'activité du médicament. Des solutions galéniques et chimiques sont employées afin de résoudre ce problème dans la mesure du possible. Pour éviter l'action des molécules médicamenteuses sur les cellules saines et empêcher la transformation de ces molécules avant d'arriver sur leur site d'action, plusieurs pistes de ciblage des cellules malades ont été développées au cours des 50 dernières années. La thérapie ciblée est surtout avantageuse dans les traitements médicamenteux qui impliquent l'utilisation de molécules hautement toxiques, comme dans le cas de la chimiothérapie anticancéreuse. Une des pistes de ciblage est la vectorisation de principe actif en utilisant les liposomes [1].

Les liposomes ont été largement étudiés depuis les années 1970 comme vecteurs de médicaments pour améliorer la délivrance de l'agent thérapeutique à des endroits spécifiques du corps. Lorsque les phospholipides sont dispersés dans l'eau, ils forment spontanément une structure fermée avec un environnement aqueux interne délimité par la membrane bicouche des phospholipides, ce système vésiculaire est appelé liposome [2].

Les liposomes sont de petites vésicules de forme sphérique qui peuvent être produites à partir de cholestérol, de tensioactifs non toxiques, de sphingolipides, de glycolipides, d'acides gras à longue chaîne et même de protéines membranaires [3].

Structurellement, les liposomes sont des cellules nerveuses concentriques dans lesquelles un volume aqueux est entièrement entouré par une bicouche lipidique membranaire. Les membranes sont généralement constituées de phospholipides, qui sont des molécules ayant un groupe de tête hydrophile et un groupe de queue hydrophobe, La tête est attirée par l'eau et la

Introduction générale

queue, qui est constituée d'une longue chaîne d'hydrocarbures, est repoussée par l'eau. La membrane plasmique fait face aux solutions aqueuses des deux côtés, ses phospholipides s'y adaptent en formant une bicouche de phospholipides dont les queues hydrophobes se font face. [4].

La vectorisation en utilisant les liposomes permet de véhiculer par encapsulation et libérer le principe actif directement sur son site d'action. Ceci permet d'avoir une concentration élevée de principe actif au sein du tissu cible. L'encapsulation de principe actif dans des liposomes offre les avantages suivants :

- libération programmée du principe actif; protection du principe actif contre la dégradation par l'organisme humain afin de garder l'intégrité du principe actif jusqu'à son site d'action;
- diminution de la toxicité du principe actif en évitant son action sur les cellules saines;
- possibilité d'administrer par voie intraveineuse des principes actifs insolubles dans l'eau [1].

Si la notion de radicaux libres est connue des chimistes depuis les années 30, ce n'est que depuis les années 1990, avec l'avènement du concept de stress oxydatif, que les données sur la réactivité des radicaux libres et leurs actions délétères sur les systèmes biologiques connaissent une véritable explosion scientifique. Un consensus existe aujourd'hui concernant l'implication des radicaux libres dans la pathogénie et la physiopathologie d'affections variées.

Des molécules dites antioxydants interviennent selon différents modes d'action afin de limiter la production des radicaux libres. Elles constituent donc un mécanisme de défense pour l'organisme [5].

Jusqu'à présent, les liposomes se sont révélés très prometteurs en tant que vecteurs potentiels de composés biologiquement actifs dans les industries cosmétique et pharmaceutique. Ces applications ont été étendues aux industries alimentaires et agricoles, où des substances instables telles que les antioxydants, les arômes et les antimicrobiens ont été explorées pour l'encapsulation liposomale. Dans tous ces domaines d'application, les liposomes ont été considérés comme les systèmes d'administration les plus performants en raison de leurs multiples avantages [3]

Notre travail est organisé en 3 chapitres :

Introduction générale

Chapitre 01 : Les liposomes. Dans ce chapitre, nous allons revenir plus particulièrement sur la signification du terme « liposome ». Puis nous l'étudierons d'un côté chimique et biologique.

Chapitre 02 : Les anti-radicalaires et les antioxydants. On va parler dans ce chapitre des antioxydants et des radicaux libres ; leurs classifications, leurs modes d'action, et leurs applications...

Chapitre 03 : Les travaux antérieurs. Ce dernier chapitre est consacré aux quelques travaux antérieurs afin de récapituler les résultats de chaque expérience, ensuite déduire les différences entre elles pour définir les meilleures conditions opératoires

Chapitre I

Les liposomes

I. Les liposomes

I.1. Introduction

Le terme de liposome ne s'applique qu'à l'entité comprenant une vésicule et une composition à base de phospholipides. En effet, ils sont des vésicules constituées d'un volume interne aqueux entouré d'une ou de plusieurs bicouches lipidiques concentriques. Ils sont de plus en plus développés dans la recherche pharmaceutique comme vecteurs de médicaments car ils permettent d'encapsuler des principes actifs de solubilité différente. Ils sont notamment utilisés pour favoriser la solubilité de substances actives insolubles en milieu aqueux, pour augmenter leur biodisponibilité, pour améliorer dans certains cas la stabilité et pour diminuer les effets indésirables [6].

Dans ce chapitre, nous allons revenir plus particulièrement sur la signification du terme « liposome ». Puis nous l'étudierons d'un côté chimique (découverte, propriétés, composition, préparation...) et d'un autre côté biologique (application, dégradation, stabilité...).

I.2. Historique

L'histoire des liposomes remonte au milieu des années 1960 et le mérite de leur naissance revient à Bangham et ses collègues, qui ont découvert que les phospholipides en présence de solvants appropriés forment des bilayers membranaires qui finissent par s'enrouler pour former des vésicules unilamellaires ou multilamellaires. L'histoire de Les liposomes peuvent être divisés en trois périodes : La genèse, le Moyen Âge et l'ère moderne.

- Genèse (1968-75)

La caractérisation physico-chimique des liposomes avait été réalisée à cette époque. De plus, une méthode d'hydratation du film lipidique mince avait été mise au point pour préparer les vésicules multilamellaires (VML). Les liposomes ont été largement utilisés pour étudier la nature de la membrane biologique en raison de la proximité des membranes bicouche avec la membrane biologique.

- Moyen âge (1975 - 85)

L'utilité des liposomes a été améliorée à la suite de recherches fondamentales qui ont permis de mieux comprendre leur stabilité et l'interaction caractéristiques au sein du système. Cette période a également porté sur la découverte de diverses méthodes alternatives pour la préparation des liposomes. En outre, en raison de la disponibilité de vastes connaissances sur les propriétés physico-chimiques des liposomes, leur comportement dans le corps, leur interaction avec les cellules, des tentatives ont été faites pour améliorer leurs performances en tant que systèmes de transport de médicaments.

- L'ère moderne (à partir de 1985)

Aujourd'hui, les liposomes sont utilisés avec succès dans diverses disciplines scientifiques, notamment les mathématiques et la physique théorique, la biophysique (propriétés des membranes), la chimie (catalyse, énergie conversion), la science des colloïdes (stabilité, thermodynamique des systèmes finis), la biochimie (fonction des protéines membranaires) et la biologie (excrétion, fonction cellulaire). En outre, la renaissance de la recherche sur les liposomes promet de nombreux autres produits à venir dans un avenir proche [7].

I.3. Définition des liposomes

Il y a deux sources principales qui engendrent la pollution une source naturelle représentée par Le mot liposome est dérivé des mots grecs « lipos » qui signifie gros, et « soma » qui signifie corps [4].

Les liposomes sont définis comme des vésicules sphériques dont la taille des particules varie de 30 nm à plusieurs micromètres. Ils sont constitués d'une ou plusieurs bicouches lipidiques entourant des compartiments aqueux, où les groupes de têtes polaires sont orientés vers les phases aqueuses intérieures et extérieures [8]. Leur intérêt réside principalement sur la possibilité de vectorisé des substances, soit par inclusion dans la membrane lipidiques. Soit par encapsulation dans l'espace interne. Il est donc possible d'y encapsuler des principes actifs de solubilités très différente (hydrophile, amphiphile ou lipophile) [9].

I.4. Composition des liposomes

Les liposomes sont constitués généralement d'un ou de plusieurs types de phospholipides. Ils sont non-toxiques, non-immunogènes, biocompatibles et biodégradables.

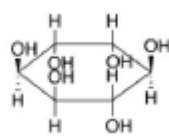
Le cholestérol entre souvent dans la composition des liposomes [10]

I.4.1. Les phospholipides

Les phospholipides ont les caractéristiques d'une excellente biocompatibilité et d'une amphiphilicité et ont une propension à former des liposomes, qui peuvent être employés comme transporteurs de médicaments. Ils sont des molécules dans lesquelles les têtes hydrophiles et les chaînes acyles hydrophobes sont liées à l'alcool. La variation des groupes de tête, des chaînes aliphatiques et des alcools conduit à l'existence d'une grande variété de phospholipides [11].

Les phospholipides sont construits à partir du glycérol dont deux fonctions alcool ont été estérifiées par des acides gras qui forment la zone hydrophobe (apolaire) de la molécule de phospholipide. La troisième fonction alcool porte un groupe phosphate polaire, lui-même estérifié par différents groupements (glycérol, choline, éthanol amine, sérine et inositol) (Tableau I.1), constituant la tête polaire du phospholipide [10].

Tableau I-1: Exemples de groupement chimique associé au phosphate des phospholipides [10].

Nom classique	Abréviation	Formule chimique du groupement associé au phosphate des phospholipides
Acide phosphatidique	PA	-H
Phosphatidylcholine	PC	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$
Phosphatidyléthanolamine	PE	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$
Phosphatidylsérine.	PS	$-\text{CH}_2-\text{CH}-(\text{COO})\text{NH}_3^+$
Phosphatidylinositol	PI	
Phosphatidylglycérol	PG	$-\text{CH}_2\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$

Les phospholipides utilisés pour la préparation des liposomes doivent être très purs (pureté supérieure à 99 %), ils doivent être exempts de lysophosphatidyl-choline (lysoPC), dont la

présence augmente considérablement la perméabilité des membranes des phospholipides. Les phospholipides insaturés sont des molécules que l'on doit manipuler avec précaution; en effet l'oxydation en présence de l'oxygène de l'air, peut donner des composés toxiques. Ils doivent être conservés sous leur forme solide ou en solution à -20°C ou à -70°C, en présence d'azote ou d'argon.

Les solutions doivent être conditionnées dans des tubes scellés de façon hermétique ou dans des ampoules injectables, à l'abri de la lumière.

- Les phospholipides les plus utilisés:

✚ Phospholipides naturels :

Les phospholipides naturels peuvent être extraits de lécithine d'œuf ou de soja et sont caractérisés par leurs différents degrés de pureté. Ces phospholipides naturels sont chers et instables, ils subissent des dégradations enzymatiques, des insaturations et des peroxydations.

✚ Phospholipides synthétiques :

Ce sont des produits stables, bien purs car les chaînes sont toujours les mêmes. Leur polarité est différente avec des charges de surfaces souvent différentes.

Ex : Dipalmétylphosphatidylcholine [12].

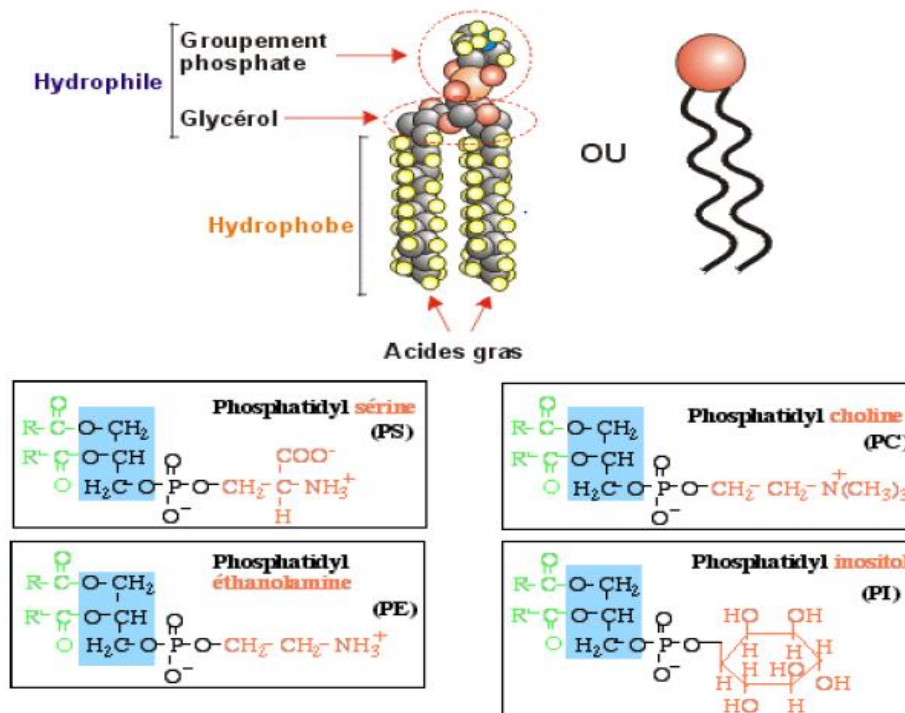


Figure I-1: Structure des phospholipides [9].

I.4.2. Le cholestérol

Le cholestérol est une substance molle et cireuse. Trouvée parmi les lipides ou les graisses dans la circulation sanguine et dans toutes les membranes cellulaires, il est nécessaire pour la biosynthèse des membranes cellulaires, plusieurs hormones, la vitamine D, et les acides biliaires nécessaires à la digestion des graisses présentes dans nos aliments.

Le cholestérol est le stérol majeur dans le corps humain et appartient à la classe des molécules appelées stéroïdes [13].

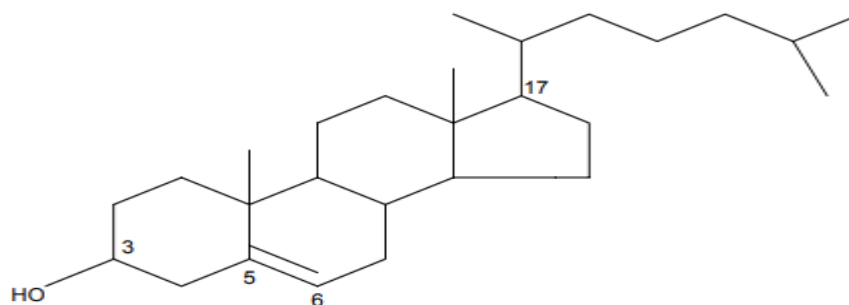


Figure I-2: Structure de la molécule de cholestérol (C₂₇H₄₆O) [13].

Le stérol le plus employé est le cholestérol (ajouté généralement à raison de 30 % dans la composition lipidique). Il a une grande influence sur la fluidité de la paroi et sur la stabilité des liposomes dans le sang après leur administration. Le cholestérol diminue la fluidité de la bicouche lipidique car la structure rigide du stéroïde limite les mouvements des chaînes des acides gras. Il diminue ainsi la perméabilité membranaire pour les molécules hydrosolubles et enfin, il augmente la rigidité de la bicouche favorisant ainsi sa stabilité en milieu sérique. Les liposomes sans cholestérol ont tendance à interagir avec les protéines du sang comme l'albumine, la transferrine ou les macroglobulines [9].

I.4.3. Les agents antioxydants

Ils sont utilisés pour réduire les phénomènes d'oxydation des liaisons insaturées des chaînes acylés des phospholipides. Exemple : l' α -tocophérol, le BHT (butylhydroxytoluène), ou le BHA (butylhydroxyanisole) [12].

I.5. Structure des liposomes

Les liposomes sont des vésicules formées de bicouches lipidiques concentriques, constituant une zone hydrophobe propre à la vectorisation de molécules hydrophobes et présentant un cœur hydrophile spécifique à la vectorisation de molécules hydrophiles. Dans le domaine biomédical, ces structures déformables sont des transporteurs de principes actifs thérapeutiques ou d'agents d'imagerie présentant une forte biocompatibilité [14].

La structure des liposomes dépend de leur composition, mais également de leur mode de préparation. Dans la grande majorité des cas, les étapes générales d'obtention des liposomes sont les suivantes :

- Dissolution des lipides dans un solvant organique,
- Evaporation du solvant organique,
- Dispersion des lipides séchés dans une solution aqueuse [6].

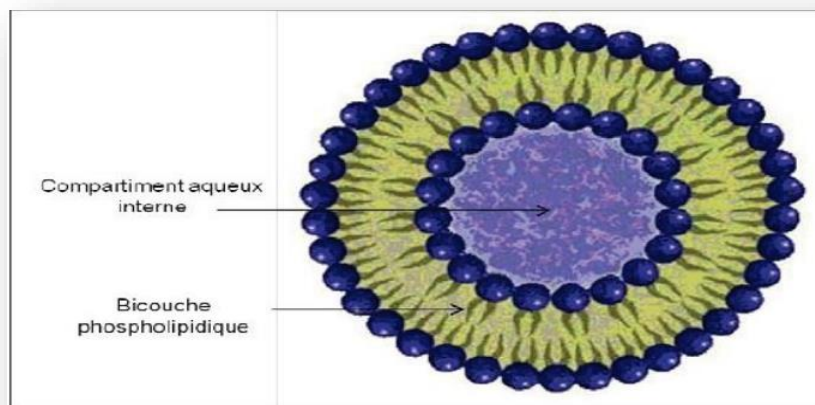


Figure I-3: Structure d'un liposome [6].

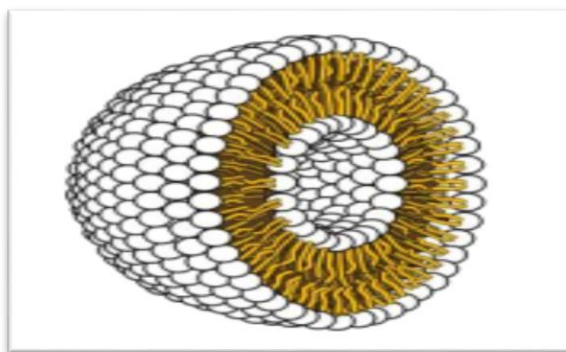


Figure I-4: Coupe transversale d'un liposome [15].

I.6. Propriétés physico-chimiques des liposomes

Elles représentent un ensemble de paramètres physico-chimiques lors de la mise en œuvre des procédés de préparation des liposomes. La variation de ces paramètres va favoriser une utilisation ultérieure d'un type de vecteur lipidique en dépit d'un autre.

I.6.1. Taille et forme des liposomes

La taille moyenne et la distribution de taille sont des paramètres qui doivent être modulés en fonction de l'application ultérieure du système liposomal. Il a été démontré que la taille moyenne des liposomes est influencée par la composition lipidique et la méthode de préparation. Les techniques de mesure utilisées relèvent de la nanotechnologie. La taille moyenne d'une dispersion aqueuse de liposomes peut être mesurée en utilisant la diffusion dynamique de la lumière DLS (Dynamic light scattering). Fonctionnant avec la détection hétérodyne. Elle permet d'indiquer la taille mais ne donne pas de précision sur la forme et la structure liposomales [16].

I.6.2. Potentiel des liposomes

L'utilisation potentielle de liposomes comme molécules porteuses de médicaments, contre certaines souches bactériennes résistantes aux traitements conventionnels présente un grand intérêt. En plus de réduire le niveau de toxicité des médicaments, le liposome permet de prolonger la demi-vie d'une molécule biologique et de diminuer la quantité à administrer. En augmentant la durée de contact de l'antibiotique avec la cellule bactérienne, on potentialise son effet et cela avec des doses beaucoup moins importantes d'antibiotique. Les drogues incorporées dans les liposomes sont protégées contre les attaques enzymatiques et immunologiques de l'hôte. En plus de présenter une activité thérapeutique accrue, les drogues encapsulées dans les liposomes peuvent présenter une distribution différente dans les tissus comparativement à l'état libre. Les liposomes pourraient également être utilisés dans des protocoles de traitement [17].

I.6.3. Température de transition

Température de transition de phase liée à la nature des chaînes des phospholipides et de leur degré d'insaturation. Sous l'influence de la température, l'état lamellaire peut osciller réversiblement entre plusieurs configurations (transitions de phase) :

- les chaînes grasses sont parallèles et rigides à une température inférieure à celle de la transition de phase.

- les chaînes grasses sont mobiles (état dit «fluide») à une température supérieure à celle de la transition de phase. Ces états sont de première importance dans la mesure où ils conditionnent les capacités d'échange avec le milieu environnant (perméabilité, échange de composés de la paroi) [18].

La technique traditionnelle pour la détermination des transitions de phase lipidique est la calorimétrie différentielle à balayage DSC (Differential scanning calorimetry). Le principe de la méthodologie est basé sur l'évolution des propriétés thermiques des phospholipides lors de la transition de phase. L'absorption de chaleur se produit lorsque les liposomes subissent une transition de phase d'une phase de gel ordonnée à une phase cristalline fluide désordonnée. L'absorption de chaleur est enregistrée comme un flux de chaleur dans le DSC en fonction de la température. La température enregistrée au flux thermique maximum est définie comme la T_m (Melting Point) du lipide. Bien que la T_m soit lié à la perméabilité des liposomes, la connexion entre eux est indirecte. En effet, la détermination de la T_m par DSC est basée sur les propriétés thermiques des liposomes, et non sur le changement conformationnel des liposomes [19].

I.6.4. Mobilité électrophorétique des liposomes

Les phospholipides acides comme la phosphatidylsérine, le phosphatidylglycérol, le dicétylphosphate ou les acides phosphatiques qui confèrent une charge négative aux liposomes peuvent avoir une influence considérable sur T_c (Température de cristallisation). Ainsi, la valeur de T_c des phospholipides acides peut être modulée par des interactions avec des cations divalents, par exemple, les ions calcium et magnésium à des concentrations physiologique (0,1-10mM) peuvent augmenter la température [20].

I.6.5. Miscibilité des phospholipides

La miscibilité des phospholipides doit être prise en considération lors de l'utilisation de plusieurs PI différents pour la fabrication de chémoliposomes. Par exemple, deux molécules de phosphatidylcholine qui diffèrent par deux atomes de carbone dans leur chaîne d'acide gras sont miscibles, ceux qui diffèrent par quatre atomes de carbone sont partiellement miscibles, alors que ceux différant par six atomes de carbone sont non miscibles et sont à l'état de gel. La sélection de phospholipides non miscibles dans la fabrication de chémoliposomes, entraîne l'apparition de domaines de fluidité ou d'organisations hétérogènes de la membrane, ce qui provoque une augmentation de la taille des vésicules et affecte leur perméabilité [16].

I.6.6. Lamellarité

La lamellarité et la taille des vésicules lipidiques sont généralement les caractéristiques les plus importantes. La lamellarité est le nombre de bicouches lipidiques entourant l'espace aqueux interne des vésicules lipidiques. Les vésicules sont observées par différentes techniques analytiques, comme par exemple, la microscopie électronique. L'observation microscopique directe donne des informations sur la taille, l'homogénéité de l'échantillon et la lamellarité des liposomes. La lamellarité d'une préparation de liposomes peut être également déterminée en utilisant la résonance magnétique nucléaire (RMN) [16].

I.7. Classification

Il existe différentes classes de liposomes. Leur classification et leur dénomination se fait le plus souvent selon des critères structuraux (taille, lamellarité), mais on peut aussi les classer selon des critères plus fonctionnels (composition et leur application in vivo) ou même, selon leur méthode de préparation.

I.7.1. Classification de liposomes selon leurs critères morphologique

Les différents liposomes se distinguent selon leur taille mais aussi selon leur nombre de bicouches lipidiques ou lamellaire. Plusieurs abréviations sont utilisées pour les désigner d'après ces deux critères [6].

I.7.1.1. Les liposomes multilamellaires

Dans les liposomes multilamellaires, Les vésicules ont une structure d'oignon. Classiquement, plusieurs vésicules unilamellaires se formeront à l'intérieur de l'autre avec une taille plus petite, créant une structure multilamellaire de sphères phospholipidiques concentriques séparées par des couches d'eau, Leur diamètre total, suivant le nombre de lamelles, est compris entre 400 à 3500 nm [3].

I.7.1.2. Les liposomes unilamellaires

Répartis en trois catégories selon l'importance de leur taille : les liposomes de grande taille LUV (Large unilamellar Vesicle) allant de 80 nm à 1 µm de diamètre, des liposomes unilamellaires géants GUV : (Giant unilamellar Vesicle) d'une taille supérieure à 1 µm [16].

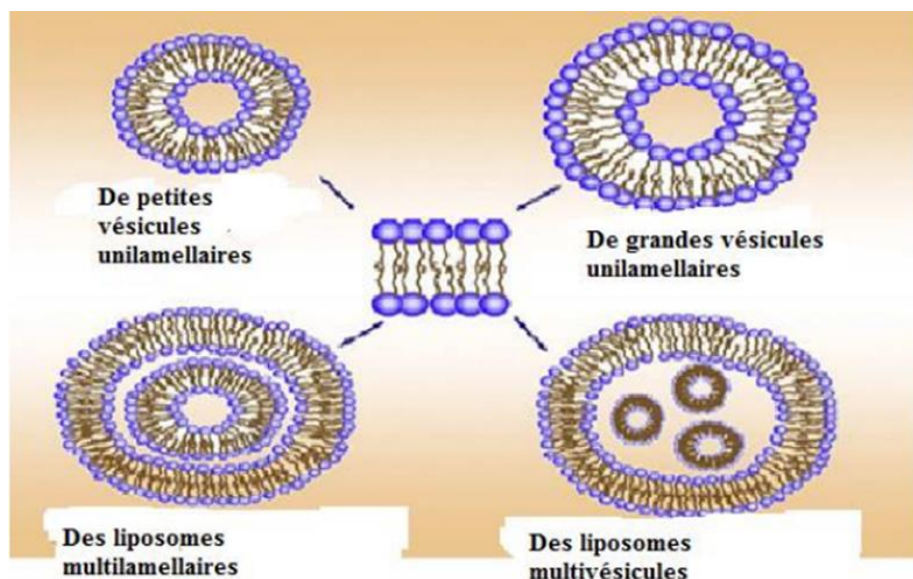


Figure I-5:Classification des liposomes [6].

I.7.2. Classification selon des critères technologiques

Il existe une grande diversité de procédés de préparation des liposomes. Chaque procédé génère des liposomes de caractéristique donnée: Lamellarité et diamètre en particulier. Mais ils peuvent également être choisis en fonction de critères tels que le taux d'encapsulation et de conditions de préparation respectant l'intégrité chimique des constituants de la formule [9].

Tableau I-2: Classification des liposomes selon les procédés de préparation [6].

Source endogènes	Source exogènes
NADPH oxydases	Tabagisme
Chaîne respiratoire mitochondrial	Cytokine pro-inflammatoire
Xanthine oxydase	Chimiothérapie
Atherogénèse	Radiation ionisantes
Lipo-oxygénase	Radiation UV
Phagocytes	Toxique environnementaux
Inflammation	Champs électriques
Etat d'ischémie-reperfusion	Xénobiotique pro-oxydant

I.7.3. Classification selon leur composition et leur application in vivo

I.7.3.1. Liposomes de 1ère génération (Liposomes Conventionnels)

Des vecteurs dits de première génération, ont été mis au point dans les années 1970 par des équipes européennes [21]. Ils contiennent seulement le principe actif (PA) encapsulé dans la vésicule formée par la bicouche lipidique (Figure 4). Ces liposomes sont injectés dans la circulation sanguine. Certaines protéines plasmatiques, opsonines, s'adsorbent à la surface de ces liposomes pour les marquer comme « non-soi » [1]. Bien que les liposomes soient comme des biomembranes, ils sont toujours des objets étrangers du corps. Par conséquent, les liposomes sont connus par le système phagocytaire mononucléaire MPS (Mononuclear phagocyte) après contact avec des protéines plasmatiques. En conséquence, les liposomes sont éliminés de la circulation sanguine [3].

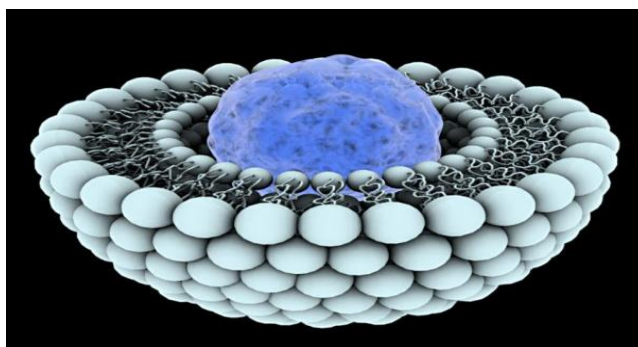


Figure I-6: Liposome de première génération [22].

I.7.3.2. Liposomes de deuxième génération (furtifs)

Ils utilisent des polymères hydrophiles (matériaux ayant une affinité particulière avec un milieu liquide) qui sont fixés à la surface des nanoparticules. Conséquence : ils sont moins reconnus comme étrangers par l'organisme et circulent dans le sang plus longtemps (on dit qu'ils sont « furtifs ») [3]. C'est à dire invisibles pour les macrophages et capables de diffuser de manière sélective à travers des capillaires rendus plus perméables par une réaction inflammatoire [23]. Ce type de médicaments peut ainsi être utilisé pour le traitement des tumeurs cancéreuses. « Les nouveaux vaisseaux sanguins formés par une tumeur sont plus poreux que des vaisseaux sains, explique Patrick Couvreur. Les nanomédicaments traversent donc plus facilement la paroi de ces vaisseaux et réussissent ainsi à atteindre les cellules malades. » Plus gros qu'une simple molécule, les nanomédicaments sont retenus plus longtemps au sein de la tumeur, ce qui prolonge leur action [3].

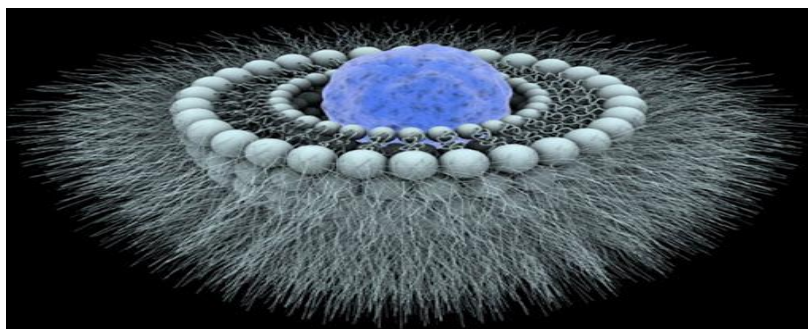


Figure I-7: Liposome de deuxième génération [16].

I.7.3.3. Liposomes de 3ème génération (Immunoliposomes)

Les liposomes à ciblage actif sont ceux dont la surface est décorée à l'aide d'un ligand spécifique, tel que les anticorps monoclonaux ou des fragments d'anticorps, les peptides, les facteurs de croissance, les glycoprotéines ou les glucides, capable de reconnaître un récepteur cellulaire spécifique surexprimé au niveau du site cible en vue d'augmenter la sélectivité de l'interaction liposome-cellules et de favoriser l'internalisation des liposomes dans des cellules cibles par endocytose médiée par ce récepteur [24].

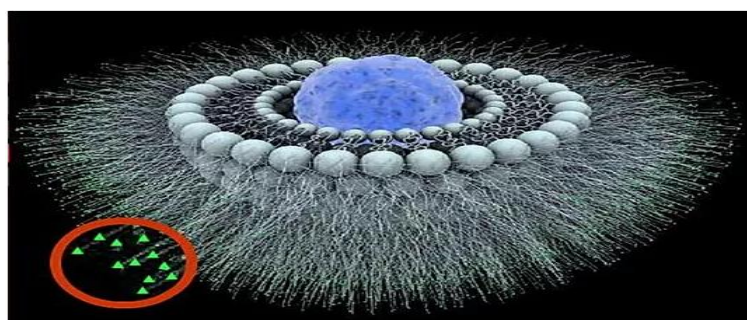


Figure I-8: Représentation en trois dimensions d'un liposome de troisième génération, on peut remarquer l'endroit où les ligands sont placés.

Ceux-ci sont schématisés par des triangles verts [25].

I.8. Les différents types d'instabilité

Les problèmes d'instabilité qu'une préparation liposomale peut subir sont :

I.8.1. Instabilité Chimique (réactions d'oxydation, d'hydrolyse)

Les phospholipides sont des gras chimiquement insaturés, des acides qui sont sujets à l'oxydation et à l'hydrolyse, qui peuvent altérer la stabilité du produit pharmaceutique.

En outre, le pH (potentiel hydrogène), la force ionique, le système de solvant et les espèces tamponnées jouent également un rôle majeur dans en maintenant une formulation liposomale. En effet La réaction chimique peut être induite même par la lumière, l'oxygène, la température et les ions de métaux lourds. La détérioration par oxydation implique la formation des peroxydes cycliques et les hydroxyperoxydases dus au résultat de la génération de radicaux libres dans le processus d'oxydation.

Les liposomes peuvent être évités de la dégradation oxydative en les protégeant de la lumière, en ajoutant des antioxydants tels que l'alpha - tocophérol ou butylhydroxytoluène (BHT), la fabrication du produit dans un environnement inerte (présence d'azote ou d'argon) ou en ajoutant EDTA (Éthylènediaminetétraacétique). Pour éliminer les métaux lourds à l'état de traces. L'hydrolyse de la liaison ester à la position du carbone de la fraction glycérol des phospholipides conduit à la formation de la lyso-phosphatidylcholine (lysoPC), qui améliore la perméabilité de la contenu liposomal. Il devient donc nécessaire pour contrôler la limite de la lysoPC dans les liposomes produit pharmaceutique. Cela peut être réalisé par la formulation de liposomes avec de la phosphatidylcholine libre de lysoPC [26].

I.8.2. Instabilité physique (agrégation des liposomes, fuite du contenu)

La stabilité physique des liposomes peut être affectée par un certain nombre de facteurs tels que l'intégrité des liposomes, la distribution de la taille, les groupes d'acides gras insaturés. Des défauts dans la structure du réseau peuvent entraîner la fusion des liposomes, l'agrégation et la fuite de la substance médicamenteuse contenue pendant le stockage. Par conséquent, les tests de stabilité doivent inclure des tests pour évaluer la distribution de taille et l'intégrité des liposomes. Les méthodes analytiques basées sur les changements de fluorescence en FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) et en microscopie à épifluorescence sont particulièrement utiles pour mesurer la stabilité physique des liposomes. La congélation, le séchage par pulvérisation et la lyophilisation peuvent également être envisagés afin de garantir la stabilité à long terme des liposomes. En outre, la capacité des liposomes à rester intacts pendant le transport des médicaments est la valeur fondamentale de tout liposome, et doit être correctement mesurée avant toute application [27,28].

I.9. Facteurs influençant la stabilité d'une préparation liposomiale

I.9.1. La composition qualitative et quantitative de la bicouche phospholipidique

Une paroi de liposome constituée de cholestérol et phospholipides ayant une T_m élevée est plus rigide et moins perméable. Les phospholipides possédant des chaînes carbonées saturées diminuent la perméabilité de la bicouche phospholipidique.

La proportion des différents composants de la paroi est aussi un facteur déterminant de la stabilité. Il faut trouver une proportion optimale pour la stabilité physico-chimique de la préparation et pour le profil pharmacocinétique (la biodisponibilité) souhaité.

I.9.2. Le rapport PA/Phospholipide

La quantité des phospholipides utilisés doit être suffisante pour une encapsulation optimale de la quantité du PA à administrer. Ce rapport est variable selon le PA, la méthode d'encapsulation et les composants du liposome. Ce paramètre est important et permet d'avoir la quantité suffisante des phospholipides pour véhiculer le PA intègre jusqu'au site d'action.

I.9.3. La méthode de préparation

Les méthodes de préparation des liposomes et l'encapsulation du PA jouent un rôle dans la stabilité de la préparation liposomiale finale. Pour les PA qui sont des bases faibles, l'encapsulation par le gradient de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ donne des sels de sulfate ayant une meilleure stabilité à l'intérieur des liposomes qu'une encapsulation par un simple gradient de pH. Dans l'utilisation de gradient de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, il y a la protonation et la formation de sel [29].

I.10. Avantages et inconvénients des liposomes

I.10.1. Avantages

- Ils augmentent l'efficacité et l'indice thérapeutique du médicament.
- Ils présentent une administration ciblée des médicaments.
- Ils peuvent administrer des médicaments solubles dans l'eau et les lipides.
- Ils contribuent à réduire l'exposition des tissus sensibles aux médicaments toxiques.
- Sa taille peut être large pour intégrer des molécules de médicaments plus ou moins grandes.
- Ils sont biocompatibles, biodégradables, non immunogènes et non toxiques.
- Ils peuvent être administrés par différentes voies.

I.10.2. Inconvénients

- Ils ont une demi-vie courte.
- Le coût de production des liposomes est élevé.
- Ils ont un problème de stabilité.
- Ils ont une faible solubilité.
- Il peut y avoir des possibilités de fuite et de fusion des médicaments/molécules encapsulés.
- Des réactions allergiques peuvent se produire aux constituants liposomiques.
- Les phospholipides peuvent subir une oxydation et une hydrolyse [30].

I.11. Les méthodes de préparation des liposomes

I.11.1. Préparation de liposomes par la dispersion mécanique

I.11.1.1. Hydratation du film lipidique (Bangham Méthode 1965)

Il s'agit de la méthode originale qui a été initialement utilisée pour la production de liposomes. Un mélange de phospholipides et le cholestérol ont été dispersés dans un solvant organique [6]. Le mélange chloroforme: méthanol (2 :1) est souvent utilisé [7] Ensuite, le solvant organique a été éliminé par évaporation (à l'aide d'un évaporateur rotatif à pression réduite). Enfin, le film lipidique sec déposé sur la paroi du ballon a été hydraté par l'ajout d'une solution tampon aqueuse sous agitation à une température supérieure à la température de transition des lipides [31].

Les composés à encapsuler sont ajoutés, en fonction de leur solubilité, soit dans la phase aqueuse soit dans le solvant organique contenant les lipides. Cette méthode possède certains inconvénients comme: un petit volume aqueux interne, une faible efficacité d'encapsulation et une distribution de taille des liposomes très hétérogène. Ce procédé nécessite des méthodes d'homogénéisation et de réduction de taille des MLV (Multilamellar Vesicle) par traitement mécanique, comme la sonication, l'extrusion et la micro fluidisation. Des liposomes de type DRV (dehydration rehydration vesicles) peuvent être également obtenus. Après hydratation du film lipidique, les liposomes obtenus sont lyophilisés et ensuite réhydratés [10].

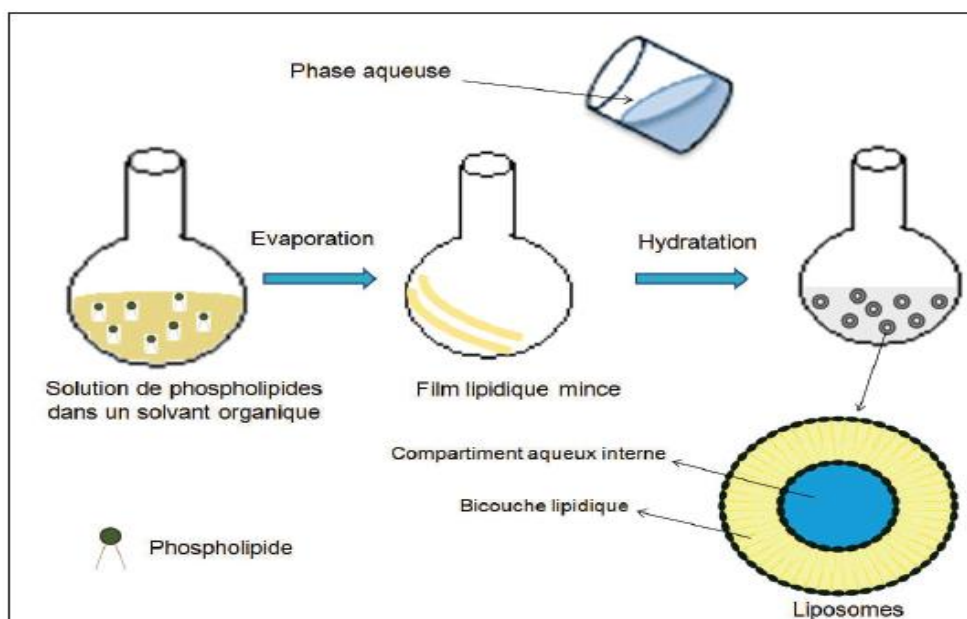


Figure I-9: Préparation des liposomes par la méthode d'hydratation du film lipidique [31].

I.11.1.2. Sonication

Saunders et al. En 1962 propose l'utilisation des ultrasons afin de réduire le diamètre des liposomes MLV. Les vésicules formées sont des SUV (small unilamellar Vesicle) unilamellaires de petite taille ayant un diamètre compris entre 15 à 50 nm selon la composition en lipides [9]. La plus courante l'instrumentation pour la préparation des particules soniques est des sonicators à bain et à pointe de sonde. et Les sonicators Cup-horn, bien que moins utilisés, on a produit avec succès un SUV. Sondeurs de pointe fournissent un apport énergétique élevé à la suspension lipidique mais souffrent d'une surchauffe de la suspension lipidique causant une dégradation. Les conseils en matière de sonication ont également tendance à libérer des particules de titane dans la suspension lipidique qui doit être éliminée par centrifugation avant l'utilisation. Pour ces raisons, les sonicators de bain sont les plus des instruments largement utilisés pour la préparation. La sonication d'une dispersion de MLV est réalisée par placer un tube à essai contenant la suspension dans un sonicator de bain (ou en plaçant la pointe du sonicator dans l'éprouvette) et en sonifiant pendant 5 à 10 minutes au-dessus le T_c du lipide. La suspension lipidique doit commencer à clarifier pour obtenir une solution transparente légèrement trouble. La brume est due à la diffusion de la lumière induite par les grosses particules résiduelles restant en suspension. Ces particules peuvent être éliminées par centrifugation pour entraînent une suspension claire des SUV. La taille moyenne et la distribution est influencée par la composition et la concentration, la température, le temps de sonication et la puissance, le volume et le réglage du sonicator. Comme il est presque impossible

de reproduire les conditions de sonication, variation de taille entre les lots produits à des moments différents n'est pas rare. En outre, en raison de degré élevé de courbure de ces membranes, SUV sont intrinsèquement instables et fusionneront spontanément pour former des vésicules plus grandes lorsqu'elles sont stockées en dessous de leur phase température de transition [4].

I.11.1.3. Extrusion

Membrane de polycarbonate

L'extrusion des liposomes se fait en poussant la solution des grosses MLV à travers des filtres de polycarbonate membrane. La taille souhaitée des vésicules est contrôlée par la pression appliquée, puisque la taille moyenne Manuscrit accepté diminue lorsque la pression d'extrusion augmente, ce qui réduit également la taille des pores du filtre et la distribution de taille des liposomes, il a été signalé que en utilisant une membrane filtrante dont la taille des pores est supérieure à 0,2 μm la taille des liposomes obtenus était inférieur à la taille des pores de la membrane, mais en utilisant une membrane dont la taille des pores est inférieure à 0,2 μm , la taille des liposomes produits était légèrement supérieure à la taille des pores du filtre . Et aussi, une autre étude a prouvé que la filtration de la solution à l'aide d'une membrane filtrante à pores $\sim 1 \mu\text{m}$ suivi d'une filtration cinq fois répétée à travers les pores 0,4- et 0,2- μm . Ensuite, cinq à dix Les extrusions utilisant une taille de pore de 100 nm pour la membrane entraîneront la formation de grandes surfaces unilamellaires vésicules de taille $\sim 110\text{-}120 \text{ nm}$. Si la taille doit être inférieure, une filtration continue à l'aide d'un filtre à membrane dont les pores ont une taille de 80 et 50 nm. Les vésicules traitées par l'extrusion des techniques caractérisées par une bonne homogénéité et un contrôle facile de la distribution de la taille des vésicules [32].

Presse de French

L'extrusion des MLV peut également s'effectuer sur une presse de French décrite par Hamilton en 1980. Une suspension de liposomes de 40 ml est placée dans une chambre de presse de French à température ambiante et extrudée à l'aide d'un piston sous haute pression de 20000 psi à travers un petit orifice. Elle nécessite donc des pressions plus élevées que celles utilisées avec les membranes de polycarbonate [10]. Elle présente plusieurs avantages par rapport à la sonication. Le site est simple, rapide, reproductible et implique la manipulation en douceur de matériaux instables. Les liposomes qui en résultent sont quelque peu plus grands que les SUV soniques. Les inconvénients de la sont que la température est difficile à atteindre et les volumes de travail sont relativement faibles (environ 50 ml maximum) [4].

I.11.1.4. Microfluidisation

La micro fluidisation est également utilisée pour homogénéiser les suspensions de MLV. Elle consiste à forcer les suspensions de MLV sous haute pression (10000 psi) à travers un filtre ayant des pores de 5 μm de diamètre. La suspension est séparée en deux canaux qui se rejoignent dans une chambre d'interaction où les vésicules vont s'entrechoquer avec une grande vitesse pour former des petites vésicules de taille homogène. Plus on augmente le nombre de passage à travers le microfluidiseur, plus la taille des liposomes et leur polydispersité diminuent. Cette technique permet la production des liposomes à grande échelle dans des conditions stériles [10].

I.11.2. Préparation des liposomes par l'élimination du solvant organique

I.11.2.1. Injection de solvant organique

✚ Méthode d'injection d'éther

Une solution de lipides dissous dans de l'éther diéthylique ou Le mélange éther/méthanol est lentement injecté dans une solution aqueuse de la matière à encapsuler à 55-65°C ou sous pression réduite. L'élimination de l'éther sous vide conduit à la formation de liposomes. Les principaux inconvénients de la méthode sont la population est hétérogène (70-190 nm) et l'exposition des composés à encapsuler à solvants organiques ou à haute température [4].

✚ Méthode d'injection d'éthanol

Cette méthode implique l'utilisation de l'éthanol pour dissoudre les phospholipides et le cholestérol. Par moyen d'une pompe à seringue, la solution lipidique obtenue est injectée sous agitation dans un volume défini de la solution aqueuse. Les liposomes se forment alors spontanément dès que La solution lipidique est en contact avec la phase aqueuse. La suspension de liposomes est ensuite laissée sous agitation à température ambiante pendant 15 min. Cette procédure offre de nombreux avantages, tels que la rapidité la mise en œuvre, la simplicité et la reproductibilité. En outre, il n'entraîne pas d'altérations oxydatives ou dégradation des lipides et a la capacité de former de petites vésicules unilamellaires sans extrusion ou sonication [32]. Les inconvénients de cette méthode sont les suivants la population est hétérogène (30 à 110 nm), liposomes sont très dilués, l'élimination de tout l'éthanol est difficile parce qu'il se forme en azéotrope avec l'eau, et la probabilité que les différentes substances biologiquement active macromolécules à inactiver en présence de faibles quantités d'éthanol sont élevées [3].

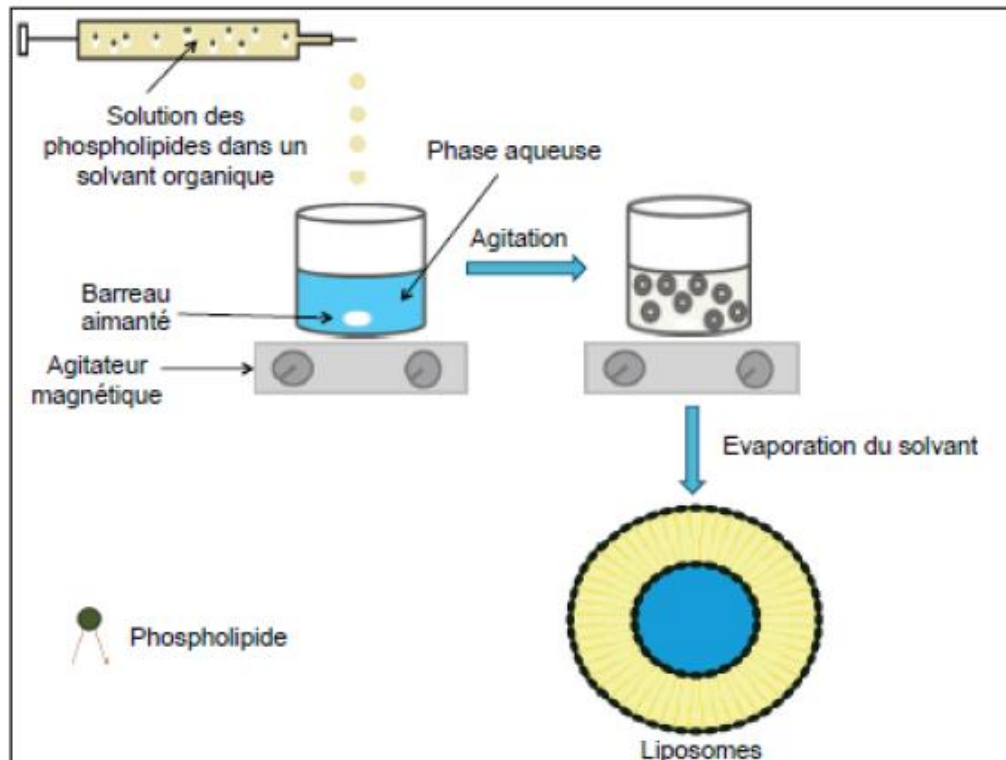


Figure I-10: Préparation des liposomes par injection de solvant organique [1].

I.11.2.2. Evaporation en phase inverse

Les phospholipides sont d'abord mélangés dans un solvant organique. Le solvant organique le plus souvent utilisé est le chloroforme ou un mélange de chloroforme/éther isopropylique (1:1). Ensuite, la phase aqueuse pouvant contenir un principe actif est ajoutée à la phase organique. Le rapport de phase aqueuse/phase organique est 1/3 à 1/6. Les phospholipides se placent à l'interface de deux phases non-miscibles. Le mélange non-miscible va subir une agitation mécanique ou ultrasonique. Cette agitation donne une émulsion eau/huile constituée des micelles inverses dans lesquelles la phase aqueuse est enfermée à l'intérieur des micelles. La phase organique est éliminée par évaporation sous pression réduite. Cette élimination de la phase organique entraîne le rapprochement des micelles inverses et formation d'un gel. L'élimination totale de la phase organique mène à la rupture du gel. La rupture du gel est suivie par le rapprochement des monocouches de phospholipides et la formation de bicouche de phospholipides qui entourent les liposomes LUV (Figure I.11) [1].

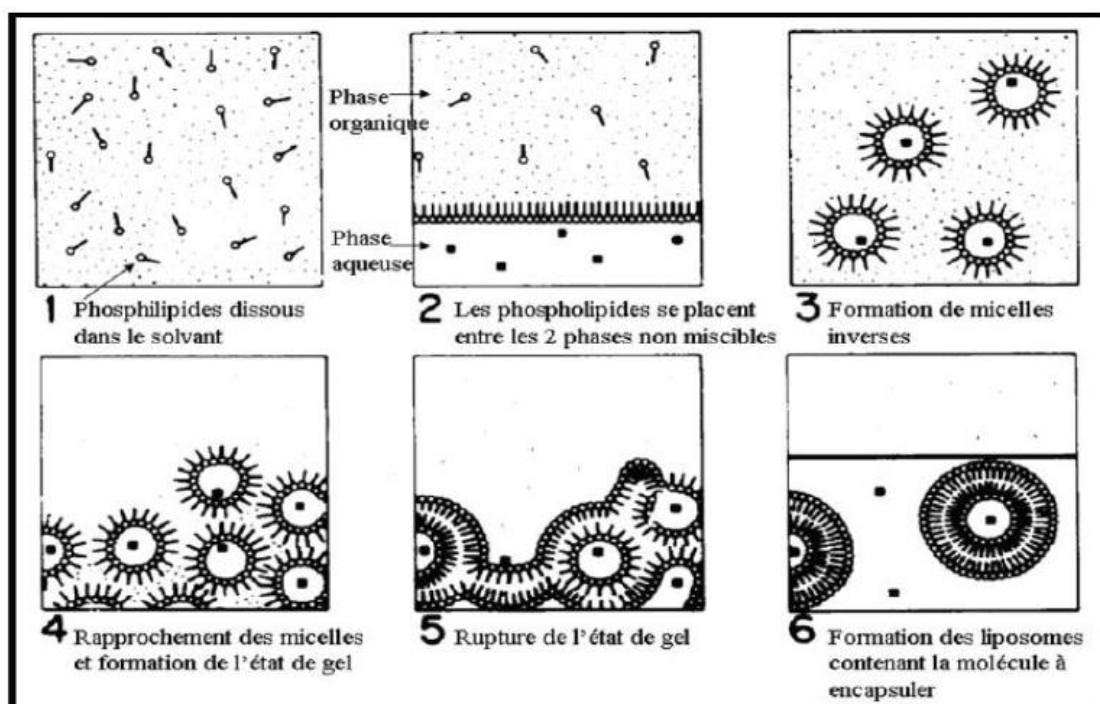


Figure I-11: Formation des liposomes par évaporation en phase inverse [1].

I.11.3. Préparation des liposomes par l'élimination d'un détergent

Les mélanges détergents/phospholipides peuvent former de grandes vésicules unilamellaires lors de l'élimination du détergent non ionique en utilisant des adsorbants appropriés pour le détergent. Dans cette méthode, le phospholipide est mis en contact intime avec la phase aqueuse par l'intermédiaire du détergent, qui s'associe aux molécules de phospholipide de l'eau. Dans la structure formée à la suite de cette association sont connus sous le nom de micelles, et peut être composé de plusieurs centaines de molécules composant. Leur forme et leur taille dépendent de la nature chimique du détergent, de la concentration et des autres lipides impliqués. La concentration de détergent dans l'eau à laquelle les molécules de l'eau se trouvent est connue sous le nom de concentration critique de micelles (CMC) [33]. Cette élimination de détergent se fait par dialyse, par chromatographie d'exclusion stérique sur un gel de sephadex ou par chromatographie d'adsorption sur des résines hydrophobes [1].

- Les avantages des détergents :

Les méthodes de dialyses sont excellentes en termes de reproductibilité et de production de populations de liposomes.

- Le principal inconvénient de cette méthode est la rétention de traces de détergent(s) dans les liposomes [34].

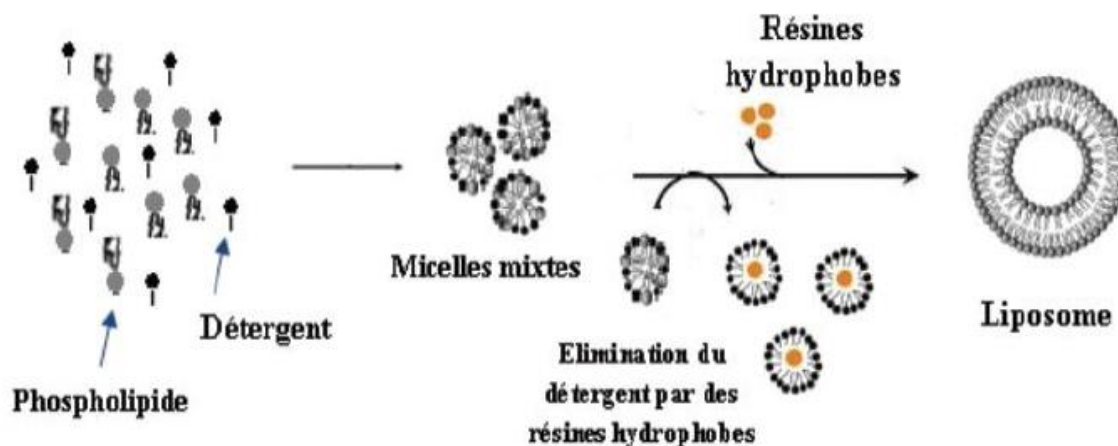


Figure I-12: Préparation des liposomes par la méthode d'élimination de détergent [1].

I.12. Les facteurs influençant la capacité d'encapsulation des liposomes

I.12.1. Type de substances à encapsuler

Le principal caractère qui détermine l'efficacité de l'encapsulation est lié à l'hydrophobicité du composé, la plupart des molécules peuvent être classées en trois catégories selon leurs propriétés hydrophiles, lipophiles ou amphiphiles [9].

➤ Les substances hydrophiles

Médicaments hydrophiles : Ils peuvent être directement dissous dans la phase aqueuse, et se retrouver dans les liposomes après leur formation. Comme les composés hydrophiles pénètrent souvent mal dans les cellules, il est avantageux de les encapsuler. Ils constituent la plus grande partie des principes actifs utilisés. Toutefois, bien tenir compte de la polarité et de la charge électronique : déstabilisation du liposome et donc destruction possible de la vésicule [25].

➤ Les substances hydrophobes

Les substances hydrophobes : Ont un comportement différent. Les produits insolubles dans l'eau et les solvants organiques seront très difficiles à encapsuler. Parmi les produits solubles dans le méthanol ou le chloroforme, ils seront partiellement ou totalement fixés dans la membrane

(selon la concentration). Le liposome s'avère intéressant pour pouvoir injecter par voie I.V des composés lipophiles ou très peu solubles dans l'eau [9].

➤ **Les substances amphiphiles**

Ils ont un comportement très instable : Il convient de pratiquer une encapsulation active de sorte à les placer au travers de la bicouche lipidique : partie lipophile à l'intérieur de la bicouche et partie hydrophile à l'extérieur : en contact du sang, qui est aqueux [25].

I.12.2. Type de liposome

Plus la taille des liposomes est importante, plus la capacité d'encapsulation sera grande. De nombreuses techniques permettent de déterminer la taille mais aussi la distribution de la taille des liposomes. Ce sont par exemple la microscopie électronique, les techniques de chromatographie, et la mesure dynamique de la diffusion de la lumière [36].

I.13. Type de liposome

I.13.1. Applications des liposomes en médecine

Les liposomes sont les nanosupports les plus courants et les mieux étudiés pour l'administration ciblée de médicaments. Ils ont amélioré les thérapies pour une gamme d'applications biomédicales en stabilisant les composés thérapeutiques, en surmontant les obstacles à l'absorption cellulaire et tissulaire et en améliorant la biodistribution des composés vers des sites cibles in vivo [37].

➤ **Les maladies intestinales**

L'absorption par l'intestin grêle est quasiment complète. En effet, le liposome traverse le système digestif sans heurt afin d'arriver, intact, dans l'intestin grêle qui permettra une transmission dans le sang totalement complète. La méthode d'encapsulation permet aux produits liposomés de ne pas être altéré par une quelconque entrave dans le système digestif, par l'acide de l'estomac pour ne citer que lui. Ainsi, l'absorption totale par l'intestin grêle permettra à la molécule d'être directement livrés au cœur de la cellule. Cette absorption optimale empêchera, de plus, le complexe liposomé de s'oxyder au cours du processus de digestion [38].

➤ **Cancers**

Les liposomes fournissent un conteneur biocompatible et biodégradable pour le chargement de médicaments et dont la surface peut être modifiée avec divers ligands de ciblage,

ils ont une grande possibilité de délivrer des médicaments pour une thérapie anticancéreuse ciblée [39].

➤ **Les maladies parasites**

Les liposomes sont des véhicules idéals de l'administration de médicaments pour permettre le traitement visé à certaines régions du corps.

Par exemple, une infection parasite des macrophages, leishmaniose, est un état potentiellement fatal et il peut être difficile de traiter les médicaments employés pour traiter l'état parce que la dose toxique est seulement incrémentiel plus élevée que la dose efficace exigée. La distribution de médicament avec des liposomes serait une solution idéale parce que les liposomes visent naturellement les macrophages et, en conséquence, soient orientées sur l'infection [40].

➤ **Maladie coronariennes**

Un autre rôle joué par les liposomes est de servir de réservoir de principe actif. En effet, lorsque un principe actif est injecté seul en solution, une partie est captée par les muqueuses et l'autre est éliminée. Or l'avantage des liposomes est de préserver le (PA) sur une longue période et de le libérer progressivement. Une illustration est le cas de la nifedipine. Ce principe actif est un bloqueur de canaux calciques et est généralement utilisé en tant que dilatateur de l'artère coronarienne [41].

Et d'autre maladie comme : Maladies cardiovasculaires, Mucoviscidose, Sida, L'hypercholestérolémie familiale, maladie héréditaire, l'ADA, etc.

I.13.2. Applications cosmétologiques

De nombreuses substances utilisées en cosmétologie (antioxydants, collagène, etc.) sont en général appliquées localement 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 des liposomes permet de contourner ce problème. Aussi, en plus de la diffusion passive et continue du produit au travers des bicouches des liposomes, ceux-ci peuvent fusionner avec les cellules de la peau et libérer le principe actif dans la cellule et augmenter son efficacité [42].

I.14. Conclusion

Les liposomes présentent de grandes possibilités en tant que porteurs de médicaments et sont déjà utilisés comme systèmes d'administration de médicaments dans le traitement du cancer, mais ils sont parfois connus pour induire une activation du complément qui peut conduire à des réactions d'hypersensibilité. Enfin, les médicaments liposomaux présentent des toxicités réduites

et conservent une efficacité accrue par rapport aux compléments libres. Seul le temps nous dira lesquelles des applications et spéculations ci-dessus se révéleront efficaces. Cependant, sur la base des applications pharmaceutiques et des produits disponibles, nous pouvons dire que les liposomes ont définitivement établi leur position dans les systèmes d'administration modernes.

Chapitre II

Les antioxydants

II. Les antioxydants

II.1. Introduction

La réaction d'auto-oxydation, à laquelle sont soumis divers produits gras (agroalimentaires, cosmétiques, pharmaceutiques, lubrifiants, etc.), nuis aux qualités de ces derniers. Sous l'effet de l'oxygène atmosphérique, ces produits s'oxydent en devenant notamment rances, visqueux, de couleur foncée et donc inadaptés à leurs usages habituels. La préservation des corps gras contre l'oxydation repose habituellement sur l'usage d'additifs antioxydants, lesquels limitent et/ou retardent la détérioration.

De nos jours, il existe un intérêt croissant vis-à-vis de la biologie des radicaux libres. Cela n'est pas seulement dû à leur rôle dans des phénomènes aigus tels que l'ischémie, mais aussi à leur implication dans de nombreuses pathologies chroniques associées au vieillissement tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires et la dégénérescence du système immunitaire.

Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les espèces réactives oxygénées ROS (Reactive Oxygen Species) à l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations noncytotoxiques des ROS. Notre organisme réagit donc de façon constante à cette production permanente de radicaux libres, intracellulaire par la chaîne respiratoire mitochondriale et le système des oxydases à fonction mixte, ou extracellulaire d'origine surtout phagocytaire. Contre cette production potentiellement toxique [43].

Les antioxydants sont classés en deux systèmes de défense différents en fonction de leur origine, le système de défense endogène et le système de défense exogène [44].

On va parler dans ce chapitre des antioxydants et des radicaux libres ; leurs classifications, leurs modes d'action, et leurs applications...

II.2. Radicaux libres

II.2.1. Définition

Un radical libre, tout atome ou groupe d'atomes possédant un électron non apparié "célibataire" sur son orbitale externe. Ce radical porte une charge électrique négative [45].

Les radicaux libres c'est des molécules avec un ou plusieurs électrons libres. Un électron libre est hautement réactif et très instable. Ces radicaux libres se lient avec des éléments stables du corps, afin de leur prendre un électron et acquérir une certaine stabilité. Suite à la perte de son électron, l'élément devient lui-même un radical libre et ira prendre un électron à un autre élément stable entraînant une cascade de réactions [46]. Ce phénomène aboutit à la production de plus en plus de radicaux libres. Les radicaux libres attaquent certaines parties du corps, ce qui cause plusieurs dommages. Toutes ces réactions contribuent à endommager les cellules. De plus, cela induit la progression de certaines maladies telles que le cancer, le diabète, ainsi que le vieillissement. L'organisme limite l'extension des réactions radicalaires par des réactions enzymatiques, en piégeant les radicaux libres grâce à des molécules appelées antioxydants. Les antioxydants neutralisent les radicaux libres en leur donnant un électron, ce qui arrête le processus. Quand ils perdent des électrons, les antioxydants ne deviennent pas des radicaux libres car, ils sont stables sous toutes les formes. Les antioxydants se retrouvent sous plusieurs formes dans l'alimentation. En effet, nous pouvons les retrouver sous forme de minéral (zinc, manganèse et sélénium) ou sous forme de vitamine (vitamine E, beta-carotène et vitamine C) [47].

II.2.2. Stress oxydant

Défini comme un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène ROS (Reactive oxygen species) et le réseau antioxydant, en faveur du premier. Notre style de vie (tabagisme, alcoolisme, obésité, exercice physique intense), mais également notre alimentation inadéquate, contribue à augmenter considérablement la production de ROS dans notre organisme. C'est potentiellement associé à un risque accru de développer des problèmes liés aux pathologies de vieillissement telles que les maladies cardiovasculaires et le cancer [48]. Les ROS sont présentes dans la cellule à des doses raisonnables : leur concentration est régulée par l'équilibre entre leur taux de production et leur taux d'élimination par les systèmes antioxydants [49].

Le stress oxydant n'est pas une maladie mais un mécanisme physiopathologique. Un excès d'espèces réactives mal maîtrisé favorisera une maladie ou un vieillissement accéléré. Le stress oxydant est un état de déséquilibre entre la production d'espèces réactives et les défenses de

l'organisme. Le terme stress oxydatif est un anglicisme. Un état de stress oxydant existe lorsqu'au moins une des trois conditions suivantes est présente:

- Excès des espèces réactives d'O₂, N₂ ou Cl₂.
- Défenses insuffisantes (endogènes et exogènes).
- Mécanismes de réparation insuffisants [50].

II.2.3. Radicaux libres de l'oxygène (ROS)

Le paradoxe des ROS est qu'elles constituent des produits potentiellement toxiques du métabolisme et sont en même temps des molécules essentielles à la signalisation et à la régulation cellulaires. Cette double potentialité peut être expliquée, au moins en partie, par le fait que les réponses cellulaires varient de manière très sensible et très différente en fonction de la nature chimique de l'ROS, de son niveau de production (effet dose-dépendant) ou encore du site producteur [51]. Les ROS désignant toutes les espèces réactives oxygénées non azotées) [52].

Les ROS regroupent les dérivés radicalaires de l'oxygène et non radicalaires. Ainsi, tous les radicaux oxygénés sont des ROS, mais tous les ROS ne sont pas des radicaux [53].

II.2.4. Origines des espèces réactives

A l'état naturel, l'oxygène, qui comporte naturellement deux électrons célibataires sur la couche périphérique, est très instable avec une forte tendance à oxyder tous les composants qu'il rencontre en leur arrachant un électron pour l'apparier à l'un de ses électrons célibataires [54].

En général, Les sources de production de radicaux libres sont classées en deux catégories : Les sources endogènes et les sources exogènes.

II.2.4.1. Les sources endogènes

Les radicaux libres sont des produits des réactions de l'organisme tels que, l'activation des globules blancs qui est une source très importante pour la production d'ROS et l'oxydation de l'hémoglobine [55]. Les RL (radicaux libres) sont des produits des réactions de l'organisme [56]. D'autres systèmes endogènes entrent en ligne dans la production massive d'ROS comme l'activation de la xanthine oxydase et la NADPH (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) oxydase [55].

II.2.4.2. Les sources exogènes

L'environnement dans lequel nous vivons mais aussi notre mode de vie sont à l'origine d'une augmentation de la production des radicaux libres dans notre organisme tels que : l'exposition prolongée au soleil et aux radiations, contacts avec des agents cancérogènes et pollution [54].

Tableau II-1: Principales sources des ROS [56].

Source endogène	Source exogène
NADPH Oxydases	Tabagisme
Chaîne respiratoire mitochondrial	Cytokine pro- inflammatoire
Xanthine Oxydase	Chimiothérapie
Athérogenèse	Radiation ionisantes
Lipo-Oxygénase	Radiation UV
Phagocytes	Toxique environnementaux
Inflammation	Champs électrique
Etat d'ischémie – reperfusion	Xénobiotique pro-oxydant

II.2.5. Les cibles biologiques des espèces oxygénées réactives

II.2.5.1.L'ADN

Acide désoxyribonucléique, support de l'information génétique d'un organisme, est également un substrat particulièrement sensible aux radicaux libres. On peut effectivement dénombrer au moins cinq catégories de dommages causés à l'ADN, qui sont :

L'oxydation des bases puriques et pyrimidiques, La formation de sites abasiques par attaque de la liaison entre la base et le désoxyribose, La formation d'adduits intra-caténares par

réaction entre les bases de l'ADN et les produits de la peroxydation lipidique (comme le MDA) [57].

II.2.5.2. Les protéines

Les protéines sont des cibles préférentielles pour les espèces réactives oxygénées. Les dommages qui vont être causés sont de deux types :

Une oxydation des chaînes latérales des acides aminés, Une oxydation de la chaîne polypeptidique (chaîne d'acides aminés).

Les espèces réactives de l'oxygène vont pouvoir cibler toutes les chaînes latérales des acides aminés. Cependant les principales cibles sont les acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane), les acides aminés soufrés (cystéine, méthionine) et les acides aminés basiques (arginine, histidine, lysine) [58].

II.2.5.3. Les lipides

L'oxydation des lipides polyinsaturés en présence d'oxygène est connue sous le nom de peroxydation lipidique, l'initiation est due à l'attaque d'une espèce radicalaire suffisamment réactive pour arracher un hydrogène à partir d'un groupement méthylène ($-\text{CH}_2$) (hydrogène plus labile), conduisant à la formation d'un radical centré sur l'atome de carbone ($-\dot{\text{C}}\text{H}-$). Ce radical se stabilise par réarrangement intramoléculaire en formant un diène conjugué capable de réagir facilement avec l'oxygène pour donner un radical peroxyde $\text{ROO}\cdot$ [59].

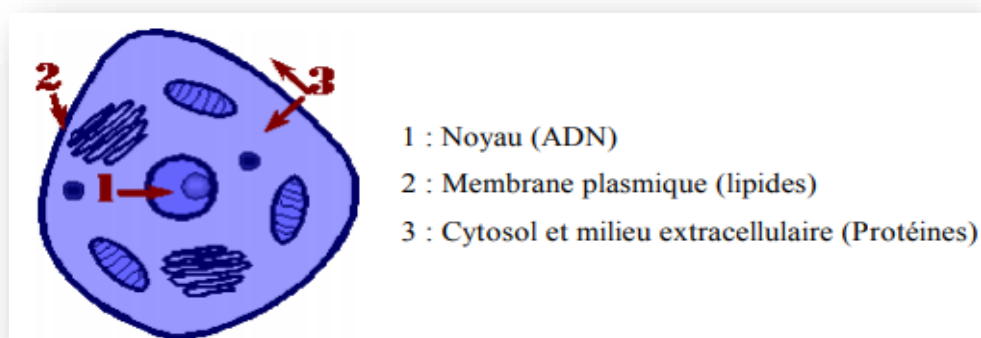


Figure II-1: Sites d'action des radicaux libres dans la cellule [60].

II.2.6. Classification des radicaux libres

II.2.6.1. Radicaux libres primaires

Les radicaux libres primaires sont les plus dangereux car ils sont formés directement à partir de l'oxygène. L'oxygène possède une configuration électronique particulière, avec deux électrons non appariés de spins parallèles sur ses orbitales, à cause de cette configuration définie comme état triplet, l'oxygène est une molécule très peu réactive vis-à-vis des molécules organiques, A partir de l'oxygène moléculaire, chaque réduction aboutit à la formation des espèces suivantes : le radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle (OH^{\bullet}) et l'oxygène singulet ($1O_2$) [61].

Le radical anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$)

L'anion superoxyde est formé par la réduction monoélectronique de l'oxygène. Dans la cellule, le superoxyde est produit majoritairement au niveau de la chaîne respiratoire. Plusieurs éléments de la chaîne respiratoire peuvent laisser échapper des électrons qui vont réduire partiellement l'oxygène et produire du superoxyde. Il s'agit notamment des cytochromes de types b et du coenzyme Q. Il a été estimé que chez la bactérie *Escherichia coli*, la formation de $O_2^{\bullet-}$ au niveau de la chaîne respiratoire représente 0.2 % de l'oxygène respiré [62].

Radical hydroxyle ($^{\bullet}OH$)

Il est formé par la réaction de Fenton, transformant le peroxyde d'hydrogène en ion OH^- et en $^{\bullet}OH$ en présence d'ions métalliques. Il est extrêmement réactif et provoque des réactions en chaîne à l'origine de la formation d'autres radicaux libres [63].

Oxygène singulet

L'oxygène singulet, comme de nombreuses espèces réactives de l'Oxygène (ROS) est généré par les cellules et implique dans de nombreux processus cellulaires [64], cette espèce particulièrement réactive. Sa présence dans le milieu réactionnel conduit essentiellement à des réactions d'oxydation de substrat [65]. Par la réaction entre divers ROS ou en présence de la lumière, il est formé à partir de l'ion superoxyde [56].

Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Ce n'est pas un radical libre à proprement parler mais une molécule car tous ses électrons périphériques sont appariés. Cependant, il peut générer des radicaux hydroxyles HO^{\bullet} en présence de cations métalliques tels que Fe^{2+} (réaction de Fenton), ou de Cu^+ [66].

Tableau II-2: Mode d'action des radicaux libres primaires [67].

Radicaux caractéristique	Mode d'action
<p>Radical superoxyde $O_2^{\cdot-}$</p> <ul style="list-style-type: none"> - Constante de vitesse faible - Très peu réactif - Toxicité indirecte 	<p>1) Action de la SOD $O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} \rightarrow H_2O_2 + O_2$</p> <p>2) Formation $\cdot OH$ (haber-Weiss) $O_2^{\cdot-} + Fe^{3+} \rightarrow O_2 + Fe^{2+}$ $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow \cdot OH + Fe^{3+} + \cdot OH$</p> <hr/> <p>$O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow \cdot OH + \cdot OH$</p> <p>Dismutation non catalysée $HO_2^{\cdot-} + HO_2^{\cdot-} \rightarrow H_2O_2 + O_2$</p> <p>$HO_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} (+H^+) \rightarrow H_2O_2 + O_2$</p> <p>1) Formation de peroxynitrite $O_2^{\cdot-} + \cdot NO \rightarrow OONO^{\cdot-}$</p>
<p>Radicale Hydroxyle</p>	<p>1) Arrachement d'un électron $\cdot OH + Fe^{2+} \rightarrow \cdot OH + Fe^{3+}$</p> <p>2) Arrachement d'un atome d'hydrogène $\cdot OH + RH \rightarrow R^{\cdot} + H_2O_2$</p> <p>3) Addition sur des doubles liaisons $\cdot OH + >C=C< \rightarrow C-C(OH)\cdot$</p>

II.2.6.2. Radicaux libres secondaires

Les radicaux libres secondaires sont de grandes molécules, qui ne sont pas formés spontanément. Ils sont formés par l'action d'un radical libre primaire sur un composant cellulaire

(acides nucléiques, lipides membranaires et protéines). Par exemple, le radical peroxyde ($R\text{-OO}\cdot$) est formé après que O^{2-} ou $OH\cdot$ ait agi sur un acide gras insaturé de la membrane cellulaire [55].

II.3. Les antioxydants

II.3.1. Définition des antioxydants

Une définition tente de définir un antioxydant comme « toute substance qui, une fois présentée à une concentration faible en comparaison avec celle d'un substrat oxydé, considérablement retarde ou empêche l'oxydation du substrat ». Au fil des ans, cette définition est venue être reconnue comme "clairement imparfaite", alors, un nouveau concept beaucoup plus général a défini un antioxydant comme "une substance qui retarde, empêche ou élimine les dommages oxydatifs à une molécule cible" [68]. Il peut prévenir la synthèse de radicaux libres en inhibant l'initiation des chaînes réactionnelles ou désactiver directement les ROS [69]. Un antioxydant peut agir de différentes façons : piéger les composés qui initient la réaction radicalaire, piéger les ions métalliques tel que Fe^{2+} , neutraliser l'anion superoxyde pour éviter la formation de peroxydes, ou terminer la réaction de propagation dans la réaction radicalaire mise en place ou réduire la concentration en O_2 [70].

L'organisme possède des systèmes endogènes dédiés à cette action protectrice. Cependant, cette ligne de défense est facilement saturée [69]. Notamment les superoxydes dismutases, les catalases et les glutathions peroxydases [71]. De nombreux antioxydants exogènes sont également présents dans l'alimentation apportant un soutien significatif dans la lutte antioxydante. Nous les trouvons dans les fruits (pommes, poires, fruits rouges...), les légumes (brocoli, oignon...), les boissons (café, thé...) ainsi que dans les épices, le cacao ou encore les céréales. Ces antioxydants sont surtout connus pour leur capacité à réagir directement avec les radicaux libres en les « neutralisant » par réaction de réduction [69]. Ces antioxydants, essentiellement d'origine végétale, sont apportés sous la forme de composés phénoliques, des vitamines (tel l'acide ascorbique et l' α -tocophérol) et des caroténoïdes [71].

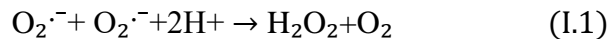
II.3.2. Classification des antioxydants

II.3.2.1. Les antioxydants endogènes

Superoxyde dismutases

Les superoxydes dismutases sont des métalloenzymes (ce sont des enzymes utilisant des métaux comme cofacteurs). Il s'agit d'une des premières lignes de défense contre les ROS. Leur

cible privilégiée est l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) qu'elle transforme en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) [72].

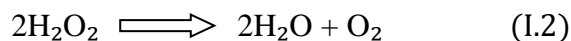


Cette enzyme existe en trois types:

- La SOD à cuivre et à zinc (Cu/Zn-SOD) ou (SOD1) localisée dans le cytosol des celluleseucaryotes et dans les globules rouges,
- La SOD à manganèse (Mn SOD) ou (SOD2), située dans la membrane mitochondriale interne.
- La SOD à cuivre et à zinc extracellulaire (Cu Zn SOD) ou (SOD3) a été découverte chez l'homme dans le sérum, la lymphe et le liquide Synovial [43].

Les catalases

Les catalases sont des enzymes hémiques localisés dans les érythrocytes et les tissus à métabolisme élevé comme le foie, les reins et le cœur, mais ils existent en fortes concentrations dans les peroxysomes [5]. L'enzyme catalase est connue pour catalyser la dégradation du peroxyde d'hydrogène en oxygène et de l'eau. Le métabolisme du peroxyde d'hydrogène est principalement régulé par cette enzyme [73].



Glutathion peroxydase

Une enzyme à cofacteur de sélénium se localise dans le cytosol et la matrice mitochondriale. Elle a pour activité la dégradation des peroxydes organiques (ROOH) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) [74].



La Bilirubine

Les globules rouges sont décomposés à la fin de leur vie circulatoire dans le système réticulo-endothélial et principalement dans la rate. L'hème résultant, est alors converti en bilirubine. Son excrétion de l'organisme est réalisée de façon prédominante par sécrétion dans la bile, elle est insoluble et nécessite une transformation chimique par le foie avant son excrétion pour être solubilisée. Elle est présente sous deux formes dans le sérum, direct conjugué (soluble)

ou indirecte qui correspond à la forme non conjugué (non soluble). Les normes de la bilirubine représentent la balance entre la production (dégradation de l'hémoglobine) et son élimination hépatique [75].

La bilirubine est également considérée comme un membre de la famille antioxydant, contre des radicaux de peroxy. Dans le plasma, elle peut agir synergique avec la vitamine E de protéger des membranes contre la peroxydation lipidique, peut agir *in vivo* comme l'extracteur efficace du ROS et joue un rôle physiologique principal dans la cytoprotection contre des dommages oxydatifs [76].

✚ Thiorédoxine (TRX)

Cette enzyme a une structure proche de celle de la glutathion réductase. Elle consomme aussi du NADPH dans son fonctionnement et joue un rôle protecteur contre une grande variété de stress oxydatif grâce à ses propriétés de capture des radicaux libres [77].

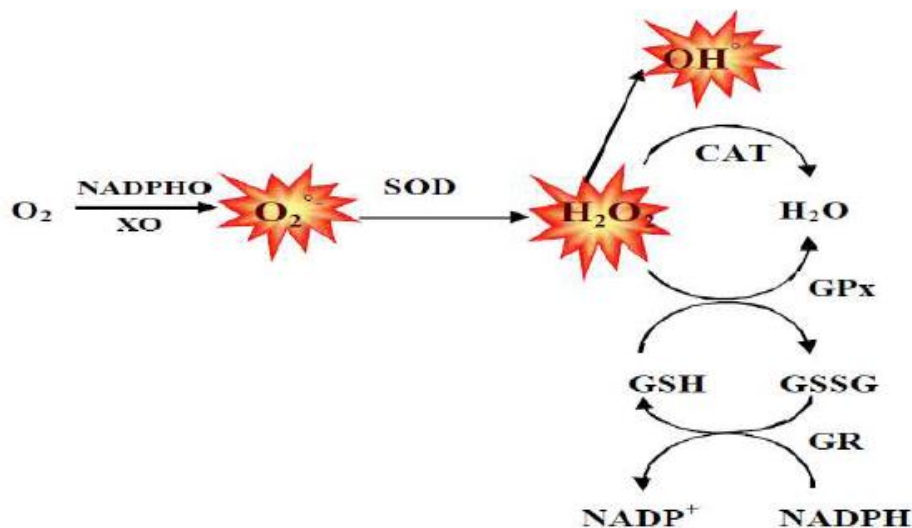


Figure II-2: Système antioxydant enzymatique [43].

✚ Les protéines antioxydants

La transferrine, la ferritine et la céruléoplasmine jouent un rôle antioxydant par chélation des ions. Ces chélateurs forment des complexes ou des composés de coordination avec les métaux. Ils inhibent ainsi le cycle redox du métal ont construisent des complexes métalliques insolubles [78].

II.3.2.2. Les antioxydants exogènes

➤ Les composés phénoliques (Naturel)

Les polyphénols constituent le groupe de métabolites le plus large et le plus répandu du règne végétal et font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzoïque au quel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside [78].

✚ Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont divisés en deux catégories : les dérivés de l'acide benzoïque comme l'acide gallique ou vanillique et les dérivés de l'acide cinnamique comme l'acide caféique, coumarique, sinapique et férulique. Ces derniers ont une bonne activité antioxydante [79].

Tableau II-3: Principales classes des composés phénoliques [43].

Squelette carboné	Classe	Exemple
C6	Phénols simples	Catéchol
C6-C1	Acide hydroxy benzoïques	P- hydroxybenzoïques
C6-C3	Acides hydroxy cinnamique Coumarines	Acide caféique
C6-C2-C6	Stilbénes	Resveratrol
C6-C3-C6	Flavonoïdes	Quercétine .catéchine
(C6-C3) n	Lignines	-
(C6-C3-C6) n	Tanins	Procyanidine trimérique

✚ Tannins

Les tannins sont des polyphénols de structure complexe, avec une activité antioxydante très puissante due au piégeage d'O₂⁻ grâce aux différents groupes phénoliques [79].

Les tanins vont être classés selon deux groupes de tanins :

- Les tannins condensés.
- Les tanins hydrolysables [68].

 Les flavonoïdes (C6-C3-C6)

Ces composés représentent le groupe le plus vaste et le plus distribué dans le règne végétal [43].

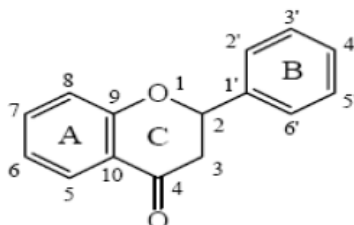
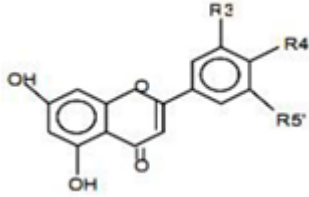
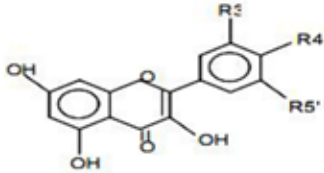
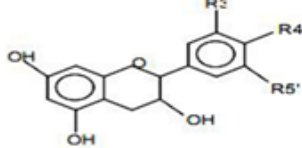
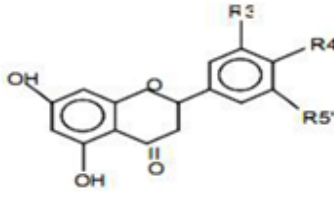
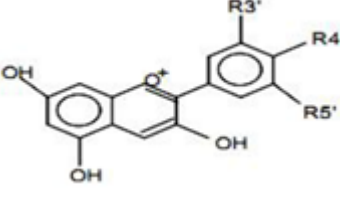
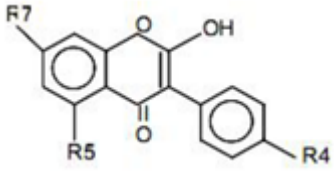


Figure II-3: Structure de base des flavonoïdes [78].

Le nom flavonoïde est issu du latin « Flavus » qui signifie jaune. Ce sont des pigments qui sont responsables de la coloration des fruits et des fleurs.

Les flavonoïdes sont constitués de deux cycles aromatiques liés par trois atomes de carbone qui peuvent se lier en formant un cycle oxygéné. Selon le degré d'oxydation, les flavonoïdes sont classés en six classes : anthocyane, flavonol, flavone, flavanone, isoflavone, flavanol [72].

Tableau II-4: Principales classes des flavonoïdes avec quelques exemples [78].

Classes	Structure chimique	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH ₃	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		R5	R7	R4'	-
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-Glu	OH	Daidzeine

✚ Les stilbènes

Les stilbènes sont des composés polyphénoliques qui ont une structure en C6-C2-C6, deux noyaux benzéniques reliés par un pont méthylène, ils sont produits par les plantes en réponse à des attaques, fongiques, bactériennes ou virales, et possèdent des propriétés antioxydantes comme l'ensemble des polyphénols [80].

➤ Les vitamines (Naturel)

✚ Vitamine E

La vitamine E (alpha-tocophérol) est liposoluble et elle est l'antioxydant le plus important dans les lipides. En fait, la vitamine E est l'antioxydant prédominant dans les lipoprotéines et les membranes cellulaires [81]. A l'état naturel, la vitamine E est synthétisée par les plantes, et principalement trouvée dans les huiles végétales, les noix, et les grains [5].

La vitamine E est un terme générique qui représente une famille de composés chimiquement apparentés qui est subdivisée en deux sous-groupes appelés tocophérols et tocotriénols. De plus, les tocophérols et les tocotriénols ont les formes α , β , γ et δ [68]. Sa structure moléculaire comporte une extrémité hydrophile et une extrémité hydrophobe [82]. La vitamine E (α -tocophérol) lutte contre la peroxydation lipidique des membranes cellulaires et peut arrêter la chaîne de radicaux libres en formant des dérivés de faible réactivité, incapables d'attaquer les substrats lipidiques. Ainsi, la vitamine E joue un rôle dans la préservation de la membrane contre les dommages des radicaux libres promu par les lipoprotéines de faible densité LDL (Low-density lipoprotein) [83].

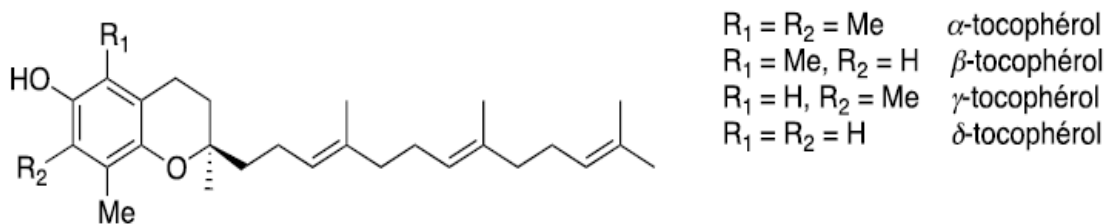


Figure II-4: Structures des tocophérols [69].

✚ Vitamine C

La vitamine C, ou acide ascorbique, est une molécule hydrosoluble [71] sensible à la chaleur, aux ultraviolets et à l'oxygène [84]. C'est un très bon capteur de radicaux libres [71] qui

n'est pas synthétisée par l'organisme [82] et l'on retrouve dans de nombreux fruits comme les oranges, les citrons et les fraises [69].

L'acide ascorbique est formé de 6 atomes de Carbone, 8 atomes d'hydrogènes et 6 atomes d'oxygènes [85]. Elle joue un rôle de prévention de l'oxydation dans le plasma et les fluides extracellulaires, dont elle est considérée comme le plus important antioxydant. Son action est directe et indirecte, elle agit directement sur les ROS (superoxydes, hydroxyle, singulet oxygène, radicaux lipidiques) et indirectement par son action de régénération de la vitamine E et du GSH (Glutathione) [86].

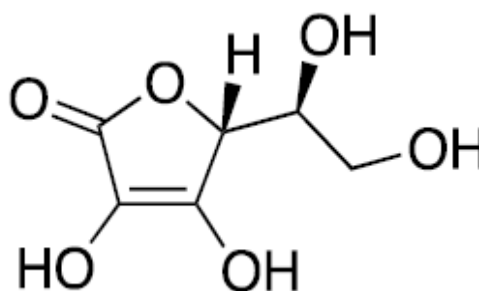


Figure II-5: Structure chimique de la vitamine C [69].

✚ Vitamine A

La vitamine A est une vitamine liposoluble que l'on retrouve en grande quantité dans l'organisme surtout au niveau du foie, son lieu de stockage principal. On distingue deux groupes, à savoir les rétinoïdes (rétinol, trétinoïne...) et les provitamines A (principalement les α - et β -carotènes) [69]

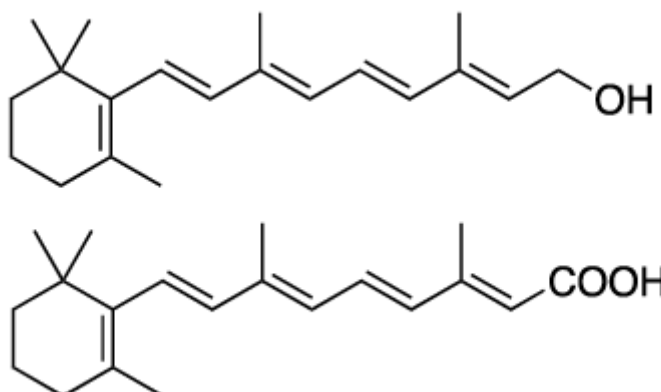


Figure II-6: Structure chimique de quelques rétinoïdes [69].

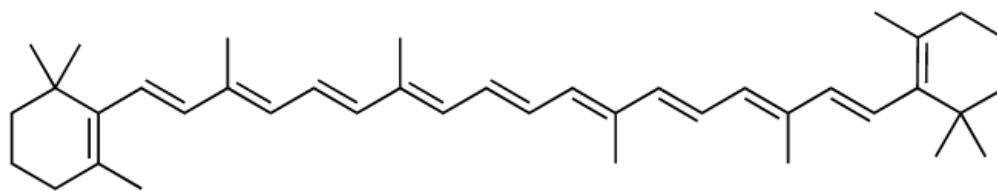


Figure II-7: Structure chimique des β - carotènes [69].

Les rétinoïdes vont se retrouver dans les aliments d'origine animale (œufs, lait, viande...). Les provitamines A sont essentiellement contenues dans les végétaux et plus particulièrement la carotte, la citrouille et la patate douce. Même en l'absence de liaison OH, le β - carotène est un bon antioxydant naturel. Son activité s'explique en partie par ses propriétés lipophiles lui permettant de traverser les membranes cellulaires et en partie par son système π -conjugué permettant d'interagir avec les radicaux libres pour former des adduits.

Le β - carotène peut agir comme un inhibiteur de la peroxydation lipidique uniquement à une faible pression partielle en O₂. Il peut être oxydé tout comme un acide gras et ainsi avoir un effet pro-oxydant [69].

✚ Les caroténoïdes

Ils sont majoritairement représentés par la β -carotène, appelée aussi « pro-vitamine A » [83].

Les caroténoïdes sont des pigments organiques qui sont naturellement produits par les plantes, les algues, certains types de champignons et certaines bactéries, mais pas les animaux.

Les caroténoïdes sont des antioxydants liposolubles, ils sont une source importante de la vitamine A. L'activité antioxydant est connue pour être l'une des propriétés biologiques les plus importantes des caroténoïdes [68], qui exercent des fonctions antioxydantes dans des conditions particulières de basse pression partielle d'oxygène. Les caroténoïdes semblent capables de prévenir et d'interrompre les procédés de peroxydation en neutralisant l'oxygène singulet et les radicaux libres [79].

➤ Les oligo-éléments (Naturel)

✚ Zinc

Le zinc (Zn) joue un rôle antioxydant indirect en assurant la stabilisation de la Cu-Zn SOD [79]. Cet oligo-élément est un des cofacteurs essentiels de la SOD. La prise de zinc conduit à long terme à l'induction de protéines antioxydantes comme les métallothionéines. Le zinc protège

également les groupements thiols des protéines. Le zinc peut inhiber partiellement les réactions de formation d'espèces oxygénées induites par le fer ou le cuivre [82].

On retrouve le zinc dans les huitres, le foie de veau et la viande de bœuf [69].

✚ Sélénium

Le sélénium est un constituant de la glutathion peroxydase, enzyme qui joue un rôle intracellulaire antioxydant, voisin de celui de la vitamine E. Cet effet antioxydant est capital dans la détoxification des radicaux libres produits par le métabolisme cellulaire. Cet effet de détoxification serait responsable des effets anti-cancéreux et anti-âge, attribués au sélénium [82].

✚ cuivre

Le cuivre est un des cofacteurs essentiels de la SOD étant donné sa facilité à passer de l'état réduit à l'état oxydé. On retrouve le cuivre surtout dans le foie, les huitres et le chocolat noir.

Néanmoins, il joue également un rôle important dans l'initiation des réactions produisant des ROS de par ses propriétés de métal de transition, tout comme le fer. Une concentration importante en cuivre pourra être le révélateur d'un stress oxydant. Au cours du processus de vieillissement, la concentration sérique en cuivre est amenée à augmenter. En d'autres termes, cet élément peut jouer à la fois le rôle de protecteur ou d'initiateur [69].

II.3.3. Mécanisme d'action des antioxydants

Les antioxydants sont divisés en deux catégories en fonction de leur mécanisme d'action :

II.3.3.1. Mécanisme d'action des antioxydants piègeurs

Les cellules utilisent de nombreuses stratégies antioxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leur niveau d'espèces réactives de l'oxygène. Certains composés antioxydants comme la vitamine E, la vitamine C ou les caroténoïdes et les polyphénols apportés par l'alimentation, agissent en piégeant les radicaux et en captant leur électron célibataire et en les transformant en molécules ou ions stables. Ce type d'antioxydant est appelé piègeur ou éboueur (scavenger ou chain breaking antioxidants). Il existe de plus, des composés endogènes synthétisés par les cellules et jouant le même rôle ; le plus important est le glutathion réduit qui protège non seulement contre les radicaux oxygénés, mais aussi contre les peroxydes ou le NO[•].

II.3.3.2. Mécanisme d'action des antioxydants préventifs

Une autre stratégie utilisée dans la lutte contre le stress oxydant, elle est de nature enzymatique, visant à détruire les superoxydes et les peroxydes. Ainsi, les superoxydes dismutases sont capables d'éliminer l'anion superoxyde par une réaction de dismutation. Cette réaction est

catalysée par un métal situé au cœur de l'enzyme. Les principales enzymes capables de détruire le peroxyde d'hydrogène sont les catalases à cofacteur fer et les glutathions peroxydases à cofacteur sélénium. Il existe de nombreuses autres enzymes antioxydantes comme les peroxyredoxines, l'hème oxygénase, la glutathion transférase, les thioredoxines réductases ou les thioredoxines peroxydases [87].

II.3.4. Activités antioxydants

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, l'activité antioxydant par piégeage de radicaux différents, comme les peroxydes (ROO \cdot) par les méthodes ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et la méthode utilisant le radical libre (DPPH \cdot) (diphényl-picrylhydrazyle) [88].

II.3.4.1. Méthode du radical libre (DPPH \cdot)

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α , α -diphényl- β -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères, i.e. DPPH \cdot reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. La délocalisation provoque aussi la couleur bleue bien caractéristique de la solution de DPPH \cdot . La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue, due à une recombinaison des radicaux DPPH \cdot , mesurable par spectrophotométrie à 515-518 nm [89].

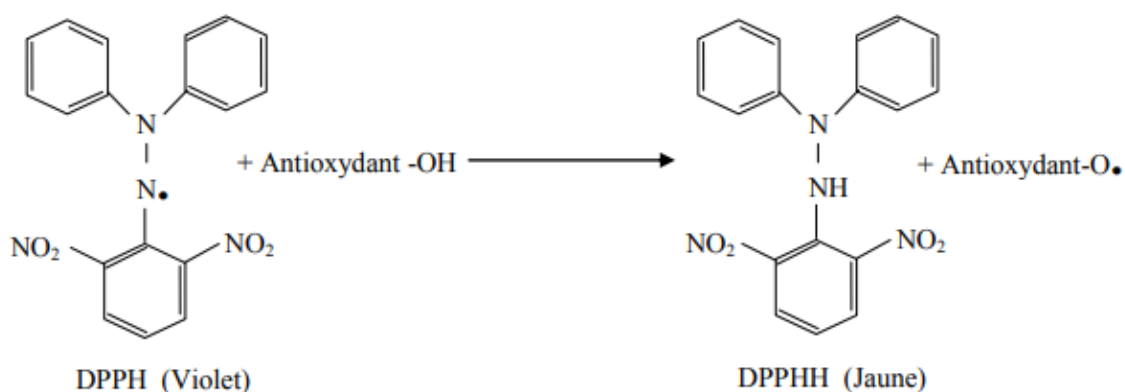


Figure II-8: Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH [90].

II.3.4.2. Méthode de Capacité d'absorption radicale d'oxygène (ORAC)

Méthode ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) mécaniquement, est basée sur le transfert d'atomes d'hydrogène HAT (Hydrogen Atom Transfer), réaction entre un oxydant et un radical libre. La méthode ORAC utilise un initiateur radicalaire AAPH (2, 2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride) pour générer un radical peroxy, qui fait abstraction de l'hydrogène atome d'antioxydant, empêchant ainsi toute Action.

Le consommateur moderne et bien éduqué n'a pas besoin seules des informations de base sur la composition du produit étiquette d'index, mais également des informations son potentiel antioxydant [91].

II.4. Conclusion

Ce chapitre a démontré que les radicaux hydroxyles sont capables de dégrader la quasi-totalité des polluants organiques persistants à cause de leur pouvoir oxydant très élevé, de leur réactivité extrême, et de leur non sélectivité vis-à-vis des micropolluants organiques. L'attaque de ces radicaux sur les polluants organiques initie un mécanisme radicalaire conduisant à la minéralisation par trois modes d'action : addition électrophile, abstraction d'atome d'hydrogène et transfert électronique.

Ces radicaux peuvent être générés par les procédés d'oxydation avancée POA, l'une de ces procédés est l'oxydation anodique qu'on a choisie vis à la facilité et l'efficacité de ses résultats pendant un temps court sans générer aucun type de pollution qui pourrait être une perturbation de la faune aquatique ou constituer un risque pour la santé humaine.

Chapitre III

Travaux antérieurs

III. Travaux antérieurs

III.1. Introduction

Nous avons discuté précédemment les types des antioxydants et les techniques de mise en forme des liposomes. Ce dernier chapitre est consacré aux quelques travaux antérieurs afin de récapituler les résultats de chaque expérience, ensuite déduire les différences entre elles pour définir les meilleures conditions d'encapsulation. La comparaison est faite sur la base de la distribution des tailles, la détermination de la composition et de la concentration des lipides, l'efficacité d'encapsulation, ainsi que la vue microscopique.

III.2. Préparation

III.2.1. Lois utilisées

✚ Calcul du taux d'encapsulation

$$\%EE = \frac{\text{La quantité encapsulé}}{\text{La quantité totale}} \times 100 \quad (\text{III.1})$$

- EE: Taux d'encapsulation (%)

✚ Calcul du pourcentage de piégeage des radicaux

$$\text{DPPH} (\%) = \left[1 - \frac{A \text{ échantillon} - A \text{ échantillon control}}{A \text{ blanc}} \right] \times 100 \% \quad (\text{III.2})$$

- DPPH: Activité de piégeage des radicaux (%).
- A échantillon: L'absorbance de la solution échantillon (nm).
- A échantillon control : L'absorbance de la solution témoin (nm).
- A blanc : L'absorbance de La solution à blanc (nm).

✚ Calcul du taux de fuite.

$$\text{Rapport de fuite \%} = \left(1 - \frac{W_{\text{durant}}}{W_{\text{avant}}}\right) \times 100\% \quad (\text{III.3})$$

- W_{durant} : La quantité de médicaments encapsulés dans des liposomes à un moment précis pendant la période de stockage (mg)
- W_{avant} : La quantité de médicaments encapsulés dans des liposomes avant le stockage (mg)

✚ Calcul du ratio de médicament retenu

$$\text{Ratio de rétention du médicament \%} = \frac{W}{W_0} \times 100\% \quad (\text{III.4})$$

- W est la quantité de médicaments initiaux (mg)
- W_0 est la quantité de médicaments après 40 jours (mg)

✚ Calcul du diamètre moyen de Sauter

$$D_{3,2} = \frac{\sum_{i=1}^n S_i D_i}{\sum_{i=1}^n S_i} = \frac{\sum_{i=1}^n n_i D_i^3}{\sum_{i=1}^n n_i D_i^2} \quad (\text{III.5})$$

- $(D_{3,2})$: Diamètre moyen de Sauter.
- S_i : La surface (mm^2).
- D_i : Le diamètre (mm).
- n_i : Le nombre de particule.

✚ Calcul du diamètre moyen de Brouker

$$D_{4,3} = \frac{\sum_{i=1}^n V_i D_i}{\sum_{i=1}^n V_i} = \frac{\sum_{i=1}^n n_i D_i^4}{\sum_{i=1}^n n_i D_i^3} \quad (\text{III.6})$$

- $(D_{4,3})$: Diamètre moyen de Brouker.
- V_i : Le volume (mm^3).

✚ Calcul de la quantité de pénétration de l'accumulation

$$Q = (C_n \times V_n + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \times V_i) / A \quad (\text{III.7})$$

- Q : La quantité de pénétration de l'accumulation (g/cm²) a pénétré à travers la peau du lapin.
- C_n et C_i : Représentent respectivement la concentration (g/ml) de PT dans l'échantillon (n) ou (i)
- V_n : Le volume total des (50 ml).
- V_i : le volume de prélèvement (3 ml).
- A: Représente la surface de peau de lapin pour la pénétration (7,065 cm²).

✚ Calcul de la constante de stabilité apparente

$$K_S = \frac{\text{pente}}{S_0(1-\text{pente})} \quad (\text{III.8})$$

- K_s : La constante de stabilité apparente
- S₀ : est la solubilité de la quercétine à 30°C

✚ Calcul de la charge de médicaments

$$DL\% = \frac{\text{Quantité de drogue piégée}}{\text{Quantité de médicament ajoutée} + \text{quantité de lipide ajoutée}} \times 100\% \quad (\text{III.9})$$

- DL : la charge de médicaments (%)

✚ Calcul du pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique du médicament

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (\text{III.10})$$

- A₀ : L'absorbance du contrôle (blanc) (nm)
- A₁ : L'absorbance en présence des échantillons à tester (nm)

✚ Calcul de l'efficacité d'incorporation IE

$$IE (\%) = \frac{V_1 C_1 \times V_2 C_2}{V_1 C_1} \times 100 \quad (\text{III.11})$$

- IE : Efficacité d'incorporation (%).

- V1 : Volume de la solution initiale de liposomes (mL).
- C1 : Concentration initiale du médicament ($\mu\text{g} / \text{mL}$).
- V2 : Volume restant de solution de liposomes (ml).
- C2 : Concentration de médicament restant ($\mu\text{g} / \text{mL}$).

✚ Calcul du Consommation d'eau

$$\text{CE (\%)} = \frac{H_s - H_g}{V_1 - C_1} \times 100 \quad (\text{III.12})$$

- CE (%) : Consommation d'eau.
- Hg : poids d'hydrogel gonflé (g).
- Hs : Poids d'hydrogel séché (g).

✚ Calcul de la libération fractionnée de médicament dans le milieu de dissolution.

$$F = \frac{M_t}{M} \times K_r \times t^{nr} \quad (\text{III.13})$$

- F : Libération fractionnée de médicament dans le milieu de dissolution (%)
- Mt : Montant de médicament libéré au temps t.
- M : Quantité totale de médicament (mg)
- Kr : Constante de taux du système d'administration de médicaments.
- nr : Valeurs utilisé pour examiner les mécanismes de transport de la quercétine et de la rutine dans la peau.

III.2.2. Mise en forme liposomale de la vitamine C

III.2.2.1. Exemple 1. Vitamine C et acide folique sous forme liposomale

❖ Matériaux : La phosphatidylcholine (PC) de soja, le chitosane (CH, degré de désacétylation 80~95%), le cholestérol (CHOL), polysorbates 80, l'acide folique (AF) et l'éthanol. La vitamine C (VC), Le méthanol de qualité chromatographique.

❖ Préparation des liposomes : PC, CHOL, polysorbates 80, VC et AF avec le rapport de masse de 1, 0.5, 0.5, 0.125, 0.125 ont été dissous dans de l'éthanol et incubés à 50°C pendant 15 min, puis la solution a été rapidement injectée dans la solution tampon de phosphate (pH=7,4). Après avoir agité le mélange à 800 tr/min pendant 15 minutes,

l'éthanol a été éliminé à l'aide d'un évaporateur rotatif sur le site 40°C et le produit final, la vitamine C liposomale (VCFA-Lip), a été obtenu.

Le VCFA-Lip enduit de chitosane (CS-VCFA-Lip) a été préparé comme suit : la solution de CH (0,05 %, p/v) a été obtenue en dissolvant une quantité appropriée de CH dans de l'eau distillée contenant 0,5 % (v/v) d'acide acétique. Ensuite, 4 ml de suspension VCFA-Lip ont été ajoutés goutte à goutte à 8 ml de solution CH. Le rapport de masse ajouté de PC et de CH est de 3:2 pendant la préparation. Après que le mélange a été agité à 400 tours/minute pendant 60 minutes, le CS-VCFA-Lip a été obtenu. Selon l'application pratique des liposomes chargés, aucune autre étape de purification n'a été effectuée et les liposomes préparés ont été stockés à 4 °C dans l'obscurité avant la caractérisation.

❖ Taille des particules et analyse du potentiel zêta : La taille des particules, l'indice de polydispersité (PDI) et le potentiel zêta ont été évalués par spectroscopie de corrélation photonique (PCS). Tous les échantillons ont été dilués environ 200 fois avec de l'eau déionisée avant les mesures. Chaque test a été effectué en trois exemplaires et les valeurs moyennes ont été calculées.

❖ Observation morphologique par microscopie électronique à transmission (TEM) : La morphologie du VCFA-Lip et du CS-VCFA-Lip a été observée par TEM. La suspension de liposomes a été diluée avec de l'eau désionisée et puis placée sur les grilles de maillage. L'excès de solution était éliminé par un papier filtre et les échantillons colorés ont été analysés à 200 kV.

❖ Activité de piégeage des radicaux DPPH : Toutes les expériences ont été réalisées en trois exemplaires. Le pourcentage de piégeage des radicaux DPPH a été calculé par l'équation (III.2)

❖ Etudes de stabilité : Les liposomes préparés ont été conservés à 4°C ou à température ambiante (25°C) pendant 40 jours dans un état sombre. La stabilité au stockage a été déterminée en mesurant la taille des particules et le taux de fuite à un moment précis pendant la période de stockage. La taille des particules a été déterminée par PCS (phosphatidylcholine de soja). Les taux de fuite de VC et d'AF ont été obtenus en mesurant la quantité de médicaments encapsulés dans des liposomes à un moment

précis de la période de stockage et la quantité de médicaments encapsulé dans des liposomes avant le stockage. Le taux de fuite a été calculé par l'équation (III.3).

Dans ce système, les médicaments encapsulés sont stables et peu de médicaments se dégraderaient pendant le stockage. Par conséquent, le changement des médicaments encapsulés est considéré comme la raison de la fuite de médicaments. La photo-stabilité des échantillons préparés a été réalisée par exposition à la lumière du soleil avec un rayonnement UV (Ultraviolet) solaire de haut niveau pendant 40 jours. Pendant cette période, la température quotidienne moyenne était comprise entre 1 °C et 10 °C. La photo-stabilité a été évaluée en mesurant le ratio de médicament retenu, qui a été calculé par l'équation (III.4). La solution tampon de phosphate VC et la solution tampon de phosphate FA ont été utilisées comme groupes de contrôle pour le test de photostabilité [92].

III.2.2.2. Exemple 2. Encapsulation de la VC dans des liposomes avec des phospholipides dérivés de la membrane des globules gras du lait

❖ Matériaux : Les phospholipides du lait, dérivés du ont été donnés par Fonterra (Coopérative Fonterra Groupe, Palmerston North, Nouvelle-Zélande).

❖ Préparation des liposomes : Les phospholipides du lait ont été dispersés dans un tampon aqueux (20 mM d'imidazole, 50 mM de chlorure de sodium, 0.02 % d'azide de sodium comme agent bactérostatique, et 1 % (p/p) d'acide ascorbique, pH 7.0). La dispersion a été soigneusement mélangée à l'aide d'un mélangeur Polytron à 7 000 tr/min pendant 10 min. La dispersion des phospholipides a ensuite été cyclée par un microfluidiseur, Pour cinq passages à une pression d'entrée de 580 bar.

❖ Les dispersions ont été préparées avec des concentrations de poudre riche en phospholipides allant de 5 % à 16 % (p/p). Pour produire des liposomes avec de diamètre apparent (environ 100 nm), le nombre de passages dans le microfluidiseur a varié de 3 à 10 (des concentrations plus élevées ont nécessité un plus grand nombre de passages pour obtenir des vésicules de 100 nm de diamètre).

❖ Quantification de l'acide ascorbique encapsulé : Immédiatement après la préparation des liposomes et après le stockage, l'acide ascorbique libre (non encapsulé) a été séparé des liposomes contenant l'acide ascorbique piégé par chromatographie par perméation de gel. Des aliquotes (2,5 ml) de la dispersion de liposomes ont été passées

dans une colonne de dessalage alimentée par gravité de 10×150 mm de Sephadex G-25. Un tampon à l'imidazole (20 mM d'imidazole, 50 mM de chlorure de sodium, 0.02 % d'azide de sodium, pH 7) a été utilisé comme phase mobile. La fraction contenant des liposomes a été recueillie dans les premiers 4ml, puis le reste de l'acide ascorbique libre a été élué. Les contrôles ont été effectués avec des liposomes vides ainsi qu'avec de l'acide ascorbique libre, pour tester la performance de la colonne. L'efficacité d'encapsulation a été déterminée comme le rapport entre la quantité d'acide ascorbique récupérée dans la fraction liposomale et la quantité initiale d'acide ascorbique dans l'échantillon original. Les changements dans l'efficacité d'encapsulation avec le stockage ont été évalués en mesurant la quantité d'acide ascorbique récupérée dans la fraction de liposomes après le stockage et en calculant le rapport (quantité après le stockage/quantité initialement présente dans le liposome frais).

La concentration d'acide ascorbique dans les liposomes frais et stockés a été mesurée par spectrophotométrie, basé sur le test colorimétrique MTT-formazan, en utilisant le kit de dosage de l'acide ascorbique, en suivant les instructions du fabricant. Dans la première aliquote de l'échantillon, l'acide L-ascorbique et tous les autres composés réducteurs sont mesurés. Dans la deuxième aliquote d'échantillon, l'acide L-ascorbique est éliminé sélectivement avec l'oxydase d'acide ascorbique et toutes les substances réductrices restantes sont mesurées. La réaction implique la réduction du sel de tétrazolium MTT en composé de formazan qui est mesuré par spectrophotométrie à 578 nm. La différence entre la première et la deuxième mesure est la quantité d'acide L-ascorbique. Il est important de souligner que le test ne tient pas compte de l'acide ascorbique oxydé.

❖ Stabilité des dispersions de liposomes pendant le stockage : La stabilité des liposomes stockés à 4 °C et 25 °C a été évaluée sur une période de 7 semaines. Avant le stockage, un ensemble de dispersions de liposomes a été ajusté à un pH de 3, avec du HCl 6 N et stocké pendant 7 semaines. En outre, un autre ensemble de liposomes à pH 7 a été dilué à 1:1 (v/v) avec une solution de dextrose à 10 % (p/v) et conservé pendant 7 semaines. Les dispersions de liposomes ont été évaluées chaque semaine en mesurant les changements du diamètre hydrodynamique moyen, de l'indice de peroxyde et de la quantité d'acide ascorbique retenue [93].

III.2.2.3. Exemple 3. Les liposomes comme véhicules des vitamines E et C: une alternative pour fortifier le jus d'orange et offrir une protection en vitamine C après un traitement thermique

- ❖ Matériaux : AS (Acide stéarique), SCa (stéarate de calcium), VE et VC.
- ❖ Préparation des liposomes : Les liposomes multilamellaires ont été préparés par la méthode de déshydratation réhydratation. 40 μ mol de lipides ont été dissous dans 500 μ l d'éthanol dans un ballon à fond rond, le solvant a été séché dans un évaporateur rotatif à 37 °C, et entraîné avec du N₂. Le film lipidique sec composé de PCS, PCS:AS (1:0,25, rapport molaire), et PCS: SCa (1:0,25, rapport molaire) a été réhydraté avec 2 ml d'acide acétique 3 % p/v à une concentration finale de 50 mM de lipides Afin de préparer des liposomes avec VE, une solution mère de la vitamine diluée dans l'éthanol a été préparée. La concentration du stock était de 22,4 mM. Ensuite, 0,445 ml de ce stock a été prélevé et mélangé avec une quantité appropriée de lipides. Le solvant a été évaporé et un film lipidique a été obtenu. Lorsque le film a été réhydraté dans 2 ml d'acide acétique 3 % v/v, une concentration finale de 5 mM a été atteinte. Dans le cas de la VC, des solutions fraîches de cette vitamine ont été préparées au moment de la réhydratation. La VC a été pondérée et diluée dans de l'acide acétique à 3 % v/v pour atteindre une concentration de 5 mM pour les essais de peroxydation et une concentration de 90 mM pour tous les autres essais.

- ❖ Distribution de la taille des particules : Les distributions de taille des particules ont été déterminées dans une fourchette de 0,1- 0,5 μ m par diffusion laser à l'aide d'un analyseur de particules. Le liposome a été dilué dans 500 μ l d'acide acétique 3 % p/v. Le site de la dispersion a été effectué à 2000 tours/minute et le degré d'obscurcissement se situait entre 10 et 15 % (L'équation (III.5) et (III.6)).

- ❖ Mesure de l'efficacité de l'encapsulation : Les vitamines non encapsulées étaient séparées par centrifugation immédiatement après la préparation des liposomes. Un protocole d'agrégation de la protamine a été utilisé. Une concentration de 5 mM dans le cas de VE et 90 mM dans le cas de VC a été utilisée. En bref : 0,5 ml de liposomes avec chaque vitamine seule a été remise en suspension dans de l'acide acétique 3 % p/v (la concentration en lipides était de 1 mg/mL). Ils ont ensuite été mélangés à 10 μ l de solution de protamine à 100 mg/ml. Les échantillons ont été conservés à température ambiante pendant 30 minutes. Après incubation, les liposomes ont été centrifugés à 4 °C et à 12 000 tours/minute pendant 20 min. La vitamine C a été déterminée par

spectrophotométrie avec un spectrophotomètre UV-vis, en enregistrant l'absorbance à 265 nm. VE, a également été déterminée par spectrophotométrie, avec un UV-vis spectrophotomètre en enregistrant l'absorbance à 295 nm avec un coefficient d'extinction molaire de $3058 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Pour calculer le % EE, 500 μl des échantillons de liposomes ont été placés dans un sac à membrane, et dialysé contre 50 ml d'acide acétique à 3 % p/v pendant 72 h à température ambiante pour éliminer la vitamine non encapsulée qui reste dans le milieu de dispersion. Ensuite, les aliquotes de liposomes retirées les échantillons ont été perturbés par une solution de Triton X-100 (10% v/v) pour libérer la vitamine encapsulée. La concentration de VC était déterminée avec un spectrophotomètre UV-vis en enregistrant l'absorbance à 265 nm [94].

III.2.2.4. Etude comparative

Tableau III-1: Etude comparative de l'encapsulation de la vitamine C [92, 93, 94].

Exemples	Méthode de préparation	Conditions opératoires	Conditions de stockage	EE %
Exemple 1	<ul style="list-style-type: none"> Injection d'éthanol 	<ul style="list-style-type: none"> Rapport de masse de VC = 0.125. T°= 50°C. t =15min. pH=7.4. λ= 243 nm. Additifs : Chitosane. 	<ul style="list-style-type: none"> T= 4°C ou 25°C. t= 40 jours. 	<ul style="list-style-type: none"> VCAF-Lip= 34.63 ± 1.80. CS-VCFA-Lip = 80.96 ± 1.23.
Exemple 2	<ul style="list-style-type: none"> Microfluidisation 	<ul style="list-style-type: none"> pH= 7 t=10min p=580 bar λ= 578 nm. 	<ul style="list-style-type: none"> T°=4 °C et 25 °C. t= 7 semaines 	<ul style="list-style-type: none"> 67
Exemple 3	<ul style="list-style-type: none"> déshydratation-Réhydratation. 	<ul style="list-style-type: none"> T°=37°c. PH <7. λ= 265nm. Additifs : AS, Sca 	<ul style="list-style-type: none"> T= 4°C t= 37jours 	<ul style="list-style-type: none"> PCS=86.33±0.73 PCS:AS=86.08±0.63 PCS:Sca=85.31±0.38

→ D'après ces résultats, on peut déduire :

- Exemple 1 : L'addition du chitosane peut améliorer efficacement l'efficacité d'encapsulation des liposomes. Au cours du processus, le chitosane se dépose sur la surface des liposomes et remplit les lacunes de la bicouche hydrophobe par diverses forces telles que la force de Van der Waals, la liaison hydrogène et les interactions

électrostatiques. Par conséquent, le processus peut améliorer l'EE des médicaments, et il peut également empêcher la fuite de médicaments des liposomes. Donc, l'enrobage en chitosane pourrait améliorer efficacement l'activité antioxydante de VCAF-Lip [92].

-Exemple 2 : Il est possible pour protéger l'acide ascorbique par encapsulation dans des liposomes préparés avec des phospholipides dérivés du lait. Grâce à la microfluidisation, il a été possible d'obtenir de petits liposomes unilamellaires, stables à un pH neutre pendant au moins 7 semaines.

Les valeurs de l'efficacité d'encapsulation ont atteint un plateau à environ 10 % de poudre riche en phospholipides de lait, et à des concentrations plus élevées, de petites multivésicules se forment. Après un stockage à 4 °C et à un pH de 7, 67 % de l'acide ascorbique encapsulé initial était encore conservé après 7 semaines. Les liposomes se sont révélés moins stables au pH 3 qu'au pH 7, et ils ont montré une perméabilité accrue lorsqu'ils étaient stockés dans des solutions sucrées à 5 % [93].

-Exemple 3 : Le système AS montré la rétention la plus élevée de VC. Dans le système PCS: AS, l'effet stabilisateur de l'ajout de l'AS pourrait être le résultat d'une rigidité accrue de la bicouche. Cela réduit le débit de l'eau, ce qui améliore la rétention de la VC. L'ajout de SCa peut avoir augmenté la rigidité de la bicouche, mais au pH de ces systèmes, le calcium est libre de se lier avec deux PC générant des zones de compactage et produisant une déshydratation des domaines intercouchent.

Pour la VC, la formulation la plus appropriée à utiliser comme véhicule est le PCS avec AS, considérant que ce système a montré une grande stabilité oxydative après pasteurisation et la plus grande rétention de VC après 72 h de dialyse. Le système PCS:SCa a montré une rétention de la VC similaire à celle du système SPC mais inférieure à celle du système PCS:AS ; il présente toutefois l'avantage nutritionnel d'apporter du calcium au produit final [94].

En général, on remarque que le meilleur taux d'encapsulation de 86% est de l'exemple 3 ; il est obtenu par la méthode de déshydratation-réhydratation. L'AS et le SCa peuvent être incorporés comme additifs de la membrane pour stabiliser la bicouche lipidique une, et cela pour fournir une rigidité croissante. De plus, le SCa et le PCS

fournissent respectivement des ions calcium et des acides gras essentiels, offrant ainsi un aliment fonctionnel. La stabilité oxydative des formulations liposomales avec ou sans vitamines a été déterminée avant et après la pasteurisation, car plus la stabilité est élevée, plus les vitamines sont protégées, ce qui permet de conserver leur activité antioxydant [94].

III.2.3. Encapsulation de la vitamine E dans des liposomes

III.2.3.1. Exemple 1. Préparation et caractérisation des liposomes complexes à l'échelle nanométrique chargés en polyphénols de thé et en vitamine E

❖ Matériels et méthodes : Les liposomes complexes chargés en polyphénols de thé (PT) et vitamine E (VE) ont été préparés par évaporation en phase inverse. En routine, une solution en phase organique était préparée en dissolvant la phosphatidylcholine de soja (PCS), le cholestérol (CS) et la vitamine E dans le chloroforme, puis était séchée dans un film mince à l'aide d'un évaporateur rotatif. Une solution en phase aqueuse contenant une solution saline tamponnée au phosphate (PBS, pH 7,4) et de la PT (polyphénols de thé) a été ajoutée goutte à goutte et les deux phases ont été brièvement mélangées par vortex pour mettre les lipides en suspension.

La suspension a été en outre soniquée dans un bain sonore pendant 10 minutes à 20°C. Le mélange a été placé sur un évaporateur rotatif, et le solvant a été éliminé sous une pression légèrement réduite (pompe à vide multifonctionnelle à circulation d'eau) jusqu'à ce que la suspension devienne un gel, suivi d'une évaporation continue sous grand vide jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène (liposome complexe PT-VE). Le solvant organique résiduel a été éliminé par N₂ pendant 20 minutes, les dispersions de liposomes PT-VE ont été diluées avec de l'eau doublement distillée pour atteindre une intensité de détection appropriée dans la plage de 5×10^4 - 1×10^6 comptes/s.

Les données d'analyse de la taille des particules ont été évaluées en utilisant la distribution de volume pour détecter même quelques grosses particules. Le potentiel zêta a été déterminé sur un analyseur de potentiel zêta Delsa 440SX à 20°C (n = 3).

L'efficacité d'encapsulation du liposome complexe PT-VE a été calculée après avoir déterminé la concentration de PT et VE piégés dans le liposome complexe PT-VE et de PT et VE non enchevêtrés dans la phase aqueuse par Analyse HPLC, respectivement.

Le liposome complexe PT-VE a été séparé de la phase aqueuse à l'aide d'une centrifugeuse à froid à 17000 tr/min pendant 30 min à 4°C. Pour l'analyse par HPLC, une colonne RP-C18 (25 cm × 46 mm, 5 m) a été utilisée.

La phase mobile était du méthanol pur, et le flux a été fixé à 1 ml/min. Le volume d'injection a été 20 µl et la détection UV était à 280 nm selon la longueur d'onde du pic d'absorption de la PT et de la VE.

VE a été éluée à 9,36 min et la courbe d'étalonnage linéaire de VE a été obtenue dans la plage de $0,203-2,030 \times 10^3$ µg/ml. Avant la mesure, un échantillon de 20 µl du liposome complexe PT-VE a été dilué à 1:50 (v/v) avec du méthanol avant le test HPLC, filtré à travers un filtre de 0,45 µm. D'autre part, la PT et la VE non piégées restant dans la phase aqueuse ont été mesurés directement par la méthode HPLC sans le prétraitement du méthanol.

Les concentrations de polyphénols du thé dans les échantillons ont été déterminées en utilisant une spectroscopie UV à 275 nm avec l'aide de la courbe d'étalonnage correspondante dans la plage de 1,58-37,92 µg/ml. Les calculs sont faits selon l'équation (III.7) [95].

III.2.3.2. Exemple 2. Préparation de liposomes de vitamine E par la méthode des couches minces et étude sur son taux de fuite

❖ Matériaux : La vitamine, le cholestérol, le chloroforme et le méthanol, un sac de dialyse, une membrane de lixiviation, un évaporateur rotatif.

❖ Préparation des liposomes de vitamine E : Les liposomes ont été préparés par la méthode des couches minces. une certaine proportion de poudre de lécithine de haute pureté, du cholestérol, de l'octadécylamine, 20 mg de vitamine E, et ont été ajoutés à un erlenmeyer de 150 ml, le mélange est dissous dans un rapport volumique 2:1 chloroforme/,on utilise une distillation sous vide pour éliminer le solvant, il a été évaporé

à l'aide d'un évaporateur dans un bain-marie à 42 ° C sous pression réduite, puis ajouté une certaine quantité de pH = 6.8 solution tampon phosphate de milieu hydraté, et mise en rotation 45min dans un bain-marie sous pression atmosphérique. Il a formé une suspension laiteuse et a été filtré à travers une membrane filtrante de 0,45 µm de diamètre, obtenu des liposomes de vitamine E, puis il a été conservé à 4°C [96].

III.2.3.3. Exemple 3. Préparation de liposomes: une nouvelle application de membranes de micro-ingénierie - étude des paramètres du processus et application à l'encapsulation de la vitamine E

❖ **Matériaux :** Les phospholipides utilisés étaient des POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) et Lipoid E80 ; ils sont obtenus à partir de la lécithine de jaune d'œuf et contiennent 82% de phosphatidyl-choline et 9% de phosphatidyl-éthanolamine. Les autres réactifs sont la VE, le cholestérol, l'acide phosphotungstique et l'éthanol à 95 %.

❖ **Méthode de préparation :** La suspension de liposomes a été préparée à l'aide d'une cellule agitée avec une membrane à disque plat placée sous l'agitateur à pales, comme l'indique la figure III.1. La vitesse de rotation des pales pouvait être contrôlée dans la plage de 200 à 1300 tr/min par la tension appliquée. Et les membranes utilisées étaient en nickel microtechnique contenant des pores cylindriques uniformes avec une de 5, 10, 20 ou 40 mm de diamètre, disposés à un espacement uniforme de 80 ou 200 mm.

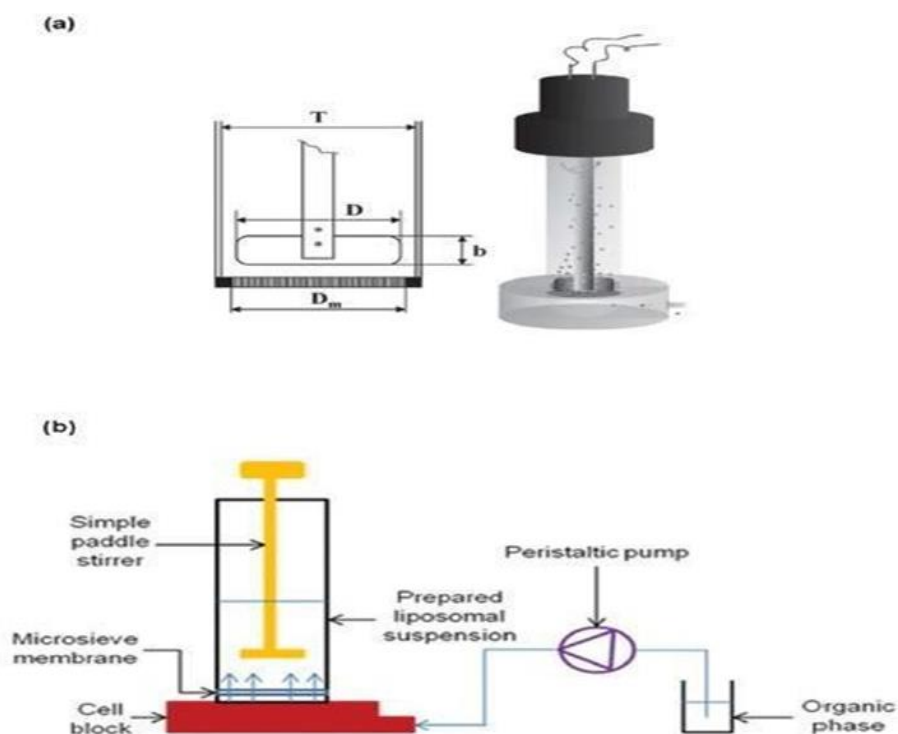


Figure III-1: Illustration schématique de la cellule agitée avec un simple agitateur à pales au-dessus d'une membrane à disque plat. b) Schéma du dispositif expérimental [97].

Les quantités requises de phospholipides (20 ou 50 mg.ml^{-1} Lipoid E80 ou POPC) et un stabilisateur (cholestérol, acide stéarique ou beurre de cacao, 25% p/p sur la base de la matière sèche phospholipidique) ont été dissous dans de l'éthanol. La phase organique a été injectée à travers la membrane au moyen d'une pompe péristaltique. La vitesse d'agitation était comprise entre 200 et 1300 tr/min , ce qui a généré une contrainte de cisaillement sur la surface de la membrane entre $0,80$ et $15,5 \text{ Pa}$. La cellule a été remplie de 20 à 60 ml d'eau ultra-pure. La formation spontanée de liposomes a commencé dès que la phase organique a été mise en contact avec la phase aqueuse. La suspension liposomale a été maintenue sous agitation pendant 15 minutes et finalement la suspension a été recueillie et l'éthanol a été éliminé par évaporation sous pression réduite.

Après chaque expérience, la membrane a été soniquée dans éthanol pendant 1 h , puis trempage dans une solution à base de siloxane (agent mouillant) pendant 30 minutes afin d'augmenter l'hydrophilie de la surface de la membrane. La taille moyenne des particules a été exprimée par le diamètre moyen en nombre, et la polydispersité par le

coefficient de variation, $CV = (\delta/d_{av}) \times 100$, δ c'est l'écart-type des diamètres des particules dans une suspension. Le potentiel zêta était mesuré à l'aide d'un Zetasizer Nano-series de Malvern et utilisée pour prédire la stabilité colloïdale de la suspension de liposomes. Les mesures ont été répétées au moins trois fois après la dilution de l'échantillon dans l'eau. Le potentiel zêta a été calculé à partir de la mobilité électrophorétique en utilisant l'équation de Helmholtz-Smoluchowski [97]

III.2.3.4. Etude comparative

Tableau III-2: Etude comparative de l'encapsulation de la vitamine E [95, 96, 97].

Exemples	Méthode de Préparation	Conditions opératoires	Conditions de stockage	EE%
Exemple 1	• Evaporation en phase inverse	<ul style="list-style-type: none"> • $M_{VE} = 15$ mg • PH = 7.4 • $T^{\circ} = 20$ °c • t = 10 min • $\lambda = 280$nm 	<ul style="list-style-type: none"> • T= 4 C° • t= 2 mois 	• 94.05±3.45
Exemple 2	• Couches minces	<ul style="list-style-type: none"> • $M_{VE} = 20$ mg • PH = 6.8 • $T^{\circ} = 42$ °c • t = 45 min • $\lambda = 290$nm 	<ul style="list-style-type: none"> • T= 3C° • t= 10 mois 	• 76.17
Exemple 3	• Injection d'éthanol	<ul style="list-style-type: none"> • $M_{VE} = 20$mg • $T^{\circ} = 25$°c • t=10min • $\lambda = 292$nm 	<ul style="list-style-type: none"> • T= 5±3°c • t=3 mois 	• 99.87±1.14

➔ D'après le tableau III.2, on constate que :

- Exemple 1 : L'efficacité de piégeage de VE était de $(94.05 \pm 3.45)\%$, l'augmentation de la quantité de VE a entraîné la diminution de l'efficacité de piégeage de VE, en raison de la limitation de la capacité d'encapsulation des liposomes. Les résultats indiquent que le liposome complexe offre une nouvelle approche pour piéger le médicament soluble dans

l'eau et le médicament peu soluble, une protection liposomique interne, une efficacité d'encapsulation élevée du médicament et une pénétration transdermique soutenue [95].

- Exemple 2 : cet exemple adopte la méthode du film mince pour préparer les liposomes de vitamine E, l'efficacité de piégeage des liposomes de vitamine E a été déterminée par la méthode de dialyse inverse. La vitamine E qui est encapsulée par la lécithine de soja peut améliorer la stabilité, il peut favoriser l'absorption percutanée de la vitamine E, et a pour effet une libération lente. Cette technique permet un bon taux d'encapsulation et un faible taux de fuite [96].

- Exemple 3 : Dans cette étude, l'efficacité élevée d'encapsulation de la vitamine E dans les liposomes ($99,87 \pm 1,14\%$) était probablement due à la lipophilie élevée du médicament. Ce résultat était en accord avec ceux rapportés dans la littérature. Marsanasco ont rapporté que le pourcentage de vitamine E encapsulée dans les liposomes préparés par la méthode de Bangham était égal à $98,13 \pm 0,02\%$ [97].

En général, on peut déduire que l'efficacité de piégeage de VE était principalement influencée par la quantité initiale de VE, comme l'indique le tableau III.2. Évidemment, l'augmentation de la quantité de VE a entraîné la diminution de l'efficacité de piégeage de VE, en raison de la limitation de la capacité d'encapsulation des liposomes. En outre, le procédé d'injection d'éthanol conventionnelle a offert l'efficacité de piégeage de VE la plus importante.

III.2.4. Encapsulation de la quercétine dans des liposomes

III.2.4.1. Exemple 1. Liposomes à double charge encapsulant la quercétine et la quercétine bêta-cyclodextrine (β -CD) complexes : Préparation, caractérisation et évaluation

- ❖ Matériaux : La quercétine, la phosphatidylcholine, le cholestérol, β -CD.
- ❖ Préparation des liposomes chargés de quercétine : Vésicules multilamellaires constituées d'un mélange de lipides (phosphatidylcholine et cholestérol dans des proportions différentes) ont été préparés en fonction de la technique de l'évaporation de la couche mince utilisant 2:1 v/v de chloroforme:méthanol.

En bref, une solution méthanolique de quercétine a été ajoutée à la solution lipidique dans le chloroforme. Les solvants ont été éliminés sous pression réduite dans un

évaporateur rotatif, ce qui a permis d'obtenir une fine pellicule de lipides séchés sur la paroi du flacon. L'évaporation a été poursuivie pendant 1 h. Le film a ensuite été hydraté par l'ajout d'un tampon (pH 5,7) sous agitation vigoureuse afin d'agir sur la formation des vésicules. La suspension laiteuse contenant des vésicules multilamellaires a encore été réduite en taille dans un sonicateur à sonde.

❖ Préparation de liposomes chargés de quercétine et de Quercétine- β -CD complexes (liposomes à double charge) : Essentiellement, la même méthode de Bangham, a été utilisée pour préparer des liposomes à double charge. Cependant, tout en hydratant le film lipidique avec un tampon, les complexes de Quercetin- β -CD ont été dissous dans le tampon puis incorporés dans la phase aqueuse des liposomes. Ainsi, la quercétine était "doublement" chargée dans les bicouches lipidiques ainsi que dans le compartiment aqueux des liposomes. Ce double chargement a été confirmé à l'aide du CBD (Calorimétrie à balayage différentiel) conformément au protocole indiqué précédemment.

La charge en médicaments (DL%) a été calculé selon l'équation (III.9).

Le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique du médicament testé/standard a été calculé par l'équation (III.10) [98].

III.2.4.2. Exemple 2. Effet protecteur des liposomes encapsulés en quercétine et rutine sur le stress oxydatif induit

❖ Matériaux : La quercétine (Q), la rutine (R), l'éthanol, DOPC (1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine), DOPE (1,2-di- (9Z-octadécénoyl) -sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine), DOPA (1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphate) et DOTAP (1,2-dioléoyl-3-triméthylammoniumpropane).

❖ Préparation de liposomes chargés de quercétine et de rutine : DOPC / DOPE, DOPE / DOPA et DOTAP / DOPE ont été préparés à Rapport 1: 1 M avec une concentration lipidique totale finale de 10^{-2} M. Des liposomes chargés de quercétine et de rutine ont été préparés pour obtenir une Rapport 1: 1 M entre les lipides totaux et les antioxydants. Les liposomes ont été préparés dans un flacon à fond rond en mélangeant des quantités appropriées de solutions mères, qui étaient 4×10^{-2} M en chloroforme pour

les lipides et 2×10^{-2} M dans l'éthanol pour Q et R. A sec, un film lipidique (avec et sans antioxydants) a été obtenu par évaporation du solvant sous vide pendant une nuit. Réhydrater avec le grade Milli-Q H₂O a donné une dispersion multilamellaire. Au vortex, des vésicules multilamellaires ont été obtenues, qui ont été puis soumis à huit cycles de gel/dégel. Cette méthode a amélioré l'homogénéité de la distribution granulométrique dans la suspension finale. Les liposomes ont ensuite été réduits en taille et convertis en vésicules unilamellaires par extrusion à travers des membranes en polycarbonate de 100 nm. Tous les liposomes ont été conservés à 4 °C.

❖ Matériaux : Cellulose (microcristalline, poudre), épichlorhydrine (P99.0%, ECH), La phosphatidylcholine (à partir de jaune d'oeuf, P 60%, oeuf PC), cholestérol (P99.0%, Chol), acide oléique (P99 0.0%, AO), la quercétine et la rutine. Céramide-3 (DS-Ceramide Y30). Des solvants tels que le 1,3-butylène glycol, le méthanol, l'éthanol, le chloroforme et l'acétone [99].

III.2.4.3. Exemple 3. Préparation de liposomes céramides chargés de la quercétine et de la rutine

❖ Matériaux : Cellulose (microcristalline, poudre), (\pm) -épichlorhydrine (P99.0%, ECH), La phosphatidylcholine (à partir de jaune d'oeuf, P 60%, oeuf PC), cholestérol (P99.0%, Chol), acide oléique (P99 0.0%, AO), la quercétine et la rutine. Céramide-3 (DS-Ceramide Y30). Des solvants tels que le 1,3-butylène glycol, le méthanol, l'éthanol, le chloroforme et l'acétone.

❖ Préparation de liposomes céramides : Les liposomes ont été préparés en utilisant la méthode d'hydratation en couche mince. OEuf PC, Cer, Chol, AO, quercétine et rutine ont été dissous dans 25 ml d'un mélange chloroforme-méthanol à un rapport molaire (4:1). Les mélanges ont été évaporés dans un évaporateur pour éliminer les traces de solvant et également pour former un film. Pour éviter la séparation de la membrane phospholipidique par hydrolyse, le film a été hydraté avec un tampon phosphate (pH 9) pendant 1h à une température supérieure à la température de transition lipidique, et le produit a été maintenu sous forme de solution liposomique à pH 7.0 ± 0.5 . La suspension

de vésicules a ensuite été homogénéisée à l'aide d'un sonicateur à sonde, passé à travers un filtre de 0.45 μm et conservé jusqu'à son utilisation.

❖ Test de stabilité des liposomes céramides : La stabilité des liposomes céramides non chargés et de la quercétine ou de la rutine les liposomes céramides chargés a été évaluée en mesurant la taille et la distribution moyennes des particules. Les mesures sont faites en utilisant un analyseur de taille de particules à 25 °C, avec un angle de diffusion de 165° en utilisant un laser Argon. La taille moyenne des particules a été déterminée par analyse cumulative et la distribution a été résolue à l'aide de la méthode Contin.

❖ Efficacité d'encapsulation de la quercétine ou de la rutine dans la céramide : La quercétine ou la rutine déchargée a été récupérée à partir d'un volume de 2 ml de solution liposomique en passant la solution liposomique dans un Filtre 0.45 μm , et dégradation de la solution avec 15 ml d'éthanol. L'éthanol a été évaporé dans un évaporateur et la quercétine ou la rutine ont ensuite été redissoutes dans 2 ml d'éthanol. La concentration de la quercétine et de rutine a été déterminée par HPLC.

❖ Préparation d'hydrogel de cellulose : La poudre de cellulose (0.5 g) était dispersé dans 13.45 ml d'une solution de NaOH à 9% à température ambiante, et l'échantillon a été dissous par congélation à 70 °C pendant 24 h. Après décongélation, 11.55 ml d'eau distillée ont été ajoutés à la cellulose solution, suivi de l'ajout goutte à goutte de 3 ml d'ECH (épichlorhydrine), en remuant continuellement. La réaction de réticulation a ensuite été réalisée à 80 °C pendant 8h. Une fois la réaction terminée, le produit d'hydrogel de cellulose a été lavé avec de l'eau distillée pour éliminer le NaOH et le NaCl qui s'étaient formés, suivi d'un lavage à l'acétone pour éliminer l'excès d'ECH. Le solvant a été retiré de l'échantillon par centrifugation, et l'échantillon a été séché sous vide à température ambiante avant stockage.

❖ Préparation d'un complexe hydrogel liposome-cellulose céramide : Le complexe a été préparé en incorporant 5 ml de céramide solution de liposomes dans 0.1 g d'hydrogel de cellulose séché. Le liposome céramide a pénétré et a été absorbé dans la matrice d'hydrogel gonflé.

❖ Incorporer l'efficacité du liposome céramide dans la cellulose hydrogel et degré d'absorption d'eau de l'hydrogel de cellulose : L'hydrogel de cellulose séché (0.1 g) a été gonflé dans 5 ml d'une solution de liposome de céramide à 37°C pendant 24h afin de mesurer l'efficacité d'incorporation. Pour évaluer la quantité de liposome incorporé, la concentration de quercétine ou de rutine dans les liposomes a été déterminée, et pour cela, les solutions de liposomes avant et après incorporation ont été analysées par HPLC. L'équation (III.11) a été utilisée pour calculer la concentration de quercétine ou rutine dans les liposomes incorporés dans des matrices d'hydrogel de cellulose.

Le degré d'absorption d'eau dans l'hydrogel de cellulose était évalué pour toutes les formulations de liposomes céramides.

Le degré d'absorption de l'eau est connu pour dépendre de la capacité de gonflement de l'hydrogel, et indique le volume d'eau absorbable par rapport au poids d'hydrogel séché. Pour vérifier si le degré de l'absorption d'eau dans l'hydrogel était similaire dans toutes les formulations de liposomes, 0.1 g d'hydrogel séché était gonflé dans 5 ml de liposome solution à 37°C pendant 24h. Des échantillons ont été périodiquement prélevés à la surface de la solution d'hydrogel et pesés immédiatement. L'équation (III.12) a été utilisée pour calculer le degré d'absorption d'eau dans l'hydrogel.

❖ Évaluation de la perméation cutanée et du comportement de libération de la quercétine : L'équation (III.13), représentant le modèle de Korsmeyer Peppas, a été utilisée pour étudier le mécanisme de diffusion de la quercétine ou de la rutine dans la peau après la libération des liposomes dans le système hydrogel [100].

III.2.4.4. Etude comparative

Tableau III-3: Etude comparative de l'encapsulation de la quercétine [98, 99, 100].

Exemples	Méthode de préparation	Conditions opératoires	Conditions de stockage	EE %
Exemple 1	<ul style="list-style-type: none"> Evaporation du solvant sous vide. 	<ul style="list-style-type: none"> M_{qur} = 60 mg M_{rutine} = 0.125 mg T° = 16°C t = 1h 	<ul style="list-style-type: none"> T° = 4 ± 1 ° C t = 3mois 	<ul style="list-style-type: none"> DOPC/DOPE + Q = 18.9 ± 5.3 DOPE/DO PA + Q = 14.2 ± 1.9 DOPE/DO TAP + Q = 15.6 ± 1.5
Exemple 2	<ul style="list-style-type: none"> Hydratation en couches minces 	<ul style="list-style-type: none"> PH=9 T°=25°C t=1h pH=7.4 Vcéramide =5 ml 	<ul style="list-style-type: none"> t= plus de 3 semaines 	<ul style="list-style-type: none"> 70.00±2.61
Exemple 3	<ul style="list-style-type: none"> Hydratation en couches minces 	<ul style="list-style-type: none"> M_{qur} = 5mg pH= 5.7 t= 2h (HPLC) 	/	<ul style="list-style-type: none"> 85.73 ± 0.6 90.68 ± 0.51

→ D'après le tableau récapitulatif montré ci-dessus, on constate que :

- Exemple 1 : L'efficacité d'encapsulation était également très similaire en changeant la formulation des lipides et les valeurs de EE% démontrent que la quercétine étaient chargés en liposomes zwitterioniques, anioniques et cationiques avec une faible efficacité [98].

- Exemple 2 : L'efficacité d'encapsulation de la quercétine était plus grande lors de l'utilisation d'un rapport molaire de 0.5 de Chol par rapport à 1. En termes d'efficacité d'encapsulation, la formation optimale de quercétine était 70.00 ± 2.61. Ce résultat a démontré que la quercétine était moins efficace pour la pénétration entre les membranes lipidiques du liposome [99].

- Exemple 3 : EE% pouvait atteindre jusqu'à $90.68 \pm 0.51\%$ pour les liposomes à double charge. Les valeurs de piégeage étaient encore liées au rapport des lipides utilisés dans le système. Maximum de médicament a été encapsulé par le liposome à double charge.

On remarque que le meilleur taux d'encapsulation c'était dans l'exemple 3 par la méthode de préparation (Hydratation en couche mince). Cette structure permet aux liposomes d'encapsuler des matériaux hydrophiles et lipophiles et libérer plus de médicament que les liposomes encapsulant le médicament ordinaire. La libération de médicament étant liée à l'efficacité de piégeage et aussi à la masse de quercétine [100].

III.3. Conclusion

On a étudié plusieurs exemples sur trois antioxydants (VC, VE, quercétine). On conclut que le taux d'encapsulation dépend de l'antioxydant utilisé et les conditions opératoires de chaque expérience.

Les facteurs qui semblent être les plus influençant sont : les additifs utilisés, la quantité de l'antioxydant à encapsuler, et la méthode de préparation utilisé.

Conclusion

Conclusion générale

Les liposomes sont des vésicules lipidiques biocompatibles, biodégradables, non toxiques et non immunogènes. Ils sont couramment utilisés pour assurer une libération contrôlée des principes actifs, améliorer leur pharmacocinétique et diminuer leur toxicité. En plus, ils sont considérés lors de la vectorisation des agents anticancéreux. Ils sont étudiés pour améliorer la solubilité aqueuse, la stabilité chimique et les activités biologiques.

Dans ce travail, nous avons pu montrer que les meilleurs liposomes en termes de taux d'encapsulation de la vitamine C, de la vitamine E et de la quercétine ont été obtenus grâce aux conditions suivantes: additifs, masse encapsulée et selon le mode de préparation également.

Nous pouvons conclure que les liposomes peuvent être considérés comme les cellules biologiques artificielles les plus simples, qui ont de grandes applications potentielles dans l'administration de médicaments.

La vectorisation efficace pourra un jour révolutionner l'arsenal thérapeutique en donnant aux principes actifs existants des champs d'application élargis, une efficacité plus élevée et moins d'effets indésirables.

Références bibliographiques

Bibliographie

- [1] G.Haile, L'utilisation des liposomes comme vecteurs médicamenteux, Thèse de doctorat, Université de Picardie Jules Verne, France, 2017.
- [2] K.S.Anil, S.Bhawana, S.Renu, S.L.Rawat, A study on liposomes: Classification techniques and importance, International Journal of Research in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Vol. 2, 2017, 55-60.
- [3] A.Akbarzadeh, R.R.Sadabady, S.Davaran, S.W. Joo, N.Zarghami, Y.Hanifehpour, M.Samiei, M.Kouhi, K.N.Koshki, Liposome: classification, preparation, and applications, Journal of Nanoscale Research Letters, Vol. 8, 2013, 2-9.
- [4] J.S.Dua, A.C.Rana, A.K.Bhandari, Liposome: methods of preparation and applications, International Journal of Pharmaceutical Studies and Research, Vol. 3, 2012, 14-20.
- [5] M.Chabaud, Utilisations des antioxydants en hépatologie chez les carnivores domestiques, Thèse de doctorat, Ecole nationale vétérinaire de Lyon, Université Claude-Bernard, Lyon, 2007.
- [6] L.Daoud, D.Ouyahia, Préparation, Optimisation et caractérisation des liposomes de vitamine E, Faculté de Technologie, Université A. Mira, Bejaia, 2016.
- [7] K.V.Sharma, D.N.Mishra, A.K.Sharma, B.Srivastava, Liposomes: Present Prospective and Future Challenges, International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research, Vol. 1, 2010, 7-16.
- [8] A.Wagner, K.Vorauer, Liposome Technology for Industrial Purposes, Journal of Drug Delivery, Vol. 2011, 2010, 9
- [9] M.M.Degraef, Les liposomes : aspects technologiques et pharmaceutiques radiomarquage des liposomes pour le ciblage en radiomunothérapie, Thèse de doctorat, Faculté de pharmacie, Université de Nantes, France, 2004.
- [10] C. Sebaaly, Caractérisation des nanostructures et évaluation de leur effet antioxydant, Thèse de doctorat, Ecole doctorale de chimie de Lyon-Ecole doctorale des sciences et technologie, Université Claude Bernard Lyon-Université libanaise, France, 2016.
- [11] J.Li, X.Wang, T.Zhang, C.Wang, Z.Huang, X.Luo, Y.Deng, A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems, Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 10, 2015, 81-98.
- [12] A.Chastagnier, Les liposomes en thérapie orale et parentérale, Thèse de doctorat, Faculté de pharmacie, Université Joseph Fourier, France, 1998.
- [13] D.C.Essaka, Reversed-Phase HPLC Determination of Cholesterol in Food Items, East Tennessee State University, USA, 2007.

- [14] M.Jahadi, K.Khosravi-Darani, M.R.Ehsani, T.Pimentel, A.Gomes, M.R.Mozafari, Accelerating ripening of Iranian white brined cheeses using liposome encapsulated and free proteinases, *Journal of Open Access*, Volume. 10, 2020, 4966 – 4971.
- [15] C.Guilleux, Thèse prise en charge de l'argent dissous et nanoparticulaire par des liposomes et par une chaîne trophique simple, Thèse de doctorat, Institut national de la recherche scientifique, Université du Québec, Canada, 2017.
- [16] B.Maherani, Encapsulation and Targeting of Biofunctional Molecules in Nanoliposomes: Study of Physico-Chemical Properties and Mechanisms of Transfer through Liposome Membrane, Thèse de doctorat, École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires, Universities Lorraine, France, 2018.
- [17] C.Beaulac, Elaboration et évaluation de chémoliposomes à action bactéricide anti-*Pseudomonas aeruginosa* chez un modèle animal d'infection chronique, Thèse de doctorat, Université du Québec, Canada, 1995.
- [18] J.Faucon, P.Meleard, Polymorphisme des lipides Contraintes stériques et élastiques Dans « Liposomes », Vol. 1, 1993, 7-36.
- [19] W.Chen, F.Witos, Determination of the main phase transition temperature of phospholipids by nanoplasmonic detection, *Journal of A nature research*, Vol. 8, 2018, 2045-2322.
- [20] M.Patrick, Les liposomes en biologie cellulaire et pharmacologie, Edition INSBRM, France, 1987.
- [21] J.Guery, Emulsions doubles cristallisables : stabilité, encapsulation et relargage, Thèse de doctorat, Ecole doctorale de Physique et Chimie des Matériaux, Université Paris VI, France, 2006.
- [22] P.Couvreur, Les nanotechnologies à l'assaut du cancer, *Journal de CNRS*, N°237, P 20, France, 2009.
- [23] C.Martin, D.Woodle, Sterically stabilized liposomes, *Journal of Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1113, 1992, 171 – 199.
- [24] C.Al.Sabbagh, Liposomes thermosensibles furtifs pour l'administration du 5-Fluorouracile déclenchée par ultrasons, Thèse de doctorat, Université Paris-Sud 11, France, 2014.
- [25] M.Acker, C.Denis, A.Desplanques, Le combat des liposomes face aux cancers, Elèves lycéens de La Croix Blanche à Bondues, Réalisé en première, promotion 2015-2016.
- [26] S.Kalepu, Liposomal drug delivery system, *International Journal of Drug Development & Research*, Vol. 5, 2013, 62-75.
- [27] M.Marsanasco, B.Piotrkowski, V.Calabró, S.V.Alonso, N.S.Chiamaroni, Bioactive constituents in liposomes incorporated in orange juice as new functional food: thermal stability, *Journal of rheological and organoleptic properties*, Vol. 52, 2015, 7828–7838.

- [28] J.F.Boelter, A.Brandelli, Innovative bionanocomposite films of edible proteins containing liposome-encapsulated nisin and halloysitenanoclay, *Journal of colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 145, 2016, 740-747.
- [29] D.Zucker, D.Marcus, Y.Barenholz, A.Goldblum, *Journal of controlled release, Liposome drugs' loading efficiency: A working model based on loading conditions and drug's 53 physicochemical properties*, Vol. 139, 2009, 73-80.
- [30] A.Gujrati, A.Sharma, D.Pandit, S.C.Mahajan, Review on liposomal drug delivery system and it's applications, *World Journal of Pharmaceutical Research*, Vol. 8, 2019, 1375-1391.
- [31] A.Laouini, C.Jaafar-Maalej, I.Limaye, S.Sfar, C.Charcosset, H.Fessi, *Journal of Colloid Science and Biotechnology, Preparation Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art*, Vol. 1, 2012, 147–168.
- [32] K.S.Ahmed, S.A.Hussein, A.H.Ali, S.A.Korma, Q.Lipeng, C.Jinghua, Composition, characterization, preparation, and recent innovation in clinical applications, *Journal of Drug Targeting*, Vol. 27, 2018, 742-761.
- [33] CH.Dwivedi, SH.Verma, Review on Preparation and Characterization of Liposomes with Application, *Journal of scientific and innovative research*, Vol. 2, 2013, 2320-4818.
- [34] A.Naeem, *Liposomes: A novel drug delivery system*, Hamdard University, Faculty of Pharmacy, Pakistan, 2017.
- [35] S.Rabeau, Thèse Etude d'un procédé continu de microencapsulation basé sur un micromélangeur, Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Lorraine, Université de lorraine, France, 2009.
- [36] A.M.Allegrezza, Modulation of Antitumor Immunity by the Mek inhibitor Trametinib: Implications for Targeted Therapy of Cancer, Thèse de doctorat, University of Pennsylvania, États-Unis, 2016.
- [37] L.Sercombe, T.Veerati, F.Moheimani, S.Y.Wu, A.K.Sood, S.Hua, Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery, *Journal of Frontiers in Pharmacology*, Vol. 6, 2015, 1-13.
- [38] T.Schmitz, V.Colant, *Les liposomes : Vecteurs de principes actifs au cœur même des cellules*, Editions Tredanie, France, 2008.
- [39] W.Qin, G.Huang, Z.Chen, Y. Zhang, Nanomaterials in Targeting Cancer Stem Cells for Cancer Therapy, *Journal of Frontiers in pharmacology*, Vol. 8, 2017, 1-15.
- [40] Y.Smith, B.Pharm, Utilisations de liposome, *Journal of News-Medical*, Vol. 23, 2018, 1.
- [41] F.Piegay, *Les liposomes dans l'administration intranasale de médicament et de vaccin*, *Journal de Midifabs*, Vol. 1, 2003, 17-26.
- [42] A.Lorin, C.Flore, A.Thomas, R.Brasseur, *Les liposomes : description, fabrication et*

applications, Journal universitaire de Centre de Biophysique moléculaire numérique de Gembloux., Vol. 8, 2004, 163–176.

[43] K.Benchalal, GH.Hani, Evaluation de l'activité Antioxydant de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* in vivo, Faculté de Technologie, Université Abderrahmane MIRA de Bejaia, Alger, 2012.

[44] H.Ghaffour, Synthèse de quelques hybrides antioxydants-peptidomimétiques, Faculté des sciences, Université Abou bakrbelkaid de Tlemcen, Alger, 2015.

[45] F.Oubane, Les Radicaux libres et complications cutanées, Thèse de doctorat, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V, Maroc, 2017.

[46] B.Halliwell, J.M.Guttreridge, Free radicals in biology and medicine, Fifth Edition, England, 2015.

[47] C. K.Ramonatxo, Oxygène stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires, Journal de Nutrition clinique et métabolisme EA701, Vol. 20, 2006, 165 – 177.

[48] J. Haleng, J.Pincemail, J.O.Defraigne, C.Charlier, J.P.Chapelle, Le stress oxydant, Journal de Med Service de Biologie clinique, Vol. 62, 2007, 628-638.

[49] H.Christiane, La peau et ses alternatives, Société de Pharmaco-Toxicologie Cellulaire, Edition SPTC, France, 2011.

[50] M.D.Mercan, Oxidative Stress, Journal of National Heart, Vol. 408, 2000, 239-247.

[51] S.E.Fadhila, Fonctionnalisation de surfaces d'électrodes par un film de poly (3,4-éthylènedioxythiophène) PEDOT pour l'élaboration de microcapteur spécifique des acides ascorbique et urique : application à l'étude des propriétés antioxydantes du sérum sanguin, Thèse de doctorat, Université de Toulouse, Paris, 2011.

[52] K. Azzoug, D.Babouri, Etude de l'activité anti-radicalaire des extraits aqueux de quatre plantes médicinales locales, Faculté de technologie, Université Abderrahmane MIRA de Bejaia, Alger, 2012.

[53] M.Boughellout, T.Amara, Les effets protecteurs des plants médicinales contre le stress oxydant, Université des Frères Mentouri Constantine, Alger, 2014.

[54] C. Migdal, Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant, Article universitaire Laboratoire de recherche dermatologique, Volume 27, 2011, 405 – 412.

[55] S.Gheddouchi, Etude des dysfonctionnements lipidiques et du statut redox au cours du syndrome coronarien, Thèse de doctorat, Faculté Sciences de la Nature et de la Vie, Université Abou bekrbelkaid de Tlemcen, Alger, 2018.

[56] L. Boucelha, R. Djebbar, Les espèces réactives d'oxygène (ROS), Université des Sciences et

de la Technologie Houari Boumediene (USTHB), Alger, 2014.

[57] F.C.Mary, Développement de nouveaux agents anti-radicalaires de type nitroxyde et nitronéutrisables comme sondes et agents thérapeutiques, Thèse de doctorat, l'Université d'Avignon, France, 2011.

[58] J. Pescheux, L'implication de la vitamine C dans la thérapeutique parodontale, Thèse de doctorat, Faculté de chirurgie dentaire, Université Toulouse III – Paul Sabatier, France, 2016.

[59] H.Moulet, Thèse Mort cellulaire initiée par l'oxygène Singulet : mise en évidence d'effets à longue portée, Thèse de doctorat, Université de Lille, France, 2019.

[60] A.Nomzikof, R.Santus, N.Giraud, l'oxygène Singulet dans les eaux de mer, Journal de CNEXO, Volume. 14, 1982, 87-96.

[61] R. Barouki, Stress oxydant et vieillissement, Journal de médecine sciences, Vol. 22, 2006, 266–272.

[62] F. Bonnot, Mécanisme de transfert d'électrons vers le site actif et rôle de la lysine 48 dans la catalyse, Thèse de Doctorat, Faculté de Chimie et Sciences du Vivant, Université Joseph Fourier-Grenoble, France, 2009.

[63] K.Mtikai, W.Oka, Kinetic Study Of Free-Radical-Scavenging Action Of Flavonoids In Homogeneous And Aqueous Triton X-100 Micellar Solutions, Journal of Physical Chemistry, Vol. 101, 1997, 3746-3753.

[64] J.Delattre, J.L.Beaudeau, D.B.Rousselot. Radicaux libres et stress oxydant : Aspects biologiques et pathologiques, Edition Tec & Doc Lavoisier, France, 2007.

[65] A.Wilson, L.Salamatian, Les Radicaux Libres : Une question d'équilibre, Thèse de doctorat, Université de Versailles Saint Quentin en Yvelines, France, 2003.

[66] N.Belkheiri, Dérives phénoliques a activités antiathérogènes, Thèse de doctorat, Ecole doctorale: Sciences de la matière, Université Toulouse III - Paul Sabatier, France, 2010.

[67] C.Migdal, M.Serres, Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant, Article universitaire Laboratoire de recherche dermatologique, Vol. 27, 2011, 408.

[68] M.Krim, L'importance des antioxydants (Gingembre) dans la réduction des effets toxiques induits par les chromates chez les rats, Thèse de doctorat, Faculté des sciences, Université Badji Mokhtar, Annaba, 2014.

[69] T.Desmier, Les Antioxydants de nos jours : Définition et applications, Thèse de doctorat, Faculté de Pharmacie, Université de Limoges, France, 2016.

[70] K.Maurent, Synthèse de composés phénoliques de type diarylheptanoïde : évaluation de leurs propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires, Thèse de doctorat, Université Toulouse 3 Paul Sabatier, France, 2017.

- [71] Z.Belmokhtar, Identification et caractérisation des molécules du métabolisme secondaire de *Retamamonosperma*, Thèse de doctorat, Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed Boudiaf, Alger, 2015.
- [72] A.Guilouty, Plantes médicinales et antioxydants, Université Toulouse III Paul Sabatier, France, 2016.
- [73] J.Kaushal, S.G.Singh, A.Raina, S.K.Arya, Catalase enzyme: Application in bioremediation and food industry, *Journal of international society of biocatalysis and agricultural biotechnology Kaushal*, Vol. 16, 2018, 192–199.
- [74] M.Valko, C.Rhodes, J.Moncol, M.Izakovic, M.Mazur, Metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Journal of Chemico-Biological Interactions Free radicals* Vol. 160, 2006, 1–40.
- [75] A.K.Masood, S.Faisal, M.K.Mushahid, A.Nadeem, M.Siddiqui, M.Owais, Binding of bilirubin with albumin-coupled liposomes: implications in the treatment of jaundice, *Journal of Biochimica et BiophysicaActa (BBA)*, Vol. 1564, 2002, 219–226.
- [76] B.Garait, Le stress oxydant induit par voie métabolique ou par voie gazeuse et effet de la GliSODin, Thèse doctorat, Faculté de sciences et technologie, Université Joseph Fourier, France, 2006.
- [77] J.P.Reichheld, E.Meyer, M.Khafif, G.Bonnard, Y.Meyer, *Journal of FEBS Letters*, AtNTRB is the major mitochondrial thioredoxin reductase in *Arabidopsis thaliana*, Vol. 579, 2004, 337–342.
- [78] S.Kessoum, Activité antioxydante des polyphénols d'*Artemisia herba alba*, Faculté de Technologie, Université Abderrahmane MIRA de Bejaia, Alger, 2014.
- [79] A.Dwassay, Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant : aspects biologique et, Thèse de doctorat, Faculté de médecine et de pharmacie, Université Mohammed V de Souissi, Maroc, 2014.
- [80] K.Chira, J.H.Suh, C.Saucier, P.L.Teissèdre, Les polyphénols du raisin, *Journal of Phytothérapie*, Vol. 6, 2018, 75-82.
- [81] M.Badeau, Effet d'un antioxydant le tempol sur les actions métaboliques et vasculaires de l'insuline chez le rat insulino-résistant avec un surplus de poids, Faculté des études supérieures de l'Université Laval, Canada, 2006.
- [82] A.F.Soares, Effets du stress oxydant sur le fonctionnement des adipocytes : Adiponectine et prostaglandines, Thèse de doctorat, L'institut national des sciences appliquées, Lyon, 2005.
- [83] H.Bensmaine, Etude de l'activité antioxydante de l'*Annonacherimola*, Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem, 2019.

- [84] F.Zakkad, Etude phytochimique et évaluation de quelques propriétés biologiques de trois espèces de l'Euphorbia, Thèse de doctorat, Faculté des Sciences, Université Badji Mokhtar, Annaba, 2017.
- [85] A.Bouchachia, Mesure de la vitamine C et de l'activité anti-radicalaire et anti-oxydante des citroflavonoïdes de l'écorce du citron, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Abou bekrbelkaid, Tlemcen, 2017.
- [86] A.Massart, Supplémentation en oméga 3 et antioxydant et stress oxydant au cours d'un entraînement de judo, Thèse de doctorat, Université d'Orléans, 2011.
- [87] A.Favier, Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. Journal d'Actualité Chimique, Vol. 51, 2003, 108-15.
- [88] M.Boutamani, Etude de la variation du rendement et de la composition chimique du curcuma longa et myristicafragrans en fonction du temps et de la technique utilisée, Université des sciences et de la technologie Houari Boumediene, Alger, 2013.
- [89] A.Abdellaoui, Synthèse et étude de l'activitéantioxydant de structures bipyrazoliques, Faculté des Sciences, Université Abou Bekr-Belkaïd de Tlemcen, Alger, 2016.
- [90] H.Talbi, A.Boumaza, K.E.mostafa, J.Talbi, A.Hilali, Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la Nigellasativa L, Journal de JMESCEN, Vol. 6, 2015, 1111-1117.
- [91] A.G.Michalowska, J.Korczak, Oxygen radical absorbance capacity of selected food products, Journal of ActaSci Pol Technol Aliment, Vol. 12, 2013, 175-180.
- [92] J.Zhen, W.Xiudong, Y.Yuting , X.Jingxin, M.Yanan, Preparation and evaluation of a chitosan-coated antioxidant liposome containing vitamin C and folic acid, Journal of Microencapsulation, Vol. 265, 2018, 1464-5246.
- [93] B.Farhang, Y.Kakuda, M.Corredig, Encapsulation of ascorbic acid in liposomes prepared with milk fat globule membrane-derived phospholipids, Journal of Dairy Sci & Technol, Vol. 92, 2012, 353–366.
- [94] M.Marsanasco, A.L.Márquez, J. R.Wagner, S.d.V.Alonso, N.S.Chiamoni, Liposomes as vehicles for vitamins E and C: An alternative to fortify orange juice and offer vitamin C protection after heat treatment, Journal of Food Research International, Vol. 44, 2011, 3039–3046.
- [95] Q.H.Ma, Y.Z.Kuang, X.Z.Hao, N.Gu, Preparation and Characterization of Tea Polyphenols and Vitamin E Loaded Nanoscale Complex Liposome, Journal of Nanoscience and Nanotechnology, Vol.9, 2009, 1379–1383.
- [96] W.Zhang, A.J.Liang, Y.Cai, Preparation of Vitamin E liposomes by the thin film method and

study on its leakage rate, *Journal of Advanced Materials Research*, Vols. 236-238, 2011, 2207-2210.

[97] A.Laouini, C.Charcosset, H.Fessi, R.G.Holdich, G.T.Vladislavljevic, Preparation of liposomes: a novel application of microengineered membranes - investigation of the process parameters and application to the encapsulation of vitamin E, *Journal of RSC Advances*, Vol. 3, 2013, 4985–4994.

[98] J.Shaji, S.Iyer, Double-loaded liposomes encapsulating Quercetin and Quercetin beta-cyclodextrin complexes: Preparation, characterization and evaluation, *Asian Journal of Pharmaceutics*, Vol. 6, 2012, 218-26.

[99] C.Bonechi, A.Donati, G.Tamasi, G.Leone, M.Consumi, C.Rossi, S.Lamponi, A.Magnani, Protective effect of quercetin and rutin encapsulated liposomes on induced oxidative stress, *Journal of Biophysical Chemistry*, Vol. 233, 2018, 55–63.

[100] S.N.Park, M.H.Lee, S.J.Kim, E.R.Yu, Preparation of quercetin and rutin-loaded ceramide liposomes and drug-releasing effect in liposome-in-hydrogel complex system, *Journal of Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol.435, 2013, 361–366.

[101] N.K.Jain, *Controlled and Novel Drug Delivery*. CBS Publisher, 304-326.

[102] A.Meybeck, Les liposomes en cosmétique, *Journal de l'actualité chimique*, n° 323-324, 2008, 64.

[103] S.G.I.Hadj, Encapsulation du Fluconazole dans les niosomes et les liposomes, *Faculté de sciences, Université Abou-Bekr Belkaid – Tlemcen*, 2019.

[104] M.Çağdaş, A.D.Sezer, S.Bucak, *Liposomes as Potential Drug Carrier Systems for Drug Delivery*, Department of Chemistry, Boğaziçi University, Turkey, 2014.