Université Libanaise
École Doctorale
Sciences et Technologies

Université Claude Bernard Lyon 1

THESE EN CO-TUTELLE

Pour obtenir le grade de Docteur délivré par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1
Ecole Doctorale de Chimie de Lyon
et
L'UNIVERSITE LIBANAISE
Ecole Doctorale des Sciences et Technologie

Spécialité : Biochimie/Pharmacotechnie

Présentée et soutenue publiquement par

Carine SEBAALY

Le 5 Janvier 2016

Préparation à petite et grande échelle des liposomes encapsulant l'huile essentielle de clou de girofle libre et sous forme de complexe d'inclusion dans l'hydroxypropyl-β-cyclodextrine : caractérisation des nanostructures et évaluation de leur effet antioxydant

Membres du Jury :

Mme Sophie Fourmentin, Pr, Université du Littoral Côte d'Opale	Rapporteur
M. Bernard Tinland, DR, CNRS, Marseille	Rapporteur
M. Hatem Fessi, Pr, Université Lyon 1	Examinateur
M. Nader Yaacoub, Pr, Université Libanaise	Examinateur
Mme Héléne Greige, Pr, Université Libanaise	Directrice de thèse
Mme Catherine Charcosset, HDR, Université Lyon 1	Directrice de thèse
Mme Alia Jraij, Pr, Université Libanaise	Co-Encadrante de thèse

Remerciements

J'exprime en premier lieu mes vifs et sincères remerciements *A DIEU*, notre créateur, pour sa générosité, son aide et sa protection.

J'adresse ma vive gratitude à tout le corps administratif de *l'Ecole Doctorale des Sciences et Technologie* à *l'Université Libanaise* et *de l'Ecole Doctorale de Chimie de Lyon* pour faciliter les procédures d'inscription en thèse de doctorat en cotutelle.

Pr. Hélène Greige

Je tiens à vous exprimer ma profonde reconnaissance pour m'avoir fait profiter de vos grandes connaissances et cultures scientifiques. Votre compétence, votre intérêt pour la recherche et votre supervision ont été des atouts précieux et ont porté leurs fruits dans mon travail. Je vous remercie infiniment pour votre soutien inconditionnel sans faille et pour m'avoir fait confiance tout au long de ces années. Je vous en serais toujours reconnaissante.

Dr. Catherine Charcosset

Je tiens à vous accorder toute ma gratitude de m'avoir accompagnée et dirigée mes travaux de thèse durant mes séjours en France. Vos intuitions, vos grandes qualités humaines, votre sympathie, votre disponibilité et votre rigueur scientifique ont rendu mon travail plus fructueux et en même temps agréable.

Pr. Alia Jraij

Je vous remercie profondément pour votre participation enrichissante dans le suivi de mon travail.

Pr. Hatem Fessi

Je tiens à vous exprimer mes vifs remerciements de m'avoir accueillie, dans un bon environnement de travail, au sein du Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés que vous dirigez. Je vous remercie vivement pour vos conseils, votre générosité et vos qualités

scientifiques. Merci d'avoir accepté de rédiger la préface de notre livre et de faire partie du jury de ma thèse.

Pr. Sophie Fourmentin et Dr. Bernard Tinland
Je vous suis sincèrement reconnaissante de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.

Pr. Nader Yaacoub
Je vous remercie pour l'intérêt que vous portez à ce travail de thèse en acceptant d'être examinateur.

Pr. Bassam Badran
Je vous remercie de m'avoir accueillie à la Plateforme de Recherche et d'Analyses en Sciences de l'Environnement, à l'Université Libanaise, campus Hadath, et pour la sympathie que votre équipe m'a accordée durant la réalisation de mes travaux.

Dr. Serge Stainmesse
Je vous remercie infiniment pour votre aide dans la réalisation des études de lyophilisation.

Géraldine Agusti
Je vous adresse mes vifs remerciements pour votre pertinence dans la réalisation des imageries par microscopie électronique à transmission au Centre Technologique des Microstructures à l'Université Lyon 1.

Nisrine Oueidat et Souha Khoury
Je vous exprime ma sincère reconnaissance pour votre disponibilité et votre aide dans les expériences de chromatographie liquide à haute performance et spectroscopie de fluorescence, au Laboratoire de Chimie Analytique à l'Université Libanaise, campus Fanar. Merci pour vos conseils, votre soutien et votre amitié.

Je remercie infiniment le *Conseil National de la Recherche Scientifique au Liban (CNRS-L) et l'Université Libanaise* pour la bourse doctorale qu'ils m'ont accordée durant ma thèse.

Mes chères amies
Raniya Ghazal, Raymona Ghazal, *Elissa Ephrem, Jessica Saad, Nisrine Salloum, Sabrina Nicolas,* merci pour votre soutien et votre aide inestimables.

Mes parents, mes sœurs, mon frère
Je vous remercie chaleureusement de m'avoir soutenue et encouragée avec amour et patience tout au long de mes études. Sans vous je ne serais par arrivée jusque là.

Mon Mari Charbel
Enfin un remerciement particulier à mon mari Charbel pour la qualité de votre présence à mes côtés tout au long de ce parcours.

Résumé

L'huile essentielle de clou de girofle (HECG) et son constituant majeur l'eugénol (Eug) sont reconnus pour leurs propriétés biologiques. Ces principes actifs naturels peuvent constituer des alternatifs aux agents antimicrobiens, antioxydants et anti-inflammatoires de synthèse dans les formulations alimentaires et pharmaceutiques. Cependant, leur utilisation est limitée en raison de leur faible solubilité aqueuse, volatilité et sensibilité à la lumière. Notre travail de thèse porte sur la préparation et la caractérisation des vésicules lipidiques encapsulant l'HECG et l'Eug ainsi que les complexes d'inclusion cyclodextrine/Eug. Dans une première étape, la méthode d'injection éthanolique est utilisée à l'échelle du laboratoire où les paramètres de préparation ont été optimisés. Des phospholipides naturels de soja saturés (Phospholipon 80H et Phospholipon 90H) et insaturés (Lipoid S100) ont été utilisés pour étudier l'effet de l'hydrogénation et de la composition des phospholipides sur les caractéristiques des liposomes. Les conditions optimales ont été par la suite appliquées pour préparer les liposomes à grande échelle par contacteur à membrane et à l'échelle pilote. Des résultats similaires en termes de taille, indice de polydispersité, potentiel zêta, morphologie et taux d'incorporation de phospholipides sont obtenus à petite et grande échelle. Ceci indique la reproductibilité de ces procédés de préparation. Par ailleurs, des complexes d'inclusion d'HP-β-CD/Eug et d'HP-β-CD/HECG sont préparés dans une solution aqueuse et ensuite incorporés dans les liposomes formant un système combiné « drug in cyclodextrin in liposomes, DCL ». Un système en double encapsulation (DCL_2) a été également préparé où l'Eug ou l'HECG sont ajoutés dans la phase organique et leurs complexes d'inclusion dans la phase aqueuse. En comparant à une simple incorporation dans les liposomes, DCL et DCL_2 améliorent le rendement d'encapsulation de l'Eug et possèdent des tailles plus petites. Les résultats ont montré que les liposomes et les DCLs sont stables et maintiennent l'activité anti-oxydante de l'Eug. De plus, les liposomes protègent l'Eug contre la dégradation induite par les rayons UVC. Les DCLs, dont la particularité est de maintenir une huile essentielle volatile dans un lyophilisat en dépit des pressions très basses appliquées, peuvent être considérés comme un système de vectorisation prometteur de l'HECG et de l'Eug permettant leur utilisation en tant qu'ingrédients dans les préparations cosmétiques, pharmaceutiques, et agroalimentaires.

Mots clés : Activité Anti-oxydante, contacteur à membrane, drug in cyclodextrin in liposomes, eugénol, hydroxypropyl-β-cyclodextrine, huile essentielle de clou de girofle, liposomes, lyophilisation, pilote.

Abstract

Clove essential oil (CEO) and its major constituent eugenol (Eug) are recognized for their biological properties. These molecules may constitute natural alternatives to synthetic antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory agents in food and pharmaceutical formulations. However, CEO constituents are volatile, sensitive to light and possess low aqueous solubility, which may limit their wide applications. Our thesis focuses on the preparation and characterization of lipid vesicles encapsulating CEO, Eug and the inclusion complexes cyclodextrin/Eug. In a first step, the ethanol injection method is applied at laboratory scale where the preparation parameters have been optimized. Natural hydrogenated (Phospholipon 80H, Phospholipon 90H) and non-hydrogenated (Lipoid S100) soybean phospholipids were used to study the effect of hydrogenation and phospholipid composition on the characteristics of liposomes. Optimal conditions were then applied to prepare liposomes at large scale by membrane contactor and at pilot scale. Similar results in terms of size, polydispersity index, zeta potential, morphology and phospholipid loading rate were obtained at laboratory and large scale. This indicates the reproducibility of the preparation methods. In addition, HP-β-CD/Eug and HP-β-CD/CEO inclusion complexes were prepared in aqueous solution and were then incorporated into liposomes forming a combined system « drug in cyclodextrin in liposomes, DCL ». Double loaded liposomes (DCL_2) were also prepared where CEO or Eug were added in the organic phase and their inclusion complexes in the aqueous phase. Compared to CEO and Eug loaded liposomes, DCL and DCL_2 improved the loading rate of Eug and possessed smaller vesicles size. Results showed that both liposomes and DCLs are stable and maintain the antioxidant activity of Eug. In addition, liposomes protect Eug from degradation induced by UVC irradiation. DCLs, whose characteristic is to keep a volatile essential oil in a lyophilized form despite the very low applied pressures, could be considered as a promising carrier system of CEO and Eug permitting their use as ingredients in cosmetic, pharmaceutical and food industries.

Keywords: Antioxidant activity, clove essential oil, drug in cyclodextrin in liposomes, eugenol, hydroxypropyl-β-cyclodextrin, liposomes, lyophilization, membrane contactor, pilot.

Tables de matières

Introduction générale 1
PARTIE 1 : BIBLIOGRAPHIE
Chapitre 1 : Les liposomes 5
1.1. Introduction 5
1.2. Composition des liposomes 5
1.2.1. Les phospholipides 6
1.2.1.1. Température de transition de phase des phospholipides 8
1.2.1.2. Dynamique des lipides au sein des membranes 8
1.2.2. Le cholestérol 9
1.2.3. Autres constituants 10
1.3. Classification des liposomes 10
1.4. Méthodes de préparation des liposomes à petite échelle 11
1.4.1. Les méthodes mécaniques de dispersion de phospholipides 12
1.4.1.1. Hydratation du film lipidique 12
1.4.1.2. Sonication 13
1.4.1.3. Extrusion 14
1.4.1.3.1. Membrane de polycarbonate 14
1.4.1.3.2. Presse de French 14
1.4.1.4. Microfluidisation 15
1.4.2. Les méthodes basées sur l'élimination du détergent 15
1.4.3. Les méthodes utilisant des liposomes préformés: La congélation-décongélation (Freeze-thaw method) 16
1.4.4. Les méthodes basées sur l'élimination du solvant organique 16
1.4.4.1. Evaporation en phase inverse 16
1.4.4.2. Injection de solvant organique 18
1.4.4.2.1. Injection d'éthanol 18
1.4.4.2.2. Injection d'éther 19
1.4.4.2.3. Injection d'isopropanol 20
1.5. Production des liposomes à grande échelle 21
1.5.1. Injection par écoulement transversal ou « Cross flow injection technique » 22
1.5.2. Contacteur à membrane 24
1.5.3. Pilote 26
1.6. Stabilité des liposomes 29
1.6.1. Agrégation des liposomes 29
1.6.2. Dégradation chimique des liposomes 29
1.6.2.1. Réaction de peroxydation 30
1.6.2.2. Réaction d'hydrolyse 30

1.6.3. Lyophilisation des liposomes 30
1.7. Liposomes commercialisés 34

Chapitre 2 : Les cyclodextrines 37
2.1. Introduction 37
2.2. Caractéristiques physico-chimiques des cyclodextrines 38
2.3. Dérivés des cyclodextrines 39
2.3.1. Hydroxypropyl-β-cyclodextrine (HP-β-CD) 40
2.4. Méthodes de préparation des complexes d'inclusion 40
2.4.1. Préparation du complexe d'inclusion dans la phase aqueuse 41
2.5. Interactions des cyclodextrines avec les membranes 41
2.5.1. Membrane artificielle 41
2.5.1.1. Monocouches lipidiques 41
2.5.1.2. Liposomes 42
2.5.2. Membrane cellulaire 46
2.5.2.1. Modulation du cholestérol membranaire 46

Chapitre 3 : Complexes d'inclusion dans les liposomes 48
3.1. Introduction 48
3.2. Propriétés du système mixte DCL 48
3.2.1. Effet des CDs sur la taille des liposomes 49
3.2.2. Effet des CDs sur la taille des liposomes déformables 50
3.2.3. Comparaison entre la taille des liposomes déformables et non déformables encapsulant les complexes d'inclusion 50
3.2.4. Effet de la technique de double encapsulation sur la taille des liposomes 54
3.2.5. Effet des CDs sur le potentiel zêta des liposomes 55
3.2.6. Effet des CDs sur la morphologie des liposomes 55
3.2.7. Effet des CDs sur l'efficacité d'encapsulation des principes actifs 55
3.2.8. Corrélation entre l'efficacité d'encapsulation et la concentration du complexe d'inclusion 56
3.2.9. Effet des tensioactifs sur l'efficacité d'encapsulation dans les liposomes déformables 57
3.2.10. Effet des CDs sur la vitesse de libération des principes actifs 57
3.2.11. Stabilité des DCLs 59
3.2.12. Effets biologiques des DCLs 59

Chapitre 4: L'huile essentielle de clou de girofle 61
4.1. Les huiles essentielles 61
4.1.1. Définition 61
4.1.2. Composition chimique des huiles essentielles 61

4.2. L'huile essentielle de clou de girofle 61
4.2.1. Généralités 61
4.2.2. Les principaux constituants de l'huile essentielle de clou de girofle 62
4.2.3. Eugénol 66
4.2.3.1. Biosynthèse de l'eugénol chez les plantes 66
4.2.3.2. Propriétés physico-chimiques de l'eugénol 69
4.2.3.3. Oxydation de l'eugénol 69
4.2.3.4. Pharmacocinétique de l'eugénol 70
4.2.3.4.1. Absorption 70
4.2.3.4.2. Distribution 70
4.2.3.4.3. Métabolisme 71
4.2.3.4.4. Excrétion 72
4.2.3.5. Biotransformation végétale et microbienne de l'eugénol 72
4.2.3.6. Propriétés biologiques de l'HECG et de l'eugénol 74
4.2.3.6.1. Propriété antibactérienne 74
4.2.3.6.2. Propriété antifongique 75
4.2.3.6.3. Propriété antivirale 76
4.2.3.6.4. Propriétés acaricide et insecticide 76
4.2.3.6.5. Propriété anti-tumorale 76
4.2.3.6.6. Effet anti-hépatotoxique 77
4.2.3.6.7. Propriété anti-oxydante 77
4.2.3.6.8. Propriété analgésique 78
4.2.3.6.9. Effet neuroprotecteur 79
4.2.3.6.10. Propriété anti-inflammatoire 79
4.2.3.6.11. Propriétés anti-diarrhéique et anti-ulcère 80
4.2.3.7. Applications de l'HECG et de l'Eug 80
4.2.3.7.1. Application cosmétique 80
4.2.3.7.2. Application thérapeutique 80
4.2.3.7.3. Application agroalimentaire 80

Chapitre 5 : Systèmes d'encapsulation de l'huile essentielle de clou de girofle et de l'eugénol 83
5.1. Introduction 83
5.2. Complexes d'inclusion 83
5.2.1. Mise en évidence de la formation du complexe d'inclusion 84
5.2.2. Détermination de la constante de formation 84
5.2.3. Protection de l'Eug 84
5.2.4. Augmentation de la solubilité aqueuse de l'Eug 84
5.2.5. Détermination de l'efficacité d'encapsulation de l'Eug 85
5.2.6. Détermination de la taille 86

5.2.7. Profil de libération de l'Eug 86
5.2.8. Mécanisme de formation du complexe CD /Eug 86
5.3. β-CDs quaternizées greffées avec du chitosan encapsulant l'Eug 89
5.4. Nanofibres à base d'alcool polyvinylique encapsulant des complexes d'inclusion d'Eug 91
5.5. Micelles 91
5.5.1. Localisation de l'Eug dans les micelles 91
5.5.2. Stabilité des micelles encapsulant l'Eug 92
5.5.3. Nanofibres à base d'alcool polyvinylique encapsulant des micelles d'Eug 93
5.6. Liposomes 93
5.7. Nanoparticules 94
5.7.1. Nanoparticules à base d'acide poly (DL-lactique-co-glycolique) 95
5.7.2. Nanostructured lipid carrier 95
5.7.3. Nanoparticules lipides solides 96
5.7.4. Nanoparticules magnétiques 97
5.7.5. Nanoparticules à base de chitosan 97
5.7.5.1. Nanoparticules à base de chitosan encapsulant l'Eug 97
5.7.5.2 L'Eug greffé sur des nanoparticules à base de chitosan 97
5.7.5.3. Hydrogels préparés à partir de l'Eug greffé sur des nanoparticules à base de chitosan 98
5.8. Nanocapsules 99
5.8.1. Nanocapsules à base de polycaprolactone 99
5.8.2. Nanocapsules à base d'isolat de protéines de lactosérum et de maltodextrines 100
5.9. Micro-encapsulation 103
5.9.1. Microcapsules à base de maltodextrines et de gomme arabique 103
5.9.2. Microcapsules à base de gélatine et de gélatine- alginate de sodium 103
5.9.3. Granules avec un noyau à base de cellulose microcristalline renfermant un mélange de l'Eug, carvacrol et de thymol 104

PARTIE 2: PARTIE EXPERIMENTALE
Chapitre 6: Objectifs et stratégie expérimentale 106
6.1. Objectifs 106
6.2. Stratégie expérimentale 106
6.2.1. Choix du vecteur 106
6.2.2. Choix des phospholipides 108
6.2.3. Préparation des liposomes par la méthode d'injection d'éthanol 108
6.2.3.1. Optimisation de la méthode de préparation des liposomes à petite échelle 109
6.2.4. Préparation des complexes d'inclusion dans les liposomes 109

6.2.5. Production à grande échelle 110
6.2.6. Lyophilisation 110
6.2.7. Caractérisation structurale et morphologique des liposomes 111
6.2.8. Détermination de l'efficacité d'encapsulation des constituants de l'HECG dans les liposomes 111
6.2.9. Etude de la stabilité des liposomes 112
6.2.10. Etude de la photostabilité de l'Eug libre et encapsulé 112
6.2.11. Détermination de l'activité anti-oxydante 112
6.3. Schémas récapitulatifs 112

Chapitre 7: Matériels et méthodes 115
7.1. Produits chimiques 115
7.2. Membranes de type Shirasu Porous Glass (SPG) 115
7.3. Préparation des complexes d'inclusion dans la phase aqueuse 116
7.4. Préparation des liposomes 117
7.4.1. Préparation à petite échelle par la méthode d'injection d'éthanol 117
7.4.1.1. Choix des conditions optimales 117
7.4.1.2. Préparation des liposomes avec trois types de phospholipides 117
7.4.1.3. Formulations liposomiales 117
7.4.2. Préparation à grande échelle 118
7.4.2.1. Contacteur à membrane 118
7.4.2.1.1. Formulations liposomiales 121
7.4.2.1.2. Régénération de la membrane 122
7.4.2.2. Pilote 122
7.4.2.2.1. Formulations liposomiales 123
7.5. Lyophilisation 123
7.6. Caractérisation des liposomes 124
7.6.1. Mesure de taille et d'indice de polydispersité par diffusion dynamique de la lumière (DLS : Dynamic Light Scattering) 124
7.6.2. Détermination du potentiel zêta 125
7.6.3. Détermination de l'efficacité d'encapsulation des constituants de l'huile essentielle de clou de girofle dans les liposomes par HPLC 125
7.6.4. Détermination du rendement d'encapsulation de l'Eug 126
7.6.5. Dosage des phospholipides 127
7.6.6. Observation morphologique par microscopie électronique à transmission (TEM : Transmission Electron Microscopy) 128
7.6.7. Etude de la stabilité des liposomes 128
7.6.7.1. Stabilité physico-chimique 128
7.6.7.2 Photostabilité de l'Eug sous forme libre et encapsulée 129
7.6.8. Détermination de l'activité anti-oxydante de l'Eug et l'HECG libres et 129

encapsulés par piégeage du DPPH•
7.7. Analyse statistique 130

PARTIE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION
Chapitre 8 : Résultats et Discussion 131
8.1. Optimisation des liposomes à petite échelle : effet de différents paramètres sur la taille et l'indice de polydispersité des liposomes préparés par injection d'éthanol 131
8.1.1. Effet de la concentration en phospholipides en absence du cholestérol 131
8.1.2. Effet du cholestérol 131
8.1.3. Effet de la concentration en phospholipides en présence du cholestérol 133
8.1.4. Effet de la vitesse d'agitation de la phase aqueuse 135
8.1.5. Effet du rapport volumique éthanol/eau 136
8.1.6. Effet de la vitesse d'injection de la phase organique 136
8.2. Effet de la composition et de l'hydrogénation des phospholipides sur la taille, le pdI et le potentiel zêta des liposomes témoins 137
8.3. Effet de l'eugénol et de l'HECG sur les caractéristiques des liposomes 143
8.4. Détermination de l'efficacité d'encapsulation des constituants de l'HECG dans les liposomes par HPLC 145
8.5. Rendement d'encapsulation de l'eugénol 148
8.6. Détermination du taux d'incorporation des phospholipides en absence et présence de l'Eug et l'HECG 149
8.7. Morphologie des liposomes 151
8.8. Stabilité des liposomes 154
8.8.1. Stabilité physico-chimique 154
8.8.2. Photostabilité de l'Eug en solution aqueuse et dans les liposomes 154
8.9. Activité anti-oxydante de l'Eug libre et encapsulé dans les liposomes à petite échelle 155
8.10. Production des liposomes encapsulant l'HECG et l'Eug à grande échelle 156
8.10.1. Caractéristiques des liposomes témoins en termes de taille, pdI et potentiel zêta 157
8.10.2. Caractéristiques des liposomes encapsulant l'Eug et l'HECG en termes de taille, pdI et potentiel zêta 160
8.10.3. Détermination de taux d'incorporation de phospholipides en absence et en présence de l'Eug et l'HECG 161
8.10.4. Détermination de l'efficacité d'encapsulation des constituants de l'HECG dans les liposomes 164
8.10.5. Détermination du rendement d'encapsulation de l'Eug 165
8.10.6. Morphologie des liposomes préparés à grande échelle 166
8.10.7. Stabilité des liposomes encapsulant l'Eug et l'HECG préparés à grande échelle 168

8.11. Complexes d'inclusion de l'HECG et de l'Eug dans les liposomes 169
8.11.1. Caractéristiques des liposomes encapsulant les complexes d'inclusion de l'Eug et l'HECG en termes de taille, pdI et potentiel zêta 169
8.11.2. Détermination de l'efficacité d'encapsulation des constituants de l'HECG 173
8.11.3. Détermination du rendement d'encapsulation de l'Eug 175
8.11.4. Morphologie des DCL et DCL_2 176
8.11.5. Stabilité des DCL et DCL_2 178
8.11.6. Activité anti-oxydante de l'Eug et l'HECG libres, leurs complexes d'inclusions, les DCL et DCL_2 179
8.12. Lyophilisation des liposomes 180

Conclusion et perspectives 187
Références 191
Annexe 218

Liste des figures

Figure 1 : Structure du phospholipide et du liposome 5
Figure 2 : Représentation schématique de la dynamique des lipides au sein des membranes 9
Figure 3 : Structure du cholestérol (a), positionnement du cholestérol au sein de la monocouche lipidique (b) 9
Figure 4 : Les différentes classes de liposomes selon la taille et le nombre de lamelles 11
Figure 5 : Préparation des liposomes par la méthode d'hydratation du film lipidique 13
Figure 6 : Préparation des liposomes par la méthode d'élimination du détergent 16
Figure 7 : Préparation des liposomes par évaporation en phase inverse 17
Figure 8 : Préparation des liposomes par injection de solvant organique 18
Figure 9 : Préparation des liposomes par injection par écoulement transversal ou « cross-flow injection technique » 23
Figure 10 : Injection par écoulement transversal en utilisant un connecteur spécial Y 24
Figure 11 : Préparation des liposomes par contacteur à membrane 25
Figure 12 : Préparation des liposomes par pilote équipé d'un tube (a) ou d'une membrane (b) pour injection de la phase organique dans la phase aqueuse 27
Figure 13 : Mécanisme de remplacement de l'eau lors de la lyophilisation et la réhydratation 32
Figure 14 : Structure des cyclodextrines natives 37
Figure 15 : Structures chimiques des dérivés de la β-CD 39
Figure 16 : Schéma représentatif du système « drug-in-cyclodextrin-in-liposome » avec les complexes d'inclusion CD/principe actif incorporés dans la phase aqueuse des liposomes 48
Figure 17**:** Schéma représentatif des « double loaded liposomes» 54
Figure 18 : Le giroflier *Syzygium aromaticum L* (a) et les clous de girofle (b) 62
Figure 19 : Structure chimique des constituants de l'huile essentielle de clou de girofle: eugénol (a), β-caryophyllène (b), acétate d'eugénol (c), α-humulène ou α-caryophyllène (d), cadinène (e), 1,8 cinéole (f), α-copaène (g), alcool benzylique (h), vanilline (i), 3-allyl-6-méthoxyphénol (j) et oxyde de caryophyllène (K) 63
Figure 20 : Voie de biosynthèse de l'eugénol chez les plantes 68
Figure 21: Réaction de l'oxydation de l'eugénol par la lumière 70
Figure 22: Les métabolites de l'Eug chez l'homme 71
Figure 23: La glycosylation de l'Eug par les cellules végétales en culture d'*Eucalyptus Perriniana* 72
Figure 24 : Biotransformation de l'eugénol (a) et de l'isoeugénol (b) en vanilline 73
Figure 25 : Mécanisme antibactérien de l'eugénol 75
Figure 26 : Voies réactionnelles de l'eugénol avec le radical DPPH•. Les réactions [1], [2] et [3] correspondent respectivement à un don d'un second atome d'hydrogène, à 78

une dimérisation et à une complexation
Figure 27 : Différents mode de complexation entre l'eugénol et les cyclodextrines 88
Figure 28 : β-CDs quaternizées greffées avec du chitosan QCD-g-CS (a), en présence de l'acide citrique QCDCA22-g-CS (b) 89
Figure 29 : La réaction à base de Schiff pour le greffage de l'Eug sur des nanoparticules à base de chitosan 98
Figure 30 : Réaction de greffage entre l'Eug et le chitosan 99
Figure 31 : Méthodologie suivie dans notre étude pour la préparation des liposomes, des systèmes DCL à petite et grande échelle et des poudres 113
Figure 32 : Techniques utilisées dans notre étude pour la caractérisation des liposomes 114
Figure 33 : Préparation des complexes d'inclusion d'HP-β-CD/invité 116
Figure 34 : Taille des liposomes obtenue par granulométrie à différents rapports phospholipide : cholestérol 10 : 0 (a); 10 : 3 (b) et 10 : 5 (c) 132
Figure 35 : Incorporation de l'eugénol dans les liposomes 144
Figure 36 : Les chromatogrammes utilisés pour le dosage de l'Eug (A) et l'HECG (B) 146
Figure 37 : Courbes d'étalonnage utilisées pour le dosage de l'Eug (A), Eug-Ac (B) et Crph (C) 147
Figure 38 : Courbe d'étalonnage utilisée pour le dosage des phospholipides 149
Figure 39 : Images obtenues par TEM pour des échantillons des suspensions liposomiales préparées par injection d'éthanol à petite échelle. (A,B,C) : des liposomes constitués de Phospholipon 80H témoins (A), encapsulant l'HECG à une concentration de 2,5 mg/ml (B) et l'Eug à 12,5 mg/ml (C). (D,E,F) : des liposomes constitués de Phospholipon 90H témoins (D), encapsulant l'HECG à une concentration de 1 mg/ml (E) et 2,5 mg/ml (F). (G,H) : des liposomes constitués de Lipoid S100 témoins (G) et encapsulant l'HECG à une concentration de 2,5 mg/ml (H, I) 152
Figure 40 : Photostabilité de l'Eug libre en solution aqueuse et encapsulé dans les liposomes après irradiations aux rayons UVC 155
Figure 41 : Activité anti-oxydante de l'Eug libre et encapsulé dans les liposomes constitués de Phospholipon 80H, Phospholipon 90H et Lipoid S100 par piégeage du radical DPPH• 156
Figure 42 : Caractéristiques des liposomes constitués de Phospholipon 90H encapsulant l'Eug et l'HECG préparés par contacteur à membrane le jour de la préparation et après 2 mois de stockage à 4 et 25 °C 158
Figure 43 : Caractéristiques des liposomes constitués de Lipoid S100 encapsulant l'Eug et l'HECG préparés par contacteur à membrane le jour de la préparation et après 1 mois de stockage à 4 °C 159
Figure 44 : Caractéristiques des liposomes constitués de Phospholipon 90H encapsulant l'Eug et l'HECG préparés par pilote et évaporés soit directement sur le pilote soit par évaporation rotative le jour de la préparation et après 2 mois de stockage à 4 et 25 °C 160
Figure 45 : Images obtenues par TEM pour des échantillons des suspensions 167

liposomiales préparées à grande échelle. (A,B,C) : des liposomes constitués de Phospholipon 90H témoins (A), encapsulant l'Eug à 2,5 mg/ml (B) et l'HECG à une concentration de 1 mg/ml (C) préparés par contacteur à membrane. (D,E) : des liposomes constitués de Lipoid S100 témoins (D), encapsulant l'HECG à une concentration de 2,5 mg/ml (E) préparés par contacteur à membrane. (F, G) : des liposomes constitués de Phospholipon 90H témoins (F), encapsulant l'Eug à 2,5 mg/ml (G) préparés par le pilote suivie par une évaporation de l'éthanol directement sur le pilote

Figure 46 : Incorporation de l'Eug dans les systèmes DCL (a) et DCL_2 (b) 173

Figure 47 : Efficacité d'encapsulation de l'Eug dans les DCL et DCL_2 préparés par injection éthanolique et contacteur à membrane en comparaison à celle obtenue par simple incorporation de l'Eug dans les liposomes à petite et grande échelle 174

Figure 48 : Efficacité d'encapsulation des constituants de l'HECG dans les DCL et DCL_2 préparés par injection éthanolique et contacteur à membrane en comparaison à celle obtenue par simple incorporation de l'HECG dans les liposomes à petite et grande échelle 175

Figure 49 : Images obtenues par TEM pour des liposomes encapsulant des HP-β-CDs libres (a), des DCL (b), et DCL_2 (c) incorporant l'Eug préparés par injection éthanolique 177

Figure 50 : Images obtenues par TEM pour des liposomes encapsulant des HP-β-CDs libres (a), des DCL (b), et DCL_2 (c) incorporant l'Eug préparés par contacteur à membrane 178

Figure 51 : Activité anti-oxydante de l'Eug et l'HECG sous forme libre et encapsulée (liposomes, complexes d'inclusion, DCL et DCL_2). 180

Figure 52 : Images obtenues par TEM pour les liposomes encapsulant les HP-β-CDs libres (a), les DCL (b), et DCL_2 (c,d) incorporant l'Eug après lyophilisation et reconstitution dans l'eau ultra-pure 186

Liste des tableaux

Tableau 1 : Exemples de groupement chimique associé au phosphate des phospholipides 6

Tableau 2 : Principaux phospholipides et lipides utilisés dans la formulation des liposomes 7

Tableau 3 : Liposomes commercialisés 35

Tableau 4 : Propriétés physico-chimiques des CDs natives 38

Tableau 5 : Caractéristiques des dérivés de cyclodextrines 40

Tableau 6 : Caractéristiques des DCLs en comparaison avec d'autres formulations liposomiales 51

Tableau 7 : L'huile essentielle de clou de girofle : origine, méthode d'extraction et principaux constituants 64

Tableau 8 : Caractéristiques des complexes d'inclusion d'Eug et d'HECG. Ce tableau présente uniquement les études où la taille et le pdI ont été déterminés. 85

Tableau 9 : Caractéristiques des β-CDs quaternizées greffées avec du chitosan encapsulant l'Eug 90

Tableau 10 : Caractéristiques des micelles encapsulant l'HECG ou l'Eug et des nanofibres. Ce tableau présente uniquement les études où la taille et le pdI ont été déterminés. 92

Tableau 11 : Caractéristiques des liposomes encapsulant l'HECG et l'Eug 94

Tableau 12 : Caractéristiques des nanoparticules et nanocapsules encapsulant l'Eug ou l'HECG 101

Tableau 13 : Caractéristiques des microcapsules encapsulant l'Eug et l'HECG 104

Tableau 14 : Conditions expérimentales utilisées pour la préparation des liposomes à grande échelle 120

Tableau 15 : Effet du cholestérol sur la taille, le pdI et le potentiel zêta des liposomes 133

Tableau 16 : Effet des différents paramètres sur la taille et le pdI des liposomes constitués de Phospholipon 80H 135

Tableau 17 : Caractéristiques des liposomes constitués de Phospholipon 80H et encapsulant l'eugénol et l'HECG 138

Tableau 18 : Caractéristiques des liposomes constitués de Phospholipon 90H et encapsulant l'eugénol et l'HECG 141

Tableau 19 : Caractéristiques des liposomes constitués de Lipoid S100 et encapsulant l'eugénol et l'HECG 142

Tableau 20 : Caractéristiques des liposomes constitués de Phospholipon 90H et encapsulant l'Eug et l'HECG par contacteur à membrane 162

Tableau 21 : Caractéristiques des liposomes constitués de Lipoid S100 et encapsulant l'eugénol et l'HECG par contacteur à membrane 163

Tableau 22 : Caractéristiques des liposomes constitués de Phospholipon 90H et 164

encapsulant l'Eug et l'HECG par le pilote en utilisant les deux méthodes d'évaporation d'éthanol.
Tableau 23 : Caractéristiques des systèmes DCL et DCL_2 encapsulant l'Eug par injection éthanolique et contacteur à membrane 170
Tableau 24 : Caractéristiques des systèmes DCL et DCL_2 encapsulant l'HECG par injection éthanolique et contacteur à membrane 172
Tableau 25 : Effet des cryoprotecteurs sur la taille, pdI, et potentiel zêta des liposomes constitués de Phospholipon 90H encapsulant l'Eug avant et après lyophilisation. (a) et (b) implique l'addition des cryoprotecteurs respectivement pendant et après la préparation des liposomes 182
Tableau 26 : Caractéristiques des liposomes constitués de Phospholipon 90H encapsulant l'Eug avant et après lyophilisation en utilisant l'HP-β-CD comme cryoprotecteur. (a) et (b) implique l'addition du cryoprotecteur respectivement pendant et après la préparation des liposomes 184

Liste d'abréviations

12 HPETE : acide 12-hydroxyperoxyeicosatetraenoique

ADN : acide désoxyribonucléique

ATP : adénosine triphosphate

BPF : bilayered planar fragments

CDs : cyclodextrines

CH NPs : chitosan nanoparticles

Chol : cholestérol

CMC : concentrations micellaires critiques

CoA : coenzyme A

COX-2 : cyclooxygénase 2

Crph : caryophyllène

CRYSMEB : low methylated β-cyclodextrin

DCL : drug in cyclodextrin in liposomes

DCL_2 : drug in cyclodextrin in liposomes prepared by double loading technique

DE : dextrose equivalent

di-10-PC : didecanoylphosphatidylcholine

Dimeb : diméthyl- β-cyclodextrine

DLS : dynamic light scattering

DMPC : dimyristoylphosphatidylcholine

DOPC : dioléoylphosphatidylcholine

DPPC : dipalmitoylphosphatidylcholine

DPPG : dipalmitoylphosphatidylglycérol

DPPH : 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle

DPPH-H : diphénylpicrylhydrazine

DRV : dehydration-rehydration vesicles

DRX : diffraction des rayons X

DSC : differential scanning calorimetry

DSPC : distéaroylphosphatidylcholine

DSPE : distéaroylphosphatidyléthanolamine

DV: distillation à la vapeur

EE : efficacité d'encapsulation

EFS: Extraction par fluide supercritique CO_2

EPC : egg phosphatidylcholine

EPG : egg phosphatidylglycérol

ES: extraction par solvant organique

Eug : eugénol

Eug-Ac : acétate d'eugénol

FTIR : fourier transform infrared

$GABA_A$: γ-aminobutyric acid

GRAS : generally recognized as safe

GUV : giant unilamellar vesicles

H-EPC : hydrogenated egg phosphatidylcholine

HD: hydro-distillation

HE-β-CD : mono [2-O- (2-hydroxyéthyl)]β-cyclodextrine

HECG : huile essentielle de clou de girofle

HEs : huiles essentielles

HP-α-CD : hydroxypropyl-alpha-cyclodextrine

HP-β-CD : hydroxypropyl-béta-cyclodextrine

HP-γ-CD : hydroxypropyl-gamma-cyclodextrine

HPLC : high performance liquid chromatography

HSV-1 : herpes simplex virus 1

IDL : isolat de protéines de lactosérum

IL : interleukines

LIPOVA-E120 : egg lecithin

LUV : large unilamellar vesicles

LUVET : large unilamellar vesicles by extrusion techniques

MD : maltodextrine

MEB : microscopie à balayage électronique

MLV : multilamellar vesicles

MS : degré de substitution molaire moyen

MVV : multivesicular vesicles

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NC : nanocapsules

ND: non déterminé

NF-kB :nucleor factor-kappa B

NLC : nanostructured lipid carrier

NMDA :N-méthyl-D-aspartate

NPs : nanoparticules

NS: non signalé

OLV : oligolamellar vesicles

P90: Phospholipon 90

P90H: Phospholipon 90 hydrogéné

PAF : platelet activating factor

PC : phosphatidylcholine

PCL NCs : polycaprolactone nanocapsules

PdI : Indice de polydispersité

PE : phosphatidyléthanolamine

PEG : polyéthylène glycol

Ph : phospholipides

PLGA : poly(DL-lactide-co-glycolide)

PLGA NPs : poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticules

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

PVA :polyvinyl alcool

PVA-CD/Eug : polyvinyl alcool nanofibers loaded with cyclodextrin/eugenol inclusion complex

QCD-g-CS : quaternized cyclodextrin grafted with chitosan

QCDCA-g-CS : quaternized cyclodextrin grafted with chitosan with citric acid spacer

RAMEB : randomly methylated β-cyclodextrin

RE : rendement d'encapsulation

REV : reverse phase evaporation vesicles

RMN : résonance magnétique nucléaire

RPE : résonance paramagnétique electronique

SA : scavenging activity

SBE-β-CD : sulfobutyléther-béta-cyclodextrine

SDS : sodium dodecyl sulfate

SLN : solid lipid nanoparticles

SPC : soybean phosphatidylcholine

SPG : shirasu porous glass

SUV : small unilamellar vesicles

TEM : transmission electron microscopy

TGA : thermogravimetric analysis

TNF : tumor necrosis factor

TPP : pentasodium triphosphate

Trimeb : triméthyl-β-cyclodextrine

TRPV1 : transient receptor potential vanilloid 1

WHO : world health organization

Liste des symboles

$-CH_2-CH=CH_2$: allyl group

$^1O_2$: singlet oxygen

A_0: absorbance value of blank sample

A_s: absorbance value of sample

C_0 : concentration de l'eugénol à t_0

Ca^{2+} : ion calcium

C_{max} : concentration maximale

CO_2 : dioxyde de carbone

C_t : concentration de l'eugénol au temps t

h : hour

HCl : chlorure d'hydrogène

Hg : mercure

K_f : constante de formation

KH_2PO_4 : monopotassium phosphate

Log P : hydrophobic/hydrophilic character

MeO : groupement méthoxy

Na^+ : ion sodium

Na_2HPO_4 : disodium phosphate

NaCl : chlorure de sodium

OH : groupement hydroxyle

$T_{1/2}$: demi-vie

T_g : glass transition

T_{gel} : température de gélification

T_m : melting transition

ΔH_m : melting enthalpy

Liste des travaux

Publications

1. Sebaaly C, Jraij A, Fessi H, Charcosset C, Greige-Gerges H, 2015. Preparation and characterization of clove essential oil loaded liposomes. Food Chemistry, 178, 52-62.
2. Sebaaly C, Greige-Gerges H, Agusti G, Fessi H, Charcosset C, 2015. Large-scale preparation of clove essential oil and eugenol-loaded liposomes using a membrane contactor and a pilot plant. Journal of Liposomes Research, 23, 1-13.
3. Sebaaly C, Charcosset C, Stainmesse S, Fessi H, Greige-Gerges H, 2016. Clove essential oil-in-cyclodextrin-in-liposomes in the aqueous and lyophilized states: from laboratory to large scale using a membrane contactor**.** Carbohydrates Polymers, 138, 75-85.
4. Sebaaly C, Greige-Gerges H, Stainmesse S, Fessi H, Charcosset C. Effect of composition, hydrogenation of phospholipids and lyophilization on the characteristics of eugenol-loaded liposomes prepared by ethanol injection method. Food Bioscience, Soumis.

Livre

Greige-Gerges H, Sebaaly C, 2015. Essential oils encapsulation technologies : application to cloves. Lambert Academic Publishing, p 1-127.

Communications orales

1. Sebaaly C, Sherry M, Jraij A, Khreich N, Charcosset C, Greige-Gerges H. Preparation and Characterization of liposomes encapsulating eugenol by the ethanol injection method. 19th LAAS International Science Conference, Lebanese American University, Beirut (Liban), 5-6 Avril, 2013.
2. Sebaaly C, Jraij A, Khreich N, Charcosset C, Greige-Gerges H. Préparation et caractérisation des liposomes encapsulant l'huile essentielle de clou de Girofle. Journées Jeunes Chercheurs, CPE (Lyon), 5 Juillet 2013.
3. Sebaaly C, Jraij A, Fessi H, Charcosset C, Greige-Gerges H. Preparation and characterization of liposomes loading clove essential oils using soybean lecithin-lipids of natural origin. 3rd ScienceOne Conference on Drug Discovery and Development, Dubai, 21-23 Janvier 2014.

4. Sebaaly C, Jraij A, Fessi H, Charcosset H, Greige-Gerges H. Characteristics of Phospholipon 90H-liposomes loading clove essential oil and its main component eugenol. The Lebanese Association for the Advancement of Science, 20th LAAS International Science Conference, Hadath (Liban), 27-29 Mars 2014.
5. Sebaaly C, Jraij A, Fessi H, Charcosset C, Greige-Gerges H. Preparation of clove essential oil-loaded Phospholipon 90H liposomes by the ethanol injection method: from laboratory scale to large scale using a membrane contactor. Journée Ecole Doctorale Chimie de Lyon/ Annual Meeting of the Graduate School of Chemistry, Villeurbanne (Lyon), 10 Avril 2014.
6. Sebaaly C, Charcosset C, Greige-Gerges H. Clove essential oil encapsulation into liposomes: application in food industry. 1st symposium of Biomolecules and their applications. Tripoli (Liban), 26-27 February 2015.

Communications par affiche

1. Sebaaly C, Jraij A, Khreich N, Charcosset C, Greige H. Physico-chemical and morphological characterization of eugenol-loaded liposomes made from hydrogenated soybean phosphatidylcholine. Journée Rhônes-Alpes des Biomolécules, Villeurbanne (Lyon), 7 Juin 2013.
2. Sebaaly S, Jraij A, Khreich N, Charcosset C, Greige-Gerges H. Entrapment of clove essential oils in hydrogenated phospholipids. Journées Scientifiques à l'Ecole Doctorale de Sciences et Technologie, Hadath (Liban), 5 Juillet 2013.
3. Gharib R, Sebaaly C, Jraij A, Auezova L, Charcosset C, Kayouka M, Greige-Gerges H. Development of a nanoparticle system composed of cyclodextrin/drug inclusion complex in liposomes to preserve essential oil components. Biobeirut 4 International Meeting Cancer Biology & Stem Cells, Hadath (Liban), 16-17 Octobre 2014.
4. Sebaaly C, Jraij A, Fessi H, Charcosset C, Greige-Gerges H. Preparation of liposomes encapsulating clove essential oil using ethanol injection method at laboratory and large scale: effect of injection devices. 4ème Forum Doctoral-EDST-UL. Hadath (Liban), 27 Novembre 2014.

Introduction générale

Composés aromatiques naturels, les huiles essentielles (HEs) continuent à susciter un intérêt croissant dans de nombreux domaines pharmaceutique, agroalimentaire et cosmétique (Bakkali et al., 2008). Dans ce travail de thèse, l'huile essentielle de clou de girofle (HECG) et son principal composant l'eugénol (Eug) sont étudiés, en raison de leurs activités biologiques remarquables, notamment, antibactérienne (Hill et al., 2013 ; Liang et al., 2012), antifongique (Sajomsang et al., 2012), anti-oxydante (Brand-Williams et al., 1995 ; Bortolomeazzi et al., 2010), anti-inflammatoire (Bachiega et al., 2012), etc. Ces molécules peuvent constituer des alternatifs aux composés synthétiques dans les formulations alimentaires et pharmaceutiques sans présenter les mêmes effets secondaires.

Toutefois, l'HECG et l'Eug sont des composés volatils, faiblement solubles dans l'eau et sensibles aux conditions environnementales (lumière, chaleur, oxygène), limitant leurs applications. Ainsi, divers procédés d'encapsulation ont été développés pour bénéficier des propriétés de l'HECG et l'Eug tels que les cyclodextrines, les micelles, les nanoparticules, les nano-et micro-capsules. Dans notre travail, nous nous sommes particulièrement intéressées à l'encapsulation de l'HECG et l'Eug dans les liposomes, les cyclodextrines et un système combiné à base de cyclodextrine et de liposome nommé « drug in cyclodextrin in liposomes, DCL».

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 (Drulis-Kawa et al., 2010). Ils sont étudiés pour améliorer la solubilité aqueuse, la stabilité chimique et les activités biologiques des HEs (Coimbra et al., 2011 ; Sherry et al., 2013). De plus, les cyclodextrines (CDs) constituent des systèmes d'encapsulation car elles permettent de former des complexes d'inclusion avec des principes actifs peu hydrosolubles, d'améliorer leur solubilité, leur biodisponibilité et leur stabilité et d'assurer une libération prolongée et contrôlée des principes actifs (Hill et al., 2013 ; Wang et al., 2011 ; Nuchuchua et al., 2009). Le concept proposé par McCormack et Gregoriadis

(1994) sur l'encapsulation des complexes d'inclusion dans les liposomes formant des systèmes mixtes DCL combine les avantages de ces deux systèmes d'encapsulation et peut améliorer les caractéristiques de chaque système. En effet, les problèmes liés à l'administration des complexes d'inclusion par voie intraveineuse comme leur élimination rapide dans les urines peuvent être contournés par leur incorporation dans des liposomes (McCormack et Gregoriadis, 1994). Les liposomes peuvent ainsi modifier la pharmacocinétique des complexes d'inclusion. Les liposomes augmentent l'absorption des complexes par le foie et la rate. Après la désintégration des liposomes dans les tissus, les principes actifs sont métabolisés à un taux dépendant de la stabilité des complexes d'inclusion (McCormack et Gregoriadis, 1998).

Ce travail de thèse est réalisé dans les Laboratoires de Pharmacocinétique et de Pharmacotechnie (Faculté des Sciences, Section II, Université Libanaise) et à la Plateforme de Recherche et d'Analyse en Sciences de l'Environnement (Ecole Doctorale des Sciences et Technologie, Université Libanaise) et le Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (Université Claude Bernard Lyon 1). Il porte principalement sur la préparation, la caractérisation physico-chimique et l'évaluation de l'activité anti-oxydante des vésicules lipidiques encapsulant l'HECG, l'Eug et leurs complexes d'inclusion à petite et grande échelle. Notre étude vise également à réaliser la lyophilisation de ces liposomes en présence de différents cryoprotecteurs. La lyophilisation des liposomes a pour but de résoudre les problèmes d'instabilité chimique et physique qu'ils confrontent dans un milieu aqueux et de les conserver à long terme.

Au cours de ce travail, nous avons commencé par trouver les conditions optimales de préparation des liposomes par la méthode d'injection éthanolique. Dans ce contexte, nous avons testé, en utilisant le Phospholipon 80H comme phospholipide, différents paramètres qui peuvent affecter la taille et l'indice de polydispersité des liposomes comme la concentration en cholestérol et en phospholipides, la vitesse d'injection de la phase organique dans la phase aqueuse, la vitesse d'agitation de la phase aqueuse et le rapport volumique éthanol:eau. Nous avons également étudié l'effet de la concentration en HECG et en Eug et celui de l'hydrogénation et de la composition des phospholipides sur les caractéristiques des liposomes. Dans ce dernier cas, différents types de phospholipides provenant de la lécithine de soja (Phospholipon 80H, Phospholipon 90H et Lipoid S100) sont utilisés pour préparer les formulations liposomiales.

Après avoir optimisé la préparation des liposomes encapsulant l'HECG et l'Eug à petite échelle, des volumes plus importants des formulations, à échelle industrielle, sont préparés en utilisant le contacteur à membrane et le pilote.

Nous avons ensuite préparé, à petite et grande échelle, des liposomes encapsulant des complexes d'inclusion d'HP-β-CD/HECG et d'HP-β-CD/Eug, dissouts dans la phase aqueuse, dans le but d'améliorer les caractéristiques des liposomes préparés par la méthode conventionnelle. Nous nous sommes également intéressées à produire des lyophilisats des liposomes contenant une substance volatile en dépit du vide appliqué.

Nous avons utilisé des techniques spectroscopiques, analytiques et microscopiques pour caractériser les liposomes en termes de taille, indice de polydispersité, potentiel zêta, taux d'incorporation des phospholipides, efficacité d'encapsulation des constituants de l'HECG, rendement d'encapsulation de l'Eug, encapsulation pondérée de l'Eug et morphologie. Nous avons évalué la capacité de ces liposomes en tant que systèmes de protection et de stockage de l'HECG. Des études de stabilité physico-chimique, photostabilité de liposomes et de l'activité anti-oxydante de l'HECG et de l'Eug par piégeage du radical DPPH sont également réalisées.

Ce manuscrit s'organise en trois parties constituées de huit chapitres:

La première partie présente une synthèse bibliographique, divisée en cinq chapitres. Le chapitre 1 porte sur les liposomes, leurs propriétés, leurs méthodes de préparation à petite et grande échelle et leur commercialisation. Le chapitre 2 porte sur les cylodextrines, leurs propriétés, les méthodes de préparation des complexes d'inclusion et leurs interactions avec les membranes. Le chapitre 3 porte sur les complexes d'inclusion cyxlodextrine/principe actif dans les liposomes et leurs propriétés. Le chapitre 4 porte sur les huiles essentielles, en particulier l'HECG et son constituant majeur l'eugénol. La composition de l'HECG, la voie de biosynthèse, la pharmacocinétique et la biotransformation de l'Eug, les propriétés physicochimiques et biologiques de l'HECG et de l'Eug sont présentées dans ce chapitre. Le chapitre 5 porte sur les différents systèmes d'encapsulation de l'HECG et de l'Eug et leurs caractéristiques.

La deuxième partie de ce manuscrit est divisée en deux chapitres 6 et 7. Dans le chapitre 6, nous exposons la stratégie expérimentale suivie pour préparer et caractériser les liposomes encapsulant l'HECG, l'Eug et les complexes d'inclusion cyclodextrine/principe actif. Le chapitre 7 décrit la méthode d'injection d'éthanol utilisée pour préparer les liposomes et les DCLs à petite échelle et les procédés de contacteur à membrane et de pilote à grande échelle. Nous présentons également la méthode de lyophilisation et le travail expérimental que nous avons mené pour caractériser les suspensions liposomiales. Les études de stabilité et l'évaluation de l'activité biologique de ces liposomes sont également présentées.

La troisième partie de ce manuscrit est constituée du chapitre 8 dans lequel nous présentons nos résultats et nous les discutons. Ce chapitre porte sur la présentation des caractéristiques des liposomes encapsulant l'HECG, l'Eug et leurs complexes d'inclusion préparés à petite et grande échelle. Les lyophilisats des liposomes sont également caractérisés. Ce manuscrit s'achève par une conclusion générale et des perspectives pour la suite de ce travail.

Les articles issus de cette thèse sont inclus en annexe à la fin de ce manuscrit.

PARTIE 1 : BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 1: Les liposomes

1.1. Introduction

Les liposomes ont été découverts par Alec Bangham et ses collègues dans les années 1960 et ont été d'abord principalement utilisés comme modèle membranaire (Bangham et al., 1965). Le terme « liposome » dérive de deux mots d'origine grecque, « lipos » qui signifie gras et « soma » qui signifie corps. Les liposomes (Figure 1) sont des vésicules sphériques composées d'une ou plusieurs bicouches phospholipidiques entourant des compartiments aqueux (Bangham et al., 1965). Leur taille varie d'une vingtaine de nanomètres à quelques micromètres. Ils sont utilisés comme système de délivrance de substances actives. Ils peuvent encapsuler à la fois des substances hydrophiles (dans le compartiment aqueux), lipophiles (dans la membrane) et amphiphiles (à l'interface eau-lipide) (Laouini et al., 2012a).

Figure 1: Structure du phospholipide et du liposome (Laouini et al., 2012a).

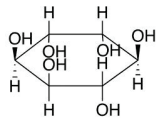
1.2. Composition des liposomes

Les liposomes sont constitués généralement d'un ou de plusieurs types de phospholipides. Ils sont non-toxiques, non-immunogènes, biocompatibles et biodégradables (Laouini et al., 2012a). Le cholestérol entre souvent dans la composition des liposomes.

1.2.1. Les phospholipides

Les glycérophospholipides, constituants majeurs de la membrane biologique, sont généralement les phospholipides qui forment les liposomes (Figure 1). Ce sont des molécules amphiphiles. Ils 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, éthanolamine, sérine et inositol) (Tableau 1), constituant la tête polaire du phospholipide (Shashi et al., 2012).

Tableau 1 : Exemples de groupement chimique associé au phosphate des phospholipides.

Nom classique	**Abréviation**	**Formule chimique du groupement associé au phosphate des phospholipides**
Acide phosphatidique	PA	-H
Phosphatidylcholine	PC	$-CH_2-CH_2-N(CH_3)_3^+$
Phosphatidyléthanolamine	PE	$-CH_2-CH_2-NH_3^+$
Phosphatidylsérine	PS	$-CH_2-CH-(COO)NH_3^+$
Phosphatidylinositol	PI	
Phosphatidylglycérol	PG	$-CH_2CHOH-CH_2OH$

Ainsi, les molécules de phospholipides ont tendance à s'auto-organiser en solution, de manière à ce que les groupements polaires soient en contact avec des groupements polaires qui se trouvent dans le milieu environnant. Les phospholipides pouvant former des bicouches ont deux chaînes hydrocarbonées généralement entre 14 à 18 atomes de carbone (Weinstein et al., 1984). Les phospholipides peuvent être d'origine naturelle ou synthétique. Le coût des préparations liposomiales à base de phospholipides naturels est habituellement inférieur à celui des formulations préparées avec des phospholipides synthétiques (Justo et al., 2011).

L'incorporation dans la bicouche lipidique de phospholipides chargés négativement comme le phosphatidylglycérol, phosphatidylsérine, phosphatidylinositol, ou l'acide phosphatidique ou des lipides chargés positivement comme le stéarylamine permet de diminuer les phénomènes

d'agrégation des vésicules entre elles (Weinstein et al., 1984; Piel et al., 2006).

Des sphingolipides (sphingomyéline) peuvent entrer également dans la composition des liposomes (Shashi et al., 2012). La sphingomyéline avec le cholestérol sont à l'origine de la formation de microdomaines rigides dans les membranes (Shashi et al., 2012).

Le tableau 2 regroupe les principaux phospholipides et lipides utilisés dans la formulation des liposomes.

Tableau 2: Principaux phospholipides et lipides utilisés dans la formulation des liposomes (Shashi et al., 2012; Immordino et al., 2006; Fattal et al., 1993).

	Lipides	**Abréviation**	**Carbone : saturation**	**Charge**
Phospholipides naturels neutres	Phosphatidylcholine de jaune d'œuf	EPC		0
	Phosphatidylcholine de soja	SPC		0
Phospholipides synthétiques neutres	Dimyristoylphosphatidylcholine	DMPC	14 :0	0
	Dipalmitoylphosphatidylcholine	DPPC	16 :0	0
	Distéaroylphosphatidylcholine	DSPC	18 :0	0
	Dioleoylphosphatidylcholine	DOPC	18 :1	0
	Dimyristoylphosphatidyléthanolamine	DMPE	14 :0	0
	Dipalmitoylphosphatidyléthanolamine	DPPE	16 :0	0
	Distéaroylphosphatidyléthanolamine	DSPE	18 :0	0
	Dioleoylphosphatidyléthanolamine	DOPE	18 :1	0
Phospholipides synthétiques chargés négativement	Dimyristoylphosphatidylglycérol	DMPG	14 :0	-1
	Dipalmitoylphosphatidylglycérol	DPPG	16 :0	-1
	Distéaroylphosphatidylglycérol	DSPG	18 :0	-1
	Dioleoylphosphatidylglycérol	DOPG	18 :1	-1
	Dipalmitoyl acide phosphatidique	DPPA	16 :0	-1 ou -2
	Dipalmitoylphosphatidylsérine	DPPS	16 :0	-1
Lipides chargés positivement	Stéarylamine	SA	18 :0	+1
	Dioleoyloxytriméthylamoniopropane	DOTAP	18 :1	+1

1.2.1.1. Température de transition de phase des phospholipides

Les phospholipides sont caractérisés par une température de transition de phase (T_m, *melting temperature*) qui correspond au passage d'un état gel ordonné (L_β, configuration *trans*) vers un état fluide désordonné (L_α, configuration *gauche*) via un état intermédiaire P_β (Lorin et al., 2004; Maxfield et al., 2005).

T_m est un paramètre thermodynamique généralement utilisé pour étudier la fluidité de la bicouche lipidique. En effet, à une température inférieure à T_m, les phospholipides s'arrangent suivant un état « gel » ou phase L_β où les chaînes hydrocarbonées sont ordonnées, parallèles entre elles, étirées au maximum et peu mobiles. Une élévation de la température entraîne un accroissement de la mobilité moléculaire. La probabilité d'une isomérisation trans-gauche s'accroît alors. Au-delà de T_m, les bicouches passent en état « fluide », ou phase L_α, où les chaînes hydrocarbonées ne sont plus étirées mais désordonnées et animées de mouvement plus ou moins pendulaires (Maxfield et al., 2005; Lorin et al., 2004) (Figure 2).

La température de transition de phase varie en fonction de la longueur et du degré de saturation des chaînes d'acides gras des phospholipides. Ainsi, la T_m augmente proportionnellement avec la longueur des chaînes car les interactions de Van der Waals augmentent. Par contre, la T_m diminue avec le nombre d'insaturation qui défavorise les interactions entre les chaînes (Lorin et al., 2004). Cette température doit être prise en considération lors de la préparation des liposomes. Ces derniers ne se forment qu'à une température supérieure à celle de leur transition de phase (Lorin et al., 2004).

1.2.1.2. Dynamique des lipides au sein des membranes

Les molécules de lipides peuvent diffuser librement dans la bicouche lipidique (Figure 2). Dans la monocouche, les lipides peuvent tourner autour de leur axe perpendiculairement au plan de la membrane (rotation axiale ou diffusion rotationnelle) ou diffuser latéralement dans le feuillet dont ils font partie. Au sein de la bicouche, la diffusion transversale également appelée « flip-flop » est associée au passage d'un lipide d'une monocouche à une autre. Ce mouvement est lent comme il nécessite le passage de la tête polaire d'une molécule lipidique à l'intérieur de la zone hydrophobe constituée par les queues des phospholipides (Lipowsky et al., 1995; Alberts et al., 2002; Lorin et al., 2004).

Figure 2: Représentation schématique de la dynamique des lipides au sein des membranes (Lipowsky et al., 1995).

1.2.2. Le cholestérol

Le cholestérol s'intercale au sein de la bicouche phospholipidique. Il s'insère dans la membrane avec son groupement hydroxyle polaire orienté vers les têtes polaires des phospholipides et sa partie apolaire (noyau tétracyclique et chaîne hydrocarbonée) orientée parallèlement aux chaînes d'acides gras des phospholipides (Figure 3) (Maxfield et al., 2005; Matsingou et al., 2007).

Figure 3: Structure du cholestérol (a), positionnement du cholestérol au sein de la monocouche lipidique (b) (Maxfield et al., 2005).

A l'état gel (au dessous de T_m), le cholestérol, à de faibles concentrations, tend à augmenter le désordre des phospholipides, particulièrement au niveau des chaînes hydrocarbonées et par

conséquent possède un effet fluidifiant (Demetzos, 2008). Cependant, à une concentration de 30 % molaire, une phase « liquide ordonnée » est révélée, dans laquelle les chaînes hydrocarbonées ont une conformation plus ordonnée (Kyrikou et al., 2005). Ainsi, à l'état fluide (au-dessus de T_m), le cholestérol exerce un effet condensant; il rassemble fermement les phospholipides et la membrane devient moins fluide et moins perméable aux molécules hydrophiles et aux ions (Mills et al., 2009). Il est alors un modulateur de la fluidité de la bicouche lipidique formant les liposomes.

1.2.3. Autres constituants

Selon l'application souhaitée, d'autres constituants peuvent également entrer dans la composition des liposomes. Par exemple, les chaînes de polyéthylène glycol (PEG) sont souvent greffées sur des phospholipides ou du cholestérol. La PEGylation permet une stabilisation stérique des liposomes (Kontogiannopoulos et al., 2014).

Dans un autre cas, pour d'autres applications, l'addition d'un « edge activator » déstabilise les bicouches lipidiques formant des liposomes dits déformables ou transfersomes (Cevc et Blume, 1992). Les « edge activators » les plus souvent utilisés sont des tensioactifs comme le déoxycholate de sodium, les polysorbates ou les esters de sorbitane (Cevc et Blume, 1992 ; Trotta et al., 2004).

1.3. Classification des liposomes

Les liposomes sont classés en fonction de leur nombre de bicouches appelé lamellarité et de leur taille (Rongen et al., 1997; Laouini et al., 2012a). Ces caractéristiques varient en fonction de la méthode de préparation et des matières premières utilisées pour les former.

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

En prenant en compte la taille des liposomes, on peut distinguer parmi les unilamellaires, les vésicules de petite taille «*small unilamellar vesicles* ou *SUV*» dont la taille est comprise entre 20 et 100 nm, les vésicules de grande taille «*large unilamellar vesicles* ou *LUV*» de taille allant de 100 à 1000 nm et les vésicules géantes «*giant unilamellar vesicles* ou *GUV*» dont la taille est

supérieure à 1000 nm.

Les vésicules oligolamellaires «*oligolamellar vesicles* ou *OLV*» ont une taille comprise entre 100 et 500 nm et comptent environ 5 bicouches concentriques. Les vésicules multilamellaires «*multilamellar vesicles* ou *MLV*» dont la taille est supérieure à 500 nm comptent plusieurs bicouches concentriques (entre 5 et 20). Les vésicules multivésiculaires «*multivesicular vesicles* ou *MVV*» sont des vésicules formées de plusieurs bicouches non concentriques emprisonnées dans une vésicule plus grosse dont la taille est supérieure à 1000 nm. Ces éléments sont regroupés sur la Figure 4.

Figure 4: Les différentes classes de liposomes selon la taille et le nombre de lamelles (Laouini et al., 2012a).

1.4. Méthodes de préparation des liposomes à petite échelle

Le choix de la méthode de préparation des liposomes dépend de plusieurs paramètres (Mozafari et al., 2008):

1. Les propriétés physico-chimiques de la molécule encapsulée et celles des composants liposomiques
2. La nature du milieu dans lequel les vésicules lipidiques seront dispersées

3. La concentration de la substance encapsulée et sa toxicité potentielle
4. La taille optimale, la polydispersité et la durée de vie des vésicules pour l'application prévue
5. La reproductibilité de la méthode et la possibilité de production à grande échelle des liposomes.

Les méthodes de préparation des liposomes se divisent en quatre groupes principaux (Rongen et al., 1997; Akbarzadeh et al., 2013):

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

Ces méthodes sont basées sur la dispersion des lipides dans le milieu aqueux après élimination du solvant organique (Akbarzadeh et al., 2013).

1.4.1. Les méthodes mécaniques de dispersion de phospholipides

1.4.1.1. Hydratation du film lipidique

Cette méthode décrite par Bangham et al., 1965 est la plus utilisée pour la préparation des MLV (Figure 5). C'est une méthode simple et rapide. Les lipides sont tout d'abord dissous dans un solvant organique ou dans un mélange de solvants organiques. Le mélange chloroforme: méthanol (2 :1) est souvent utilisé. Le solvant est ensuite évaporé ce qui provoque la formation d'un film lipidique mince sur la paroi du ballon. Le film lipidique est hydraté en ajoutant une phase aqueuse; la dispersion ainsi formée est agitée par vortex pour une durée de quelques minutes. L'étape d'hydratation est réalisée à une température au-dessus de la T_m du phospholipide ou à la T_m la plus élevée si un mélange de phospholipides est utilisé. 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 (Bangham et al., 1965). Ce procédé nécessite des méthodes d'homogénéisation et de réduction de taille des MLV par traitement mécanique, comme la sonication, l'extrusion et la microfluidisation.

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 (Chen et al., 2007; Hatzi et al., 2007).

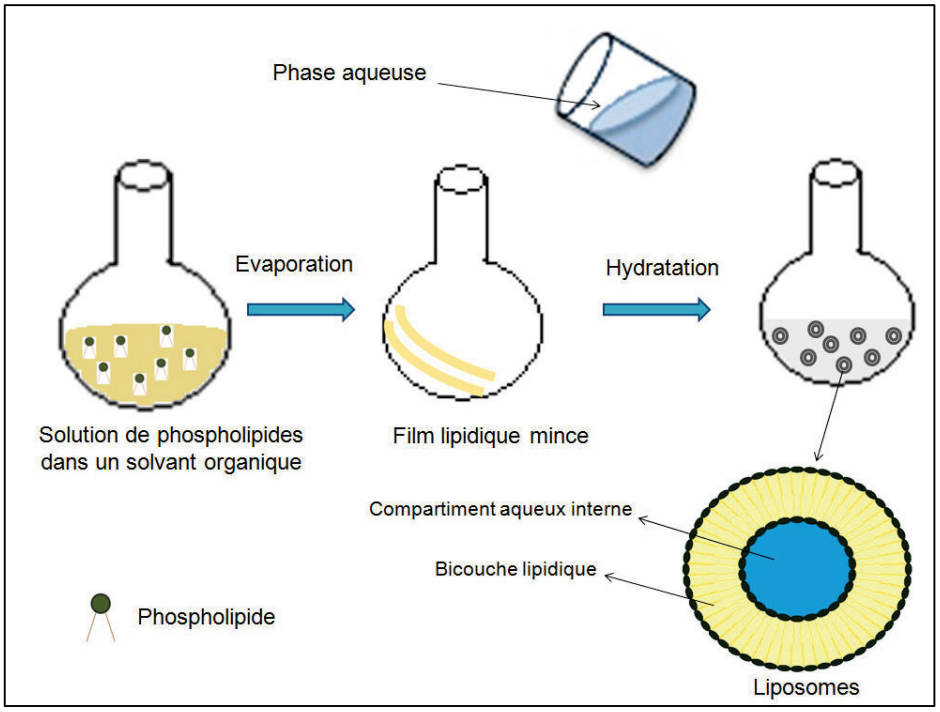


Figure 5: Préparation des liposomes par la méthode d'hydratation du film lipidique.

1.4.1.2. Sonication

Les MLV subissent une sonication soit dans un bain à ultrasons à une température supérieure à la T_m du phospholipide ou bien en utilisant une sonde à ultrasons plongée directement dans la dispersion de liposomes (Silva et al., 2010; Cho et al., 2013). Les ultrasons fournissent de l'énergie acoustique induisant une pression brisant les MLV en petites vésicules unilamellaires de type SUV (Cho et al., 2013).

La durée et la force de sonication influencent les vésicules traitées (Cho et al., 2013). En effet, une augmentation de la durée et de la force de sonication entraînent une réduction de la taille des liposomes (Silva et al., 2010). Cependant, cette méthode possède plusieurs inconvénients comme: un faible volume aqueux interne, une faible efficacité d'encapsulation, une possible dégradation des phospholipides et des molécules encapsulées, une contamination du milieu par le métal de la sonde (titanium) dans le cas de la sonication par une sonde à ultrasons (Riaz et al.,

1996; Akbarzadeh et al., 2013). En effet, Xia et al., 2005 ont démontré une diminution de l'efficacité d'encapsulation des molécules encapsulées comme le sulfate ferreux en augmentant la force de sonication (Xia et al., 2005).

1.4.1.3. Extrusion

L'extrusion des liposomes est réalisée soit à travers des membranes de polycarbonate ou bien sur une presse de French.

1.4.1.3.1. Membrane de polycarbonate

Cette technique consiste à forcer une suspension des liposomes à traverser un filtre de polycarbonate ayant une taille des pores bien définies afin d'obtenir des liposomes d'un diamètre proche de la taille des pores de la membrane utilisée (Lapinski et al., 2007). L'extrusion est réalisée sous atmosphère d'azote et sous pression modérée (100-250 psi) à une température supérieure à la T_m du phospholipide (MacDonald et al., 1991). Elle implique la rupture et le réarrangement spontané des vésicules lors du passage à travers la membrane de polycarbonate (MacDonald et al., 1991). Elle permet une homogénéisation des suspensions de MLV qui peuvent être filtrées successivement à travers des membranes de dimension de pores décroissante, produisant ainsi des vésicules plus petites et unilamellaires. Des dispositifs permettant d'obtenir des LUV sont disponibles sur le marché sous le nom commercial de « LUVET » pour « Large Unilamellar Vesicles by Extrusion Techniques » ou extrudeur. Néanmoins, l'extrusion peut provoquer une diminution du taux d'encapsulation du principe actif. En effet, l'efficacité d'encapsulation de la dexaméthasone, molécule hydrophobe, diminue de 50 % environ après extrusion (Bhardwaj et al., 2010).

1.4.1.3.2. Presse de French

L'extrusion des MLV peut également s'effectuer sur une presse de French (*French pressure cell)* 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 (Hamilton et al., 1980). Elle nécessite donc des pressions plus élevées que celles utilisées avec les membranes de polycarbonate. Elle présente plusieurs avantages par rapport à la sonication. En effet, le passage répétitif à travers la presse de

French n'altère pas les liposomes. Aucune dégradation des phospholipides n'est détectée après dix passages consécutifs à 20 000 psi en absence d'une atmosphère d'azote (Hamilton et al., 1980). Cependant, cette méthode est limitée principalement par la difficulté d'atteindre une température élevée et d'obtenir des volumes relativement importants (> 50 ml) (Hamilton et al., 1980; Riaz et al., 1996).

1.4.1.4. Microfluidisation

La microfluidisation 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 (*Microfluidizer*^{TM}). 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 (Vemuri et al., 1990). Plus on augmente le nombre de passage à travers le microfluidiseur, plus la taille des liposomes et leur polydispersité diminuent (Vemuri et al., 1990). Cette technique permet la production des liposomes à grande échelle dans des conditions stériles (Vemuri et al., 1990; Sorgi et Huang, 1996).

1.4.2. Les méthodes basées sur l'élimination du détergent

Les détergents à leurs concentrations micellaires critiques (CMC) sont utilisés pour solubiliser les phospholipides dans un milieu aqueux. Il se forme alors des micelles mixtes. Lorsque le détergent est éliminé, les micelles deviennent progressivement plus riche en phospholipides et, enfin, se combinent pour former des liposomes unilamellaires (Figure 6) (Alpes et al., 1986; Akbarzadeh et al., 2013). La taille des liposomes dépend de la nature chimique et de la concentration des phospholipides et du détergent utilisés (Wagner et al., 2010). Les détergents utilisés sont le Triton X-100, le Tween 20, l'octyl glucoside et le cholate de sodium (Akbarzadeh et al., 2013). Ils peuvent être éliminés par dialyse (Purwaningsih et al., 2004; Alpes et al., 1986), par chromatographie d'exclusion stérique sur un gel Sephadex G50 (Abeywardena et al., 1983) ou par adsorption sur des résines hydrophobes (Madani et al., 2011). Le principal inconvénient est la rétention de traces de détergent à l'intérieur des liposomes (Alpes et al, 1986).

Figure 6: Préparation des liposomes par la méthode d'élimination du détergent (Rigaud et al., 2000).

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

A partir d'une suspension de liposomes de type SUV ou MLV, cette méthode consiste à répéter plusieurs cycles de congélation dans l'azote liquide suivis de décongélation dans l'eau chaude. Des LUV se forment soit par fusion des SUV de départ ou bien par rupture des MLV (Traikia et al., 2000; Akbarzadeh et al., 2013). La taille des liposomes obtenus est inférieure à 200 nm (Traikia et al., 2000). En augmentant le nombre de cycles, la taille et la lamellarité des MLV diminuent alors que le volume aqueux et l'efficacité d'encapsulation des molécules hydrophiles augmentent (Sriwongsitanont et al., 2011, Traikia et al., 2000). En effet, l'encapsulation du sulfate ferreux, une molécule hydrophile, est améliorée après congélation-décongélation des liposomes de type MLV préparés par hydratation du film lipidique (Xia et al., 2005).

1.4.4. Les méthodes basées sur l'élimination du solvant organique

1.4.4.1. Evaporation en phase inverse

Cette méthode permet l'obtention des liposomes unilamellaires avec une grande cavité aqueuse LUV également appelés REV pour « Reverse phase Evaporation Vesicles » (Szoka et Papahadjopoulos, 1978). Elle consiste à dissoudre les phospholipides dans un solvant organique comme le diéthyléther ou l'isopropyléther ou dans un mélange isopropyléther:chloroforme 1:1 (Figure 7.1) et d'y ajouter la phase aqueuse contenant les molécules hydrophiles à encapsuler. A

ce stade, les phospholipides se placent à l'interface entre les deux phases non miscibles (Figure 7.2). Après sonication pour une durée de quelques minutes, une émulsion huile/eau se forme dans laquelle les phospholipides s'organisent sous forme de micelles inverses entourant des compartiments aqueux (Figure 7.3). L'élimination lente du solvant organique par évaporation sous pression réduite entraîne un rapprochement de ces micelles inverses et la formation d'un gel (Figure 7.4). La pression est ensuite réduite davantage pour favoriser l'évaporation totale de l'éther et entraîner la rupture de l'état gel (Figure 7.5). Enfin, les monocouches de phospholipides se rapprochent pour former les liposomes (Figure 7.6) (Szoka et al., 1978). Les vésicules ainsi obtenues ont un volume aqueux d'encapsulation 4 fois supérieur à celui des MLV obtenues par hydratation du film lipidique et 30 fois supérieur à celui des SUV obtenues par sonication (Szoka et al., 1978; Laouini et al., 2012a). Cette méthode permet d'obtenir une encapsulation maximale de la phase aqueuse (jusqu'à 65 % pour des solutions de faible force ionique) permettant d'encapsuler une grande variété de macromolécules hydrosolubles avec une grande efficacité (Szoka et al., 1978; Laouini et al., 2012a). L'inconvénient principal de cette technique est le contact des molécules à encapsuler avec le solvant organique et leur exposition, même pour une courte durée, à la sonication. Ces conditions peuvent causer la rupture des brins d'ADN et la dénaturation des protéines (Szoka et al., 1978).

Figure 7: Préparation des liposomes par évaporation en phase inverse (Szoka et al., 1978).

1.4.4.2. Injection de solvant organique

1.4.4.2.1. Injection d'éthanol

La méthode d'injection d'éthanol est décrite par Batzri et Korn en 1973. Elle consiste à dissoudre les phospholipides dans l'éthanol. La phase organique résultante est ensuite injectée à l'aide d'une seringue dans une solution aqueuse soumise à une agitation magnétique à une température supérieure à la T_m du phospholipide. Dès que la phase organique entre en contact avec la phase aqueuse, les molécules de lipides se précipitent et forment des fragments de bicouches planes « bilayer planar fragments ou BPF», qui eux-mêmes forment des liposomes (Lasic, 1988). Enfin, l'éthanol et une partie de l'eau sont éliminés à l'aide d'un évaporateur rotatif sous pression réduite (Batzri et al., 1973; Jaafar-Maalej et al., 2010, Song et al., 2011) (Figure 8).

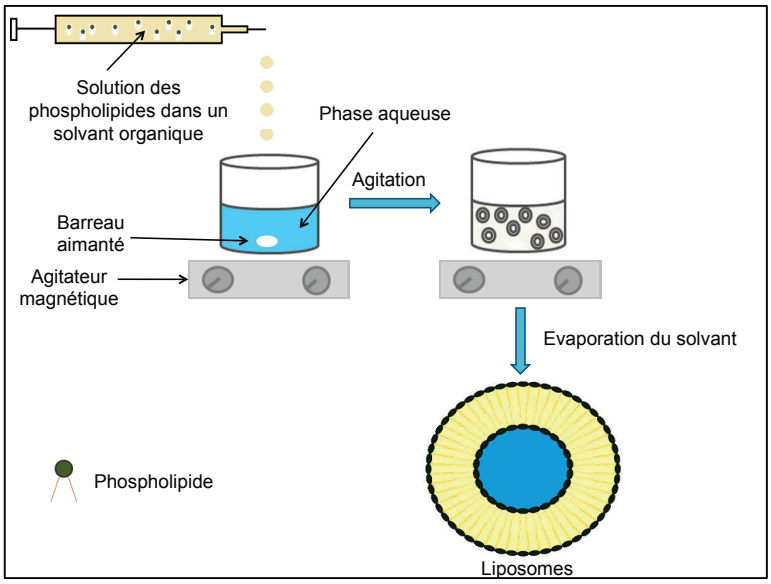


Figure 8: Préparation des liposomes par injection de solvant organique.

La méthode d'injection d'éthanol présente plusieurs avantages par rapport aux autres techniques utilisées pour la préparation des liposomes (Batzri et al., 1973; Wang et al., 2003; Wagner et al., 2002a et 2006; Justo et al., 2010 et 2011; Jaafar-Maalej et al., 2010; Yang et al., 2012):

- rapide, simple, reproductible, peu coûteuse;
- procédé en une seule étape (sans extrusion ni sonication);
- ne nécessite pas l'utilisation des solvants dangereux ni des traitements mécaniques qui peuvent endommager les liposomes ainsi que les substances encapsulées;

- obtention des liposomes stables, de petite taille avec une distribution étroite et une efficacité d'encapsulation élevée;
- encapsulation d'une grande variété de substances (hydrophiles, hydrophobes, amphiphiles);
- Possibilité de production à grande échelle.

Plusieurs paramètres modifient les caractéristiques des liposomes. Plus la concentration des lipides dans la phase organique augmente plus la taille des liposomes augmente (Kremer et al., 1977; Jaafar-Maalej et al., 2010). De plus, la taille des vésicules décroît avec l'augmentation de la vitesse d'agitation de la phase aqueuse (Jaafar-Maalej et al., 2010) et augmente avec l'augmentation du rapport volumique solvant/eau (Maitani et al., 2001; Yang et al., 2012). En revanche, la vitesse d'injection de la solution organique (Kremer et al., 1977; Jaafar-Maalej et al., 2010; Song et al., 2011), la variation du pH du milieu (Maitani et al., 2001) et le contenu en cholestérol n'affectent pas la taille des liposomes (Jaafar-Maalej et al., 2010).

Selon cette technique, l'efficacité d'encapsulation des molécules à encapsuler est également affectée par plusieurs paramètres. Il a été démontré que l'efficacité d'encapsulation de la cytosine arabinoside, une substance hydrophile, augmente avec l'augmentation de la concentration des lipides dans la phase organique mais elle diminue avec l'augmentation du contenu en cholestérol et la diminution du rapport volumique solvant/eau (Jaafar-Maalej et al., 2010). L'efficacité d'encapsulation de cette molécule varie entre 3 et 16 %. Par ailleurs, l'efficacité d'encapsulation de la béclométhasone dipropionate, une molécule hydrophobe, est plus élevée (entre 87 et 100 %), diminue légèrement en présence du cholestérol, et augmente avec l'augmentation de la concentration des lipides (Jaafar-Maalej et al., 2010).

1.4.4.2.2. Injection d'éther

Deamer et Bangham (1976) ont décrit la méthode de préparation des liposomes par injection d'éther. La solution de lipides dissoute dans l'éther est injectée lentement dans une solution aqueuse chauffée à 55-65 °C au-dessus du point d'ébullition de l'éther. Ceci provoque une évaporation rapide de l'éther et la formation des liposomes (Deamer et al., 1976). La méthode d'injection d'éther diffère donc de l'injection éthanolique par le fait que l'éther est non-miscible

dans la phase aqueuse et s'évapore lors du contact avec la phase aqueuse chaude (Laouini et al., 2012a). Dans le cas de l'éthanol, son élimination totale est difficile parce qu'il se forme un mélange azéotropique avec l'eau (Dua et al., 2012).

1.4.4.2.3. Injection d'isopropanol

Gentine et al., 2012 ont testé plusieurs solvants organiques tels que le t-butanol, n-butanol, éthanol, éthyle acétate, isopropanol et n-propanol dans le but de contrôler le diamètre des liposomes formés par la méthode d'injection de solvant, d'éviter la grande variabilité de taille et de remplacer l'éthanol.

Il a été démontré que les liposomes obtenus par l'injection d'éthanol classique possèdent une taille de 133 nm et un indice de polydispersité (pdI) de 0,275. Toutefois, les solvants n-butanol et éthyle acétate entraînent la formation des populations liposomiales polydisperses dont le pdI est respectivement de l'ordre de 0,489 et 0,354 et la taille est environ 200 nm. Deux populations liposomiales ont été également obtenues avec le n-propanol : une population de 103 nm (44 %) et une autre de 20 nm (56 %) avec un pdI de 0,207. Les liposomes obtenus par la méthode d'injection du t-butanol et de l'isopropanol sont plus petits que ceux obtenus par l'injection d'éthanol classique. En effet, les liposomes obtenus avec t-butanol possèdent une taille et un pdI respectivement de 98,8 nm et 0,211. Ces valeurs sont similaires à celles obtenues avec les liposomes préparés par l'isopropanol (Taille de 84,8 nm et pdI de 0,224). La différence entre les valeurs obtenues par les différents solvants a été expliquée par le fait que les solvants peuvent affecter la courbure de la membrane et interagir autrement avec les phospholipides utilisés, selon leur structure, influant ainsi sur la forme et la taille de vésicules (Gentine et al., 2012).

Par ailleurs, l'isopropanol est éliminé par dialyse, moins toxique pour les hommes que l'éthanol et le t-butanol. Ce dernier est déjà utilisé pour la préparation des liposomes par lyophilisation. En outre, les valeurs de potentiel zêta des liposomes formés avec l'isopropanol sont très proches de celles obtenues avec l'éthanol. De ce fait, les auteurs ont signalé que la méthode d'injection de l'isopropanol est une bonne alternative à l'injection éthanolique pour la préparation des liposomes (Gentine et al., 2012).

Trois types de phospholipides qui diffèrent par la charge (cationique, anionique et neutre) et deux autres qui diffèrent par le degré de saturation des chaînes hydrocarbonées (saturée et

insaturée) ont été utilisés pour préparer des liposomes afin d'étudier l'effet de la nature et de la concentration des phospholipides sur la taille et la distribution de taille des liposomes. En utilisant l'injection de l'isopropanol, les résultats ont montré que ces deux paramètres n'affectent pas la taille des liposomes en comparaison avec l'injection d'éthanol. En revanche, la nature de la phase aqueuse affecte la taille des liposomes. Selon cette méthode, il a été démontré que la taille des liposomes est contrôlée par la vitesse d'agitation de la phase aqueuse et la vitesse d'injection de la solution des lipides dans l'isopropanol (Gentine et al., 2012).

Les volumes des préparations liposomiales obtenues par la méthode d'injection d'éthanol sont généralement inferieurs à 1 L, par exemple: 1 ml (Gentine et al., 2012), 10 ml (Kremer et al., 1977; Stano et al., 2004; Justo et al., 2005), 10,75 ml (Pons et al., 1993), 25 ml (Maitani et al., 2001), 30 ml (Pham et al., 2012; Gentine et al., 2012; Jaafar-Maalej et al., 2010) pouvant atteindre 200 ml (Naeff, 1996), 300 et 800 ml (Justo et al., 2011).

1.5. Production des liposomes à grande échelle

Le contrôle de la variation de la taille, de la polydispersité et de la lamellarité des liposomes constitue un défi pour la plupart des méthodes de préparation de liposomes. Ce problème est exacerbé lors du passage à l'échelle industrielle (Riaz et al., 1996; Wagner et al., 2010). Pour la délivrance des médicaments et pour des applications cosmétiques, la taille des liposomes souhaitable doit être comprise entre 50 et 200 nm (Woodle 1995; Nastruzzi et al., 1993). Par conséquent, la réduction de la taille et de la lamellarité exige une homogénéisation, des traitements mécaniques (sonication, extrusion) ou des cycles de congélation-décongélation. Ces étapes supplémentaires rendent difficile ainsi leur production à grande échelle (Jaafar-Maalej et al., 2010). Les liposomes préparés pour un but commercial doivent être économiques et reproductibles. Ils doivent également posséder une distribution de taille homogène (Justo et al., 2011).

Récemment, de nouvelles approches basées sur le principe de la méthode d'injection d'éthanol sont introduites pour la production des liposomes à grande échelle. On peut citer la microfluidisation citée ci-dessus (Sorgi et Huang, 1996), l'injection par écoulement transversal «cross-flow injection technique» (Wagner et al., 2002; 2006), l'injection par écoulement

transversal en utilisant un connecteur spécial Y combiné avec des procédures d'ultrafiltration et d'extrusion à haute pression (Zhong et al., 2013), le contacteur à membrane (Jaafar-Maalej et al., 2011; Laouini et al., 2011; 2013 a et b; Charcosset et al., 2015) et le pilote (Charcosset et al., 2015).

1.5.1. Injection par écoulement transversal ou « Cross flow injection technique »

Le dispositif d'injection par écoulement transversal est constitué de deux tubes en acier inoxydable soudés ensemble pour former une croix (Figure 9-1). Au point de connexion ou d'injection, le module est percé par électro-érosion avec un diamètre de pores de 150 et 250 µm. La solution aqueuse est poussée à l'aide d'une pompe péristaltique du récipient 2 au récipient 3 (mode continu) ou en « batch mode » de retour au récipient 2. Au cours de la circulation de la phase aqueuse à travers le module d'injection, la phase organique (éthanol) dans laquelle les phospholipides et le cholestérol sont dissous est injectée dans la phase aqueuse en variant la pression d'azote (Wagner et al., 2002 a and b) (Figure 9). Le diamètre des pores du module n'affecte pas la taille des liposomes mais un faible débit de la phase aqueuse affecte l'homogénéité des liposomes. Par contre, la taille des liposomes est contrôlée par la concentration de lipides dans l'éthanol et la pression d'injection de la phase organique (Wagner et al., 2002 a). Le mode utilisé (mode continu ou batch mode) n'affecte pas la taille et la distribution de taille des liposomes. En effet, la taille des liposomes varie entre 20 et 650 nm avec une taille moyenne environ 150 nm, en utilisant les conditions experimentales suivantes : débit de la phase aqueuse 900 ml/min, pression de la phase organique 1,6 bar et diamètre des pores 250 µm (Wagner et al., 2002 a). Des résultats reproductibles en terme de taille, distribution de taille et efficacité d'encapsulation des protéines sont obtenus quelque soit l'échelle utilisée. Ainsi, en passant d'un volume de 300 ml à 2,4 L, la taille des liposomes reste inchangeable environ 150 nm (Wagner et al., 2002 a) et l'efficacité d'encapsulation des protéines reste presque la même autour de 30 % (Wagner et al., 2002 b). Les liposomes obtenus sont unilamellaires. Ce dispositif est un procédé continu, simple, reproductible, réalisable dans des conditions de stérilité et sécurité, et permet l'encapsulation d'une variété de substances comme de grandes protéines hydrophiles ou de petites molécules amphiphiles (Wagner et al., 2002 a, b; 2006). Il permet la préparation des liposomes avec un volume allant de 100 ml à 2,4 L (Wagner et al., 2002 a).

Figure 9: Préparation des liposomes par injection par écoulement transversal ou « cross-flow injection technique » (Wagner et al., 2002 a, b).

Par ailleurs, Zhong et al., 2013 ont préparé 1 L de liposomes encapsulant des oligonucléotides par la méthode d'injection par écoulement transversal. Les deux phases organique (éthanol) et aqueuse sont poussées chacune par une pompe péristaltique à travers des tubes en silicone de diamètre intérieur de 6,4 mm reliés par un connecteur sous forme Y à une aiguille (Figure 10). Les liposomes se forment spontanément. Afin d'éliminer l'éthanol et de concentrer la suspension liposomiale, cette technique est associée à des procédures d'ultrafiltration. Les liposomes subissent ensuite une extrusion à haute pression à travers une membrane de polycarbonate de diamètre de pores de 100 nm pour réduire la taille des liposomes (Zhong et al., 2013).

Les liposomes témoins obtenus par la méthode d'injection par écoulement transversal possèdent une taille de 262 nm et un pdI de 0,25. Après ultrafiltration, les liposomes témoins présentent un pdI de 0,18 mais leur taille augmente jusqu'à 306 nm. Après 10 cycles d'extrusion, ces liposomes témoins possèdent une taille, un pdI et un potentiel zêta respectivement de 183 nm, 0,14 et 46,9 mV. Une augmentation significative de la taille et du pdI est observée après lyophilisation de ces liposomes en présence de saccharose et mannitol. En revanche, la lyophilisation de ces liposomes en utilisant le lactose comme cryoprotecteur n'affecte pas la taille, le pdI et le potentiel zêta des liposomes. Les poudres liposomiales obtenues sont ensuite réhydratées en présence des oligonucléotides. Les liposomes encapsulant les oligonucléotides ont une taille de

229 nm, un pdI de 0,28, un potentiel Zêta de 29,7 mV et une efficacité d'encapsulation (EE) de 90 %. (Zhong et al., 2013). Les résultats ont montré que ces liposomes permettent une libération contrôlée des oligonucléotides pour une durée de 14 jours à 37 °C, maintiennent la taille, le pdI, le potentiel zêta, l'efficacité d'encapsulation des oligonucléotides et le profil de libération après 6 mois de stockage à 5 et 25 °C. Ces liposomes inhibent la prolifération des cellules du cancer de foie humain et la croissance du carcinome hépatocellulaire dans le modèle animal (Zhong et al., 2013).

Figure 10: Injection par écoulement transversal en utilisant un connecteur spécial Y (Zhong et al., 2013).

1.5.2. Contacteur à membrane

C. Charcosset et ses collègues ont développé le procédé de contacteur à membrane utilisé pour la préparation des liposomes à grande échelle (Figure 11) (Jaafar-Maalej et al., 2011). Dans ce procédé, une phase organique constituée de l'éthanol dans laquelle les phospholipides et le cholestérol sont dissouts est poussée à travers la membrane ayant une taille des pores bien définie soit au moyen du gaz azote à une pression inférieure à 5 bar (Jaafar-Maalej et al., 2011; Laouini et al., 2011) ou bien d'une pompe péristaltique (Charcosset et al., 2015). En même temps, la phase aqueuse circule tangentiellement à la membrane à l'aide d'une pompe. Les liposomes se forment spontanément lorsque les deux phases entrent en contact à l'intérieur du module membranaire. Le système est arrêté dès que des bulles d'air atteignent le tube connectant la phase organique au module membranaire, ce qui indique que le volume initial de la phase organique est entièrement consommé. Les débits des deux phases sont réglés de manière à ce qu'elles passent en un temps identique. Les liposomes sont ensuite soumis sous agitation à température ambiante pendant 15 min. Enfin, l'éthanol et une partie de l'eau sont éliminés sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif (Charcosset et al., 2015; Jaafar-Maalej et al., 2011; Laouini et al., 2011). A la fin de l'expérience, la membrane est régénérée par circulation

d’eau et d’éthanol.

Figure 11: Préparation des liposomes par contacteur à membrane (Charcosset et al., 2015).

Ce procédé possède plusieurs avantages notamment: la simplicité, la rapidité, la continuité, la reproductibilité, le contrôle de la taille des liposomes en réglant les paramètres du procédé, préparations de grands volumes de liposomes, l’application à de nombreuses molécules avec des efficacités d’encapsulation élevées (Jaafar-Maalej et al., 2011; Laouini et al., 2011, Laouni et al., 2012; Greige-Gerges et Sebaaly, 2015).

Ce procédé permet l’utilisation de différents types de membrane: « Shirasu Porous Glass » (SPG) de nature hydrophile avec une taille moyenne des pores de 0,4; 0,9 ou 10,2 µm (Jaafar-Maalej et al., 2011; Charcosset et al., 2015), «nickel microengineered membrane » contenant des pores uniformes cylindriques avec une taille de 5, 10, 20 ou 40 µm disposés selon un réseau hexagonal dont les pores sont espacés de 80 ou 200 µm (Laouini et al., 2013 a et b) et des fibres creuses en polypropylène de nature hydrophobe avec un diamètre interne et externe respectivement de 220 et 300 µm et une taille des pores estimée de 40 nm (Laouini et al., 2011).

En utilisant des « nickel microengineered membrane », Laouini et al., 2013 a and b ont montré que la taille des liposomes augmente avec l’augmentation de la taille des pores de la membrane.

Par contre, elle diminue lorsque la distance entre les pores augmente. Ceci est expliqué par une réduction de la probabilité de coalescence entre les liposomes (Laouini et al., 2013 b).
Par ailleurs, il a été démontré en utilisant soit la membrane SPG ou bien les fibres creuses en polypropylène que la taille des liposomes diminue avec la diminution de la pression de la phase organique et la concentration en phospholipides et avec l'augmentation du rapport volumique eau/éthanol (Jaafar-Maalej et al., 2011; Laouini et al., 2011).

L'efficacité d'encapsulation de différentes molécules obtenue par ce procédé est élevée, par exemple 93 % pour la spironolactone (Laouini et al., 2011), 63 % pour l'indométacine (Jaafar-Maalej et al., 2011), 98 % pour la béclométhasone dipropionate (Jaafar-Maalej et al., 2011) et 99,87 % pour la vitamine E (Laouini et al., 2013b). Ces valeurs élevées sont probablement attribuées au caractère lipophile élevé de ces principes actifs (Laouini et al., 2013b et 2011; Jaafar-Maalej et al., 2011).

Les liposomes témoins sont stables et conservent la taille, l'indice de polydispersité et le potentiel zêta après 1 mois (Jaafar-Maalej et al., 2011) ou 3 mois (Laouini et al., 2011; Laouini et al., 2013 b) de stockage à 5 °C. De plus, les liposomes encapsulant la spironolactone et la vitamine E maintiennent leur efficacité d'encapsulation après 2 mois de stockage à 5 °C (Laouini et al., 2013 b et 2011).

Ce procédé permet l'obtention de volumes intermédiaires de liposomes tels que 600 mL (Charcosset et al., 2015; Laouini et al., 2013 b) ou 750 mL (Jaafar-Maalej et al., 2011; Laouini et al., 2011).

1.5.3. Pilote

En se basant sur le principe de l'injection d'éthanol et du contacteur à membrane, un pilote a été mis au point. Ce procédé a permis l'obtention de 3 L de liposomes, et des plus grands volumes jusqu'à 10 L peuvent être obtenus (Charcosset et al., 2015).
Le pilote est adapté pour les deux méthodes d'injection: tube ou membrane (Charcosset et al., 2015). La Figure 12 représente la préparation des liposomes par pilote équipé d'un tube (Figure 12a) ou d'une membrane (Figure 12b) pour l'injection de la phase organique dans la phase

aqueuse. Le procédé implique l'utilisation de deux réacteurs à double enveloppe (A et B) de capacité 10 L équipés d'agitateur à hélice à 4 pales. Ils peuvent être chauffés jusqu'à 100 °C à l'aide d'un bain de circulation. Le second réacteur B est connecté à un régulateur de vide afin d'éliminer l'éthanol par évaporation sous pression réduite à la fin de la préparation. C'est un procédé continu et simple qui permet l'évaporation de l'éthanol directement sur le pilote. Le pilote peut être utilisé dans des conditions stériles.

Figure 12: Préparation des liposomes par pilote équipé d'un tube (a) ou d'une membrane (b) pour injection de la phase organique dans la phase aqueuse (Charcosset et al., 2015).

Pour la préparation à l'aide d'un pilote équipé d'un tube d'injection (Figure 12a), le premier réacteur A contient la phase organique et le second B contient la phase aqueuse sous agitation. La phase organique est injectée dans la phase aqueuse au moyen d'une pompe. Pour l'injection,

un tube de diamètre interne de 5 mm est plongé dans la phase aqueuse. A la fin de la préparation, les suspensions liposomiales sont maintenues dans le réacteur B sous agitation pendant 15 min (Charcosset et al., 2015).

Pour la préparation à l'aide d'un pilote équipé d'une membrane SPG pour l'injection (Figure 12b), un récipient supplémentaire C contient la phase organique et le premier réacteur A contient la phase aqueuse. La phase organique est poussée à travers la membrane au moyen d'une pompe péristaltique. La phase aqueuse circule à l'intérieur de la membrane grâce à une seconde pompe péristaltique. Les débits des deux phases sont réglés de manière à ce qu'elles passent en un temps identique. A la fin de la préparation, les suspensions liposomiales sont recueillies à la sortie de la membrane dans le deuxième réacteur à double enveloppe B et soumises à agitation pendant 15 min (Charcosset et al., 2015).

Dans les 2 cas, Charcosset et al. (2015) ont préparé 3 L de liposomes. Après agitation, la suspension liposomiale est divisée en deux lots identiques de 1.5 L. L'éthanol est éliminé par évaporation sous pression réduite soit directement sur le pilote ou bien à l'aide d'un évaporateur rotatif. Des résultats similaires en terme de taille, de pdI et de morphologie ont été obtenus pour les liposomes témoins quelque soit la méthode de préparation (contacteur à membrane, pilote équipé d'un tube ou d'une membrane) et d'évaporation d'éthanol (sur le pilote ou par évaporateur rotatif). Ces résultats indiquent l'efficacité de ces procédés de préparation. La membrane est régénérée en circulant de l'eau et de l'éthanol à la fin de l'expérience (Charcosset et al., 2015).

En effet, Charcosset et al. (2015) ont comparé les caractéristiques des liposomes obtenus par le contacteur à membrane, le pilote équipé d'un tube et d'une membrane. Ils ont démontré que tous ces procédés permettent la production des liposomes multilamellaires, quasi-sphériques, de petite taille de l'ordre de 120 nm, avec une distribution de taille étroite où l'indice de polydispersité est inférieur à 0,18, une bonne reproductibilité et stabilité pour 1 mois de stockage à 5 °C. Par ailleurs, ils ont montré que le pilote équipé d'une membrane pour l'injection améliore le micro-mélange de la phase organique dans la phase aqueuse, et permet d'optimiser le temps de la préparation et de contrôler précisément la taille des liposomes (Charcosset et al., 2015).

Dans nos travaux expérimentaux décrits dans la suite du manuscrit, nous avons utilisé la méthode d'injection d'éthanol pour la préparation des liposomes à petite échelle et la méthode de contacteur à membrane et de pilote avec une membrane pour l'injection de la phase organique dans la phase aqueuse pour la production à grande échelle.

1.6. Stabilité des liposomes

Une suspension liposomiale peut être sujette à des problèmes d'instabilité physique et chimique. La stabilité physique est reliée à la conservation de la taille des liposomes. La stabilité chimique est en relation avec la conservation de la structure et de la composition moléculaire des constituants (Chen et al., 2010). Les principaux problèmes d'instabilité des liposomes et leurs solutions sont abordés ci-dessous.

1.6.1. Agrégation des liposomes

Dans une suspension liposomiale, des phénomènes de fusion ou coalescence peuvent se produire aboutissant à des agrégats. Ainsi, l'incorporation dans la bicouche lipidique de lipides chargés négativement ou positivement réduit le phénomène d'agrégation grâce à l'augmentation des forces électrostatiques répulsives entre les liposomes (Weinstein et al., 1984; Piel et al., 2006). De plus, l'inclusion du cholestérol au sein des liposomes leur confère une meilleure stabilité (Tseng et al., 2007; Kyrikou et al., 2005). Le greffage des polymères comme le polyéthylène glycol (PEG) à la surface des liposomes les stabilise. En effet, la PEGylation empêche les contacts inter-particulaires par répulsion stérique et l'adsorption des molécules de reconnaissance des systèmes immunitaires (les opsonines) ce qui augmente le temps de séjour de ces liposomes dans le système vasculaire (Kontogiannopoulos et al., 2014).

1.6.2. Dégradation chimique des liposomes

Les phospholipides peuvent subir deux types de dégradation chimique: l'hydrolyse de leurs fonctions esters et la peroxydation des chaînes d'acides gras insaturés (Mosca et al., 2011; Liu et al., 2012). Ceci altère l'intégrité de la bicouche phospholipidique et peut entraîner la libération des principes actifs encapsulés.

1.6.2.1. Réaction de peroxydation

Principalement les phospholipides insaturés et polyinsaturés sont les plus susceptibles à subir l'oxydation (Mosca et al., 2011). La peroxydation lipidique est une réaction catalytique qui se définit par un enchaînement de réactions radicalaires aboutissant au clivage de la chaîne hydrocarbonée et la formation des peroxydes. Elle se déclenche en présence de l'oxygène, de la lumière, de la chaleur et des métaux. Les liposomes avec des chaînes lipidiques saturés sont plus résistants à la peroxydation (Justo et al., 2010). La peroxydation des phospholipides peut être limitée en stockant les liposomes à faible température (4 °C), à l'abri de l'air et de la lumière, en empêchant le contact direct avec les métaux lourds et en ajoutant des antioxydants tel que le butylhydroxytoluène (Metherel et al., 2013).

1.6.2.2. Réaction d'hydrolyse

Les liaisons esters présentes dans un phospholipide peuvent subir une hydrolyse dans les dispersions aqueuses, donnant lieu à un et/ou deux acides gras libres et un lysophospholipide. Ce dernier peut par la suite s'hydrolyser au niveau de la liaison phosphate ester pour donner l'acide glycérophosphorique. La température et le pH influencent la cinétique de la réaction d'hydrolyse. Un pH neutre de 6,5 et une faible température (4 °C) permettent de limiter la dégradation des phospholipides par hydrolyse (Grit et al., 1993). Par contre, l'hydrolyse augmente à des pH acide et basique (Grit et al., 1993; Liu et al., 2012).

In vivo, les phospholipides sont dégradés par des phospholipases, particulièrement la phospholipase A2. Cette dernière hydrolyse la liaison ester en C2 du glycérol et libère un acide gras libre et un 1-acyl-lysophospholipide (D'arrigo et al., 2010 ; Nishizuka et al., 1992; Liu et al., 2012).

1.6.3. Lyophilisation des liposomes

La lyophilisation des liposomes a été proposée afin de résoudre les problèmes d'instabilité chimique et physique qu'ils confrontent dans un milieu aqueux et de les conserver à long-terme (Chen et al., 2010). Trois étapes principales se déroulent lors de la lyophilisation (Abdelwahed et al., 2006):

- **La congélation:** elle permet de transformer l'eau libre en cristaux de glace. Cette étape permet de séparer une glace souvent très pure d'une phase résiduelle appelée matrice qui

contient la matière à lyophiliser et aboutit à une structure rigide. Un faible pourcentage d'eau qui reste à l'état liquide et non congelé est appelé eau adsorbée.

- **Le séchage primaire ou « dessiccation primaire »**: il permet d'éliminer l'eau par sublimation progressive de la glace. Le produit est soumis à un vide poussé : la glace se sublime passant directement de l'état solide à l'état gazeux sans passer par l'état liquide grâce au vide créé.
- **Le séchage secondaire ou « dessiccation secondaire » ou « désorption »**: il permet d'éliminer l'eau non congelée qui est retenue sur le produit par adsorption. Cette étape permet d'atteindre la valeur d'humidité résiduelle qui conditionne la stabilité.

Cependant, la lyophilisation des suspensions liposomiales peut engendrer de nombreux problèmes : Après congélation, des cristaux de glace se forment et sont capables d'altérer les bicouches lipidiques; après l'étape de déshydratation, des phénomènes d'agrégation/fusion des vésicules sont observés; et une perte du principe actif encapsulé (Chen et al., 2010; Darwis et al., 2002). Pour préserver alors les caractéristiques des liposomes après la phase de déshydratation/réhydratation, l'utilisation en quantités adéquates d'un agent cryoprotecteur comme les carbohydrates (saccharose, glucose, lactose, tréhalose, mannitol, dextrose et cyclodextrines) ou des polyalcools comme le glycérol, s'avère nécessaire (Stark et al., 2010; Yoshida et al., 2010; Chen et al., 2010).

Deux mécanismes de lyoprotection des sucres ont été proposés : remplacement de l'eau et vitrification. La figure 13 illustre le mécanisme de remplacement de l'eau lors de la lyophilisation et la réhydratation en absence et présence de lyoprotecteurs.

Figure 13: Mécanisme de remplacement de l'eau lors de la lyophilisation et la réhydratation (Chen et al., 2010).

Les bicouches lipidiques des liposomes sont dans un état libre en présence d'excès d'eau (Figure 13A), et passent, lors de la congélation, en un état condensé (B). Après séchage, les bicouches lipidiques deviennent compactes mais avec des possibilités de défauts d'emballage en raison de l'absence de lyoprotecteur (C). Enfin, l'eau se fuit lors de la réhydratation (D). En revanche, en présence de lyoprotecteur (sucre), les molécules d'eau sont progressivement remplacées par des molécules de lyoprotecteur. Les sucres interagissent avec les phospholipides via des liaisons hydrogènes entre les groupements hydroxyles des sucres et les groupements phosphates des phospholipides. Ces interactions maintiennent un espace entre les groupements de tête polaire des phospholipides et réduisent les interactions de Van der Waals entre les chaînes d'acides gras des phospholipides, réduisant ainsi la T_m (E). Enfin, les poudres lyophilisées peuvent être reconstituées par réhydratation (F) (Crowe et al., 1996; Chen et al., 2010).

Par ailleurs, les sucres forment durant la congélation une matrice amorphe emprisonnant les vésicules lors de la déshydratation. Cette matrice caractérisée par une viscosité élevée et une faible mobilité empêche ainsi la fusion des vésicules et la formation de cristaux qui aboutit à la libération de la molécule encapsulée (Wolkers et al., 2004; Chen et al., 2010).

Une augmentation de la taille des liposomes et une diminution significative de l'efficacité d'encapsulation du 5-fluorouracil, un agent antinéoplasique hydrophile, sont observées après lyophilisation des liposomes multilamellaires encapsulant le 5-fluorouracil en absence du saccharose. Par contre, la lyophilisation en présence du saccharose n'a pas affecté la taille des liposomes avec une rétention du 5-fluorouracil supérieure à 80 % (Glavas-Dodov et al., 2005).

La lyophilisation des liposomes multilamellaires encapsulant l'huile essentielle *Eugenia uniflora L.* en présence de saccharose et tréhalose a montré que le tréhalose était le cryoprotecteur le plus efficace pour la protection des liposomes, ainsi que pour la restauration des conditions d'origine des liposomes après réhydratation (Yoshida et al., 2010). De plus, Van den Hoven et al., 2012 ont étudié l'effet de trois cryoprotecteurs (saccharose, tréhalose et hydroxypropyl-β-cyclodextrine (HP-β-CD) sur la lyophilisation des liposomes PEGylés et encapsulant le prednisolone disodium phosphate. Il a été mis en évidence que l'HP-β-CD est le meilleur cryoprotecteur protégeant les liposomes contre l'agrégation et la dégradation, puisqu'il possède la température de transition de verre (T_g) la plus élevée. La T_g est importante durant le séchage et stockage des formulations. Une température supérieure à la T_g peut entraîner l'effondrement des poudres (Van den Hoven et al., 2012). Les liposomes reconstitués contenant l'HP-β-CD n'ont pas montré de changement ni dans la taille, ni dans l'indice de polydispersité et présentent une efficacité d'encapsulation de prednisolone disodium phosphate supérieure à 90 %. En revanche, une diminution de l'efficacité d'encapsulation jusqu'à 50 % est obtenue avec les liposomes reconstitués contenant le saccharose et le tréhalose (Van den Hoven et al., 2012). En comparant à d'autres cryoprotecteurs comme le glucose et le tréhalose, Chaudhury et al., 2012 ont montré que le saccharose ajouté avec un rapport molaire sucre:lipide 5:1 aux liposomes PEGylés ne contenant pas de cholestérol les protège plus efficacement contre la lyophilisation en maintenant intacte les membranes des liposomes et en présentant une augmentation de la taille et de l'indice de polydispersité plus faible après reconstitution. Ces liposomes PEGylés contenant le saccharose ont montré une bonne stabilité après 1 an à -20 °C sous forme d'une poudre, et après 2 mois de stockage à 2-8 °C après réhydratation (Chaudhury et al., 2012).

Ghanbarzadeh et al., (2013) ont étudié l'effet de la lyophilisation en présence et en absence de dextrose, utilisé comme cryoprotecteur, sur la stabilité physicochimique des liposomes multilamellaires contenant le sirolimus, un antibiotique hydrophobe, après 6 mois de stockage à 4 °C et à 25 °C. Les liposomes lyophilisés en présence du dextrose conservent la même taille

après 6 mois. Par contre, une augmentation significative de la taille est obtenue après 6 mois pour les liposomes en suspension et ceux lyophilisés en absence de dextrose. Une légère diminution de l'efficacité d'encapsulation du sirolimus est observée après stockage pour les liposomes lyophilisés avec ou sans dextrose par rapport aux suspensions liposomiales. Par ailleurs, elle reste la plus élevée en présence du dextrose (Ghanbarzadeh et al., 2013).

1.7. Liposomes commercialisés

De nombreuses formulations à base de liposomes sont actuellement commercialisées et d'autres sont en phase clinique. Certains liposomes se trouvent sur le marché sous forme PEGylés tels que Doxil/ Caelyx et LipoDox, sous forme de poudre lyophilisée comme par exemple AmBisome, ou de suspension comme Myocet (Allen et al., 2013). Le Tableau 3 résume les différents liposomes commercialisés.

Tableau 3: Liposomes commercialisés.

a-Produit commercialisé **b-Compagnie** **c- Forme galénique**	**Médicament**	**Indication**	**Composition liposomiale**	**Année d'approbation**	**Références**
a-AmBisome b-Gilead c-Poudre	Amphotericine B	Antifongique	HSPC, cholestérol, DSPG	1990 (Europe), 1997 (Etats Unis), 2000	Hann et al., 2001
a-Abelcet b-Enzon c-Suspension	Amphotericine B	Antifongique (Aspergillose)	DMPC et DMPG	1995	Walsh et al., 1998
a-Amphotec b-Intermune c-Poudre	Amphotericine B	Antifongique (Aspergillose)	Sulfate de cholestéryle	1996	Bowden et al., 2002
a-Doxil/Caelyx b-Johnson et Johnson c-Suspension	Doxorubicine	Sarcome de Kaposi Cancer de l'ovaire Cancer du sein	PEG 2000-DSPE, HSPC, Cholestérol	1995 1999 2003	Barenholz et al., 2012 ; Muggia et al., 1996
a-Myocet b-Cephalon c-Suspension	Doxorubicine	Cancer du sein, cyclophosphamide	EPC, cholestérol	2000 (Europe)	Batist et al., 2001
a-Lipo-Dox b-Sun Pharma c-Suspension	Doxorubicine	Sarcome de Kaposi Cancer de l'over Cancer du sein	PEG 2000-DSPE, DSPC, cholestérol	2001 (Taiwan)	Allen et al., 2013
a-DaunoXome b-Galen c-Suspension	Daunorubicine	Sarcome de Kaposi	DSPC, cholestérol	1996 (Europe, Etats Unis)	Petre et al., 2007
a-Visudyne b-QLT c-Poudre	Verteporphine	Dégénérescence maculaire, histoplasmose oculaire	EPG, DMPC	2000 (Etats Unis), 2003 (Japon)	Bressler et al., 2001
a-DepoDur b-Pacira c-Suspension	Morphine sulfate	Anti-douleur après chirurgie	DOPC, cholestérol, DPPG	2004	Gambling et al., 2005

a-Produit commercialisé **b-Compagnie** **c- Forme galénique**	**Médicament**	**Indication**	**Composition liposomiale**	**Année d'approbation**	**Références**
a-DepoCyt ou Liposome Ara-C b-Pacira c-Suspension	Cytosine Arabinoside	Méningite Lymphomateuse et néoplasique	DOPC, cholestérol, DPPG	1999	Glantz et al., 1999
a-Estrasorb b-King c-Emulsion	Estrogène	Traitement de la ménopause	Polysorbate 80, huile de soja (micelles)	2003	Simon et al., 2006
a-Marqibo b-Talon c-Suspension	Vincristine	Leucémie lymphoblastique aiguë	Cholestérol et sphingomyéline de l'oeuf	2012 (Etats Unis)	Rodriguez et al., 2009
a-Epaxal b-Crucell c-Suspension	Virus Hépatite A inactivé	Hépatite A	DOPC et DOPE	1999	Usonis et al., 2002
a-Inflexal V b-Crucell c-Suspension	Hémagglutinine inactivée des souches de virus grippaux A et B	Influenza	DOPC et DOPE	1997	Herzog et al., 2009
a-Junovan b-IDM et Medison Pharma c-Poudre	Muramyl tripeptide phosphatidyl éthanolamine	Ostéosarcome Ciblage *in vivo* des macrophages	POPC et DOPS	2007 (Europe, Etats Unis)	Rafler et al., 1994

Chapitre 2 : Les cyclodextrines

2.1. Introduction

Les cyclodextrines (CDs) ont été découvertes par Villiers en 1891. Ce sont des oligosaccharides cycliques issus de la dégradation enzymatique de l'amidon. Les trois CDs natives les plus courantes se composent de 6, 7 ou 8 unités α-D-glucopyranose en configuration chaise reliées par des liaisons glycosidiques de type α-1,4. Elles sont dénommées respectivement α-, β- ou γ-CD. Leur structure en trois dimensions apparaît sous la forme d'un cône tronqué à l'extérieur duquel se trouvent les groupements hydroxyles (Figure 14) (Arun et al., 2008; Zafar et al., 2014). La partie extérieure est donc relativement hydrophile. Les groupements hydroxyles secondaires portés par les carbones C2 et C3 se situent sur le côté le plus large du cône appelé face secondaire tandis que les hydroxyles primaires en C6 se trouvent du côté le plus étroit (face primaire) (Figure 14). L'intérieur de la cavité est tapissé par des squelettes carbonées et oxygène en liaison éther, ce qui lui confère un caractère apolaire (Yang et al., 2010; Zafar et al., 2014). C'est grâce à ce caractère amphiphile que les CDs sont capables d'interagir avec une large variété de molécules pour former des complexes d'inclusion de type hôte-invité ou « host-guest ».

Figure 14: Structure des cyclodextrines natives (Zafar et al., 2014).

2.2. Caractéristiques physico-chimiques des cyclodextrines

Les CDs natives sont des composés cristallins, homogènes et non-hygroscopiques (Zafar et al., 2014). Leurs principales caractéristiques sont rassemblées dans le tableau 4. Le diamètre de la cavité et la masse moléculaire varient avec le nombre d'unités de glucose. Par contre, la hauteur est la même pour les trois CDs. Le diamètre externe et le volume de la cavité augmentent en allant de l'α-CD à la γ-CD.

Parmi les trois CDs natives, la β-CD est la plus intéressante du point de vue complexation (Blach et al., 2008). Mais, la β-CD possède la plus faible solubilité aqueuse (Tableau 4). Ceci peut s'expliquer par les liaisons hydrogènes intramoléculaires qui s'établissent entre les fonctions hydroxyles secondaires. Au sein de la β-CD, une ceinture complète de ces liaisons est formée, ce qui lui confère une structure relativement rigide et une plus faible solubilité dans l'eau (Arun et al., 2008; Zafar et al., 2014).

Tableau 4: Propriétés physico-chimiques des CDs natives (Szjetli, 1998; Challa et al., 2005 ; Loftsson et Brewster, 2011).

Propriétés	**α-CD**	**β-CD**	**γ-CD**
Nombre d'unité de glucose	6	7	8
Formule moléculaire	$(C_6H_{10}O_5)_6$	$(C_6H_{10}O_5)_7$	$(C_6H_{10}O_5)_8$
Carbones asymétriques	30	35	40
Masse moléculaire (g/mol)	972	1135	1297
Diamètre de la cavité (A°)	5,7	7,8	9,5
Diamètre de la périphérie (A°)	14,6-15	15,4-15,8	17,5-17,9
Volume de la cavité (A°)	173	262	427
Hauteur du cône (A°)	7,8	7,8	7,8
Molécules d'eau retenues dans la cavité	6-8	11-12	13-17
Température de fusion (°C)	275	280	275
pKa à 25°C	12,3	12,2	12,1
LogP à 25°C	-13	-14	-17
Solubilité dans l'eau à 25 °C (mg/ml)	145	18,5	232

Les CDs présentent les avantages suivants (Szjetli, 1998; Nuchuchua et al., 2009):

- Biocompatibilité, biodégradabilité et non-toxicité (le glucose est le produit majeur de la dégradation);
- Non volatilité et non inflammabilité;
- Faible activité pharmacologique;
- Absence d'absorption dans la gamme d'UV utilisée pour la détection des solutés;

- Stabilité dans une large gamme de pH;
- Augmentation de la stabilité chimique, physique et thermique de la molécule encapsulée;
- Augmentation de la solubilité aqueuse des molécules hydrophobes encapsulées;
- Vitesse de libération contrôlée des molécules encapsulées;
- Amélioration des activités biologiques de la molécule encapsulée.

2.3. Dérivés des cyclodextrines

De nombreux dérivés de CDs ont été synthétisés pour différents objectifs (Szente et al., 1999) : 1) améliorer la capacité de complexation des CDs ; 2) augmenter leur solubilité aqueuse ; 3) augmenter leur affinité pour une molécule donnée ; 4) introduire des groupements spécifiques facilitant la complexation ; 5) synthétiser des polymères ; 6) diminuer les dégâts provoqués au niveau des membranes cellulaires.

Les groupements hydroxyles des CDs natives et surtout la β-CD peuvent être modifiés par voie chimique ou enzymatique (Szente, 1999). Les dérivés de cyclodextrines fréquemment rencontrés dans le domaine pharmaceutique sont de type méthyle, hydroxypropyle (HP) et sulfobutyléther (SBE) (Mosher et al., 2000). La Figure 15 représente les structures chimiques des dérivés de la β-CD.

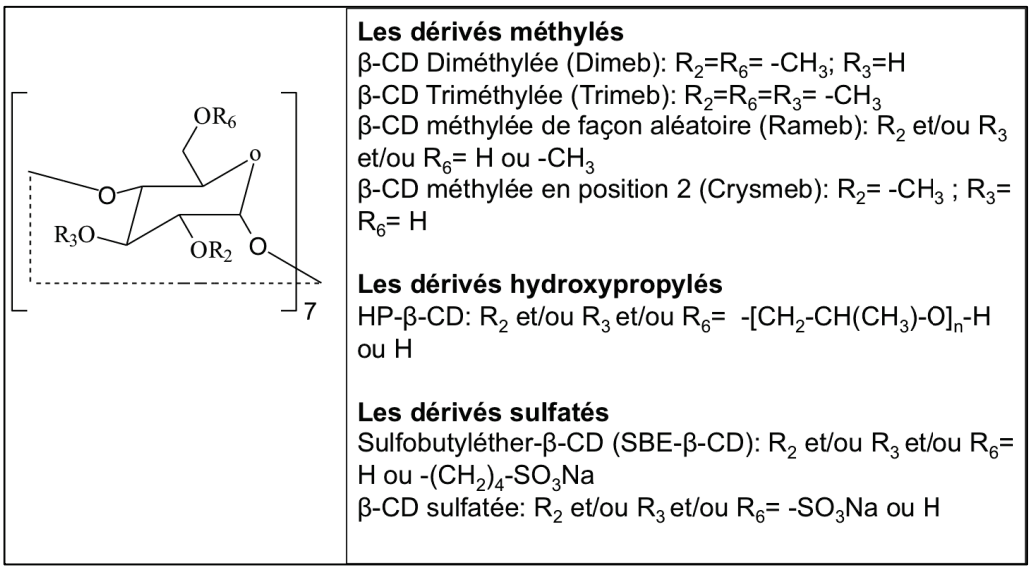


Figure 15 : Structures chimiques des dérivés de la β-CD.

Les dérivés de CD sont caractérisés par le degré de substitution molaire moyen (MS) qui est le nombre moyen de substitution par unité d'α-D-glucopyranose (le MS varie de 0 à 3) (Szente et al., 1999). Le tableau 5 résume les caractéristiques des dérivés de cyclodextrines.

Tableau 5: Caractéristiques des dérivés de cyclodextrines (Mosher et al., 2000 ; Loftsson et Duchene, 2007).

Cyclodextrine	MS	Masse moléculaire (g/mol)	Solubilité aqueuse à 25 °C (mg/ml)
Dimeb	2	1331	570
Trimeb	3	1429	310
Rameb	1,8	1312	>500
Crysmeb	0,57	1191	220
HP-β-CD	0,65	1390	>600
SBE-β-CD	0,9	2163	>500

Dans le cadre de notre thèse, nous avons utilisé le dérivé hydroxypropylé de la β-CD pour former les complexes d'inclusion avec l'eugénol et l'huile essentielle de clou de girofle.

2.3.1. Hydroxypropyl-β-cyclodextrine (HP-β-CD)

L'HP-β-CD est obtenu en traitant la β-CD par l'oxyde de propylène dans un milieu alcalin (Nasongkla et al., 2003). L'HP-β-CD possède une taille de cavité identique à celle de son homologue de β-CD mais une meilleure solubilité aqueuse (Tableaux 4 et 5) à cause de son fort caractère hydrophile. L'HP-β-CD présente un large intérêt dans le domaine pharmaceutique en raison de sa solubilité aqueuse élevée et sa faible toxicité (Challa et al., 2005).

2.4. Méthodes de préparation des complexes d'inclusion

Plusieurs méthodes de préparation sont utilisées pour former des complexes d'inclusion comme: co-précipitation, co-mélange, pétrissage, extrusion, neutralisation, co-évaporation, lyophilisation, atomisation ou pulvérisation, inclusion à sec, inclusion en suspension, inclusion en méthode humide, inclusion par micro-ondes, inclusion au CO_2 supercritique (Nasir et al., 2012).

Dans le cadre de ce travail, nous avons préparé les complexes d'inclusion d'HP-β-CD/huile essentielle de clou de girofle et d'HP-β-CD/eugénol dans la phase aqueuse.

2.4.1. Préparation du complexe d'inclusion dans la phase aqueuse

Les CDs sont dissoutes dans une phase aqueuse dans laquelle la molécule invitée est ajoutée. Les complexes d'inclusion solubles dans l'eau sont formés après agitation du mélange pendant un temps déterminé à une température spécifique et filtrés (Yang et al., 2005; Astray et al., 2010; Bethanis et al., 2013).

2.5. Interactions des cyclodextrines avec les membranes

Les interactions de différentes cyclodextrines avec les composants vitaux (phospholipides et cholestérol) des membranes biologiques permettent de mieux comprendre les conséquences de ces interactions au niveau cellulaire. Des monocouches de lipides à l'interface air-eau et des liposomes sont souvent utilisés comme modèles membranaires pour étudier l'effet des CDs sur les membranes. Les différentes études des interactions des CDs avec les membranes artificielles et cellulaires sont détaillées ci-dessous.

2.5.1. Membrane artificielle

2.5.1.1. Monocouches lipidiques

Des monocouches à l'interface air/eau constituées de lipides purs ou en mélange ont été utilisées pour étudier leur interaction avec des cyclodextrines natives en solution dans la phase aqueuse (Asgharian et al., 1988; Ohvo et al., 1996; Bernat et al., 2007; Grauby-Heywang et al., 2008).

La β-CD n'a pas montré une interaction significative avec la DPPC, la di-w-cyclohexyl-DPPC (Asgharian et al., 1988) et la DMPC (Grauby-Heywang et al., 2008). En revanche, la β-CD est démontrée capable d'extraire la palmitoyloleylphosphatidylcholine et la sphingomyéline des monocouches (Grauby-Heywang et al., 2008).

La β-CD extrait plus spécifiquement le cholestérol des monocouches vers la phase aqueuse (Asgharian et al., 1988 ; Ohvo et al., 1996). En effet, la β-CD induit une extraction du cholestérol à partir des monocouches mixtes constituées de proportions équimolaires de cholestérol et de didecanoyl phosphatidylcholine (di-10-PC). De plus, la « désorption » du cholestérol induite par la β-CD est beaucoup plus lente à partir des monocouches constituées de N-palmitoyl

sphingomyéline qu'à partir des monocouches formées de DPPC (Ohvo et al., 1996).
Au contraire de la β-CD, la cavité de l'α-CD semble être trop petite pour inclure et extraire le cholestérol (Ohvo et al., 1996). L'α-CD peut néanmoins interagir avec des assemblages phospholipidiques particuliers puisqu'un appauvrissement en phospholipides d'une monocouche de DMPC a été démontré en présence d'α-CD et augmente avec une concentration croissante en α-CD (Bernat et al., 2007). Cependant, l'α-CD n'a pas perturbé l'assemblage de l'EPC (Bernat et al., 2007). L'extraction préférentielle des phospholipides par l'α-CD est due à l'inclusion des chaînes hydrocarbonées des acides gras qui ont une taille complémentaire à la cavité de l'α-CD (Irie et Uekema, 1997).
Les interactions dépendent donc non seulement du type de cyclodextrine utilisé mais également de la composition des monocouches (Bernat et al., 2007; Grauby-Heywang et al., 2008).

2.5.1.2. Liposomes

Les liposomes ont été également utilisés comme modèle membranaire pour des études des interactions avec les cyclodextrines et ses dérivés.
Les propriétés électrostatiques de la tête polaire des phospholipides, sa charge et son moment dipolaire régissent l'action de l'α-CD (Debouzy et al., 1998). L'affinité de l'α-CD varie d'un phospholipide à un autre. L'α-CD interagit fortement avec les phosphatidylinositols, moyennement avec les phosphatidylsérines, phosphatidyléthanolamines et sphingomyélines, et faiblement avec les phosphatidylcholines (Debouzy et al., 1998). En fait, les hydroxyles primaires de l'α-CD sont considérés comme un dipôle et sont attirés par la charge négative de l'inositol. Le phosphatidylinositol est arraché de la membrane et sa chaîne d'acides gras est incluse dans la cavité de l'α-CD (Fauvelle et al., 1997).

Nishijo et al., 2000 ont étudié l'interaction des CDs et leurs dérivés avec des liposomes constitués de phospholipides qui diffèrent par la longueur de leurs chaînes d'acides gras. Cette étude consiste à suivre la libération de carboxyfluorescéine incorporée dans les liposomes, induite par les CDs. Les CDs sont classés comme suit : α-CD>Dimeb>Trimeb à partir des DMPC-liposomes ; Dimeb>α-CD>Trimeb à partir des DPPC-liposomes et Dimeb>Trimeb>α-CD à partir des DSPC-liposomes. Par contre, la β-CD, l'HP-β-CD et la γ-CD n'entraînent pas la libération de carboxyfluorescéine de ces trois types de liposomes (Nishijo et al., 2000).

L'influence de différents paramètres, tels que le type de liposomes (DRV, MLV, SUV) et la composition lipidique (EPC, H-EPC, DSPC) avec ou sans cholestérol dans un rapport molaire 1:1 a également été étudiée en présence des solutions de méthyl-β-CD, HP-β-CD et HP-γ-CD. La diminution de l'intégrité membranaire évaluée en encapsulant la calcéine a été confirmée par des mesures de turbidité et de taille des particules (Hatzi et al., 2007). En effet, les DRV liposomes composés d'un des trois types de phospholipides sont affectés de la même manière quel que soit le dérivé de CD utilisé et l'introduction du cholestérol dans les membranes les rendent plus sensibles au dérivé méthylé. Pour les deux autres types de vésicules (MLV et SUV), l'effet déstabilisant de la membrane par la méthyl-β-CD est toujours supérieur à celui des CDs hydroxypropylées étudiées qui n'ont pas montré un effet significatif sur l'intégrité membranaire (Hatzi et al., 2007). Les résultats ont montré que la rigidité de la membrane et sa courbure influent fortement sur l'interaction de CD-lipide. En effet, les auteurs ont expliqué l'augmentation de la stabilité de vésicules SUV par la courbure de la membrane lipidique qui ne permet pas d'établir un angle de contact avec les dérivés hydroxypropylés suffisant pour interagir avec les bicouches et extraire leurs lipides constitutifs (Hatzi et al., 2007).
De plus, la réduction de la taille et la turbidité des vésicules en présence des CDs montre que la méthyl-β-CD est la seule capable d'induire la perturbation et la solubilisation des liposomes en micelles. L'effet des CDs sur l'intégrité membranaire des liposomes est donc dépendant du type de vésicules (la libération de la calcéine à partir des vésicules est plus rapide dans l'ordre suivant MLV>DRV>SUV), des lipides constitutifs du fait que les liposomes constitués des phospholipides saturés sont toujours plus stables que ceux formés à partir des phospholipides insaturés et du type de la cyclodextrine utilisée (Hatzi et al., 2007).

Dans le cas des vésicules de type MLV constituées de DPPC, la présence de la β-CD et de l'HP-β-CD n'entraîne pas de modifications des paramètres thermodynamiques de la membrane déterminés par DSC. Cependant, une réduction des valeurs d'enthalpies ΔH en fonction de la quantité de la Dimeb a été observée, probablement due à sa capacité à complexer la DPPC et de l'extraire. A une concentration de la Trimeb relativement élevée (> 0,12 molaire), une interaction possible est également mise en évidence (Puglisi et al., 1996).
Concernant les liposomes composés de DPPC en association avec du cholestérol (10 mol %), la Dimeb, la Trimeb et la β-CD ont démontré une capacité à extraire le cholestérol alors que les

paramètres thermodynamiques ne sont pas modifiés en présence d'HP-β-CD (Puglisi et al., 1996). Etant incapable d'extraire le cholestérol et/ou les phospholipides des membranes, l'HP-β-CD est prouvée être la plus appropriée pour une administration des principes actifs *in vivo* (Puglisi et al., 1996).

L'interaction d'α-CD, β-CD, γ-CD et Dimeb avec les liposomes de type SUV constitués de DPPC a été étudiée en termes de stabilité physique. L'affinité des CDs pour les liposomes est caractérisée par des « isothermes de liaison ». La quantité de cyclodextrine liée par une mole de DPPC augmente dans le sens suivant : γ-CD<β-CD, Dimeb<α-CD. Les résultats obtenus sont en corrélation avec la diminution de la stabilité physique des liposomes déterminée par une augmentation de leur taille et la formation des agrégats (γ-CD<β-CD<α-CD) (Puskas et al., 2006).

Huang et al., (2013) ont étudié l'interaction de la méthyl-β-CD, l'HP-β-CD et l'HP-α-CD avec des liposomes de type MLV de composition lipidique différente où la méthyl-β-CD est trouvée seulement capable de dissoudre les liposomes. La concentration de la méthyl-β-CD nécessaire pour interagir avec les phospholipides et induire la solubilisation dépend du type de phospholipide utilisé, augmente avec la longueur des chaînes d'acides gras ainsi qu'en présence d'acides gras saturés. De plus, une augmentation de la courbure de la membrane lipidique dans le cas des liposomes de petites tailles empêche la solubilisation (Huang et al., 2013).

L'extraction du cholestérol à partir des LUV composés de cholestérol, sphingomyéline et/ou DOPC en différentes proportions est étudiée en présence de la méthyl-β-CD (Beseničar et al., 2008). Le diamètre des liposomes contenant un mélange DOPC:cholestérol avec un rapport de 6:4 est réduit en présence de la méthyl-β-CD dû à l'extraction du cholestérol, ce qui n'est pas le cas pour les vésicules en absence du cholestérol. Par ailleurs, la quantité de cholestérol extraite en présence de la méthyl-β-CD varie selon la composition des liposomes où la présence de sphingomyéline réduit fortement l'extraction du cholestérol. La température influence également la cinétique d'extraction qui est plus rapide à 37 °C qu'à 25 °C pour des mélanges DOPC:sphingomyéline:cholestérol 3:3:4 (Beseničar et al., 2008). Des études calorimétriques ont été utilisées non seulement pour étudier l'appauvrissement en cholestérol des liposomes par

complexation avec la méthyl-β-CD, mais aussi pour l'insertion du cholestérol dans les membranes sous forme des complexes cyclodextrine/cholestérol (Tsamaloukas et al., 2005).

La libération de l'inuline, une substance hydrophile, encapsulée dans des liposomes chargés positivement ou pégylés et contenant du cholestérol est évaluée en présence de la Rameb (Boulmedarat et al., 2005). Les concentrations en lipides et en cyclodextrine, le temps de contact et la composition des liposomes influent sur la cinétique de libération de l'inuline à 37 °C. En effet, la présence de la Rameb (5 %) provoque une libération importante d'inuline surtout à des concentrations lipidiques de l'ordre de 2 mM, alors que l'effet était moins marqué pour des concentrations en lipides élevées de 10 mM. Après un contact de 30 min et à une concentration en lipides de 2 mM et en Rameb de 5 %, la quantité d'inuline libérée à partir des liposomes chargés positivement (SPC:Chol:Stéarylamine 6:3:1 mol%) était de 80 % et 2 fois supérieure à celle libérée à partir des liposomes pégylés (SPC:Chol:PEG-DSPE 6,4:3:0,6 mol%). Cependant, après un contact d'un jour, les quantités libérées de l'inuline sont équivalentes pour les deux types de liposomes (Boulmedarat et al, 2005).

Des mesures des modifications de la viscosité membranaire par résonance paramagnétique électronique (RPE) ont été réalisées pour étudier l'extraction du cholestérol par la Rameb à partir des liposomes unilamellaires constitués de DMPC et de cholestérol (DMPC:Chol 7:3 mol%) (Grammenos et al., 2009). Les auteurs ont montré une corrélation entre la viscosité et la concentration du cholestérol dans la bicouche. L'addition de la Rameb jusqu'à 20 mM n'a pas affecté la viscosité après 1 h d'incubation à 37 °C. Des concentrations en Rameb élevées de l'ordre de 30, 40 et 50 mM ont provoqué une diminution de la viscosité membranaire, avec un taux de cholestérol résiduel au sein de la bicouche de 22, 15 et 10 % respectivement. Cependant, en absence de la Rameb, les liposomes contiennent 30 % de cholestérol. Ces résultats ont montré la capacité de la Rameb à extraire le cholestérol des liposomes (Grammenos et al., 2009).

Anderson et al., 2004 ont étudié l'interaction entre la Rameb et les liposomes constitués de POPC. Le mécanisme implique la formation d'un complexe d'inclusion initial entre une molécule de la Rameb et POPC de la bicouche, suivie par une fixation supplémentaire de trois molécules de Rameb. La première étape consiste à extraire une molécule de phospholipide de la bicouche vers la phase aqueuse soit avant ou bien simultanément avec la complexation à une cyclodextrine; tandis que les trois étapes suivantes ne concernent que la fixation des CDs

supplémentaires au complexe naissant (Anderson et al., 2004).

2.5.2. Membrane cellulaire

2.5.2.1. Modulation du cholestérol membranaire

Depuis les années 1995, l'équipe de Rothblat s'est intéressée aux modulations des quantités de cholestérol cellulaire par l'utilisation des cyclodextrines (Kilsdonk et al., 1995; Yancey et al., 1996; Christian et al., 1997, 1999; Atger et al., 1997; Rothblat et al., 1999; Haynes et al., 2000).

La β-CD et la méthyl-β-CD ont été utilisées comme « accepteurs » de cholestérol cellulaire (Kilsdonk et al., 1995). Les CDs étudiées induisent une libération dose-dépendante du cholestérol dans le milieu avec un effet plus prononcé pour la méthyl-β-CD. Après 8 h d'incubation avec la méthyl-β-CD à une concentration de 10 mM, 90 % du cholestérol sont libérés à partir des cellules des fibroblastes murins « L-cells ». Ce profil de libération du cholestérol a été comparé à celui obtenu à partir des cellules de l'hépatome du rat (Fu5AH) et des fibroblastes cutanés humains (GM3468A). Après 10 min d'incubation avec la β-CD et son dérivé, les auteurs ont montré que la libération du cholestérol à partir de Fu5AH et GM3468A était légèrement supérieure à celle obtenue à partir des cellules murines. Les résultats ont montré que la libération des phospholipides par les CDs était très faible et non significative par rapport à celle du cholestérol (Kilsdonk et al., 1995).

L'échange du cholestérol entre les cellules et les lipoprotéines de sérum peut être accéléré par des CDs à faible concentration (Atger et al., 1997; Christian et al., 1999). La méthyl-β-CD stimule d'une manière dose-dépendante la libération du cholestérol cellulaire avec une EC50 de 0,05 mM. Elle permet également de doubler le transfert du cholestérol vers le sérum (Christian et al., 1999). En agissant comme des « navettes » pour le cholestérol, les CDs pourraient potentiellement servir d'agents pharmacologiques pour modifier le métabolisme du cholestérol (Christian et al., 1999).

Par ailleurs, Yancey et al., 1996 ont évalué l'accumulation du cholestérol au niveau cellulaire à partir de complexes formés avec l'HP-β-CD. A des rapports molaires CD/Chol élevés, les complexes permettant d'enrichir les membranes en cholestérol, servent alors de « donneurs » de cholestérol (Yancey et al., 1996). La méthyl-β-CD s'est trouvée être également un « donneur » du cholestérol (Christian et al., 1997).

Il a été démontré que le cholestérol impliqué provient de la membrane plasmique où se trouvait

en grande majorité le cholestérol cellulaire (Haynes et al., 2000; Zidovetzki et al., 2007). De plus, le taux de cholestérol dans les membranes intracellulaires est régulé par le taux de cholestérol de la membrane plasmique et une redistribution vers la membrane plasmique serait probable suite à l'action des cyclodextrines (Zidovetzki et al., 2007).

Par ailleurs, l'extraction du cholestérol par les CDs perturbe l'organisation des microdomaines membranaires et interfère avec leur fonctionnalité (Nguyen et al., 2002; Pike et al., 2002). Les β-CDs sont capables d'appauvrir en cholestérol des fractions des membranes correspondant aux radeaux lipidiques « raft fractions » plus qu'à partir des zones correspondantes aux radeaux non lipidiques « non-raft fractions » (Zidovetzki et al., 2007).

Chapitre 3 : Complexes d'inclusion dans les liposomes

3.1. Introduction

Les complexes d'inclusion CD/principe actif sont instables dans un milieu aqueux et les principes actifs hydrophobes peuvent être rapidement libérés à partir des bicouches lipidiques (Maestrelli et al., 2005 ; Greige-Gerges et Sebaaly, 2015). Le concept d'encapsuler les complexes d'inclusion cyclodextrine/principe actif dans des liposomes sous un seul système mixte connu sous le nom « drug-in-cyclodextrin-in-liposome » ou DCL (Figure 16) a été proposé pour la première fois par McCormack et Gregoriadis en 1994. Bien que la littérature soit riche en travaux sur l'encapsulation de molécules bioactives dans les liposomes et les CDs, peu de travaux sont publiés sur le système d'encapsulation mixte (DCL).

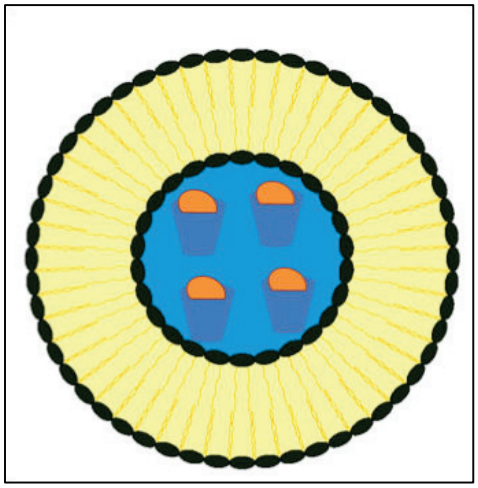


Figure 16: Schéma représentatif du système « drug-in-cyclodextrin-in-liposome » avec les complexes d'inclusion CD/principe actif incorporés dans la phase aqueuse des liposomes (Greige-Gerges et Sebaaly, 2015).

3.2. Propriétés du système mixte DCL

Récemment, une revue portant sur les propriétés du système DCL a été publiée par notre équipe (Gharib et al., 2015). En effet, les DCLs combinent les avantages des deux systèmes d'encapsulation: les CDs qui augmentent la solubilité des principes actifs hydrophobes et les liposomes qui peuvent emprisonner les complexes dans la phase aqueuse ce qui réduit la vitesse de leur libération et permet donc un meilleur contrôle de la vitesse de libération des principes

actifs (Gharib et al., 2015). Les DCLs permettent ainsi l'incorporation des molécules insolubles dans la phase aqueuse des vésicules (Nasir et al., 2012).

3.2.1. Effet des CDs sur la taille des liposomes

Les tailles des DCLs et des liposomes incorporant les principes actifs sont présentées dans le Tableau 6. Des MLV et LUV témoins et incorporant le kétoprofène et les complexes d'inclusion β-CD/Kétoprofène et HP-β-CD/kétoprofène ont une taille micrométrique (Maestrelli et al., 2005 et 2006). La taille des liposomes incorporant le kétoprofène est similaire à celle des liposomes témoins, mais plus petite que celle des liposomes incorporant les complexes CD/kétoprofène (Tableau 6). De même, les MLVs incorporant les complexes HP-β-CD/β-Lapachone ont une taille légèrement plus grande que celle obtenue avec les liposomes incorporant la β-Lapachone (Cavalcanti et al., 2011).

D'autres études ont montré des résultats contradictoires concernant l'effet des CDs sur la taille des liposomes. Des complexes d'inclusion de la bétaméthasone en présence de différents types de CDs (β-CD, Dimeb, Trimeb, Rameb, HP-γ-CD) sont incorporés dans les MLV à des concentrations de CD de 10 et 40 mM (Piel et al., 2006). A ces deux concentrations, aucune différence significative n'a été obtenue entre la taille des liposomes incorporant la bétaméthasone et celle des liposomes incorporant les complexes CD/bétaméthasone (Piel et al., 2006). De même, la taille des liposomes LUV témoins ne diffère pas significativement de celle obtenue avec les liposomes encapsulant la prédnisolone et les liposomes encapsulant les complexes CD/ prédnisolone (Fatouros et al., 2001).

Les complexes d'inclusion HP-β-CD/nifédipine préparés par lyophilisation et atomisation ont été encapsulés dans des liposomes par la méthode d'injection d'éthanol. Les DCLs ont une taille environ de 150 nm similaire à celle des liposomes encapsulant la nifédipine (Skalko et al., 1996). De même, les MLV encapsulant les complexes HP-γ-CD/curcumine et les liposomes incorporant la curcumine ont une taille similaire (Dhule et al., 2012).

Cette contradiction concernant l'effet des CDs sur la taille des liposomes peut être due à plusieurs facteurs qui affectent la taille des liposomes comme : la composition des liposomes (type de phospholipide, présence du cholestérol, rapport molaire de phospholipides:cholestérol, concentration du complexe CD/principe actif) et la méthode de préparation des liposomes (Gharib et al., 2015).

3.2.2. Effet des CDs sur la taille des liposomes déformables

Des liposomes déformables ou transfersomes incorporant des complexes d'inclusion sont également préparés en utilisant les mêmes techniques de préparation des liposomes. La présence de CDs n'affecte pas la taille des liposomes déformables (Tableau 6). En effet, aucune différence significative n'est observée entre la taille des transfersomes encapsulant la trétinoine et celle des transfersomes encapsulant les complexes dimeb/trétinoine (Ascenso et al., 2013). De même, les liposomes PEGylés encapsulant la doxorubicine et les complexes d'inclusion γ-CD/doxorubicine ont une taille similaire (Hagiwara et al., 2006).

3.2.3. Comparaison entre la taille des liposomes déformables et non déformables encapsulant les complexes d'inclusion

Les liposomes déformables contenant le déoxycholate de sodium et encapsulant les complexes d'inclusion HP-γ-CD/bétaméthazone ou Crysmeb/bétaméthazone présentent une taille plus petite que celle des liposomes correspondants non déformables quelque soit le type de CD utilisé. La réduction de la taille des liposomes déformables peut être attribuée à l'augmentation de la flexibilité et la réduction de la tension superficielle des vésicules en raison de la présence de déoxycholate de sodium (Gillet et al., 2009).

Des résultats contradictoires ont été obtenus par Jain et al. (2007) où les MLV incorporant les complexes d'inclusion β-CD/célécoxib possèdent une taille plus petite que celle des MVV déformables incorporant les complexes d'inclusion β-CD/célécoxib. Ces dernières formulations contiennent l'huile neutre comme tensioactif (Jain et al., 2007).

Tableau 6: Caractéristiques des DCLs en comparaison avec d'autres formulations liposomiales.

Principe actif (PA)	**CD** **a-Type** **b-Méthode de préparation du complexe**	**Liposomes** **a-Composition** **b-Méthode de préparation** **c-Structure**	**Taille (nm)**	**EE**	**Références**
Bétaméthasone	a-HP-γ-CD, β-CD, Dimeb, Rameb, Trimeb, Crysmeb b-Préparation dans la phase aqueuse	a-SPC:Chol:SA b-HFL c-MLV	CD/PA-MLV : 181 ± 22 à 221 ±29 pour [CD]=10 mM ou de 192 ±31 à 248 ±28 pour [CD]= 40 mM. PA-MLV : 206 ±62	CD/PA-MLV : de 0,56 ± 0,28 à 1,18 ± 0,16 % PA-MLV : 0,39 ± 0,17 %	Piel et al., 2006
Benzocaïne	a-HP-β-CD b-Co-évaporation	a-PC:Chol:SA b-HFL c-MLV	Benzocaïne-DCL_2: 661,2±0,3 Benzocaïne-MLV : 720,2±0,2	Benzocaïne-DCL_2 : 59,16±2,8 % Benzocaïne-MLV : 83,9±3,4 %	Maestrelli et al., 2010
Butamben	a-HP-β-CD b-Co-évaporation	a-PC:Chol:SA b-HFL c-MLV	Butamben-DCL_2 : 680,8±0,2 Butamben-MLV : 703,6±0,2	Butamben-DCL_2: 82,23±3% Butamben-MLV : 94,4±3,6%	Maestrelli et al., 2010
Célécoxib	a-β-CD b-Pétrissage en phase solide	a-SPC:Chol:huile neutre b-REV, HFL c-MVL, MLV	β-CD/PA-MLV : 1320±1040 β-CD/PA-MVL : entre 6520±1540 et 10420 ±440	β-CD/PA-MLV : 27,68 ± 2,9% β-CD/PA-MVL: 62,24-88,24%	Jain et al., 2007
Curcumine	a-HP-γ-CD b-Préparation dans la phase aqueuse	a-DPPC:DMPG b-HFL c-MLV	HP-γ-CD/PA-MLV : 98,2±30,1 PA-MLV: 104,7±23,1	HP-γ-CD/PA-MLV : 50% PA-MLV : 30%	Dhule et al., 2012
Doxorubicine	a-γ-CD b- Non signalé	a-DSPE-PEG b-Déshydratation-Hydratation c-LUV	γ-CD/PA-PEG LUV : 135,3± 1,5 PA-PEG LUV : 137,2±1,2	γ-CD/PA-PEG LUV : 91,1±1,1 % PA-PEG LUV : 96,4±0,5%	Hagiwara et al., 2006

Principe actif (PA)	**CD** **a-Type** **b-Méthode de préparation du complexe**	**Liposomes** **a-Composition** **b-Méthode de préparation** **c-Structure**	**Taille (nm)**	**EE**	**Références**
Indométhacine	a-β-CD, HP-β-CD b-Lyophilisation	a-SPC:Chol b-HFL c-MLV	ND	PA-MLV: 1,6 ± 0,09 µg/mg β-CD/PA-MLV : 2,38± 0,16 µg/mg HP-β-CD/PA-MLV : 2,48± 0,12 µg/mg	Chen et al., 2007
Kétoprofène	a-β-CD, HP-β-CD b-Co-évaporation	a- PC:Chol b- HFL c-MLV	MLV témoins : 1580±80 PA-MLV : 1520±50 CD/PA-MLV : 3160±100	PA-MLV : 56 ± 3,2% HP-βCD/PA-MLV : 33,8±2 % βCD/PA-MLV : 26,8 ±1,6%	Maestrelli et al., 2005
Kétoprofène	a-HP-β-CD b-Co-évaporation	a- PC:Chol b- HFL, REV c-MLV, LUV	HP-β-CD/PA-MLV: 3710±100 HP-β-CD/PA-LUV: 1850±40 MLV témoins : 1580±80 LUV témoins : 730±20	-EE augmente avec [HP-β-CD/PA] jusqu'à 75,1 % à 10 mM, puis diminue à des concentrations élevées du complexe	Maestrelli et al., 2006
Prédnisolone	a-β-CD, HP-β-CD b-Préparation dans la phase aqueuse	a- PC:Chol b-Déshydratation-Hydratation c-LUV	CD/PA-LUV, PA-LUV et LUV témoins : 300-350	PA-LUV : 27,1± 0,52% HP-β-CD/PA-LUV : 79,1 ±1,5% β-CD/PA-LUV : 32,5± 0,62%	Fatouros et al., 2001
β-Lapachone	a-HP-β-CD b-Lyophilisation	a-SPC:Chol:SA b-HFL c-MLV	HP-β-CD/PA-MLV : 112±1,49 PA/MLV : 104±2,33	HP-β-CD/PA-MLV : 93,5±0,04% PA-MLV : 97,09±0,02%	Cavalcanti et al., 2011

Principe actif (PA)	**CD** **a-Type** **b-Méthode de préparation du complexe**	**Liposomes** **a-Composition** **b-Méthode de préparation** **c-Structure**	**Taille (nm)**	**EE**	**Références**
Prilocaïne	a-HP-βCD b-Co-évaporation	a-PC:Chol:SA b-HFL c-MLV	PA-MLV : 433±38 HP-βCD/PA-MLV : 479±51 DCL_2 : 375 ±46 MLV témoins : 431± 44	EE élevée (82-85%) pour PA-liposomes, HP-βCD/PA-MLV et DCL_2	Bragagni et al., 2010
Nifédipine	a-HP-β-CD b-Atomisation	a-Lécithine b-Injection d'éthanol c-SUV	HP-β-CD/PA-SUV : 155 PA-SUV : 153	PA-liposomes : 56,2±6,3% HP-β-CD/PA-liposomes dissous dans la phase organique : 77,7±3,2% HP-β-CD/PA-liposomes dissous dans la phase aqueuse : 21,9±2,6%	Skalko et al., 1996
Trétinoine	a-Dimeb b-Pétrissage en phase solide	a-SPC, Tween 80 b-Congélation-décongélation c-LUV	dimeb/PA-transfersomes : 117±0,9 PA-transfersomes : 128±1,8	dimeb/PA-transfersomes : 88,7±6,7% PA-transfersomes : 77,8±14,6%	Ascenso et al., 2013

REV : évaporation en phase inverse ; HFL : hydratation du film lipidique ; ND : non déterminé ; PA : principe actif ; SA : Stéarylamine

3.2.4. Effet de la technique de double encapsulation sur la taille des liposomes

Des « double loaded liposomes » (DCL_2) sont préparés par la technique de double encapsulation. Ce sont des vésicules encapsulant à la fois des principes actifs lipophiles libres dans la bicouche lipidique et leurs complexes d'inclusion dans le compartiment aqueux (Figure 17).

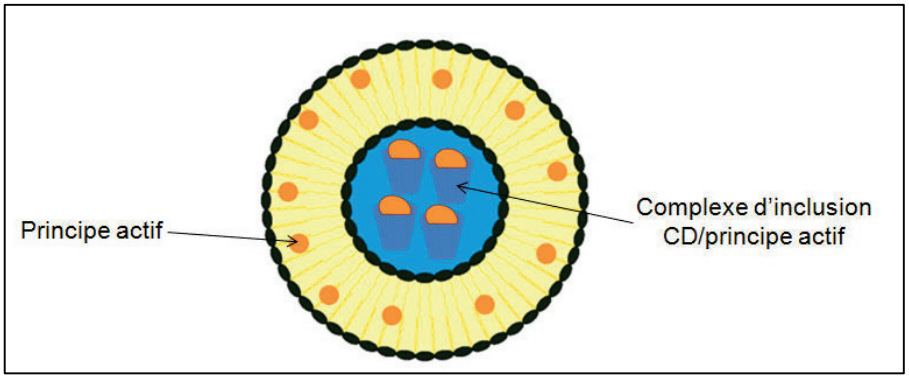


Figure 17: Schéma représentatif des « double loaded liposomes» (Greige-Gerges et Sebaaly, 2015).

Les principes actifs benzocaine et butamben ont été encapsulés dans des liposomes déformables constitués de phosphatidylcholine, cholestérol et stéarylamine (Maestrelli et al., 2010). Ce dernier composé est ajouté en tant que surfactant ionique. Les auteurs n'ont pas montré de différence significative en taille entre les liposomes préparés par la technique de double encapsulation et les liposomes encapsulant les principes actifs libres dans la phase lipophile.

Cependant, lorsque les principes actifs sont dissous dans la phase aqueuse, les liposomes ont montré des valeurs de taille plus petites par rapport aux formulations précédentes. Les auteurs ont expliqué ces résultats par la présence des principes actifs dans la bicouche, ce qui peut entraîner un réarrangement de la structure liposomiale, et par conséquent une augmentation de la taille des vésicules (Maestrelli et al., 2010).

Bragagni et al., 2010 ont préparé cinq formulations liposomiales différentes : (1) liposomes témoins; (2) liposomes encapsulant des complexes d'inclusion HP-β-CD/prilocaïne base dans la phase aqueuse; (3) liposomes encapsulant les chlorhydrates de prilocaïne dans la phase aqueuse; (4) liposomes encapsulant les prilocaïnes bases dans la phase lipophile; (5) double loaded liposomes contenant les prilocaïnes bases libres dans

la phase organique et les complexes d'inclusion HP-β-CD/prilocaïne bases dans la phase aqueuse. Dans tous les cas, le principe actif est ajouté à des concentrations allant de 1 à 5 %. Aucune variation de taille significative n'est obtenue entre ces différentes formulations. En outre, aucune corrélation n'a été trouvée entre la concentration des principes actifs et la taille des vésicules. Toutefois, les liposomes préparés par la technique de double encapsulation possèdent une meilleure homogénéité (Bragagni et al., 2010).

3.2.5. Effet des CDs sur le potentiel zêta des liposomes

L'effet des CDs sur le potentiel zêta des liposomes a été également étudié. Aucune différence significative n'est signalée entre les valeurs de potentiel zêta des liposomes incorporant les principes actifs et leurs complexes d'inclusion (Bragagni et al., 2010; Cavalcanti et al., 2011; fatouros et al., 2001; Maestrelli et al., 2010).

3.2.6. Effet des CDs sur la morphologie des liposomes

La microscopie électronique à transmission et la microscopie confocale à balayage laser sont utilisées pour visualiser les systèmes DCL. La présence des CDs n'affecte pas la morphologie des liposomes indiquant que les complexes sont inclus dans les vésicules (Maestrelli et al., 2005, 2010). Les MLV incorporant les complexes d'inclusion HP-β-CD/Kétoprofène sont sphériques avec un aspect homogène, alors que des cristaux de principe actif sont observés dans le cas des MLV incorporant les complexes d'inclusion β-CD/Kétoprofène. D'autre part, les liposomes déformables incorporant les complexes CD/bétaméthasone présentent une forme plus aplatie que celle obtenue avec les liposomes incorporant les complexes CD/bétaméthasone, en raison de leurs propriétés élastiques (Gillet et al., 2009).

3.2.7. Effet des CDs sur l'efficacité d'encapsulation des principes actifs

Le Tableau 6 présente également les valeurs d'efficacité d'encapsulation des principes actifs dans les liposomes et les DCLs. Les DCLs augmentent l'efficacité d'encapsulation des principes actifs (nifédipine, prédnisolone, indométacine, curcumine, bétaméthasone) par rapport à celle obtenue dans les liposomes (Skalko et al., 1996; Fatouros et al., 2001;

Dhule et al., 2012; Chen et al., 2007; Piel et al., 2006) (Tableau 6). Pour certains autres principes actifs tels que la doxorubicine, trétinoine et β-lapachone, les valeurs d'efficacité d'encapsulation étaient élevées dans les liposomes contenant les principes actifs ou leurs complexes d'inclusions (Ascenso et al., 2013; Cavalcanti et al., 2011; Hagiwara et al., 2006). Cependant, l'efficacité d'encapsulation du kétoprofène dans les complexes d'inclusion d'HP-β-CD ou de β-CD incorporés dans les liposomes multilamellaires MLV est inférieure à celle du kétoprofène encapsulé dans les liposomes multilamellaires MLV (Maestrelli et al., 2005). Les auteurs ont expliqué leurs résultats par le procédé de préparation des liposomes. En fait, les vésicules contenant le kétoprofène seul ont été préparées par la dissolution du kétoprofène dans la phase lipophile tandis que les complexes d'inclusion ont été dissous dans la phase aqueuse. Par conséquent, le volume occupé par la phase aqueuse, dans le cas de MLV, est plus petit que celui occupé par la phase lipidique (Maestrelli et al., 2005).

Le type de CD peut également influencer l'efficacité d'encapsulation des principes actifs. Cette dernière est supérieure dans les liposomes encapsulant les complexes d'inclusion HP-β-CD/principes actifs comparée à ceux encapsulant les complexes d'inclusion β-CD/principe actif (Maestrelli et al., 2005; Fatouros et al., 2001; Chen et al., 2007) puisque l'HP-β-CD est caractérisée par une cavité intérieure plus lipophile et une meilleure solubilité dans l'eau (Maestrelli et al., 2005; Fatouros et al., 2001).

3.2.8. Corrélation entre l'efficacité d'encapsulation et la concentration du complexe d'inclusion

En utilisant différents types de CDs (β-CD, Crysmeb, Dimeb, Rameb, Trimeb, HP-γ-CD), Piel et al., (2006) ont démontré une corrélation entre l'efficacité d'encapsulation et la concentration des complexes CD/bétaméthasone (Piel et al., 2006). D'autre part, l'efficacité d'encapsulation du kétoprofène augmente avec la concentration du complexe HP-β-CD/kétoprofène jusqu'à atteindre une valeur maximale de 75,1 % à une concentration de 10 mM, puis diminue à des concentrations élevées du complexe (57,3 et 59,9 % à 15 et 20 mM respectivement) (Maestrelli et al., 2006).

Selon Fatouros et al., 2001, la présence du cholestérol dans les systèmes DCLs peut améliorer l'efficacité d'encapsulation de la molécule qui dépend du rapport CD:molécule:cholestérol (Fatouros et al., 2001).

3.2.9. Effet des tensioactifs sur l'efficacité d'encapsulation dans les liposomes déformables

Des complexes d'inclusion CD/principe actif ont été incorporés dans des liposomes déformables dans le but d'améliorer l'efficacité d'encapsulation des principes actifs dans les DCLs. Selon Jain et al. (2007), les MVVs contiennent de nombreuses bicouches non concentriques et le rapport eau/lipide est ainsi plus élevé. L'huile neutre entoure et stabilise les compartiments aqueux internes. En outre, les molécules trioléines, ayant des chaînes d'acides gras plus longues, existent dans la membrane des bicouches lipidiques sur une plus grande surface, augmentant ainsi la taille des compartiments aqueux internes et l'efficacité d'encapsulation (Jain et al., 2007).

La présence de déoxycholate de sodium dans la bicouche peut "solubiliser" et "maintenir" la bétaméthasone libre dans les bicouches lipidiques et donc améliorer l'efficacité d'encapsulation dans les liposomes déformables (Gillet et al., 2009). Cependant, ces auteurs ont montré que les résultats diffèrent selon le type de phospholipide utilisé dans la préparation des liposomes (Gillet et al., 2009).

3.2.10. Effet des CDs sur la vitesse de libération des principes actifs

Des études de libération des principes actifs à partir des liposomes et des DCLs ont été menées et comparées afin de déterminer l'effet des CDs sur la vitesse de libération des principes actifs.

La présence des CDs inhibent la libération des principes actifs des liposomes à pH 7,4 et 37 °C (Chen et al., 2007; Maestrelli et al., 2006). Selon Chen et al., 2007, l'indométacine est rapidement libérée des liposomes puisque les principes actifs hydrophobes sont principalement incorporés dans les bicouches lipidiques (Chen et al., 2007). Plusieurs études ont montré une vitesse de libération des principes actifs (bétaméthasone, indométacine, kétoprofène, doxorubucine) plus lente à partir de DCLs comparée à celle à

partir des liposomes (Piel et al., 2006; Chen et al., 2007; Maesrtelli et al., 2005; Hagiwara et al., 2006). La libération des principes actifs à partir des DCLs pourrait se faire à partir de deux voies: 1) les complexes d'inclusion CD/principes actifs sont transportés du compartiment aqueux interne vers les bicouches lipidiques, puis libérés dans le milieu sous forme du complexe intact; 2) la libération du principe actif libre dans la phase aqueuse, qui est en équilibre avec les complexes d'inclusion (Gharib et al., 2015). En revanche, Cavalcanti et al., 2011, et Fatouros et al., 2001 ont montré que la vitesse de libération du prédnisolone et β-lapachone est plus rapide à partir du DCL en comparaison avec les liposomes encapsulant ces molécules.

La vitesse de libération du principe actif à partir du DCL peut différer selon le type du CD utilisé dans la préparation des complexes d'inclusion (Maestrelli et al., 2005; Fatouros et al., 2001). Ainsi, la vitesse de libération de la bétaméthasone à partir des liposomes ou des systèmes DCLs augmente dans le sens suivant : HP-β-CD ≈ γ-CD< Rameb < HP-γ-CD ≈ en absence de CD < Crysmeb à une concentration en CD de 10 mM (Piel et al., 2006). Par contre, Gillet et al., 2009 et Chen et al., 2007 ont signalé que le type de CD (HP-γ-CD, Crysmeb (Gillet et al., 2009) et HP-β-CD, β-CD (Chen et al., 2007)) n'affecte pas significativement le taux de libération du principe actif. En addition, une corrélation entre l'efficacité d'encapsulation de la bétaméthasone et la vitesse de libération de la molécule a été démontrée quelque soit le type et la concentration des CDs (Piel et al., 2006).

Le type de liposomes semble également influer sur le taux de libération du principe actif. En effet, il a été démontré que le taux de libération du kétoprofène était dans l'ordre suivant : LUV préparés par évaporation en phase inverse contenant HP-β-CD/kétoprofène < MLV préparés par hydratation du film lipidique contenant HP-β-CD/kétoprofène = MLV préparés par congélation-décongélation contenant HP-β-CD/kétoprofène < SUV obtenus par extrusion contenant HP-β-CD/kétoprofène (Maestrelli et al., 2006). Le faible taux de libération du kétoprofène à partir des LUV semble être dû à la densité et la viscosité élevées de ces dispersions liposomiales. D'autre part, la vitesse de libération rapide à partir des SUV, particulièrement dans la phase initiale, peut être attribuée à leur

petite taille. La vitesse de libération intermédiaire des MLV obtenus par deux méthodes différentes a été expliquée par la structure analogue de ces liposomes multilamellaires (Maestrelli et al., 2006).

Des résultats contradictoires ont été obtenus concernant l'effet des liposomes déformables sur la vitesse de libération des principes actifs (Jain et al., 2007; Gillet et al., 2009). Gillet et al. (2009) ont expliqué l'amélioration de la libération principes actifs dans les liposomes déformables par la perméabilité élevée de la bicouche en raison de la présence d'un tensioactif.

3.2.11. Stabilité des DCLs

Les DCLs augmentent la stabilité des liposomes (Skalko et al., 2000 ; Gillet et al., 2009) en réduisant les interactions des molécules avec les bicouches lipidiques grâce à leur présence dans la cavité des cyclodextrines (Skalko et al., 1996; Piel et al., 2006). Les liposomes préparés par déshydratation-réhydratation incorporant les complexes d'inclusion d'HP-β-CD et de la dexaméthasone, la déhydroépiandrostérone, le rétinal et l'acide rétinoïque ont conservé leur stabilité dans le plasma (McCormack et Gregoriadis, 1994). De plus, DCL améliore la stabilité chimique des molécules dans les liposomes multilamellaires (Loukas et al., 1995; 1998). Ainsi, ces derniers préparés par déshydratation-réhydratation incorporant les complexes d'inclusion γ-CD/riboflavine montrent une photostabilité accrue (Loukas et al., 1995), et ceux contenant les complexes d'inclusion HP-β-CD/indométhacine les protègent contre l'hydrolyse (Loukas et al., 1998).

3.2.12. Effets biologiques des DCLs

Peu d'études ont étudié les effets biologiques des principes actifs dans les systèmes DCLs. Les liposomes encapsulant les complexes d'inclusion HP-γ-CD/curcumine présentent des activités anticancéreuses à la fois *in vit*ro et *in vivo* contre des lignées cellulaires de cancer du sein (Dhule et al., 2012) et ceux contenant HP-β-CD/curcuminoïdes 4-[3,5-bis (2-chlorobenzylidène-4-oxo-pipéridine-1-yl)-acide 4-oxo-2-buténoïque] montrent une activité anti prolifération contre des tumeurs du poumon sans

présenter un effet toxique sur les fibroblastes pulmonaires normales (Agashe et al., 2011). L'effet anesthésiant de butamben, benzocaïne (Maestrelli et al., 2010) et prilocaïne (Bragagni et al., 2010) a été étudié. Par rapport à des liposomes encapsulant les principes actifs, ceux préparés par la technique de double encapsulation fournissent les meilleurs résultats puisqu'ils ont montré une libération rapide due à la présence des principes actifs libres dans la bicouche externe, et un effet prolongé en raison de la présence du complexe d'inclusion CD/principe actif dans le compartiment aqueux interne des liposomes (Maestrelli et al., 2010; Bragagni et al., 2010).

Zhu et al. (2013) ont utilisé un agent tensioactif Pluronic F127 dans la préparation des liposomes contenant les tacrolimus et les complexes β-CD/tacrolimus. Après administration orale à des rats, les auteurs ont montré que les DCLs améliorent la pénétration du principe actif à travers les surfaces épithéliales de la muqueuse, permettant au principe actif d'atteindre la muqueuse sous-jacente (Zhu et al., 2013). Dans une autre étude *in vivo*, en comparant à des liposomes PEGylés incorporant la doxorubicine, les liposomes PEGylés encapsulant les complexes d'inclusion γ-CD/doxorubicine retardent la croissance tumorale et améliorent le taux de survie après injection intraveineuse à des souris mâles (Arima et al., 2006). Enfin, des liposomes multi-vésiculaires encapsulant les complexes d'inclusion β-CD/célécoxib montrent un effet anti-inflammatoire plus prolongé que celui des liposomes multilamellaires encapsulant les complexes β-CD/célécoxib ou des solutions de β-CD/célécoxib, lors de l'administration intra-péritonéale à des rats albinos (Jain et al., 2007).

Chapitre 4: L'huile essentielle de clou de girofle

4.1. Les huiles essentielles

4.1.1. Définition

Les huiles essentielles (HEs) sont définies selon la pharmacopée comme étant «des substances odorantes, généralement de composition complexe renfermant des principes volatils, obtenues à partir d'une matière première d'origine végétale, après séparation de la phase aqueuse par des procédés physiques: soit par entraînement à la vapeur d'eau, par distillation sèche, ou bien par un procédé mécanique approprié sans chauffage» (Pharmacopée Européenne, 2010). Elles se forment comme produits du métabolisme secondaire dans plusieurs organes des plantes aromatiques, y compris les bourgeons, fleurs, feuilles, tiges, branches, graines, fruits, racines, bois ou écorces, et s'accumulent dans des cellules sécrétoires, cavités, canaux, cellules épidermiques ou glandulaires (Bakkali et al., 2008).

Les huiles essentielles ont, à toute époque, occupé une place importante dans la vie quotidienne de l'homme grâce à leurs nombreuses propriétés.

4.1.2. Composition chimique des huiles essentielles

Les HEs sont des mélanges complexes de composés volatils extraits à partir d'un grand nombre de plantes. En général, elles représentent une petite fraction de la composition végétale (moins de 5 % de la matière végétale sèche) et comprennent principalement des terpènes (mono- et sesqui-terpènes) et des phénylpropanoïdes (EL Asbahani et al., 2015).

Dans notre travail, nous nous sommes intéressées à l'huile essentielle de clou de girofle (HECG).

4.2. L'huile essentielle de clou de girofle

4.2.1. Généralités

Le girofle ou giroflier, connu scientifiquement sous le nom de *Syzygium aromaticum L*, *Eugenia aromaticum* ou *Eugenia caryophyllata* (Figure 18a), est un arbre d'origine indonésienne appartenant à la famille des myrtacées (Chaieb et al., 2007). L'arbre a une forme conique de 10 à 12 mètres de hauteur pouvant atteindre jusqu'à 20 mètres de hauteur (Singh et al., 2012). Le girofle est cultivé en Indonésie, Tanzanie, Sri Lanka, Madagascar, Malyzia, Brézil et l'Inde

(Arung et al., 2011; Singh et al., 2012). Les bourgeons de fleurs de giroflier, généralement de 10 à 17,5 mm de longueur avec une forme sub-cylindrique légèrement aplatie, sont récoltés avant leur éclosion, ensuite séchés au soleil jusqu'à ce qu'ils prennent une teinte brun foncé: ce sont les clous de girofle (Figure 18b) (Singh et al., 2012). Ces derniers contiennent environ 14 à 21 % de l'huile essentielle volatile (Tajuddin et al., 2003).

Figure 18: Le giroflier *Syzygium aromaticum L* (a) et les clous de girofle (b) (Hernández-Moreno et al., 2013).

4.2.2. Les principaux constituants de l'huile essentielle de clou de girofle

Plusieurs procédés d'extraction comme l'hydrodistillation, la distillation à la vapeur, l'extraction par solvant organique et par fluide supercritique ont été utilisés pour extraire les terpènes de différentes parties de la plante. L'HECG est très riche en eugénol (Eug), acétate d'eugénol (Eug-Ac) et bêta-caryophyllène (Crph). Elle contient également de faibles quantités d'autres composés comme l'alpha-humulène connu autrement sous le nom d'alpha-caryophyllène, cadinène, 1,8-cinéole, α-copaène, alcool benzylique, vanilline, 3-allyl-6-methoxyphénol et oxyde de caryophyllène (Figure 19).

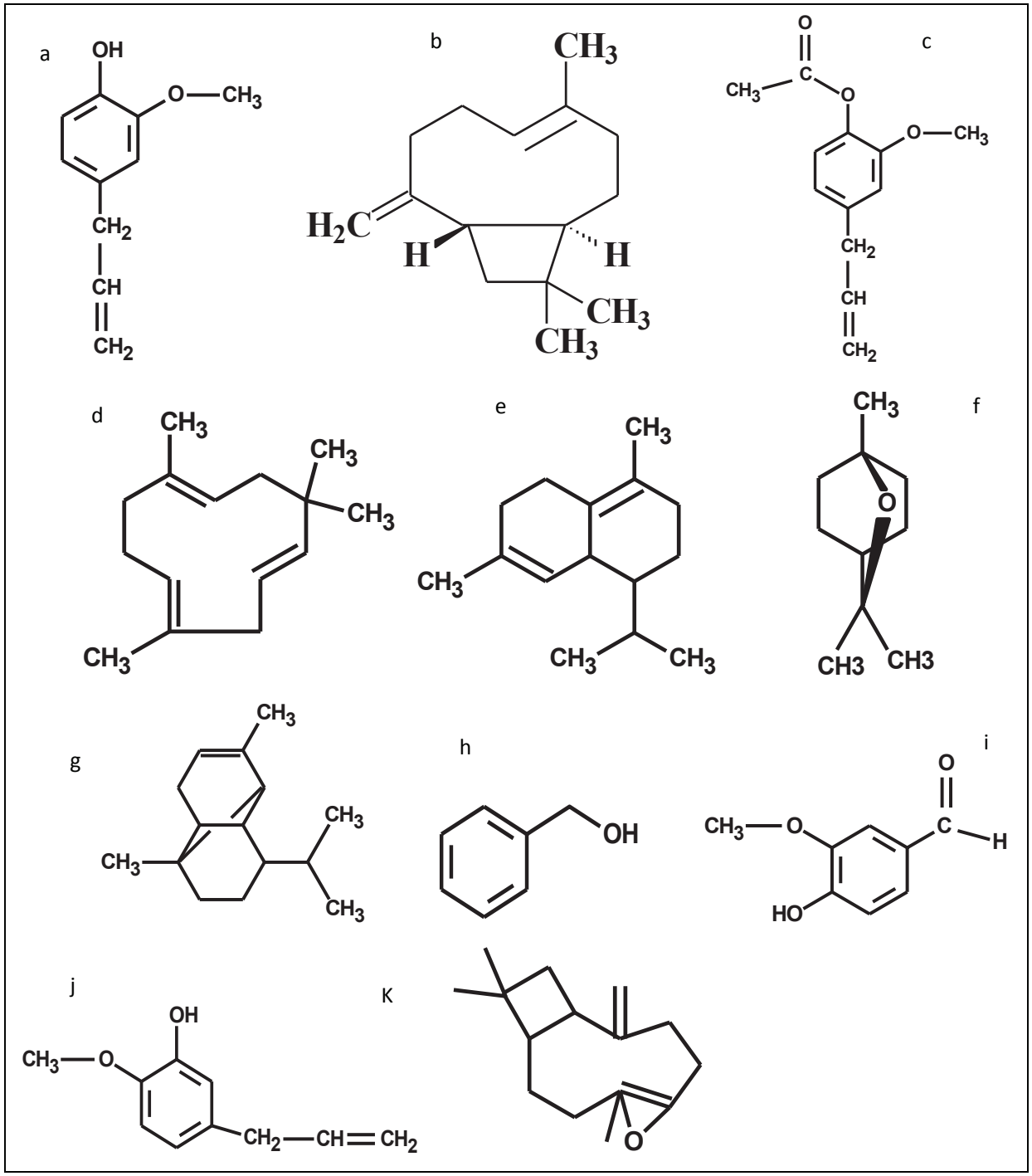


Figure 19: Structure chimique des constituants de l'huile essentielle de clou de girofle: eugénol (a), β-caryophyllène (b), acétate d'eugénol (c), α-humulène ou α-caryophyllène (d), cadinène (e), 1,8 cinéole (f), α-copaène (g), alcool benzylique (h), vanilline (i), 3-allyl-6-méthoxyphénol (j) et oxyde de caryophyllène (K).

Le tableau 7 résume les méthodes d'extraction et les différents constituants de l'HECG provenant de différentes origines. La composition de l'HECG varie en fonction de son origine, du climat et des pratiques agricoles (Tableau 7) (Hamed et al., 2012). Exceptionnellement, Lee et al., 2001 et Chatterjee et al., 2013 ont exprimé la concentration des constituants de l'HECG en mg/g de bourgeons sec. L'Eug était le constituant majeur (24,37 mg/g ou 130,01 mg/g obtenu respectivement par distillation à la vapeur et extraction par fluide supercritique).

Tableau 7: L'huile essentielle de clou de girofle : origine, méthode d'extraction et principaux constituants.

Origine	**Méthode d'extraction**	**Eug (%)**	**Eug-Ac (%)**	**β-Crph (%)**	**Autres constituants (%)**	**Références**
Bourgeon-Turkie	DV	87,0	8,01	3,56	α-humulène (0,4%) Cadinène (0,04%) Autres < 1%	Alma et al., 2007
Bourgeon-NS	HD	60,5	7,0	7,5	α-humulène (1,7%) Autres : NS	Arenas et al., 2011
HECG -NS	HD	88,58	5,62	1,39	α-humulène (0,19%) Autres < 1%	Chaieb et al., 2007
Bourgeon-Madagascar	NS	81,59	11,53	5,12	α-humulène (0,56%) Autres: NS	Du et al., 2009
Bourgeon-London UK	NS	85,29	6,91	5,15	Autres: NS	Edris et al., 2012
Bourgeon-Chine	DV	80,34	0,90	14,78	α-Crph (2,0%) Autres < 1%	Fei et al., 2011
HECG-Italie	NS	59,3	4,2	24,9	α-humulène (2,8%) Cadinène (3,6%) Autres <1%	Fichi et al., 2007
Bourgeon-Inde	DV	87,34	5,18	2,01	Autres: NS	Halder et al., 2011
Bourgeon-Egypte	HD	61,7	8,8	23,7	Autres: NS	Hamed et al., 2012
HECG-Iran	NS	88,58	5,62	1,38	Autres: NS	Hosseini et al., 2011
Bourgeon-Madagascar	NS	71,8	19,8	NS	Autres: NS	Pan et al., 2012
Feuilles-Allemagne	NS	76,8	1,2	17,4	α-humulène (2,1%) Autres <1%	Jirovetz et al., 2006

Origine	Méthode d'extraction	Eug (%)	Eug-Ac (%)	β-Crph (%)	Autres constituants (%)	Références
Bourgeon-St Louis	NS	83,66	1,81	12,25	Oxyde de caryophyllène (1,0%) Autres: NS	Kim et al., 2011
Bourgeon-Portugal	NS	85,3	ND	0,9	α-humulène (6,8%) 1,8 cinéole (1,2%) Autres <1%	Machado et al., 2011
HECG-NS	HD	58,29	19,10	17,81	α-humulène (1,77%) α-copaène (1,14%) Autres <1%	Marya et al., 2012
HECG-Turkie	DV	44,2	1,3	44,7	α-humulène (3,5%) α-copaène (1%) Autres: NS	Ozturk et al., 2005
HECG-Inde	NS	47,64	ND	1,0	Alcool benzylique (34,1%), Vanilline (0,91%), 3-allyl-6-méthoxyphénol (4,98%), Oxyde de caryophyllène (1,35%), Autres: 10,02%	Pawar et al., 2006
Bourgeon-Cuba	NS	69,8	16,1	13,0	α-humulène (0,6%) Autres <1%	Pino et al., 2001
Bourgeon-Brésil	EFS-échelle pilote	72,74	11,55	6,4	α-humulène (1,06%) Autres: NS	Prado et al., 2011
HECG- UK	NS	78,0	NS	13	NS	Prashar et al., 2006
Feuilles-Inde	HD	94,41	ND	2,91	α-humulène (0,36%) Autres <1%	Raina et al., 2001
Bourgeon-Brésil	DV	89,6	1,7	8,6	Autres: NS	Santin et al., 2011
Bourgeon-NS	HD	92,42	NS	NS	α-Crph (5,44%) Autres NS	Saviuc et al., 2012
Bourgeon-Inde	HD	70,0	2,1	19,5	α-humulène (1,9%) Autres < 1%	Srivastava et al., 2005
Bourgeon-Madagascar		82,6	6,0	7,2	α-humulène (0,8%) Autres < 1%	
Feuilles-Madagascar		82,0	0,4	13,0	α-humulène (1,5%) Autres < 1%	

Origine	Méthode d'extraction	Eug (%)	Eug-Ac (%)	β-Crph (%)	Autres constituants (%)	Références
Bourgeon-Indonésie	HD	67,6	16,8	10,8	α-humulène (2%) Autres <1%	Teixeira et al., 2013
Feuilles-Indonésie	NS	71,0	NS	14,0	α-humulène (1,75%)	Vernin et al., 1994
Bourgeon-Chine	EFS	55,41	21,06	16,22	α-humulène (2,11%) Autres (<1%)	Wenqiang et al., 2007
	DV	58,2	13,84	20,59	α-humulène (2,61%) Cadinène (1,05%) Autres < 1%	
	HD	48,82	3,89	36,94	α-humulène (4,41%) Cadinène (1,46%) Autres < 1%	
	ES	57,24	19,37	17,5	α-humulène (2,03%) Autres < 1%	

Crph: caryophyllène ; DV: distillation à la vapeur ; Eug: eugénol ; Eug-Ac: acétate d'eugénol ; EFS: extraction par fluide supercritique CO_2 ; ES: Extraction par solvant organique ; HD: hydro - distillation ; ND: non déterminé ; NS: non signalé.

4.2.3. Eugénol

L'eugénol (4-allyl-2-méthoxyphénol; $C_{10}H_{12}O_2$), liquide volatile de couleur jaune pâle, est le composant majeur de l'HECG. Il est aussi présent dans de nombreuses autres plantes y compris la cannelle, le basilic, la muscade (Choi et al., 2009), *Pimenta racemosa* et *Cinnamomum verum* (Jaganathan et al., 2011). L'Eug est particulièrement odorant et présente un goût piquant épicé (O'Neil, 2006). L'Eug est considéré comme non mutagène, non cancérigène et généralement reconnu comme sûr (GRAS) par la Food and Drug Administration (Baskaran et al., 2010). L'organisation de la santé dans le monde (WHO) a établi que la quantité quotidienne acceptable de l'HECG est de 2,5 mg/kg chez l'homme (Gülçin et al., 2012).

4.2.3.1. Biosynthèse de l'eugénol chez les plantes

Les phénylpropanoïdes sont synthétisés à partir de la phénylalanine obtenue par la voie du shikimate. La première étape de la voie générale des phénylpropanoïdes fait intervenir la phénylalanine ammonia-lyase, qui catalyse la désamination non oxydative de la phénylalanine en acide *trans*-cinnamique. Ce dernier subit une hydroxylation en position 4 du cycle aromatique,

sous l'action d'une monooxygénase, la cinnamate 4-hydroxylase, pour former l'acide *p*-coumarique. La 4-coumarate: CoA-ligase catalyse la formation ATP-dépendante d'un ester de coenzyme A (CoA) menant à la synthèse de *p*-coumaroyl-CoA (Figure 20). Ces intermédiaires constituent des formes activées des acides hydroxycinnamiques. Ils sont les précurseurs de nombreux métabolites et sont les points de branchement principaux entre la voie générale des phénylpropanoïdes et les voies secondaires, dont la voie de la lignine et des flavonoïdes (Maeda et al., 2012).

L'acide *p*-coumarique est un précurseur de l'eugénol par une série de réactions (Figure 20). L'acide *p*-coumarique est hydroxylé en position 3 du noyau aromatique, sous l'action de l'acide *p*-coumarique 3-hydroxylase, donnant l'acide caféique. L'acide caféique O-méthyltransférase catalyse ultérieurement le transfert du groupement méthyle du cofacteur S-adénosyl-L-méthionine sur l'hydroxyle en méta de l'acide caféique. L'acide férulique obtenu est ensuite réduit en aldéhyde conifférylique puis en alcool conifférylique qui est par la suite acétylé en acétate de coniféryle par la coniféryle alcool acétyltranférase. L'eugénol est enfin synthétisé par l'eugénol synthase, NADPH dépendante, à partir de l'acétate de coniféryle (Louie et al., 2007; Manitto et al., 1974).

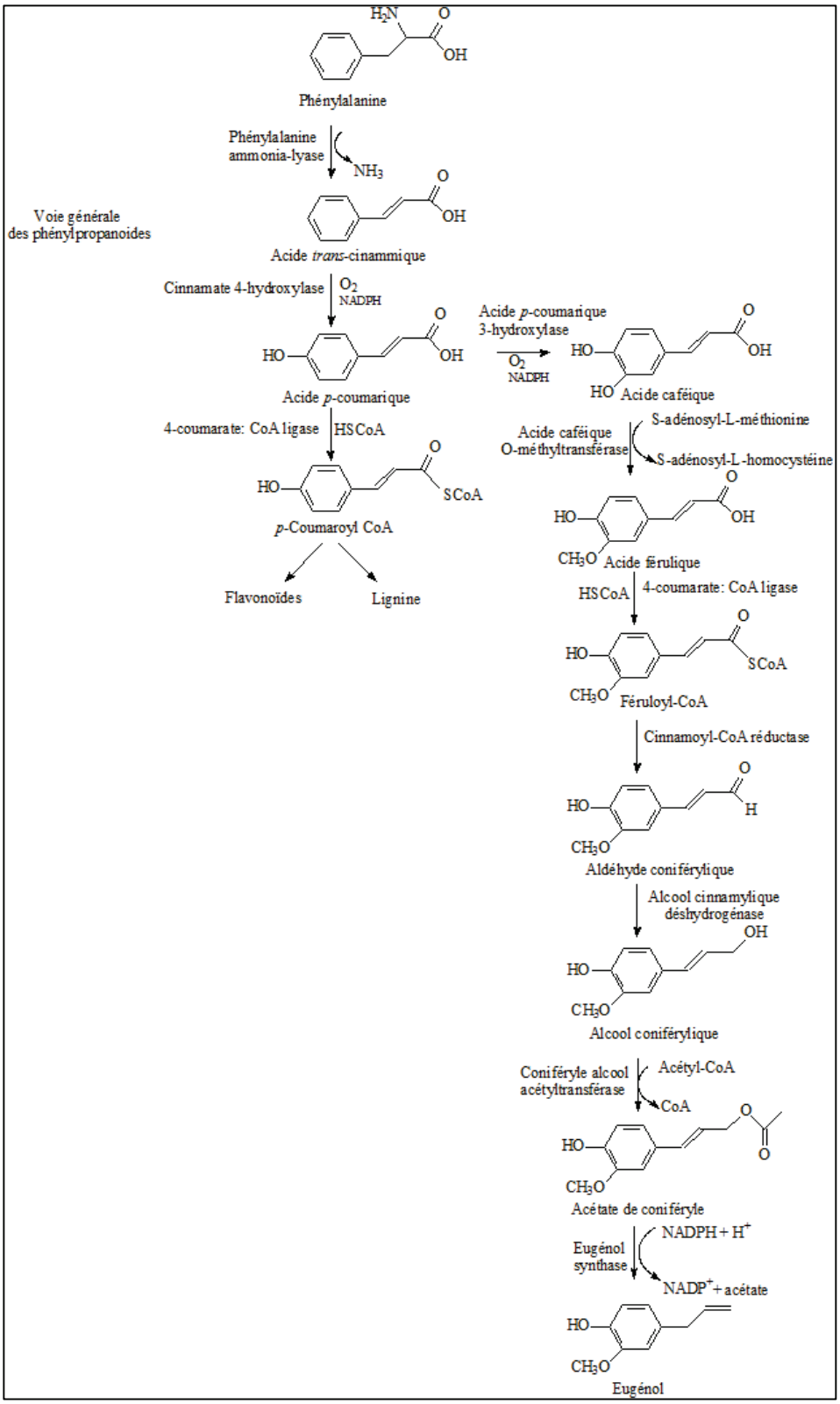


Figure 20: Voie de biosynthèse de l'eugénol chez les plantes (Louie et al., 2007).

4.2.3.2. Propriétés physico-chimiques de l'eugénol

L'Eug possède un poids moléculaire de 164,2 g/mol, un petit volume moléculaire de 0,26 nm^3 (Tchakalova et al., 2008), une température de fusion (à 1 bar) de -9,1 à -9,2 °C et d'ébullition autour de 253 °C (O'Neil, 2006), un pka de l'ordre de 10,19 (HDVB, 2012) ou 10,72 (Reiner et al., 2009), et une densité de 1,06 g/mL à 20 °C (Shinde et al., 2011; HDVB, 2012).

L'Eug est faiblement soluble dans l'eau avec une solubilité à 25 ºC de 6,535 g/L (O'Neil, 2006), 2,460 g/L (HDVB, 2012) ou 16 mM qui correspond à 2,627 g/L (Reiner et al., 2009). Il est soluble dans l'éthanol, le cyclohexane et le dichlorométhane. Il est volatile avec une pression de vapeur de 4,2 kPa à 150 °C (NIST, 2011) et 0,023 mm Hg qui correspond à 0,003 KPa à 25 °C (HDVB, 2012). Il est lipophile avec un coefficient de partage octanol/eau (log *P*) de 2,29 (Reiner et al., 2009), 2,4 (Tchakalova et al., 2008), 2,43 (Dias et al., 2003), 2,73 (Goodner et al., 2008) ou 2,99 (Griffin et al., 1999).

4.2.3.3. Oxydation de l'eugénol

L'Eug est sensible aux conditions environnementales (lumière, chaleur, oxygène) (Sajomsang et al., 2012; Choi et al., 2009; Wang et al., 2011; Garg et al., 2011). Il est capable d'être oxydé par irradiation, alcalisation ou bien par les enzymes cytochromes P450 et peroxydases (Thompson *et al.,* 1989, 1990) via la voie de transfert d'un électron en radical phénoxyle. Ce dernier se transforme par la suite en quinone méthide, qui peut se lier d'une manière covalente à des groupes thiols dans les protéines cellulaires, pouvant former des conjugués de glutathion, induisant une toxicité cellulaire (Atsumi et al., 2005; Suzuki et al., 1985). La réaction d'oxydation de l'Eug est présentée dans la Figure 21.

Figure 21: Réaction de l'oxydation de l'eugénol par la lumière (Atsumi et al., 2005).

4.2.3.4. Pharmacocinétique de l'eugénol

4.2.3.4.1. Absorption

Chez des volontaires humains sains, l'Eug est rapidement absorbé après administration orale (Fischer et al., 1990). L'Eug est rapidement absorbé après administration orale de 40 mg/Kg chez les rats Sprague-Dawley où il atteint rapidement une concentration maximale (C_{max}) de 0,123 et de 0,270 µg/mL après 2,13 et 0,25 h, respectivement dans le plasma et le sang (Guenette et al., 2007a). De plus, l'Eug est bien absorbé avec une concentration maximale sanguine C_{max} de 10,53 µg/mL après son administration à une concentration de 75 mg/L chez les truites (*Oncorhynchus mykiss*) conservées dans de l'eau oxygénée à 4 °C (Guenette et al., 2007b).

4.2.3.4.2. Distribution

Après administration orale de l'Eug (40 mg/kg) chez les rats, l'Eug atteint le plasma, le cerveau et la moelle épinière après 0,25 h avec une concentration maximale respectivement égale à 99; 438,6 et 425,7 µg/mL. L'Eug pénètre facilement les tissus nerveux et se distribue dans la moelle épinière plus que dans le cerveau. De plus, aucun signe de toxicité n'est apparu chez les rats recevant une dose quotidienne de 40 mg/kg de l'Eug pendant 30 jours consécutifs (Lionnet et al., 2010).

4.2.3.4.3. Métabolisme

Le métabolisme de l'Eug chez des volontaires humains sains masculins et féminins est étudié (Figure 22) (Fischer et al., 1990). Il a été montré que l'urine contient l'Eug et ses métabolites, notamment le 4-hydroxy-3-méthoxy-phényl-propane, le cis- et trans-isoeugénol, le 3-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)-propylène-1,2-oxyde, 3-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)-propane-1,2-diol, l'acide 3-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl) propionique, 3-hydroxy-3-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)-allylbenzène, 3-(6-mercapto-4-hydroxy-3-méthoxy-phényl) propane et l'acide 2-hydroxy-3-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl) propionique (Figure 22). La conjugaison avec l'acide glucuronique et sulfate est la principale voie métabolique de l'Eug chez l'homme. L'époxydation concerne une très faible fraction de la dose administrée et la présence de l'époxyde (3-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)-propylène-1,2-oxyde) dans le corps est très courte. De ce fait, l'Eug ne montre pas des effets toxiques (Fischer et al., 1990).

Figure 22: Les métabolites de l'Eug chez l'homme (Fischer et al., 1990).

Guenette et al., 2006 ont également identifié les métabolites glucuro- et sulfono-conjugués de l'Eug dans l'urine des rats. Des études utilisant des fractions microsomales de foie et de poumon ont révélé que l'Eug est oxydé par des enzymes cytochrome P450 et par des peroxydases en un intermédiaire réactif capable de se lier de manière covalente aux protéines et de former des conjugués avec le glutathion (Thompson et al., 1989, 1990).

4.2.3.4.4. Excrétion

Chez des volontaires humains sains, l'Eug est presque complètement excrété dans l'urine dans les 24 h suivant l'administration orale (Fischer et al., 1990). Après administration de l'Eug chez les rats à une dose de 40 mg/Kg, la clairance apparente de l'Eug est de 86,7 et 86,8 L/h/kg dans le plasma et le sang, respectivement. La demi-vie d'élimination de l'Eug ($T_{1/2}$) est élevée de 14,0 et 18,3 h respectivement dans le plasma et le sang, indiquant une possibilité d'accumulation de l'Eug suite à des administrations successives (Guenette et al., 2007a). Aussi, l'Eug est éliminé avec une longue $T_{1/2}$ de 12,14 h chez les truites (Guenette et al., 2007b).

4.2.3.5. Biotransformation végétale et microbienne de l'eugénol

L'Eug est biotransformé par les cellules végétales en culture d'*Eucalyptus Perriniana* en β-glucoside (7 %) où le résidu glucopyrannosyle est attaché au groupe hydroxyle de l'Eug formant le 2-méthoxy-4-(2-propényl)phényl β-D-glucopyranoside et en β-gentiobioside (58%) contenant deux résidus glucopyrannosyles liés par une liaison 1-6 (2-méthoxy-4-(2-propényl)phényl 6-O-(β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranoside) (Figure 23). Les glycosyltransférases sont les enzymes responsables de cette biotransformation aboutissant à la préparation des dérivés plus solubles dans l'eau qui s'accumulent dans les cellules (Shimoda et al., 2006).

Figure 23: La glycosylation de l'Eug par les cellules végétales en culture d'*Eucalyptus Perriniana* (Shimoda et al., 2006).

Par ailleurs, l'Eug et son isomère isoeugénol sont utilisés en tant que substrats pour la production de la vanilline par une transformation enzymatique. L'Eug est converti enzymatiquement via l'alcool coniférylique et l'aldéhyde coniférylique en acide férulique (Overhage et al., 2003) (Figure 24 a), ou bien il subit, sous traitement alcalin, un réarrangement intramoléculaire donnant lieu à l'isoeugénol (Hong-Li et al., 2004) qui par la suite subit une oxydation de sa chaîne latérale aromatique conduisant à la formation de l'acide férulique (Figure 24 b). Ce dernier se transforme en vanilline par une réaction similaire à la β-oxydation des acides gras (Rao et al., 1999) (Figure 24 b). De plus, diverses souches de bactéries (*Pseudomonas HR199, Ralstonia eutropha H16, Bacillus Cereus PN24*) sont capables de biotransformer l'Eug, donnant lieu aux métabolites suivants: l'acide férulique, l'alcool coniférylique, l'aldéhyde coniférylique, la vanilline et l'acide vanillique (Overhage et al., 2003).

Figure 24: Biotransformation de l'eugénol (a) (Overhage et al., 2003) et de l'isoeugénol (b) en vanilline (Rao et al., 1999).

4.2.3.6. Propriétés biologiques de l'HECG et de l'eugénol

L'HECG et son composant majeur sont reconnus pour leurs diverses activités biologiques, ce qui les rend utiles pour des applications cosmétiques, agroalimentaires et pharmaceutiques.

4.2.3.6.1. Propriété antibactérienne

L'HECG et l'Eug sont principalement connus par leurs activités antibactériennes contre diverses souches des bactéries Grams négatifs (*Salmonella Typhi* (Devi et al., 2010), *Salmonella enterica* (Friedman et al., 2002 ; Gill et al., 2006), *Salmonella enteritidis* (Pan et al., 2012), *Escherichia coli* (Friedman et al., 2002 ; Gómez-Estaca et al., 2010 ; Hemaiswarya et al., 2009), *Enterobacter aerogenes* (Hemaiswarya et al., 2009 ; Wendakoon et al., 1993), *Campylobacter jejuni* (Friedman et al., 2002), *Aeromonas hydrophila* (Sutili et al., 2014), *Proteus vulgaris* (Hemaiswarya et al., 2009), *Pseudomonas aeroginosa* (Hemaiswarya et al., 2009 ; Walsh et al., 2003), *Pseudomonas fragi* (Pan et al., 2012), *Pseudomonas fluorescens* (Gómez-Estaca et al., 2010), *Helicobacter pyroli* (Ali et al., 2005), *Saccharomyces cerevisiae* (Liang et al., 2012), *Shewanella putrefaciens* (Gómez-Estaca et al., 2010), *Photobacterium phosphoreum* (Gómez-Estaca et al., 2010)) et Grams positifs (*Listeria monocytogenes* (Gill et al., 2006 ; Friedman et al., 2002) *Listeria innocua* (Hill et al., 2013 ; Gómez-Estaca et al., 2010), *Lactobacillus sakei* (Gill et al., 2006), *Lactobacillus acidophilus* (Gómez-Estaca et al., 2010), *Bacillus cereus* (Hamed et al., 2012), *Bacillus subtilis* (Liang et al., 2012), *Propionibacterium acnes* (Fu et al., 2009), *Staphylococcus aureus* (Walsh et al., 2003), *Staphylococcus epidermis* (Chaeib et al., 2007), *Streptococcus oralis* (Sajomsang et al., 2012), *Streptococcus mutans* (Sajomsang et al., 2012). L'effet bactéricide de l'Eug (Figure 25) semble être du à son caractère hydrophobe responsable de sa pénétration dans la bicouche lipidique de la membrane cellulaire des bactéries, conduisant à une altération de la membrane cytoplasmique voire même une augmentation de sa perméabilité non-sélective et une perte de l'intégrité membranaire et par conséquent une fuite des constituants intracellulaires (protéines, ions) aboutissant finalement à la mort cellulaire (Burt et al., 2004; Hemaiswarya et al., 2009; Devi et al., 2010). D'autre part, l'interaction des molécules hydrophobes avec les membranes cellulaires est connue pour affecter l'activité des enzymes liées à la membrane (Sikkema et al., 1995). En effet, l'Eug inhibe l'ATPase (Gill et al., 2006). Il inhibe aussi directement les flagelles responsables de la motilité des cellules bactériennes par dissipation de gradient de protons de la membrane (Gill et al., 2006). De plus, la

présence du groupe hydroxyle sur l'Eug peut augmenter sa solubilité dans les suspensions aqueuses et améliorer sa capacité à passer à travers les portions hydrophiles de l'enveloppe cellulaire (Sikkema et al., 1995), et semble être essentiel pour l'activité antibactérienne de l'Eug (Wendakoon et al., 1993). Plusieurs études ont montré qu'une synergie d'action existe lorsque l'Eug est associé à d'autres antibiotiques tels que la vancomycine (Hemaiswarya et al., 2009), bêta-lactame (Hemaiswarya et al., 2009), streptomycine (Liu et al., 2015) et pénicilline (Gallucci et al., 2006).

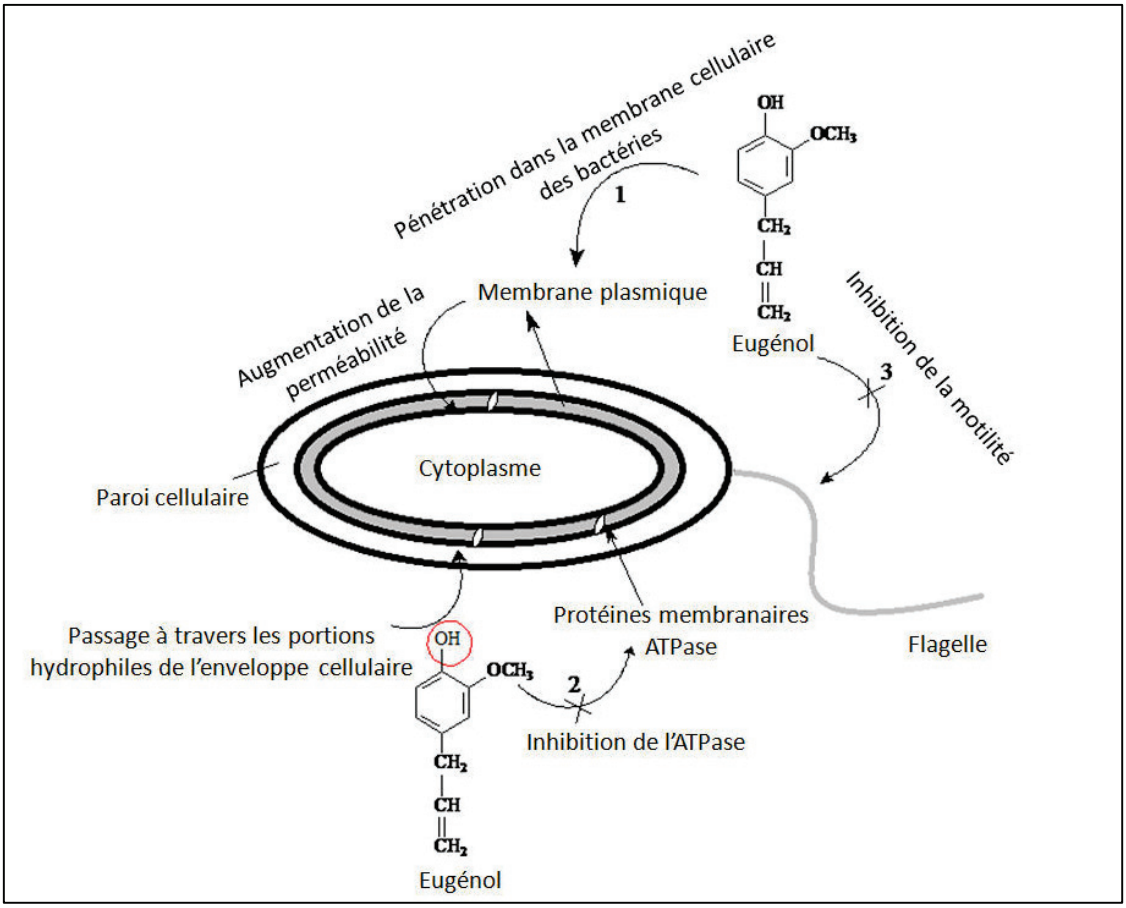


Figure 25: Mécanisme antibactérien de l'eugénol (Greige-Gerges et Sebaaly, 2015).

4.2.3.6.2. Propriété antifongique

L'Eug exerce une activité fongicide contre plusieurs espèces de champignons tels que *Aspergillus* spp (Bullerman et al., 1977), *Penicillium citrinum* (Vazquez et al., 2001), *Candida*

albicans (Sajomsang et al., 2012; Garg et al., 2011 ; Pinto et al., 2009)*, Saccharomyces cerevisiae* (Khan et al., 2012)*, Spergillus flavus* (Xing et al., 2012) et *Rhizopus nigricans* (Xing et al., 2012). L'effet antifongique de l'Eug semble aussi être du à son effet sur la membrane cellulaire (Cox et al., 2001).

4.2.3.6.3. Propriété antivirale

Il a été démontré que L'HECG possède une activité antivirale. En effet, elle inhibe la réplication du virus de l'hépatite C (Hussein et al., 2000) et spécifiquement l'activité de l'ADN polymérase du virus d'Herpès 1 (Kurokawa et al., 1998). L'Eug peut inhiber indirectement le virus d'Herpès 1 et 2, suite à ses effets modulateurs sur les activités cellulaires de glutathion S transférase (Benencia et al., 2000). Une synergie d'action est démontrée *in vitro* entre l'Eug et l'acyclovir contre le virus d'Herpès (Benencia et al., 2000). Ceci permet de réduire les doses des composés potentiellement toxiques et la probabilité de l'apparition des virus résistants aux médicaments, augmentant ainsi la puissance antivirale (Barquero et al., 1977).

4.2.3.6.4. Propriétés acaricide et insecticide

L'Eug possède une activité insecticide contre *Tribolium castaneum, Sitophilus. zeamais* (Ho et al., 1994), *Diabrotica barberi* (Ladd et al., 1983 et Lampman et al., 1988), *Psoroptes cuniculi* (Perrucci et al., 1995), *Giardia lamblia* (Machado et al., 2011), les larves *Culex pipiens* (El Hag, 1999), les moustiques *Pediculus capitis* (Yang *et al.*, 2003), *Anopheles dirus* (Trongtokit *et al.*, 2005), les ruminants *Haemonchus contortus* (Pessoa et al., 2002). L'HECG montre une puissante activité acaricide contre les acariens *Dermatophagoides farinae* et *Dermatophagoides pteronyssinus* (Kim et al, 2003). La présence du groupement hydroxyle dans la molécule d'Eug et sa propriété anti-oxydante jouent un rôle crucial dans la réduction de la population des acariens (Kim et al., 2011; Kim et al., 2004; Tomaino et al., 2005).

4.2.3.6.5. Propriété anti-tumorale

L'HECG possède des activités anti-mutagéniques (Miyazawa et al., 2003) et anticancéreuses (Kouidhi et al., 2010). L'Eug inhibe la prolifération de nombreuses cellules cancéreuses, comme les cellules du cancer de mélanome en inhibant l'activité de transcription de E2F1 (Ghosh et al., 2005), les cellules HL60 de la leucémie humaine (Yoo et al., 2005) et les cellules HCT-15 et HT-

29 du cancer du côlon humain (Jaganathan et al., 2011). L'Eug provoque une diminution du potentiel de la membrane mitochondriale et une augmentation des radicaux oxygénés menant à la fragmentation de l'ADN et l'activation de p53 et de la caspase 3 (Jaganathan et al., 2011; Yoo et al., 2005). L'Eug provoque aussi l'apoptose des mastocytes *via* la translocation de p53 phosphorylé en serine 15 vers les mitochondries et son interaction avec Bcl-2 et Bcl-xL (Park et al., 2005). A des concentrations élevées, l'Eug provoque une réduction de la tension de surface des membranes des érythrocytes chez les rats, entraînant une lyse membranaire (Manabe et al. 1987).

4.2.3.6.6. Effet anti-hépatotoxique

L'effet hépato-protecteur de l'Eug contre l'hépato-toxicité des rats induite par le tétrachlorure de carbone a été également prouvé (Kumaravelu et al., 1995). En outre, l'Eug et le β-Crph sont capables d'induire l'enzyme glutathion S-transférase impliquée dans la détoxification au niveau des cellules hépatiques et intestinales (Zheng et al., 1992).

4.2.3.6.7. Propriété anti-oxydante

Le piégeage du radical DPPH• (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle) est une des méthodes utilisées pour déterminer l'activité anti-oxydante d'une molécule. Le DPPH• est un radical libre renfermant dans sa structure un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Le don d'un atome hydrogène ou d'un électron d'un antioxydant au DPPH• le réduit en diphénylpicrylhydrazine (DPPH-H) (Kim et al., 2009). La solution de DPPH• de couleur violette se transforme en jaune après réduction. La mesure de l'activité anti-oxydante d'un composé se fait en suivant la diminution de la coloration violette, due à la réduction du DPPH•, par spectrophotométrie à une longueur d'onde entre 515 et 518 nm.

Plusieurs études ont montré que la forte activité anti-oxydante de l'HECG est due à la présence de l'Eug (Ruberto et al., 2000; Wei et al., 2010; Ozcan et al., 2011). En effet, Brand-Williams et al., 1995 ont expliqué que l'activité anti-oxydante de l'Eug peut se produire via trois mécanismes succédant la formation initiale du radical: 1) don au radical DPPH• d'un deuxième atome d'hydrogène suite à la délocalisation électronique sur le groupe para-substitué ; 2) dimérisation entre deux radicaux phénoxyles suivie d'une régénération de deux groupes hydroxyles capables d'interagir de nouveau avec DPPH•, grâce à un transfert intramoléculaire d'H•. Le dimère

dehydrodieugénol est révélé être le produit de réaction principal entre le radical DPPH• et l'Eug, contribuant à l'activité anti-oxydante de ce dernier (Bortolomeazzi et al., 2010). 3) formation d'un complexe entre un radical DPPH• et un radical aryl (Figure 26).

Figure 26: Voies réactionnelles de l'eugénol avec le radical DPPH•. Les réactions [1], [2] et [3] correspondent respectivement à un don d'un second atome d'hydrogène, à une dimérisation et à une complexation (Brand-Williams et al., 1995).

4.2.3.6.8. Propriété analgésique

L'activité analgésique de l'Eug est due à sa capacité de se lier sur les récepteurs de capsaïcine, autrement nommés les récepteurs vanilloïdes, et spécifiquement sur TRPV1 (transient receptor potential vanilloid 1) et de les bloquer (Ohakubo et al., 1997; Yang et al. 2003). L'Eug interagit avec les neurotransmetteurs impliqués dans la transmission de la douleur, avec un effet agoniste

sur les récepteurs γ-aminobutyrique ($GABA_A$) et un effet antagoniste sur les récepteurs de glutamate NMDA (N-méthyl-D-aspartate) (Aoshima et al., 1999; Wie et al., 1997). Il inhibe aussi les canaux Ca^{2+} (Lee et al., 2005), Na^{+} (Cho et al., 2008) ainsi que la lipoxygénase, une enzyme métabolisant les lipides, qui produit des métabolites induisant la douleur (leucotriène B4, l'acide 12-hydroxyperoxyeicosatetraenoique (12 HPETE), 15-HPETE ou 15 lipoxygénase métabolite) (Trang et al., 2004).

4.2.3.6.9. Effet neuroprotecteur

Il a été démontré que l'Eug est neuroprotecteur via différents mécanismes. Il atténue la neurotoxicité induite par NMDA (Wie et al., 1997) et protège les neurones hippocampiques de l'ischémie globale par son action hypothermique (Won et al., 1998). L'Eug protège également les cellules PC-12 contre les effets toxiques du peptide β-amyloïde, qui forme la plaque sénile dans la maladie d'Alzheimer (Irie et al., 2003). Il inhibe la transmission du potentiel d'action dans les nerfs sciatiques (Kozam, 1977), et attenue les complications vasculaires et neuronales chez les rats diabétiques (Nangle et al., 2006). L'Eug supprime les potentiels de champ épileptiforme et la dépression dans l'hippocampe et le néocortex. L'utilisation de l'Eug dans le traitement de l'épilepsie et la douleur céphalique est ainsi suggérée (Müller et al., 2006).

4.2.3.6.10. Propriété anti-inflammatoire

Plusieurs études ont montré que l'Eug et l'HECG présentent une activité anti-inflammatoire. Ils inhibent la cyclooxygénase 2 (COX-2) (Lee et al., 2007, Kim et al., 2003; Kaur et al., 2010; Magalhães et al., 2010), la production de l'oxyde nitrique (Kaur et al., 2010) et les interleukines IL-1 β (Rodrigues et al., 2009; Bachiega et al., 2012; Lee et al., 2007) IL-6 (Rodrigues et al., 2009; Bachiega et al., 2012; Kaur et al., 2010) et augmentent l'expression des interleukines IL-10 (Bachiega et al., 2012) chez les macrophages. Ils inhibent également plusieurs autres marqueurs inflammatoires tels que la leucotriène C4 (Raghavenra et al., 2006), la prostaglandine E2 (Kaur et al., 2010; Lee et al, 2007; Bennet et al., 1988), le facteur nucléaire kappa B (NF-kB) (Kaur et al., 2010; Bachiega et al., 2012; Magalhães et al., 2010) et le TNF (tumor necrosis factor) (Magalhães et al., 2010; Lee et al., 2007). L'Eug a montré chez le rat une activité anti-inflammatoire en inhibant le développement de l'œdème au niveau de la patte induit par les carraghénanes (Bennet et al., 1988).

4.2.3.6.11. Propriétés anti-diarrhéique et anti-ulcère

L'Eug est utilisé pour le traitement de l'ulcère et la diarrhée. Il inhibe l'activité du muscle lisse *in vitro*, le transit intestinal des rats, l'accumulation du fluide intestinal induit par la prostaglandine E2 et la diarrhée (Bennet, 1988).

De plus, l'Eug inhibe d'une manière dose dépendante l'ulcère gastrique induit par l'éthanol et le facteur d'activation des plaquettes (Platelet Activating Factor, PAF). L'Eug exerce son activité anti-ulcère non seulement suite à sa propriété anti-PAF mais aussi grâce à ses effets antioxydants, puisque l'O_2 est impliqué dans les dommages des tissus induits par le PAF (Capasso et al., 2000). Une autre étude a montré que l'effet gastroprotecteur de l'HECG et de l'Eug est plutôt basé sur leur capacité à stimuler la synthèse du mucus, un facteur important de gastroprotection (Santin et al., 2011).

4.2.3.7. Applications de l'HECG et de l'Eug

4.2.3.7.1. Application cosmétique

L'HECG a été largement utilisé en tant qu'agent odorant pour des applications cosmétiques. L'Eug est un composant de crèmes, savons, détergents, parfums et lotions sur le marché des Etats Unis (Opdyke, 1975) et de déodorants sur les marchés européens (Rastogi et al., 1998).

4.2.3.7.2. Application thérapeutique

L'Eug mélangé avec de l'oxyde de zinc est utilisé par les dentistes soit sous forme d'une pâte ou bien d'un mélange de ciment dentaire, comme un agent sédatif et aussi pour traiter les caries, les saignements des gencives et les gingivites (Markowitz et al., 1992).

4.2.3.7.3. Application agroalimentaire

L'Eug a été approuvé par la Commission européenne en tant qu'agent de saveur (Burt, 2004). Il est largement utilisé dans des produits alimentaires comme les aliments cuits, les bonbons, les boissons et les produits laitiers congelés (Baskaran et al., 2010). Ponce et al., 2011 suggère la possibilité d'utilisation des HEs y compris l'HECG, de romarin et d'arbre à thé comme bioconservateurs dans les aliments vue leur capacité à réduire ou à éliminer les bactéries pathogènes, et donc à étendre la durée de conservation des produits alimentaires (Ponce et al., 2011).

En addition, l'incorporation de l'Eug ou l'HECG dans différents systèmes d'encapsulation détaillés dans le chapitre 5 ont amélioré leurs activités antimicrobienne (Hill et al., 2013; Hamed et al., 2012; Chen et al., 2009; Shah et al., 2012, 2013; Perez-Coneza et al., 2011; Kriegel et al., 2010) et anti-oxydante (Chen et al., 2009; Woranuch et al., 2013 a, b; Jung et al., 2006). Ceci les rend appropriés pour des applications d'emballage actif en inhibant la croissance bactérienne et les espèces oxygénées, empêchant par conséquent la détérioration des aliments. En outre, il a été démontré, à un degré d'humidité relativement élevé, que les molécules d'eau interagissent avec les groupes polaires des complexes d'inclusion CD/Eug, conduisant à un complexe moins stable ce qui provoque par conséquent la libération de l'Eug dans l'environnement. Ce mécanisme pourrait être utile pour produire un emballage antimicrobien actif, et donc protéger les fruits et les légumes fraîchement coupés contre la croissance bactérienne (Ayala-Zavala et al., 2008).

De plus, les films comestibles incorporant les HEs ont été utilisés pour améliorer la sécurité alimentaire et prolonger la durée de vie des aliments en contrôlant la libération des antimicrobiens sur des surfaces alimentaires (Pan et al., 2012; Du et al., 2009). L'HECG a été incorporée dans différentes matrices et a été évaluée contre différents agents pathogènes dans les aliments. En effet, les films comestibles d'hydroxypropylméthylcellulose encapsulant chitosan/HECG présentent une forte activité antimicrobienne contre différentes bactéries pathogènes comme *E. coli, S. aureus et L. monocytogenes* (Nonsee et al., 2011). Les films comestibles des isolats de protéines de lactosérum incorporant l'HECG étaient efficaces contre les bactéries Gram-positif (*Listeria innocua, Staphylococcus aureus*), les bactéries Gram-négatif (*Salmonella enteritidis, Pseudomonas fragi*) (Pan et al., 2012) et les souches microbiennes qui se développent lors du stockage du poulet provoquant son altération (*bactéries aérobies mésophiles, entérobactéries, les bactéries lactiques et Pseudomonas spp*) (Pan et al., 2013). Ceci suggère leurs applications pour la conservation de la viande et de la volaille réfrigérées. Les films comestibles à base de gélatine/chitosan incorporant l'HECG inhibent *Pseudomonas fluorescens, Shewanella putrefaciens, Photobacterium phosphoreum, Listeria innocua, Escherichia coli et Lactobacillus acidophilus* (Gómez-Estaca et al., 2010). Lorsqu'ils sont appliqués sur des poissons réfrigérés, ces mêmes films retardent ou empêchent la croissance des bactéries Gram-négatif, surtout les entérobactéries (Gómez-Estaca et al., 2010). Du et al., 2009 développent des films comestibles à base de purée de pomme contenant l'HECG efficaces contre *E. coli, S.*

enterica et L. monocytogenes. Par conséquent, ces études suggèrent l'application de l'HECG en tant que produit actif dans des matériaux d'emballage pour la conservation de la qualité d'une variété d'aliments.

Chapitre 5 : Systèmes d'encapsulation de l'huile essentielle de clou de girofle et de l'eugénol

5.1. Introduction

Malgré leurs nombreuses propriétés, la faible solubilité aqueuse, la volatilité et la photosensibilité de l'HECG et de l'Eug ont constitué des obstacles à leur application. Pour cette raison, de nombreuses équipes se sont intéressées à développer des systèmes de protection de cette huile pour bénéficier des propriétés de ses composés (Sajomsang et al., 2012; Choi et al., 2009; Wang et al., 2011; Garg et al., 2011). Différents systèmes ont été utilisés pour encapsuler l'Eug, mais peu de systèmes concernent l'encapsulation de l'HECG.

Un livre portant sur les différents systèmes d'encapsulation de l'HECG et de l'Eug et leurs méthodes de préparation a été préparé (Greige-Gerges et Sebaaly, 2015). Les caractéristiques physico-chimiques et biologiques de la forme encapsulée de ces deux principes actifs sont détaillées dans ce livre (Greige-Gerges et Sebaaly, 2015). Nous présentons dans ce chapitre un résumé de la plupart des études incluses dans ce livre.

En outre, l'encapsulation de l'Eug a montré une amélioration de la solubilisation et une protection contre l'oxydation et la dégradation de l'Eug. Un profil de libération de l'Eug contrôlé et une amélioration de ses activités biologiques, notamment antibactérienne, muco-adhésive, acaricide et antifongique ont été également démontré (Greige-gerges et Sebaaly, 2015).

5.2. Complexes d'inclusion

Les CDs natives (α-, β-et γ-CD) et leurs dérivés (HP-β-CD, Dimeb, Rameb, Crysmeb et HE-β-CD) ont été utilisés pour former des complexes d'inclusion avec l'Eug et l'HECG. Ces complexes d'inclusion sont préparés soit par dissolution dans une phase aqueuse (Yang et al., 2005; Bethanis et al., 2013), soit par lyophilisation (Choi et al., 2009; Seo et al., 2010; Nuchuchua et al., 2009; Hill et al., 2013; Wang et al., 2011, Liang et al., 2012; Kfoury et al., 2014) ou bien par fluide supercritique CO_2 (Locci et al., 2004). Les caractéristiques des complexes d'inclusion d'Eug et d'HECG sont détaillées ci-dessus.

5.2.1. Mise en évidence de la formation du complexe d'inclusion

Les spectroscopies infrarouge (FTIR), fluorescence et UV-Vis ont mis en évidence la formation du complexe d'inclusion dans un rapport hôte / invité (CD / Eug) 1/ 1 (Yang et al., 2005; Nuchuchua et al., 2009; Zhan et al., 2008). Les paramètres thermodynamiques déterminées par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) fournissent aussi des preuves de l'inclusion de l'Eug au sein des CDs (Hill et al., 2013; Zhan et al., 2008). Il a été démontré que les CDs forment des complexes d'inclusion avec l'Eug à pH acide et neutre (Zhan et al., 2008).

5.2.2. Détermination de la constante de formation

La spectroscopie de fluorescence a permis de déterminer la constante de formation (K_f) entre l'Eug et la CD. En effet, les dérivés de la β-CD possèdent une capacité de liaison avec l'Eug plus forte que la β-CD native où les valeurs de K_f étaient dans l'ordre suivant : HP-β-CD> Dimeb > HE-β-CD > β-CD (Zhan et al., 2008). Kfoury et al., 2014 ont montré que la β-CD et ses dérivés ont une meilleure capacité de complexation avec l'Eug que l'α-CD, avec la constante de formation la plus élevée obtenue avec le Rameb (Kfoury et al., 2014). Selon Yang et al., 2005, la β-CD possède la K_F la plus élevée en comparant aux autres CDs natives et son dérivé Dimeb en suivant cet ordre : β-CD> ɣ-CD> Dimeb > α-CD (Yang et al., 2005).

5.2.3. Protection de l'Eug

La DSC et l'analyse thermogravimétrique (Thermogravimetric analysis, TGA) ont montré que l'Eug est stabilisé et protégé contre la dégradation thermique à l'intérieur de la cavité de la CD (Nuchuchua et al., 2009; Hill et al., 2013; Wang et al., 2011). Les complexes d'inclusion avec β-CD/Eug ont montré un effet protectif contre l'oxydation de l'Eug par la lumière plus élevé que celui obtenu avec les complexes d'inclusion HP-β-CD/Eug (Choi et al., 2009)

5.2.4. Augmentation de la solubilité aqueuse de l'Eug

La présence des CDs améliore la solubilité de plusieurs HEs, y compris l'Eug (Kfoury et al., 2014 ; Hill et al., 2013 ; Liang et al., 2012), et l'HECG (Hill et al., 2013). Les dérivés de la β-CD, particulièrement le Rameb (Kfoury et al., 2014) et l'HP-β-CD (Liang et al., 2012) sont des agents de solubilisation de l'Eug plus efficaces que la β-CD native (Kfoury et al., 2014 ; Liang et

al., 2012). De plus, la solubilité de l'Eug augmente avec l'augmentation de la concentration de β-CD et de la température (Hill et al., 2013).

5.2.5. Détermination de l'efficacité d'encapsulation de l'Eug

L'efficacité d'encapsulation de l'Eug dans la β-CD est comparée avec celle de l'HECG dans la β-CD et avec celle de l'Eug dans l'HP-β-CD (Tableau 8). Malgré la petite différence obtenue entre l'efficacité d'encapsulation de l'Eug dans la β-CD (90,90 %) et celle dans son dérivé l'HP-β-CD (89,10 %), Choi et al., 2009 indiquent que la β-CD était plus efficace que l'HP-β-CD pour l'encapsulation de l'Eug. Ceci est expliqué par la présence de la chaîne latérale du groupe hydroxypropyle hydrophile empêchant l'inclusion de l'Eug dans la cavité d'HP-β-CD (Choi et al., 2009). Hill et al., 2013 ont montré que l'efficacité d'encapsulation de l'Eug (90,15 %) est plus élevée que celle de l'HECG (77,74 %) dans la β-CD. Ceci indique que les autres constituants de l'HECG entre en concurrence avec l'Eug pour l'inclusion au sein de la β-CD (Hill et al., 2013). Selon Seo et al., 2010, l'efficacité d'encapsulation de l'Eug, le rendement d'encapsulation et le pourcentage de la perte de l'Eug du complexe d'inclusion β-CD / Eug après lyophilisation étaient respectivement égales à 91,74 ; 58,4 et 10,08 %. Les résultats obtenus indiquent une forte interaction entre l'Eug et la β-CD suffisante pour conserver et protéger le complexe durant la lyophilisation (Seo et al., 2010).

Tableau 8 : Caractéristiques des complexes d'inclusion d'Eug et d'HECG. Ce tableau présente uniquement les études où la taille et le pdI ont été déterminés.

CD/ principe actif Rapport molaire	Méthode de préparation	Taille (nm)	pdI	EE (%)	Efficacité	Références
β-CD/ Eug HP-β-CD/Eug 1/1	Lyophilisation	319 ± 5,1 312 ± 5,3	0,27±0,01 0,44±0,01	90,90 89,10	Protection contre l'oxydation	Choi et al., 2009
β-CD/ Eug 1/1	Lyophilisation	343 ± 1,21	0,30±0,00	91,74	Non déterminé	Seo et al., 2010
β-CD/ Eug β-CD/HECG 1/1	Lyophilisation	860 ± 0,01 1398 ± 0,56	0,00 ± 0,00 0,27±0,21	90,15 77,74	Antibactérienne	Hill et al., 2013

5.2.6. Détermination de la taille

Les complexes d'inclusion d'Eug et d'HECG préparés par la lyophilisation présentent des valeurs de taille élevées (Tableau 8). Les auteurs expliquent la grande taille obtenue par la formation des agglomérats (Hill et al., 2013; Choi et al., 2009) comme une conséquence de l'auto-assemblage de la β-CD dans l'eau (Seo et al., 2010).

5.2.7. Profil de libération de l'Eug

Pour tous les complexes d'inclusion (α-CD, β-CD, ɣ-CD et HP-β-CD / Eug), le profil de libération de l'Eug, dans un tampon de Na_2HPO_4, KH_2PO_4 et NaCl à pH 6,8 et 32 °C a montré une libération initiale brusque suivie d'une libération prolongée (Nuchuchua et al., 2009). La quantité de l'Eug libérée à partir du complexe d'inclusion α-CD / Eug (100 %) était supérieure à celle libérée à partir des complexes β-CD/Eug et HP-β-CD/Eug (70 %) à 24 h (Nuchuchua et al., 2009). Selon Wang et al., 2011, le pourcentage de perte de l'Eug à partir de la β-CD ne dépassait pas les 10 % du poids initial lorsque le complexe d'inclusion β-CD/Eug a été placé pendant 4 semaines sous 25 °C et 75 % d'humidité (Wang et al., 2011). De plus, Seo et al., 2010 ont démontré qu'une augmentation de l'humidité et de la température de stockage augmentent la vitesse de libération de l'Eug dans les poudres obtenues par lyophilisation, en raison de la dissociation de la β-CD provoquée par une augmentation de l'absorption d'eau (Seo et al., 2010).

5.2.8. Mécanisme de formation du complexe CD /Eug

Le mécanisme de formation du complexe CD /Eug a été élucidé par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN). La formation du complexe implique des interactions hydrophobes causées par le remplacement des molécules d'eau avec l'Eug dans la cavité de la β-CD, des interactions de Van der Waals et des liaisons hydrogène (Nuchuchua et al., 2009; Zhan et al., 2008). Les atomes d'hydrogène sur les carbones C3 et C5 de l'unité de glucose de la β-CD, situés dans la cavité hydrophobe, sont directement impliqués dans l'interaction hôte-invité (Locci et al., 2004).

Il a été proposé que le cycle aromatique de l'Eug pénètre dans la cavité des CDs de l'entrée large du cône, laissant les groupements hydroxyle (OH) et méthoxy (MeO) à l'extérieur (Locci et al., 2004; Yang et al., 2005; Kfoury et al., 2014). L'Eug est incorporé à l'intérieur de la cavité de CD

avec son groupe allyle soit plié vers le cycle aromatique (Figure 27, mécanisme 1) (Locci et al., 2004) soit projeté à l'extérieur de l'entrée étroite de la cavité des CDs (Figure 27, mécanisme 2) (Yang et al., 2005). Le cycle aromatique de l'Eug est entièrement transloqué dans la cavité hydrophobe de la β-CD (Nuchuchua et al., 2009; Zhan et al., 2008) et de l'HP-β-CD (Nuchuchua et al., 2009). En revanche, il est soit partiellement incorporé dans la cavité hydrophobe de l'α-CD (Nuchuchua et al., 2009) ou bien ne peut pas entrer en raison de la taille relativement faible de la cavité d'α-CD (Yang et al., 2005). De plus, la ɣ-CD est défavorable pour l'interaction avec l'Eug, probablement en raison de sa grande cavité (Nuchuchua et al., 2009). Pour Dimeb, la présence des groupements méthyls autour de l'extrémité des deux côtés de la cavité empêche la formation du complexe d'inclusion Dimeb /Eug (Yang et al., 2005). D'autre part, selon le type de CD utilisé, Nuchuchua et al., 2009 ont montré par modélisation moléculaire que l'Eug pourrait également être adsorbé sur la surface hydrophile des CDs comme suit α-CD> HP-β- CD> β-CD.

En utilisant la diffraction des rayons X et la modélisation moléculaire, Bethanis et al., 2013 ont proposé un autre mode de complexation entre l'Eug et la β-CD dans un rapport molaire Eug: CD 1,5: 1 (Figure 27, mécanisme 3). Deux molécules d'hôtes de β-CD forment par des liaisons hydrogène des dimères. Une molécule d'Eug se retrouve allongée entre les dimères β-CD dans un mode en sandwich tandis que les deux autres molécules d'Eug sont situés symétriquement à l'extérieur du côté étroit des hôtes, avec seulement leur groupement allyle hydrophobe situé à l'intérieur des cavités des CDs (Figure 27, mécanisme 3). Par conséquent, le rapport stoechiométrique de l'invité /hôte (Eug /β-CD) est de 3/2 (Bethanis et al., 2013).

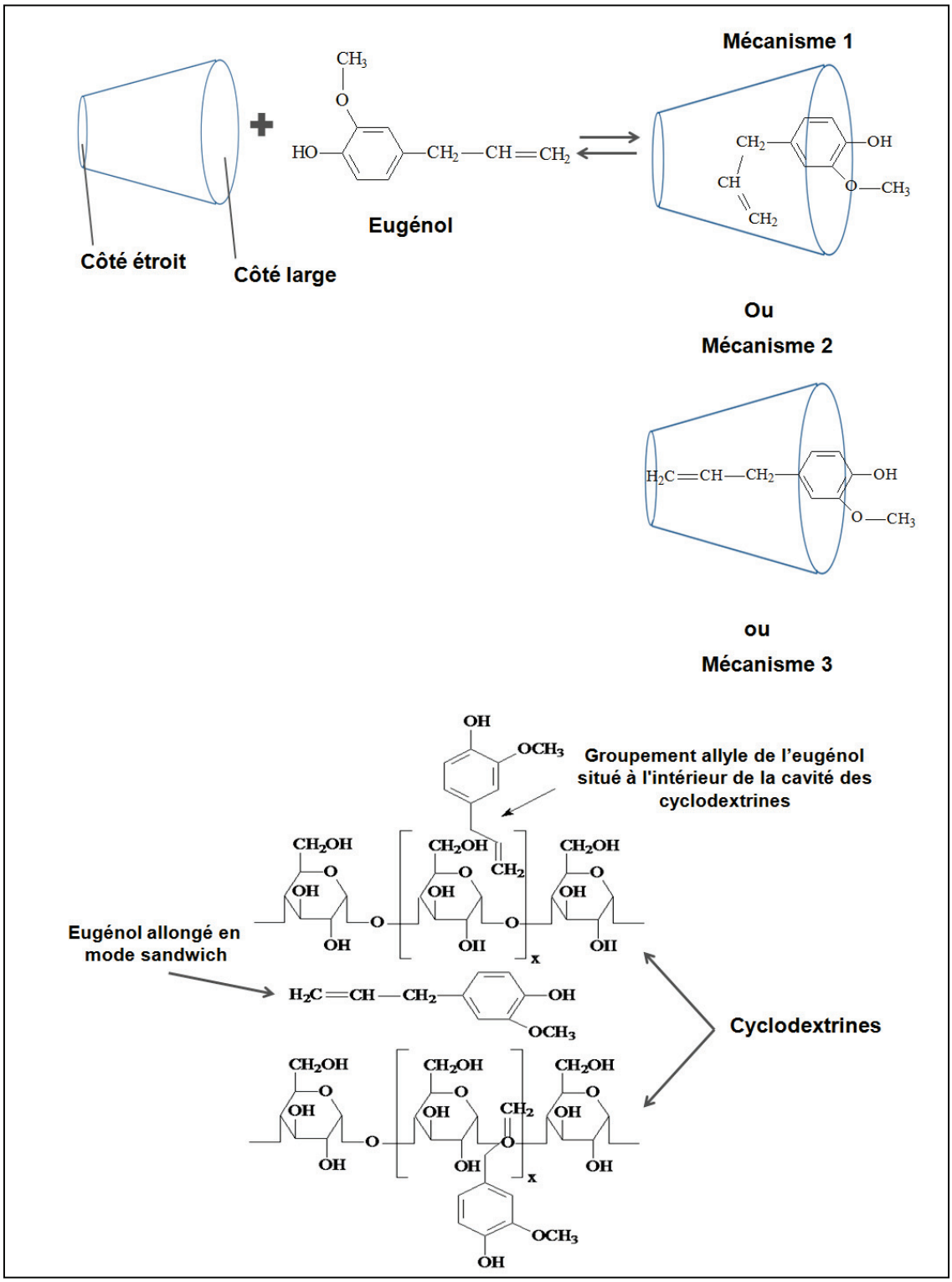


Figure 27: Différents mode de complexation entre l'eugénol et les cyclodextrines (Greige-Gerges et Sebaaly, 2015).

5.3. β-CDs quaternizées greffées avec du chitosan encapsulant l'Eug

Sajomsang et al., 2012 ont préparé des β-CDs quaternizées greffées avec du chitosan (QCD-g-CS) pour encapsuler l'Eug (Figure 28a). Le degré de substitution de la β-CD dans QCD-g-CS est de 5, 11 et 23 % pour QCD5-g-CS, QCD11-g-CS and QCD23-g-CS, respectivement. Des QCD-g-CS sont également préparées en présence de l'acide citrique (QCDCA22-g-CS) (Figure 28b) (Sajomsang et al., 2013).

Figure 28: β-CDs quaternizées greffées avec du chitosan QCD-g-CS (a) (Sajomsang et al., 2012), en présence de l'acide citrique QCDCA22-g-CS (b) (Sajomsang et al., 2013).

Il a été démontré que des agrégats de QCD-g-CS sont formés dans les solutions aqueuses, particulièrement avec QCD5-g-CS, QCD11-g-CS (Sajomsang et al., 2012), aboutissant à des valeurs d'efficacité d'encapsulation d'Eug les plus élevées (Tableau 9). La présence de l'acide citrique a entraîné l'adsorption de l'Eug sur QCDCA22-g-CS et non pas à l'intérieur de la cavité de la β-CD, ce qui résulte d'une faible efficacité d'encapsulation d'Eug (35,8 %) en comparant à QCD23-g-CS (59,3 %) (Tableau 9) (Sajomsang et al., 2013).

Tableau 9: Caractéristiques des β-CDs quaternizées greffées avec du chitosan encapsulant l'Eug.

Système d'encapsulation	Taille (nm)	EE (%)	Efficacité	Références
QCD5-g-CS	1024±56	63,8±1,3	Antibactérienne Muco-adhésive	Sajomsang et al., 2012
QCD11-g-CS	1122±98	77,5±7,4		
QCD23-g-CS	657±45	59,3±2,4		
QCDCA22-g-CS	non déterminé	35,8±2,1	Cyto-toxicité Muco-adhésive	Sajomsang et al., 2013

L'Eug est encapsulé à la fois dans la cavité hydrophobe de la β-CD et du noyau hydrophobe des agrégats de QCD-g-CS. L'Eug peut également s'adsorber sur la surface externe du QCD-g-CS/Eug (Sajomsang et al., 2012). Le profil de libération de l'Eug dans le méthanol et le tampon de Na_2HPO_4, KH_2PO_4 et NaCl à pH 6,8 et 32 °C a montré une libération rapide de l'Eug adsorbé sur QCDCA22-g-CS, suivie par une libération retardée correspondante à la libération de l'Eug du complexe d'inclusion et du noyau hydrophobe de QCD23-g-CS (Sajomsang et al., 2013).

Les β-CDs quaternizées greffées avec du chitosan encapsulant l'Eug présentent des activités antimicrobienne contre les souches de *Streptococcus oralis* et *Streptococcus mutans* et antifongique contre *Candida albicans* supérieures à celles des QCD-g-CS (Sajomsang et al., 2012). La présence donc à la fois de l'Eug et du QCD-g-CS a aboutit à un effet synergique. En addition, la présence de l'acide citrique améliore l'activité muco-adhésive. En effet, les QCDCA22-g-CS présentent une activité muco-adhésive supérieure à celle des QCD23-g-CS en raison des interactions électrostatiques entre les charges positives de la CDQ-g-CS et les charges négatives de la mucine et des liaisons hydrogène, tandis que, l'activité muco-adhésive de QCD23-g-CS est produite uniquement par des interactions électrostatiques (Sajomsang et al., 2013). L'activité muco-adhésive dépend également de la viscosité des QCDg-CS (Sajomsang et al., 2012). Les QCD11-g-CS exercent une activité muco-adhésive plus prononcée que celle des QCD5-g-CS et QCD23-g-CS, qui est due à la fois aux interactions électrostatiques et à leur haute viscosité (Sajosmang et al., 2012). Par conséquent, l'activité muco-adhésive est classée selon l'ordre suivant: QCD11-g-CS> QCD5-g-CS> QCD23-g-CS (Sajosmang et al., 2012).

5.4. Nanofibres à base d'alcool polyvinylique encapsulant des complexes d'inclusion d'Eug

Des systèmes supramoléculaires des nanofibres à base d'alcool polyvinylique (PVA) encapsulant des complexes d'inclusion d'Eug (PVA-CD/Eug) sont préparés par électrofilature « electrospinning » (Kayaci et al., 2013). Les PVA-CD/Eug ont montré des tailles supérieures à celles des PVA nanofibres témoins ou encapsulant l'Eug (PVA-Eug), probablement due aux interactions entre la chaîne du polymère PVA et l'Eug et les CDs. En effet, le diamètre des fibres était de 360 ± 50, 440 ± 90, 520 ± 120, 610 ± 110, 540 ± 150 nm pour respectivement les PVA nanofibres témoins, PVA-Eug, PVA-α-CD/Eug, PVA-β-CD/Eug et PVA-γ-CD/Eug (Kayaci et al., 2013). En comparant à l'Eug libre, les PVA-β-CD/Eug et les PVA-γ-CD/Eug ont montré une vitesse de libération contrôlée, plus lente et une stabilité thermique plus élevée à des hautes températures (Kayaci et al., 2013).

5.5. Micelles

La préparation et la caractérisation des micelles encapsulant l'Eug sont décrites en détail dans notre ouvrage (Greige-Gerges et Sebaaly, 2015).

Différents types d'agents tensioactifs (Tween 20, Tween 80, Surfynol 465, Surfynol 485W, dodécyl sulfate de sodium (SDS), hexadécyle poly (oxyéthylène) éthers, SDS combiné à l'hexadécyle poly (oxyéthylène) éther, pentaéthylène glycol mono n-décyl éther) ont été utilisés pour encapsuler l'Eug et l'HECG dans des micelles. La taille des micelles dépend du type d'agent tensioactif utilisé et augmente avec une concentration croissante en Eug (Edris et al., 2012 ; Suriyarak et al., 2014) (Tableau 10). Ceci peut être dû à: 1) l'intégration de l'Eug à l'intérieur du cœur hydrophobe et / ou à l'interface des micelles; 2) un changement de la forme des micelles en vésicules sphériques, cylindriques, allongées en forme de tige ou des structures lamellaires planes (Gayinsky et al., 2008); 3) la capacité de l'Eug à réduire la tension de surface entre les deux phases. A des concentrations élevées, les gouttelettes croissent en taille en raison de coalescence rapide après homogénéisation (Suriyarak et al., 2014).

5.5.1. Localisation de l'Eug dans les micelles

Par ^{1}H-RMN, il a été signalé que l'Eug réside à l'interface hydrophobe / hydrophile (eau-micelle) (Suratkar et al., 2000). Le groupement hydroxyle de l'Eug interagit avec les têtes polaires des agents tensioactifs et de la phase aqueuse, ce qui suggère l'insertion de l'Eug entre les

monomères tensioactifs, formant ainsi une monocouche mixte tensioactif/Eug à l'interface (Gayinsky et al., 2008; Tchakalova et al., 2008 a).

Tableau 10 : Caractéristiques des micelles encapsulant l'HECG ou l'Eug et des nanofibres. Ce tableau présente uniquement les études où la taille et le pdI ont été déterminés.

Composition Eau/HE/Tensioactif	**Méthode de préparation**	**[HE] (wt%)**	**Taille (nm)**	**pdI**	**Efficacité**	**Références**
Eau/HECG/Tween 20	Solubilisation	1,1	7,9±0,05	0,12	Antioxydante Antibactérienne	Hamed et al., 2012
Eau/HECG/Tween 20 Eau/HECG/Tween 80	Solubilisation	1 1	7,9±0,08 16,3±0,1	0,16 0,21	ND	Edris et al., 2012
Eau/Eug/Surfynol 465	Solubilisation	0,1	5,59±0,04	0,051	Antibactérienne	Gayinsky et al., 2008
		0.85	16,45±0,35	0,099		
Eau/Eug/Surfynol 485W		0,1	4,9±0,15	0,177		
		0,95	8,28±0,02			
Eau/Eug/SDS	Solubilisation	0,78	40	ND	Protection contre les irradiations	Watabe et al., 2013
Eau/Eug/Tween 20 et n-alcane	Solubilisation-microfluidisation	1-50	61-140	ND	Antibactérienne	Suriyarak et al., 2014
Nanofibres à base d'alcool polyvinylique encapsulant des Surfynol 465 micelles d'Eug	Solubilisation-électrofilature	0,75 1,5	51±21 126±56	ND	Antibactérienne	Kriegel et al., 2009 ; 2010

ND : non déterminé.

5.5.2. Stabilité des micelles encapsulant l'Eug

Des études ont révélé que les micelles encapsulant l'Eug ou l'HECG sont thermodynamiquement stables (Edris et al., 2012; Gayinsky et al., 2008). Suriyarak et al (2014) ont montré que la

stabilité des micelles encapsulant l'Eug dépend de la concentration en Eug. Dû au phénomène de coalescence, les micelles sont instables à des concentrations en Eug élevées (30-100 %). D'autre part, les micelles composées de n-dodécane, du sel protoporphyrine disodium IX et du SDS encapsulant l'Eug étaient instables lorsqu'elles ont été exposées aux irradiations. Après 60 min d'irradiation, la taille des micelles augmente de 40 à 80 nm et la concentration en Eug diminue en raison de la décomposition de l'Eug par $^1O_2$. En effet, suite à l'exposition à la lumière, le sel de protoporphyrine disodium IX (hydrophile) libère de l'$^1O_2$ dans la phase aqueuse. L'Eug localisé avec les SDS à l'interface entre les gouttelettes d'huile et la phase aqueuse externe sera oxydé par l'$^1O_2$, déstabilisant ainsi les micelles (Watabe et al., 2013).

5.5.3. Nanofibres à base d'alcool polyvinylique encapsulant des micelles d'Eug

Kriegel et al., 2009 ont préparé des nanofibres à base d'alcool polyvinylique encapsulant des micelles d'Eug formées à partir du tensioactif Surfynol 465, dont la taille augmente avec des concentrations croissantes en Eug. Les auteurs ont suggéré qu'une certaine quantité d'Eug a été incorporée à l'intérieur des nanofibres. Une fois saturées, les molécules d'Eug restantes se localisent à l'extérieur des fibres (Kriegel et al., 2010). L'étude de libération *in vitro* dans un tampon tris HCl à pH 7 et 25 °C a montré une libération rapide suivie d'une libération retardée. Ceci confirme la localisation de l'Eug à l'intérieur et à la surface de ces nanofibres (Kriegel et al., 2010).

Les nanofibres encapsulant les micelles d'Eug exercent une activité antibactérienne plus forte que les micelles d'Eug. Celle-ci peut être attribuée à la libération contrôlée de l'Eug des nanofibres (Kriegel et al., 2010). D'autre part, ces nanofibres inhibent efficacement *L. monocytogenes* et *S. thyphimirium* avec une inhibition plus prononcée contre les bactéries Gram- , suite aux interactions qui peuvent avoir lieu entre les micelles formées de Surfynol 465 et les lipopolysaccharides des bactéries Gram - (Kriegel et al., 2010).

5.6. Liposomes

Les liposomes formés d'EPC (Reiner et al, 2013), lécithine de jaune d'œuf (Pandey et al., 2006) ou DPPC (Manabe et al., 1987; Fujisawa et al., 1988) encapsulant l'Eug ont été préparés par la méthode d'hydratation du film lipidique suivie par une sonication (Fujisawa et al., 1988; Reiner et al., 2013) ou une extrusion à travers des membranes de polycarbonate (Pandey et al., 2006).

Ces liposomes ont servi pour étudier l'effet de l'Eug sur la membrane lipidique. En utilisant la DSC, il a été prouvé que l'Eug interagit par son groupe allyle ($-CH_2-CH=CH_2$) avec la partie lipophile de la bicouche (chaînes hydrocarbonées de la DPPC) (Fujisawa et al., 1988), entraînant une diminution de la température de transition de la DPPC (Manabe et al., 1987; Fujisawa et al., 1987) et des quantités d'énergie absorbées au cours de la transition (ΔH_m) (Fujisawa et al., 1987). Les auteurs ont suggéré une augmentation de la fluidité de la membrane induite par l'Eug (Fujisawa et al, 1988). De plus, Reiner et al., 2013 ont démontré, par ^1H RMN, la localisation de cinq composés phénoliques, y compris l'Eug dans la région entre les groupes polaires de la phosphatidylcholine de jaune d'œuf (molécule de choline), le squelette de glycérol et les premiers atomes des chaînes hydrocarbonées.

Pandey et al., 2006 ont démontré que l'Eug empêche les dommages oxydatifs de la membrane liposomiale ou microsomiale induits par des rayons gamma et inhibe la formation de malondialdéhyde et l'augmentation des phospholipases C (Pandey et al., 2006).

Les caractéristiques des liposomes encapsulant l'HECG et l'Eug en terme de taille, pdI, potentiel zêta, efficacité d'encapsulation des constituants de l'HECG n'ont pas été encore déterminées. Le Tableau 11 résume toutes les études concernant l'encapsulation de l'Eug dans les liposomes.

Tableau 11 : Caractéristiques des liposomes encapsulant l'HECG et l'Eug.

Composition liposomiale	**Méthode de préparation**	**Efficacité**	**Références**
Lécithine de jaune d'œuf/Eug	Hydratation du film lipidique + extrusion	Stabilité contre l'oxydation et l'irradiation par des rayons gamma	Pandey et al., 2006
DPPC/Eug	Hydratation du film lipidique	Interaction avec la membrane	Manabe et al., 1987
EPC/Eug	Hydratation du film lipidique + sonication	Interaction avec la membrane	Reiner et al., 2013
DPPC/Eug	Hydratation du film lipidique + extrusion	Interaction avec la membrane	Fujisawa et al., 1988

5.7. Nanoparticules

Les méthodes de préparation et les caractéristiques des différents types de nanoparticules sont décrites en détail dans notre livre (Greige-Gerges et Sebaaly, 2015). Un résumé de ces études est abordé ci-dessous.

5.7.1. Nanoparticules à base d'acide poly (DL-lactique-co-glycolique)

Des nanoparticules à base d'acide poly (DL-lactique-co-glycolique) (PLGA NPs) encapsulant l'Eug ont été développées par Gomes et al., 2011 en utilisant la méthode d'émulsion-évaporation (Gomes et al., 2011). L'encapsulation de l'Eug n'a pas affecté la taille (179 nm) et le pdI (0,33) des nanoparticules. Une efficacité d'encapsulation de l'Eug élevée est obtenue (98,27 %). Les auteurs ont prouvé que la vitesse de libération de l'Eug dans un tampon phosphate à pH 7,4 et à 37 °C était rapide dans les 5 premières heures (45 %), suivie par une libération lente et continue de l'Eug à partir de la matrice de PLGA. La libération rapide s'est expliquée par le fait qu'une grande quantité d'Eug est soit attachée ou bien à proximité de la surface des nanoparticules. Après 72 h d'incubation, l'Eug n'a pas été complètement libéré dans le milieu où le pourcentage de libération d'Eug ne dépassait pas 64 % de la concentration initiale d'Eug. De plus, PLGA NPs encapsulant l'Eug inhibent des bactéries Gram + (*Listeria spp*) et Gram – (*Salmonella spp*) (Gomes et al., 2011).

5.7.2. Nanostructured lipid carrier

Des systèmes d'encapsulation lipidiques nanostructurés (NLC, nanostructured lipid carrier) formés de deux types de lipides solide et liquide ont été préparés par homogénéisation dans une solution chaude contenant du tensioactif pour encapsuler l'Eug (Pokharkar et al., 2011) et l'HECG (Cortés-Rojas et al., 2014).

Des NLC encapsulant l'Eug sont incorporés dans une formulation de gel pour la livraison parodontale (Pokharkar et al., 2011). La formulation de gel optimisée contenant 16 % de Pluronic F127 présente une température de gélification T_{gel} optimale de 36 °C. En comparant aux NLC encapsulant l'Eug, le gel à base de NLC présente une taille des particules similaire (225 nm) mais une efficacité d'encapsulation de l'Eug plus élevée (99,54 %) (Tableau 12). Avec un sac de dialyse, la vitesse de libération de l'Eug à partir du gel à base de NLC effectuée dans un tampon phosphate de pH 6,8 à 37 ºC révèle 25 % d'Eug libéré dans la première heure correspondante à la libération d'Eug physiquement lié à la surface des nanoparticules. Ceci est efficace pour une action rapide pour la livraison parodontale. Ensuite, une libération prolongée de l'Eug à partir de la matrice lipidique pour une durée supérieure à 8 heures a été obtenue. De plus, NLC et sa formulation en gel sont prouvés stables à 40 °C et à une humidité relative de 75

% pendant 6 mois vu qu'aucun changement significatif n'a été observé au niveau de la taille des particules, du contenu en Eug et de profil de libération (Pokharkar et al., 2011).

Cortés-Rojas et al., 2014 ont préparé des NLC encapsulant l'HECG sous forme de poudres pour augmenter leur durée de stockage. Ils ont étudié l'effet de la méthode de séchage (pulvérisation ou lyophilisation) et les agents cryoprotecteurs (lactose, maltodextrine ou maltodextrine combinée à la gomme arabique) sur les propriétés physico-chimiques des particules. Ils ont montré que la formulation composée de Compritol (lipide solide), l'huile Buriti (lipide liquide), poloxamère 188 (tensioactif) et maltodextrine DE10 (cryoprotecteur) présente la meilleure rétention de l'Eug et de l'acétate d'Eug (60 %) et le rendement de la préparation le plus élevé (55 %). De plus, les concentrations des constituants de l'HECG étaient plus élevées dans les échantillons lyophilisés que celles dans les échantillons séchés par pulvérisation. Les poudres de NLC contenant l'Eug présentent une bonne activité anti-oxydante (Cortés-Rojas et al., 2014).

5.7.3. Nanoparticules lipides solides

Des nanoparticules lipides solides (SLN, solid lipid nanoparticles) sont préparées par la même méthode de préparation des NLC mais sont formées d'un seul type de lipide solide. Une comparaison entre SLN et NLC a été effectuée par Garg et al., 2011 afin d'étudier l'effet de l'ajout du lipide liquide aux SLN contenant l'Eug.

A la même concentration de lipide solide 2 %, les NLC contenant l'Eug composées de lipide binaire ont présenté une taille (87,8 nm) plus petite que les SLN formées d'un seul lipide encapsulant l'Eug (322 nm). Ceci a été expliqué par la formation d'une matrice lipidique désordonnée lors de l'addition d'un lipide liquide au lipide solide, nécessitant moins d'énergie pour se décomposer en petites particules, ou par une réduction de la viscosité de la solution lipidique (Garg et al., 2011).

Les NLC ont une efficacité d'encapsulation d'Eug (98,52 %) supérieure à celle obtenue dans les SLN (91,8 %), attribuée à l'amélioration de la solubilité de l'Eug en présence du lipide liquide.

En addition, les deux types de nanoparticules encapsulant l'Eug (SLN et NLC) ont montré une bonne stabilité après 3 mois de stockage à 30 °C, et ceci en conservant la taille et le potentiel Zêta. Au contraire des SLN, les NLC étaient capables de maintenir l'efficacité d'encapsulation de l'Eug pendant leur stockage, empêchant ainsi la perte de l'Eug (Garg et al., 2011).

Dans un tampon de phosphate à pH 6,8 à 37 °C avec 40 % de propylène glycol, la vitesse de libération de l'Eug à partir des NLC était plus rapide dans les 12 h (78 % d'Eug libéré) que celle obtenue à partir des SLN (65 % d'Eug libéré). Ceci est dû à la fois à la présence du lipide liquide et à la taille des particules la plus petite. Ce profil de libération est comparé à celui obtenu d'une solution contenant les complexes d'inclusion HP-β-CD/Eug où plus de 80 % d'Eug ont été libérés pendant 30 min (Garg et al., 2011).

Les SLN et NLC encapsulant l'Eug ont montré une activité antifongique plus élevée que l'Eug libre *in vivo* dans un modèle de candidose orale chez des rats immunodéprimés (Garg et al., 2011).

5.7.4. Nanoparticules magnétiques

Saviuc et al., 2012 ont préparé des nanoparticules magnétiques encapsulant l'HECG dont la taille était de 10-11 nm et le contenu en Eug de 92,42 %. Ces nanoparticules à une concentration de 50 mg/mL exercent une activité antibactérienne contre différentes souches de *S. Aureus* (Saviuc et al., 2012).

5.7.5. Nanoparticules à base de chitosan

5.7.5.1. Nanoparticules à base de chitosan encapsulant l'Eug

Des nanoparticules à base de chitosan encapsulant l'Eug sont préparées par le procédé de gélification ionique (Woranuch et al., 2013 a, b). Il a été démontré que l'encapsulation de l'Eug dans des nanoparticules à base de chitosan a amélioré la stabilité thermique et l'activité anti-oxydante de l'Eug comparées à celles de l'Eug libre (Woranuch et al., 2013 a, b).

5.7.5.2 L'Eug greffé sur des nanoparticules à base de chitosan

L'Eug est converti en Eug aldéhyde, puis greffé sur des nanoparticules à base de chitosan par la réaction de base de Schiff (Figure 29) (Chen et al., 2009). Le rendement de greffage et la taille des nanoparticules étaient respectivement de 26,7 % et 235 nm (Chen et al., 2009).

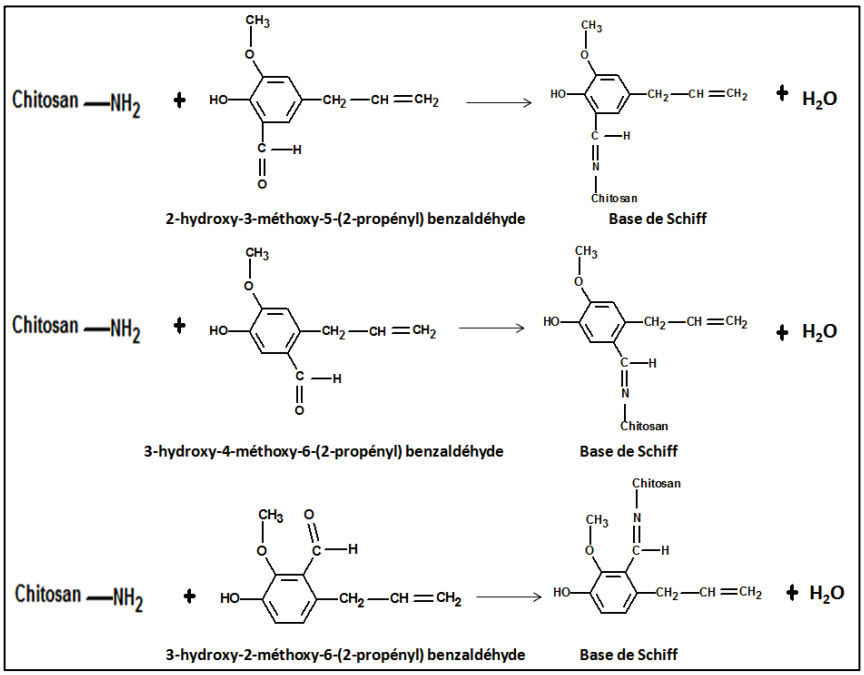


Figure 29: La réaction à base de Schiff pour le greffage de l'Eug sur des nanoparticules à base de chitosan (Chen et al., 2009).

Les auteurs ont mentionné que ce système d'encapsulation devrait être stable vu que la double liaison carbone-azote est stabilisée par une conjugaison au cycle aromatique de l'Eug. L'Eug greffé sur des nanoparticules à base de chitosan ont présenté une activité antibactérienne contre *E. Coli* et *S. Aureus* plus élevée que celle des nanoparticules non modifiées (Chen et al., 2009). L'Eug greffé sur des nanoparticules à base de chitosan ont montré une activité anti-oxydante dépendante de la concentration de l'Eug. Ces nanoparticules ont montré une activité cytotoxique sur les cellules de mammifères plus faible que celle obtenue avec l'Eug libre (Chen et al., 2009)

5.7.5.3. Hydrogels préparés à partir de l'Eug greffé sur des nanoparticules à base de chitosan

Le groupement vinyle de l'Eug est greffé d'une manière covalente sur les groupements amines du chitosan en utilisant le nitrate d'ammonium cérique comme initiateur (Figure 30). Des hydrogels sont ensuite préparés à partir des nanoparticules à base de chitosan sur lesquelles l'Eug est greffé (Jung et al., 2006).

Figure 30 : Réaction de greffage entre l'Eug et le chitosan (Jung et al., 2006).

Ces hydrogels ne sont pas affectés par le pH, puisque le groupement amine du chitosan, sensible au pH, a été greffé avec l'Eug. TGA et DRX ont révélé que l'introduction de la chaîne latérale volumineuse de l'Eug à l'intérieur du chitosan peut affecter la structure cristalline du chitosan et la rétention de l'eau, ce qui peut entraîner une diminution de la stabilité thermique. Cependant, comparée au chitosan, l'activité anti-oxydante de l'Eug est améliorée dans les hydrogels. L'activité anti-oxydante augmente avec l'augmentation du rendement de greffage de l'Eug (Jung et al., 2006).

5.8. Nanocapsules

5.8.1. Nanocapsules à base de polycaprolactone

Des nanocapsules à base de polycaprolactone encapsulant l'Eug (PCL NCs) sont développées par le procédé d'émulsion-diffusion (Choi et al., 2009; Lee et al., 2013), avec une efficacité d'encapsulation élevée de 100 % (Choi et al., 2009). Les PCL NCs sont prouvées capables de protéger l'Eug contre l'oxydation par la lumière (Choi et al., 2009).

D'autre part, Lee et al., 2013 ont démontré que la β-CD ajoutée comme cryoprotecteur est capable d'améliorer la stabilité physique des PCL NCs encapsulant l'Eug durant la lyophilisation. Il a été démontré que la lyophilisation des nanocapsules en absence de la β-CD a entraîné une augmentation de la taille des particules. En revanche, l'ajout de la β-CD a protégé les PCL NCs encapsulant l'Eug en empêchant leur agrégation durant la lyophilisation. Ceci est

dû à une membrane épaisse attribuée au complexe β-CD /Pluronic F68 protégeant ainsi la membrane de PCL et conservant le contenu de l'Eug à l'intérieur durant la lyophilisation (Lee et al., 2013).

5.8.2. Nanocapsules à base d'isolat de protéines de lactosérum et de maltodextrines

Des nanocapsules stables d'isolat des protéines de lactosérum et de maltodextrines contenant l'Eug ont été préparées par émulsion suivie d'une pulvérisation à une concentration d'Eug au-dessus de sa limite de solubilité à pH 3 et 7 (Shah et al., 2012). Un faible rapport d'isolat des protéines de lactosérum et de maltodextrines (1: 2) a entraîné un rendement de préparation et une efficacité d'encapsulation élevés (Tableau 12) (Shah et al., 2012) et une petite taille des particules (Tableau 12). Cependant, la longueur de la chaîne des maltodextrines n'a pas affecté l'efficacité d'encapsulation (Shah et al., 2012). A ce même rapport d'isolat des protéines de lactosérum et de maltodextrines (1: 2), l'activité antibactérienne de l'Eug contre *E. coli* et *L. monocytogenes* était similaire à l'Eug libre dans le bouillon de soja tryptique mais plus meilleure dans le lait (Shah et al., 2013).

Tableau 12 : Caractéristiques des nanoparticules et nanocapsules encapsulant l'Eug ou l'HECG.

Vecteur/HE	**Polymère**	**Tensioactif**	**Méthode de préparation**	**Taille (nm)**	**pdI**	**EE (%)**	**Efficacité**	**Références**
NPs/Eug	PLGA	PVA	Emulsion-Evaporation	179±36,5	0.33	98,27	Antibactérienne	Gomes et al., 2011
SLN/Eug	Acide stérique	Poloxamer 188	Homogénisation à chaud-sonication	322±14,2	0,32	91,8	Antifongique	Garg et al., 2011
NLC/Eug	Acide stérique + triglycéride caprylique			87,8± 3,8	0,27	98,52		
NLC/Eug	Acide stérique + acide oléique	Cremophore RH40, Pluronic F68, Tween 20	Homogénisation à chaud	200-228	0,60-0,62	71,5-97,4	Application parondontale	Pokharkar et al., 2011
Gel à base de NLC/Eug		Pluronique F127	-	225	ND	99,54		
NLC/HECG	Acide stérique + Huile Buriti	Polysorbate 80 ou Poloxamer 188	Homogénisation à chaud-sonication	12920	2,27	30	Anti-oxydante	Cortés-Rojas et al., 2014
	Compritol + Huile Buriti			10620-22490	1,92-3,79	20-60		
NPs magnétiques/HECG	-	-	Incubation dans un champs magnétique	10-11	ND	92,42	Antibactérienne	Saviuc et al., 2012
CH NPs/Eug	Chitosan	Tween 60	Emulsion-Gélation ionique	723-760 (0,5% TPP) 770-974 (1% TPP)	ND	1,1-20,2	Anti-oxydante/ Traitement thermique	Woranuch et al., 2013 a and b

Vecteur/HE	Polymère	Tensioactif	Méthode de préparation	Taille (nm)	pdI	EE (%)	Efficacité	Références
CH NPs/Eug	Chitosan	-	Gélation ionique-Réaction de base de Schiff	235±12	0,318	26,7 (rendement de greffage)	Antibactérienne Anti-oxydante Cyto-toxicité	Chen et al., 2009
Hydrogel/Eug	Chitosan	-	Polymérisation par le nitrate d'ammonium cérique	ND	ND	10,1-21,7 (rendement de greffage	Anti-oxydante	Jung et al., 2006
NCs/Eug	Polycaprolactone	Pluronique F68	Emulsion-diffusion	321±1,5	0,2	100	Protection contre les irradiations	Choi *et al.,* 2009
NCs/Eug	Polycaprolactone	Pluronique F68	Emulsion-diffusion	306-356	ND	ND	ND	Lee *et al.,* 2013
NCs/Eug	Isolat de protéine de lactosérum – maltodextrines (IDL : MD)	-	Emulsion-spray drying	127 (MD40, IDL: MD 1 :2)	ND	35,7 (7,3% après spray drying)	Antibactérienne	Shah et al., 2012 ; 2013
				314 (MD40, IDL:MD 1 :1)		26,8 (7,8% après spray drying)		
				255(MD40, IDL:MD 2:1)		17,8 (7,2 % après spray drying)		

5.9. Micro-encapsulation

5.9.1. Microcapsules à base de maltodextrines et de gomme arabique

L'HECG a été encapsulée dans des microcapsules à base de maltodextrines et de gomme arabique par émulsion-séchage par atomisation (émulsion-spray drying) avec un rendement de 62 % (Chatterjee et al., 2013). La teneur en Eug encapsulée dans les microcapsules sous forme de poudre était de 78,8 mg/g de poudre sèche. Les images obtenues par la microscopie à balayage électronique (MEB) pour des microcapsules encapsulant l'HECG ont montré une taille allant de 1 à 15 µm avec une taille moyenne de l'ordre de 5 µm (Chatterjee et al., 2013). Les microcapsules encapsulant l'HECG ont fournit une libération prolongée de l'HECG et une activité anti-oxydante similaire à la forme libre (Chatterjee et al., 2013).

5.9.2. Microcapsules à base de gélatine et de gélatine- alginate de sodium

Des microcapsules à base de gélatine (Kim et al., 2011) ou gélatine- alginate de sodium (Shinde et al., 2011) ont été préparées par coacervation pour encapsuler respectivement l'HECG et l'Eug. Les microcapsules à base de gélatine encapsulant l'HECG dans leur noyau ont présenté une taille allant de 4 à 85 µm avec une taille moyenne d'environ 33 µm (Kim et al., 2011). La viscosité de l'huile et la vitesse d'agitation sont des facteurs qui peuvent affecter la taille des microcapsules, où une augmentation de la viscosité et de la vitesse d'agitation entraîne des tailles de particules plus petites (Kim et al., 2011). Plus la concentration de l'HECG augmente, plus la taille des microcapsules et l'efficacité d'encapsulation augmentent (Tableau 13) (Shinde et al., 2011; Kim et al., 2011). Les auteurs ont montré par analyse thermogravimétrique (TGA) une perte de poids plus faible pour les microcapsules encapsulant l'HECG en comparant à celle obtenue par la forme libre, indiquant une bonne stabilité de ces microcapsules. Les microcapsules à base de gélatine encapsulant l'HECG ont montré une activité acaricide élevée aboutissant à une mortalité des acariens supérieure à 94 % (Kim et al., 2011).

En addition, l'ajout de l'alcool isopropylique, un agent déshydratant, a empêché la coalescence des microcapsules à base de gélatine- alginate de sodium, diminuant ainsi la taille des particules. Cependant, cet agent peut entraîner une perte de l'Eug et une diminution de son efficacité d'encapsulation (Shinde et al., 2011). Les caractéristiques des microcapsules encapsulant l'Eug en présence et en absence de l'alcool isopropylique sont présentées dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Caractéristiques des microcapsules encapsulant l'Eug et l'HECG.

Composition (m/m)	**Méthode de préparation**	**Taille (nm)**	**EE (%)**	**Efficacité**	**Références**
Maltodextrine/Gomme arabique/HECG 4,8/2,4/1	Emulsion-spray drying	5	65	Anti-oxydante	Chatterjee et al., 2013
Gélatine/HECG 1/5 Gélatine/HECG 1/2	Coacervation	35,5 29,5	65 46	Anti-acariens	Kim et al., 2011
Gélatine-alginate de sodium/Eug 1/2 (-)Alcool isopropylique	Coacervation	715	34,7	ND	Shinde et al., 2011
Gélatine-alginate de sodium/Eug 1/1 (-)Alcool isopropylique		658	21,6		
Gélatine-alginate de sodium/Eug 1/2 (+)Alcool isopropylique		453	18,24		
Gélatine-alginate de sodium/Eug 1/1 (+)Alcool isopropylique		425	8,14		
Ethyle cellulose/Eug/carvacrol/thymol 0,1/1/1/1	Rotary fluidized-bed technology	180-500 250-800	10 and 20	Etude de libération	Meunier et al., 2006

ND : non déterminé ; (-) absence ; (+) présence ; EE : efficacité d'encapsulation.

5.9.3. Granules avec un noyau à base de cellulose microcristalline renfermant un mélange de l'Eug, carvacrol et de thymol

Meunier et al., 2006 ont préparé des granules avec un noyau à base de cellulose microcristalline renfermant un mélange d'Eug, carvacrol et de thymol et revêtues par l'éthyle cellulose. La taille des particules est contrôlée par la quantité de l'eau pulvérisée durant la granulation. En effet, un diamètre moyen de 250 et 500 μm est obtenu respectivement avec 1400 et 1600 ml d'eau. Les granules incorporant 10 % d'extrait étaient sphériques, homogènes sans formation d'agrégats et avec un rendement des composés de 90 %.

Le processus de libération des composés dépend de la taille des particules, de la quantité des polymères ajoutée pour le revêtement et des molécules encapsulées. Une libération lente est obtenue avec une grande taille des particules et un taux de revêtement élevé. Le profil de libération de l'Eug était plus rapide que celui de carvacrol et thymol. En effet, le groupement OH de l'Eug interagit préférentiellement avec le doublet électronique de l'oxygène de la fonction éther, de sorte que moins de liaisons hydrogène avec la matrice de cellulose peuvent être mises

en jeu, d'où moins d'Eug pourrait être maintenu dans les granules. En revanche, le thymol et le carvacrol peuvent facilement interagir avec leur groupement OH avec la matrice de cellulose (Meunier et al., 2006).

PARTIE 2 : PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre 6: Objectifs et stratégie expérimentale

6.1. Objectifs

L'HECG et son constituant majeur l'Eug sont des molécules d'origine naturelle à activités biologiques remarquables, notamment antimicrobienne, anti-oxydante, anti-inflammatoire, anticancéreuse,… Par conséquent, ces molécules peuvent constituer des alternatifs aux composés synthétiques sans présenter les mêmes effets secondaires. Toutefois, en raison de leur faible solubilité dans l'eau, leur volatilité et leur sensibilité à la lumière limitant leur application, des systèmes d'encapsulation de cette huile ont été développés pour bénéficier de ses propriétés et améliorer sa stabilité. L'encapsulation des huiles essentielles dans des systèmes membranaires est un domaine de recherche promettant, à applications cosmétiques, agro-alimentaires et pharmaceutiques.

Nous avons cherché dans ce projet de thèse à trouver les conditions optimales de préparation d'une formulation liposomiale adéquate, pour encapsuler l'HECG et l'Eug, ayant les caractéristiques suivantes : une taille de l'ordre d'une centaine de nanomètre, une distribution de taille homogène, une efficacité d'encapsulation élevée, un rendement d'encapsulation important, une bonne stabilité et transposable à grande échelle. Nous avons utilisé différents types de phospholipides pour trouver le meilleur phospholipide répondant aux caractéristiques visées. Nous avons également préparé un système mixte d'encapsulation basé sur des liposomes encapsulant des complexes d'inclusion des principes actifs, dans le but d'améliorer les caractéristiques des liposomes obtenus par la méthode conventionnelle. Des préparations de volumes plus importants sont réalisées par les procédés du contacteur à membrane et du pilote. Nous sommes également intéressées à produire des lyophilisats des formulations liposomiales pour une conservation à long terme.

6.2. Stratégie expérimentale

Les formulations liposomiales sont préparées et caractérisées par différentes techniques. Les schémas récapitulatifs de la stratégie expérimentale suivie dans notre étude sont présentés à la fin de ce chapitre.

6.2.1. Choix du vecteur

Les liposomes sont à la fois non toxiques et biodégradables, du fait de leur composition en

phospholipides qui sont des constituants naturels des membranes biologiques. Les liposomes s'avèrent être un moyen intéressant pour contourner les problèmes liés aux HEs. De plus, ils offrent les avantages suivants :

- Solubilisation des principes actifs peu solubles dans l'eau : les liposomes améliorent la solubilité des HEs comme le carvacrol, thymol et d'autres composés naturels comme le resveratrol et l'acide caféique (Coimbra et al., 2011).
- Augmentation de la stabilité du principe actif : les liposomes encapsulant les HEs d'*Artemisia arborescens* (Sinico et al., 2005), *Anethum graveolens* (Ortan et al., 2009), *Santolina insularis* (Valenti et al., 2001) sont stables à 4 °C pendant au moins 6 mois de stockage (Sinico et al., 2005 ; Valenti et al., 2001 ; Ortan et al., 2009). Les liposomes améliorent la stabilité chimique du resveratrol en empêchant l'isomérisation trans-cis (Coimbra et al., 2011). De plus, l'incorporation des composés naturels dans des liposomes empêche leur contact avec l'environnement et les protège contre la lumière et d'autres types de dégradation (Habib et al., 1991 ; Coimbra et al., 2011). Les liposomes protègent les HEs de *Zanthoxylum tingoassuiba* (Detoni et al., 2012) et de rose (Wen et al., 2011) contre l'oxydation induite par la température (Detoni et al., 2012; Wen et al., 2011).
- Diminution de la toxicité du principe actif : c'est un des avantages essentiels des liposomes du fait de leur faible pénétration dans des tissus comme le rein, le cœur ou le tractus gastro-intestinal. Ils permettent d'éviter les effets secondaires après administration sous-cutanée, intra-dermique ou intra-musculaire de principes actifs irritants comme certains constituants des HEs (Storm et al., 1998).
- Ciblage du principe actif : Biju et al., 2005 ont ciblé les follicules pilo-sébacés en utilisant des liposomes encapsulant l'HE d'arbre à thé (*Tea Tree Oil)* (Biju et al., 2005).
- Libération programmée dans le temps en fonction de la fluidité de la paroi liposomiale. Les liposomes encapsulant l'HE de Romarin ont montré une libération contrôlée (Alikhani-Koupaci, 2015).
- Amélioration des activités biologiques du principe actif : les activités antimicrobienne du carvacrol et thymol (Liolios et al., 2009), antivirale de l'HE d'*Artemisia arborescens* contre le virus d'Herpes (HSV-1) (Sinico et al., 2005) et antifongique de l'HE d'*Eucalyptus camaldulensis* (Moghimipour et al., 2012) sont augmentées lors de

l'incorporation dans les liposomes (Liolios et al., 2009 ; Moghimpour et al., 2012 ; Sinico et al., 2005 ; Sherry et al., 2013).

6.2.2. Choix des phospholipides

Avec un matériel biologique naturel par excellence, la lécithine de soja est utilisée pour préparer les liposomes. Trois types de phospholipides ont été choisis dont deux sont saturés (Phospholipon 80H et Phospholipon 90H) et le troisième est insaturé (Lipoid S100). Ces phospholipides sont peu coûteux comparés aux phospholipides synthétiques et contiennent en majorité de la PC qui est un constituant majeur de la membrane biologique. En effet, le Phospholipon 80H, Phospholipon 90H et Lipoid S100 contiennent respectivement 78,9 ; 90 et 95 % de PC. Le Phospholipon 80H diffère des autres types de phospholipides par la présence du PE dans sa composition.

Nous sommes intéressées à comparer les caractéristiques des liposomes obtenus par ces trois types de phospholipides et élucider l'effet de la composition et de l'hydrogénation, afin d'élaborer une formulation liposomiale adéquate contenant l'HECG qui intéresserait le secteur industriel.

6.2.3. Préparation des liposomes par la méthode d'injection d'éthanol

Nous avons choisi la méthode d'injection d'éthanol pour la préparation des liposomes car elle est simple, rapide, reproductible, peu coûteuse et transposable à grande échelle (Jaafar-Maalej et al., 2010). D'autres méthodes courantes de préparation de liposomes, notamment l'hydratation du film lipidique et l'évaporation en phase inverse, nécessitent des traitements mécaniques tels que la sonication et l'extrusion. Ces étapes supplémentaires limitent la production des liposomes à grande échelle. Les méthodes de préparation des liposomes ont été développées dans la partie bibliographique (paragraphes 1.4. méthodes de préparation des liposomes à petite échelle et 1.5 production des liposomes à grande échelle).

6.2.3.1. Optimisation de la méthode de préparation des liposomes à petite échelle

Comme plusieurs paramètres peuvent modifier les caractéristiques des vésicules lipidiques, il s'avère nécessaire de définir les conditions optimales pour la préparation des liposomes à petite échelle. Le Phospholipon 80H est choisi comme modèle de phospholipide. Nous avons tout

d'abord varié les paramètres suivants : 1) la concentration en cholestérol ; 2) la concentration en phospholipides ; 3) le rapport volumique éthanol/eau ; 4) la vitesse d'agitation de la phase aqueuse ; 5) la vitesse d'injection de la phase organique dans la phase aqueuse.

Pour chaque paramètre étudié, la taille et l'indice de polydispersité des liposomes sont déterminés afin de fixer les conditions expérimentales les plus adéquates pour la préparation des liposomes témoins.

Nous avons appliqué ensuite ces conditions optimales à la préparation des liposomes en utilisant les deux autres types de phospholipides (Phospholipon 90H et Lipoid S100) et en ajoutant différentes concentrations d'Eug et d'HECG dans la phase organique.

6.2.4. Préparation des complexes d'inclusion dans les liposomes

Plusieurs études ont montré que l'encapsulation des molécules, en particulier l'Eug dans des complexes d'inclusion augmente leur solubilité aqueuse (Kfoury et al., 2014 ; Hill et al., 2013), améliore leur stabilité thermique (Choi et al., 2009; Nuchuchua et al., 2009; Hill et al., 2013) et contrôle leur libération (Nuchuchua et al., 2009). En addition, la complexation de l'Eug avec les cyclodextrines maintient leur activité anti-oxydante par piégeage du radical DPPH (Kfoury et al., 2014) et améliore leur activité antibactérienne contre diverses souches de bactéries Gram + et Gram - (Liang et al., 2012). Comme les complexes d'inclusion sont instables dans un milieu aqueux (Seo et al., 2010) et que les molécules hydrophobes peuvent être rapidement libérées à partir des bicouches lipidiques après administration *in vivo* (Takino et al., 1994 ; Maestrelli et al., 2005), l'encapsulation des complexes d'inclusion dans les liposomes (« drug in cyclodextrin in liposomes », DCL) permet de contourner les problèmes associés à chaque système et de combiner leurs avantages. Les DCLs augmentent davantage la stabilité (Loukas et al., 1998) et l'efficacité d'encapsulation (Fatouros et al., 2001) des molécules que la simple incorporation dans les liposomes par la méthode dite conventionnelle.

Nous avons choisi l'HP-β-CD pour former des complexes d'inclusion de l'Eug et des constituants de l'HECG en raison de sa solubilité aqueuse élevée et sa faible toxicité (Challa et al., 2005).

Nous avons préparé les complexes d'inclusion dans la phase aqueuse. Ensuite, ces complexes ont été encapsulés dans les liposomes par la méthode d'injection éthanolique à petite échelle et par le contacteur à membrane à grande échelle. Nous avons également préparé des DCL_2 ou « double

loaded liposomes » par la technique de double encapsulation, où l'Eug ou l'HECG sont ajoutés dans la phase organique et leurs complexes d'inclusion dans la phase aqueuse.

6.2.5. Production à grande échelle

Après avoir optimisé la méthode à petite échelle, des préparations de volumes plus importants sont réalisées par le procédé de contacteur à membrane (300 et 600 ml) et de pilote (3 L). Ce procédé est simple et continu. Il est basé sur le principe de l'injection éthanolique et utilise une membrane de type SPG. L'usage de la membrane améliore le micro-mélange de la phase organique dans la phase aqueuse et permet d'optimiser le temps de la préparation et de contrôler la taille des liposomes (Charcosset et al., 2015). De plus, le pilote équipé d'un rotavapeur présente l'avantage de pouvoir évaporer l'éthanol directement dans le réacteur.

6.2.6. Lyophilisation

Les liposomes conservés en suspension aqueuse à long terme peuvent subir des problèmes d'instabilité chimique et physique tels que : l'oxydation et l'hydrolyse des phospholipides (paragraphe 1.6.2), la fuite des molécules encapsulées et l'agrégation des liposomes (Chen et al., 2010). La lyophilisation permet de résoudre ces problèmes d'instabilité et d'assurer une conservation des liposomes sous forme de poudre.

Afin de limiter les effets de différentes sources de stress induites par le procédé de lyophilisation (basses températures et pressions, déshydratation,…) et préserver les caractéristiques des liposomes durant la lyophilisation, il est nécessaire d'optimiser la formulation des liposomes sujets à la lyophilisation par l'ajout de cryoprotecteurs. Différents cryoprotecteurs ont été ainsi testés comme le saccharose, le tréhalose, la maltodextrine, et l'HP-β-CD ainsi que d'autres molécules comme l'alcool cétylique et la stéarylamine. Ils ont été ajoutés dans des proportions variables, soit pendant la préparation dans une des deux phases en fonction de la solubilité de chaque cryoprotecteur, soit après la préparation de la formulation liposomiale c'est-à-dire après l'évaporation de l'éthanol. De plus, les systèmes DCL et DCL_2 ont été également testés pour leur capacité à protéger les liposomes durant la lyophilisation. Les lyophilisats obtenus sont reconstitués dans l'eau et les caractéristiques des liposomes resuspendus sont ainsi déterminées. La possibilité de maintenir une substance volatile *in situ* dans des lyophilisats en dépit du vide appliqué représente une tâche difficile que nous avions envisagé d'atteindre.

6.2.7. Caractérisation structurale et morphologique des liposomes

Nous avons utilisé la diffusion dynamique de la lumière afin de déterminer la taille et l'indice de polydispersité (pdI) des liposomes en absence et en présence de l'HECG et de l'Eug. Le pdI reflète la distribution de taille des liposomes et leur homogénéité et il varie entre 0 (monodisperse) à 1 (très large distribution). Par ailleurs, l'appareil que nous avions utilisé permet de mesurer le potentiel zêta des liposomes donnant ainsi la charge de la surface liposomiale (Kaszuba et al., 2010).

Nous avons utilisé la microscopie électronique à transmission par coloration négative pour visualiser les vésicules et par conséquent confirmer la formation des liposomes. Cette technique est généralement utilisée pour l'imagerie des suspensions liposomiales puisqu'elle permet d'observer la forme des vésicules et le nombre de lamelles qui les constituent (Ruozi et al., 2011).

6.2.8. Détermination de l'efficacité d'encapsulation des constituants de l'HECG dans les liposomes

Des méthodes de dosage par HPLC des constituants de l'HECG ont été développées et utilisées pour déterminer l'efficacité d'encapsulation de chaque constituant (Eug, Eug-Ac, et Crph) dans les liposomes. En se basant sur la masse de l'Eug incorporé dans les liposomes et celle initialement ajoutée, le rendement d'encapsulation ou « loading rate » pourrait être par la suite calculé. Par ailleurs, le taux de phospholipides a été déterminé par la méthode de Bartlett (Bartlett et al., 1959), ce qui a permis de calculer l'encapsulation pondérée de l'Eug dans les liposomes. L'encapsulation pondérée correspond au nombre de mole de l'Eug encapsulé rapporté au nombre de moles de phospholipides qui constituent les liposomes. Le taux d'incorporation est exprimé alors en mole d'Eug par mole de phospholipides.

6.2.9. Etude de la stabilité des liposomes

Nous avons évalué la stabilité des liposomes encapsulant l'HECG ou l'Eug et des systèmes DCL et DCL_2 préparés à petite et grande échelle après stockage à 4 et 25 °C pendant 1 ou 2 mois. De plus, la stabilité a été évaluée pour les lyophilisats reconstitués dans l'eau. Nous avons déterminé la taille, le pdI, le potentiel zêta et l'efficacité d'encapsulation des principes actifs avant et après

stockage. La comparaison des valeurs à celles initiales obtenues le jour de la préparation permet de déterminer la stabilité des liposomes.

6.2.10. Etude de la photostabilité de l'Eug libre et encapsulé

L'Eug est une molécule volatile et photosensible. De ce fait, il est nécessaire d'évaluer la photostabilité des liposomes et leur capacité à protéger ce principe actif. Nous avons déterminé le pourcentage de l'Eug restant suite à l'exposition aux rayons UVC d'une solution aqueuse de l'Eug libre et des suspensions liposomiales contenant l'Eug.

6.2.11. Détermination de l'activité anti-oxydante

L'activité anti-oxydante de l'Eug libre et encapsulé dans les liposomes, les DCL et DCL_2 est évaluée par spectrophotométrie en suivant la diminution de la coloration violette, due à la réduction du radical libre DPPH•. C'est une méthode simple et rapide. Ce test est recommandé pour les composés ayant des groupements hydroxyles. Il s'effectue à température ambiante, ce qui permet d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles (Popovici et al., 2009).

6.3. Schémas récapitulatifs

Les figures 31 et 32 représentent un récapitulatif de la stratégie expérimentale suivie dans notre étude.

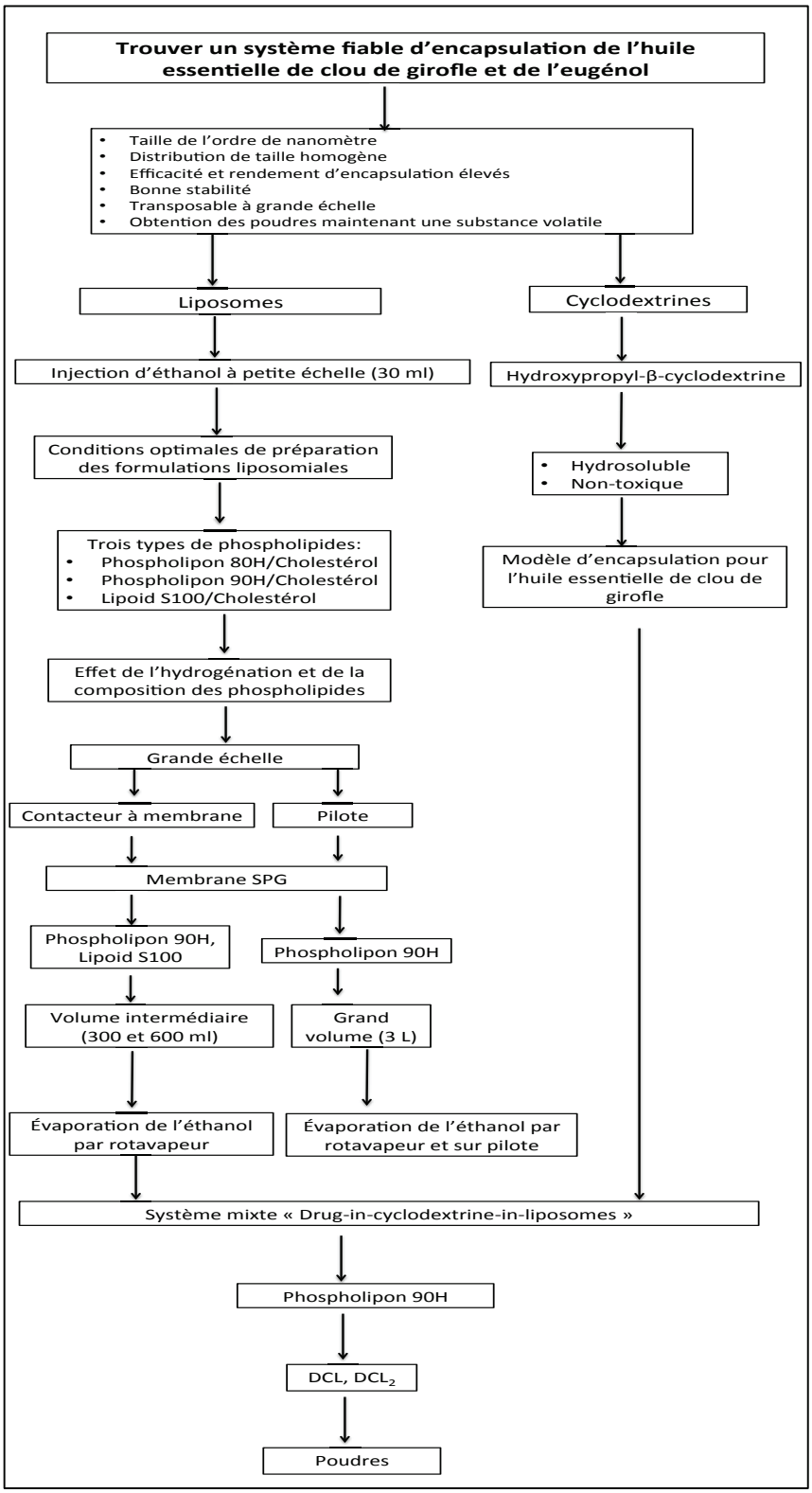


Figure 31: Méthodologie suivie dans notre étude pour la préparation des liposomes, des systèmes DCL à petite et grande échelle et des poudres.

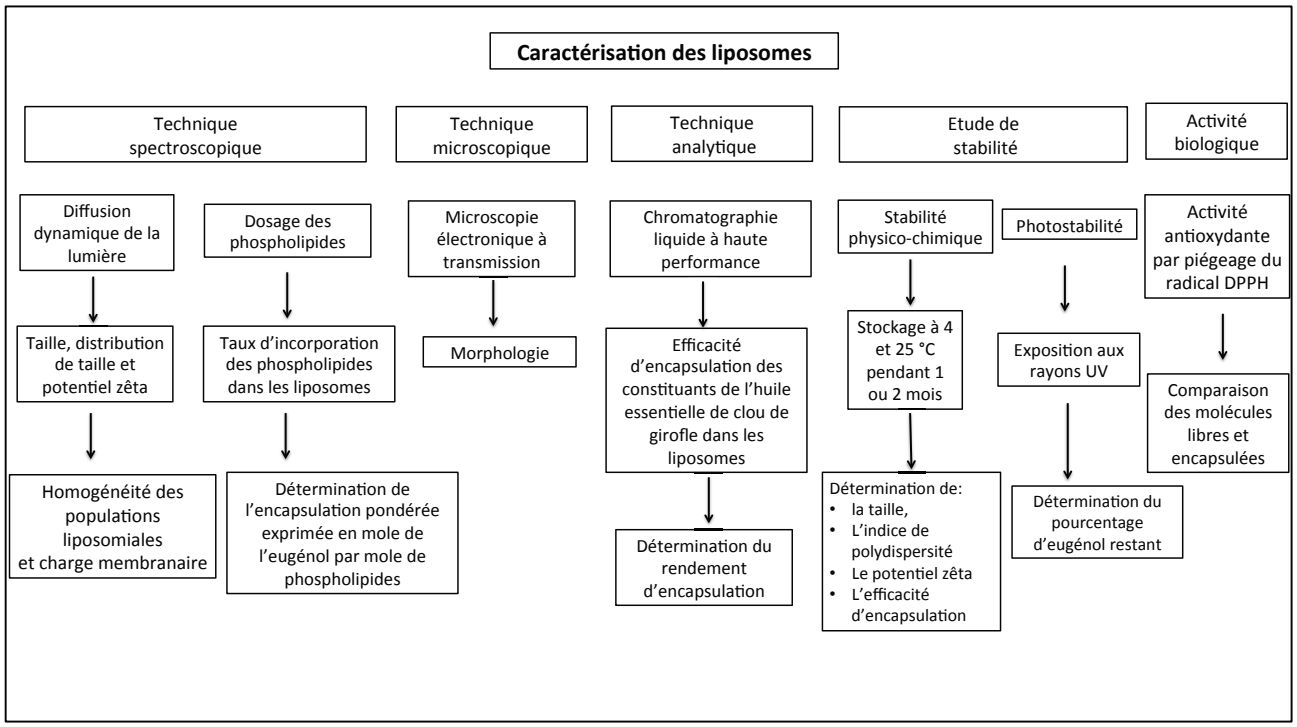


Figure 32: Techniques utilisées dans notre étude pour la caractérisation des liposomes.

Chapitre 7: Matériels et méthodes

7.1. Produits chimiques

Trois phospholipides différents fournis par Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Allemagne) sont testés:

- Phospholipon 80H hydrogéné composé de 78,9 % phosphatidylcholine de soja, 3,9 % lysophosphatidylcholine, 0,5 % eau, 0,1 % éthanol et le reste est composé de phosphatidyléthanolamine (PE) et de faibles quantités de lysophosphatidyléthanolamine et de triglycérides.
- Phospholipon 90H hydrogéné composé de 90 % phosphatidylcholine de soja, 4 % lysophosphatidylcholine, 2 % triglycérides, 2 % eau, 0,5 % éthanol et 1% iode.
- Lipoid S100 non hydrogéné composé de 94 % phosphatidylcholine de soja, 3 % lysophosphatidylcholine, 0,5 % N-acyl-phosphatidyléthanolamine, 0,1 % phosphatidyléthanolamine, 0,1 % phosphatidylinositol, 2 % eau et 0,2 % éthanol.

L'eugénol, le thymol, le cholestérol (Chol), le molybdate d'ammonium, le peroxyde d'hydrogène, le dihydrogénophosphate de potassium, l'alcool cétylique, le 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrine (HP-β-CD), le silicotungstate de sodium, et les solvants organiques: l'éthanol absolu et le méthanol (HPLC) sont fournis par Sigma-Aldrich, France. L'acétate d'eugénol (Eug-Ac), le β-caryophyllène (Crph), et le D-(+)-tréhalose dihydrate proviennent de Sigma Aldrich, USA. Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) est fourni par Sigma-Aldrich, Allemagne. L'acide sulfurique est fourni par ACROS organic, New Jersey, USA. L'acide 4 amino-3 hydroxy-1 naphtalène sulfonique est fourni par Fluka, Inde. La stéarylamine est fournie par Sigma Aldrich, Suisse. Le saccharose est fourni par Fisher Scientific, UK. Les maltodextrines Glucidex 6D et 19D sont fournies par Roquette, France. L'huile essentielle de clou de girofle (*Syzigium aromaticum*) constituée de 93,5 % Eug, 2,43 % Eug-Ac et 2,29 % Crph est fournie par Biocham, Damascus, Syrie. L'eau est purifiée par un système Milli-Q obtenu à partir d'un système de synergie Millipore (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA).

7.2. Membranes de type Shirasu Porous Glass (SPG)

Les membranes tubulaires de type SPG sont fournies par SPG Technology (Miyazaki, Japon). Les membranes SPG sont obtenues à partir de Na_2O-CaO-MgO-Al_2O_3-B_2O_3-SiO_2, qui est

synthétisé à partir des cendres volcaniques, appelées Shirasu, utilisées comme matière première principale (Vladisavljević et al., 2007). La membrane SPG est hydrophile avec une taille moyenne de pores de l'ordre de 0,9 µm. Les dimensions de la membrane SPG sont les suivantes: 0,125 m de longueur, 10^{-2} m de diamètre intérieur, et 10^{-3} m d'épaisseur. Par conséquent, la surface active de la membrane est de 3,9 x 10^{-3} m^2.

7.3. Préparation des complexes d'inclusion dans la phase aqueuse

La Figure 33 illustre la préparation des complexes d'inclusion. 500 mg d'HP-β-CD sont dissouts dans 20 ml d'eau ultra-pure. La quantité adéquate d'Eug ou d'HECG est ajoutée à la solution d'HP-β-CD pour avoir un rapport molaire CD:invité 1:1. Les solutions sont ensuite soumises sous agitation à 150 rpm, à 25 °C pendant 24 h, puis filtrées à travers des filtres d'acétate de cellulose (Sigma-Aldrich, France) de 0,45 µm (Figure 33). Une partie des solutions aqueuses des complexes d'inclusion est congelée à -20 °C, lyophilisée puis conservée à 4 °C pour des études de caractérisation. Une autre partie sert comme phase aqueuse lors de la préparation des liposomes encapsulant les complexes d'inclusion. En utilisant ce même protocole, des solutions d'HP-β-CD libres sont préparées dans la phase aqueuse en absence d'Eug et d'HECG.

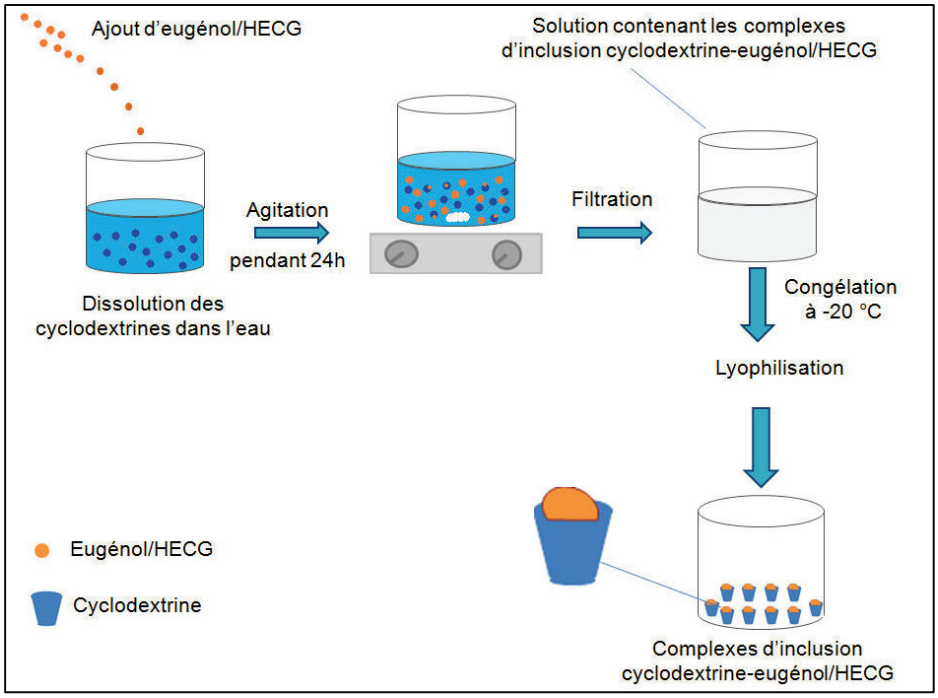


Figure 33 : Préparation des complexes d'inclusion d'HP-β-CD/invité.

7.4. Préparation des liposomes

7.4.1. Préparation à petite échelle par la méthode d'injection d'éthanol

7.4.1.1. Choix des conditions optimales

Le Phospholipon 80H est choisi comme modèle de phospholipide. Afin d'optimiser les conditions expérimentales de préparation des liposomes, plusieurs paramètres influençant la taille des liposomes sont d'abord étudiés tels que : la concentration en cholestérol (0, 3 et 5 mg/ml), la concentration en phospholipides (10, 20 et 30 mg/ml), la vitesse d'agitation (100, 200, 400, 600, 800 et 1000 rpm), le rapport volumique éthanol/eau (0,25; 0,5 et 1) et la vitesse d'injection (0,5; 1; 1,5 et 2 ml/min). Chaque expérience est répétée trois fois.

7.4.1.2. Préparation des liposomes avec trois types de phospholipides

Les liposomes témoins et encapsulant l'Eug ou l'HECG et leurs complexes d'inclusion sont préparés par la méthode d'injection d'éthanol d'après le protocole décrit par Jaafar-Maalej et al. (2010) avec quelques modifications. Les quantités adéquates de phospholipides (Phospholipon 80H, Phospholipon 90H ou Lipoid S100) (10 mg/ml) et de cholestérol (5 mg/ml) sont dissoutes dans 10 ml d'éthanol absolu. La solution organique ainsi préparée (10 mg/ml) est injectée à l'aide d'une seringue en verre (fournie par Fortuna optima, GmbH-Allemagne) dans un volume de 20 ml d'eau ultra-pure à une température au-dessus de la température de transition de phospholipides, qui est de 55 °C pour le Phospholipon 80H et le Phospholipon 90H et 25 °C pour le Lipoid S100. La vitesse d'injection, égale à 1 ml/min, est contrôlée par une pompe automatique (fournie par KDS 100, KdScientific, Holliston, USA). Le rapport éthanol/eau est de 1/2 (v/v). Au cours de l'injection, le milieu est mis sous agitation magnétique. La vitesse d'agitation est de 400 rpm. La suspension liposomiale est maintenue à température ambiante sous agitation à 400 rpm pendant 15 min. Enfin, l'éthanol et une partie de l'eau sont éliminés sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif Rotavapor R-144 (Büchi, Switzerland) à 40 °C. Les liposomes sont stockés à 4 °C. Chaque lot est préparé six fois.

7.4.1.3. Formulations liposomiales

Différentes formulations liposomiales sont préparées : 1) des liposomes témoins préparés en absence d'Eug et d'HECG en utilisant les trois types de phospholipides ; 2) des liposomes encapsulant l'Eug ou l'HECG préparés en ajoutant l'Eug ou l'HECG à différentes concentrations

allant de 1 à 15 mg/ml dans la phase organique (10 ml éthanol) avant d'être injecté dans la phase aqueuse. Ces liposomes sont préparés en utilisant les trois types de phospholipides ; 3) des liposomes composés de Phospholipon 90H encapsulant les HP-β-CD libres. La phase aqueuse (20 ml) contient les HP-β-CD libres ; 4) des liposomes composés de Phospholipon 90H encapsulant les complexes d'inclusion d'HP-β-CD/Eug ou HP-β-CD/HECG. La phase aqueuse (20 ml) contient respectivement les complexes d'inclusion d'HP-β-CD/Eug ou d'HP-β-CD/HECG. Des DCLs encapsulant l'Eug et l'HECG sont ainsi obtenus ; 5) des liposomes préparés par la technique de double encapsulation. L'Eug ou l'HECG est ajouté(e) dans la phase organique (10 ml éthanol) à une concentration de 2,5 mg/ml et la phase aqueuse (20 ml) contient les complexes d'inclusion d'HP-β-CD/Eug ou HP-β-CD/HECG. Des « double loaded liposomes » ou DCL_2 sont ainsi obtenus.

7.4.2. Préparation à grande échelle

7.4.2.1. Contacteur à membrane

Le procédé du contacteur à membrane basé sur le principe de l'injection éthanolique (Figure 11, paragraphe 1.5.2) permet la production des volumes intermédiaires de liposomes. En effet, le volume final de la préparation est de 600 ml pour les liposomes encapsulant l'Eug ou l'HECG où les volumes de la phase organique et aqueuse sont respectivement 200 ml et 400 ml. Pour les liposomes encapsulant les complexes d'inclusion HP-β-CD/Eug ou HP-β-CD/HECG (DCLs), les volumes de la phase organique et aqueuse sont respectivement 100 ml et 200 ml aboutissant à un volume final de préparation de 300 ml. Dans les deux cas, le rapport éthanol/eau est de 1/2 (v/v). Le Tableau 14 résume les conditions expérimentales utilisées dans la préparation des liposomes encapsulant l'Eug ou l'HECG, des DCL et DCL_2.

Le débit de la préparation Q (ml/min) est calculé selon la formule suivante : $Q=V/t$ avec V le volume total de la préparation (ml) et t le temps de la préparation (min). Le débit de la phase organique et celui de la phase aqueuse sont calculés de la même manière où V correspond respectivement au volume de la phase organique et celui de la phase aqueuse.

La vitesse tangentielle est le rapport entre le débit de la phase aqueuse et la surface d'entrée dans la membrane. Elle est calculée selon la formule suivante : $V = \frac{Q_{\text{phase aqueuse}}}{\Pi d^2/4}$ (m/s).

Le flux transmembranaire est le rapport entre le débit de la préparation et la surface de la membrane. La surface de la membrane est calculée selon la formule suivante S= Πdl avec d et l sont respectivement le diamètre interne et la longueur de la membrane. L'unité du flux transmembranaire est donc une vitesse (m/s).

Tableau 14: Conditions expérimentales utilisées pour la préparation des liposomes à grande échelle.

		Ph/Chol/Eug (m/m/m)	**Volume phase organique (ml)**	**Volume phase aqueuse (ml)**	**Rapport éthanol/eau (v/v)**	**Débit de la préparation (ml/min)**	**Débit de la phase organique (ml/min)**	**Vitesse tangentielle (m/s)**	**Flux (m/s)**
Liposomes encapsulant l'Eug ou l'HECG	Contacteur à membrane	10/5/0 10/5/1 10/5/2,5	200	400	0,5	1000	330	0,39	$4,3 \times 10^{-3}$
	Pilote	10/5/0 10/5/2,5	1000	2000	0,5	462	147	0,17	2×10^{-3}
DCL, DCL_2	Contacteur à membrane	10/5/0 10/5/2,5	100	200	0,5	818	270	0,35	$3,5 \times 10^{-3}$

Ph : phospholipides, Chol : cholestérol.

La phase organique constituée d'éthanol absolu, dans laquelle les phospholipides Phospholipon 90H ou Lipoid S100 (10 mg/ml) et le cholestérol (5 mg/ml) sont dissouts, est injectée à travers les pores de la SPG membrane au moyen d'une pompe Quattroflow 1000S (Life Sciences, France) avec un débit indiqué dans le tableau 14. La phase aqueuse circule tangentiellement à la membrane à l'aide d'une pompe (Filtron, France) à une vitesse tangentielle indiquée dans le tableau 14. Les liposomes sont obtenus à une température supérieure à la température de transition des phospholipides, à 55 °C et 25 °C respectivement pour le Phospholipon 90H et le Lipoid S100. Les liposomes se forment spontanément lorsque les deux phases entrent en contact à l'intérieur du module membranaire. Le système de pompes est arrêté dès que des bulles d'air atteignent le tube connectant la phase organique au module membranaire, ce qui indique que le volume initial de la phase organique est entièrement consommé. Les débits des deux phases sont réglés de manière à ce qu'elles passent en un temps identique. Les liposomes sont ensuite soumis sous agitation à 600 rpm à température ambiante pendant 15 min. Enfin, l'éthanol et une partie de l'eau sont éliminés sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif (Rotavapor R-144, Büchi, Switzerland) à 40 °C. Les liposomes sont ensuite stockés à 4 °C. Chaque lot est répété 3 fois.

7.4.2.1.1. Formulations liposomiales

Différentes formulations liposomiales sont préparées : 1) des liposomes témoins préparés en absence d'Eug et d'HECG en utilisant le Phospholipon 90H et le Lipoid S100 ; 2) des liposomes encapsulant l'Eug ou l'HECG préparés en ajoutant l'Eug ou l'HECG à deux concentrations différentes (1 et 2,5 mg/ml) dans la phase organique (200 ml éthanol) avant d'être injecté dans la phase aqueuse. Ces liposomes sont préparés en utilisant le Phospholipon 90H et le Lipoid S100 ; 3) des liposomes composés de Phospholipon 90H encapsulant les HP-β-CD libres. La phase aqueuse (200 ml) contient les HP-β-CD libres ; 4) des liposomes composés de Phospholipon 90H encapsulant les complexes d'inclusion d'HP-β-CD/Eug ou d'HP-β-CD/HECG. La phase aqueuse (200 ml) contient respectivement les complexes d'inclusion d'HP-β-CD/Eug ou HP-β-CD/HECG. Des DCLs encapsulant l'Eug et l'HECG sont ainsi obtenus ; 5) des liposomes préparés par la technique de double encapsulation. L'Eug ou l'HECG est ajouté(e) dans la phase

organique (100 ml éthanol) à une concentration de 2,5 mg/ml et la phase aqueuse (200 ml) contient les complexes d'inclusion d'HP-β-CD/Eug ou HP-β-CD/HECG. Des « double loaded liposomes » ou DCL_2 sont ainsi obtenus.

7.4.2.1.2. Régénération de la membrane

A la fin de chaque expérience, la membrane est régénérée par circulation d'eau et d'éthanol. Cette étape est réalisée en la rinçant, dans un premier temps, avec 200 ml d'éthanol absolu dans le récipient contenant la phase organique et 400 ml d'eau ultra-pure circulée tangentiellement à la membrane; et dans un second temps avec 200 ml d'eau ultra-pure et 400 ml d'eau ultra-pure circulée tangentiellement à la membrane. La perméabilité de la membrane est mesurée à une pression de 0,5 bar au début et à la fin de chaque expérience (pente du débit du perméat en fonction de la pression transmembranaire) et est vérifiée pour être autour de 90 % de sa valeur initiale.

7.4.2.2. Pilote

Les liposomes témoins et encapsulant l'Eug et l'HECG sont préparés par pilote équipé d'une membrane SPG pour l'injection de la phase organique dans la phase aqueuse (Figure 12 b, paragraphe 1.5.3) selon la méthode décrite par Charcosset et al., (2015) avec quelques modifications. Ce procédé a permis l'obtention de 3 L de liposomes.

Les quantités adéquates de Phospholipon 90H (10 mg/ml), de cholestérol (5 mg/ml), d'Eug ou HECG (0 et 2,5 mg/ml) sont dissoutes dans la phase organique constituée d'éthanol absolu (1 L) à 55 °C. Un récipient supplémentaire contient la phase organique et le premier réacteur à double enveloppe de capacité 10 L équipé d'agitateur à hélice à 4 pales contient la phase aqueuse (2 L) chauffée à 55 °C. La phase organique est poussée avec un débit de 147 ml/min à travers les pores de la membrane à l'aide d'une pompe (Quattroflow 1000S, Life Sciences, France). La phase aqueuse circule à l'intérieur de la membrane avec une vitesse tangentielle de 0,17 m/s au moyen d'une pompe péristaltique (Masterflex®, Cole Parmer, France). Durant la préparation, les suspensions liposomiales sont recueillies à la sortie de la membrane dans le deuxième réacteur à double enveloppe équipé d'agitateur à hélice à 4 pales. La vitesse d'agitation est réglée à 250 rpm. Les débits des deux phases sont réglés de manière à ce qu'elles passent en un temps

identique. Les suspensions liposomiales sont ensuite mises sous agitation magnétique à 600 rpm pendant 15 min à température ambiante. Après agitation, la suspension liposomiale est divisée en deux lots identiques de 1.5 L. L'éthanol et une partie de l'eau sont éliminés par évaporation sous pression réduite directement sur le pilote (vitesse d'agitation 250 rpm) ou à l'aide d'un évaporateur rotatif. A la fin de l'expérience, la membrane est régénérée en circulant de l'eau et de l'éthanol comme indiquée ci-dessus (paragraphe 7.4.2.1.2. régénération de la membrane). Chaque lot est répété trois fois.

7.4.2.2.1. Formulations liposomiales

Différentes formulations liposomiales sont préparées : 1) des liposomes témoins composés de Phospholipon 90H préparés en absence d'Eug ou HECG et dont l'éthanol est éliminé à l'aide d'un évaporateur rotatif ; 2) des liposomes témoins composés de Phospholipon 90H préparés en absence d'Eug ou HECG et dont l'éthanol est éliminé par évaporation sous pression réduite directement sur le pilote ; 3) des liposomes composés de Phospholipon 90H encapsulant l'Eug et l'HECG à une concentration de 2,5 mg/ml, dont l'éthanol est éliminé à l'aide d'un évaporateur rotatif ; 4) des liposomes composés de Phospholipon 90H encapsulant l'Eug et l'HECG à une concentration de 2,5 mg/ml, dont l'éthanol est éliminé par évaporation sous pression réduite directement sur le pilote.

7.5. Lyophilisation

Ce procédé a été appliqué aux formulations suivantes constituées de Phospholipon 90H et préparées par la méthode d'injection d'éthanol: 1) des liposomes témoins ; 2) des liposomes encapsulant l'Eug ; 3) des liposomes encapsulant les HP-β-CD libres ; 4) des DCL encapsulant l'Eug ; 5) des DCL_2 encapsulant l'Eug.

Chaque lot de liposomes est préparé en trois exemplaires. Ces lots ont subi une ultracentrifugation à 100000 g pendant 1 h à 4 ºC. Le surnageant est jeté et le culot est dissous dans l'eau (environ 2 ml). Les culots sont ensuite congelés à -20 °C pendant la nuit. Ils sont lyophilisés dans des flacons en verre de capacité 10 ml avec des bouchons en caoutchouc à l'aide d'un lyophilisateur Cryonext 23020 (France) en subissant les étapes de lyophilisation suivantes : 1) l'étagère du lyophilisateur est pré-refroidie à -20 °C. La température de l'étagère est ensuite descendue à -40 °C (rampe : -0,5 °C /min). Le

produit est stabilisé 30 min à -38 °C avant la mise sous vide ; 2) une dessiccation primaire est réalisée à une pression de 150 µbar pendant 3 h à -10 °C, puis la température de l'étagère est progressivement augmentée à 5 ºC pendant 6 h à 250 µbar, pour atteindre finalement 10 ºC à 350 µbar pendant 9 h. La température est ajustée de sorte que la température du produit à lyophiliser est supérieure à la température de sublimation de l'eau ; 3) une dessiccation secondaire est appliquée pendant 10 h à 20 °C à une pression de 100 µbar ; 4) les flacons sont enfin retirés du lyophilisateur et fermés avec leurs bouchons et stockés à 4 °C ; 5) les liposomes lyophilisés sont reconstitués dans l'eau ultra-pure à leur volume d'origine (15 ml) avant leur caractérisation.

Afin de garantir une meilleure résistance des liposomes à la lyophilisation, différents cryoprotecteurs ont été testés comme : le saccharose, le tréhalose, la maltodextrine et l'HP-β-CD. D'autres molécules comme l'alcool cétylique et la stéarylamine ont été également testées. Les cryoprotecteurs ont été ajoutés dans des proportions variables, soit pendant la préparation dans une des deux phases en fonction du cryoprotecteur et de sa solubilité, soit après la préparation c'est-à-dire après l'évaporation de l'éthanol.
Ainsi, le saccharose, le tréhalose et les maltodextrines 6D et 19D sont ajoutés dans des rapports massiques sucre : phospholipide 6:1 et 8:1 après et pendant la préparation; l'HP-β-CD est ajoutée dans des rapports massiques sucre : phospholipide 8:1 et 16:1 pendant la préparation, 6:1 et 12:1 après la préparation ; la stéarylamine est ajoutée à des concentrations de 0,5 ; 1 ; 2 et 3 mg/ml pendant la préparation des liposomes. L'alcool cétylique est ajouté pendant la préparation des liposomes dans la phase organique à une concentration de 0,5 ; 1,5 et 1,7 %.

7.6. Caractérisation des liposomes

7.6.1. Mesure de taille et d'indice de polydispersité par diffusion dynamique de la lumière (DLS : Dynamic Light Scattering)

La diffusion dynamique de la lumière est utilisée pour déterminer la taille et l'indice de polydispersité (pdI) des différentes préparations liposomiales. L'appareil utilisé est un Malvern Zetasizer Nano-series (Malvern Instruments Zen 3600, Malvern, UK) équipé d'un logiciel DTS (nano) de version 5.10. Les liposomes témoins et encapsulant l'Eug et l'HECG sont analysés sans dilution ni filtration. Des dilutions de 10 fois dans l'eau ultra-

pure sont faites sur les suspensions des liposomes encapsulant les complexes d'inclusion HP-β-CD/Eug ou HP-β-CD/HECG. Des mesures du diamètre moyen (nm) et de pdI de chaque lot sont répétées 3 fois à 25 °C. Le diamètre moyen et le pdI sont estimés à partir des fonctions d'autocorrélation par une analyse cumulative, et exprimés comme la moyenne ± écart-type.

7.6.2. Détermination du potentiel zêta

Le potentiel zêta est déterminé en utilisant le même appareil Malvern Zetasizer Nano-series et est calculé en se basant sur la théorie de la mobilité éléctrophorétique (Sze et al., 2003). Les liposomes témoins et encapsulant l'Eug et l'HECG sont analysés sans dilution ni filtration mais ceux encapsulant les complexes d'inclusion HP-β-CD/Eug ou HP-β-CD/HECG sont dilués 10 fois avec l'eau ultra-pure. Les mesures sont faites 3 fois à 25 °C après 2 minutes d'équilibre. Les résultats sont représentés comme étant la moyenne des 3 mesures ± écart-type.

7.6.3. Détermination de l'efficacité d'encapsulation des constituants de l'huile essentielle de clou de girofle dans les liposomes par HPLC

Une méthode de dosage par HPLC est mise au point pour déterminer l'efficacité d'encapsulation des constituants de l'HECG (Eug, Eug-Ac, Crph) dans les liposomes. Ainsi, des aliquots sont prélevés à partir des suspensions liposomiales pour déterminer la concentration totale des constituants de l'HECG ([constituant de l'HECG]$_{total}$). D'autres sont prélevés du surnageant obtenu soit par ultracentrifugation des suspensions liposomiales à 100 000 g pendant 1 h et à 4 °C ou bien par centrifugation à travers des filtres de cellulose à 15 000 rpm pendant 1 h et à 4 °C pour déterminer la concentration des constituants de l'HECG libre (constituant de l'HECG]$_{libre}$).

Les solutions mères de l'Eug (1 mg/ml), l'Eug-Ac (1 mg/ml), le Crph (1 mg/ml) et de l'étalon interne, le thymol (1 mg/ml) sont préparées dans du méthanol. Pour la préparation de la gamme étalon, des aliquots prélevés de chaque solution mère sont dilués dans le méthanol afin d'obtenir une gamme de solutions de concentrations allant de 1 à 100 µg/ml. Une solution fille de thymol est préparée à partir de la solution mère (1 mg/ml) dans le méthanol pour obtenir une concentration de 100 µg/ml.

Ensuite, 100 µl de chaque solution de la gamme étalon (Eug, Eug-Ac et Crph), des suspensions liposomiales ou du surnageant sont ajoutés à 100 µl de thymol (100 µg/ml) et 200 µl de méthanol sont ensuite ajoutés. Puis, les échantillons subissent une sonication pendant 30 min à température ambiante pour garantir la solubilisation complète des liposomes et la libération de leur contenu. Cette étape est suivie d'une centrifugation à 15 000 rpm pendant 15 min à 4 °C. 250 µl sont prélevés du surnageant dont 20 µl sont analysés par HPLC en utilisant une colonne analytique Zorbax eclipse XDB-C18 de dimension (4,6x150mm, 5 µm) (Agilent). Pour le dosage de l'Eug, la phase mobile est un mélange de méthanol et d'eau (70/30). Pour le dosage de l'HECG, un gradient d'élution a été réalisé en faisant varier les proportions d'eau et de méthanol. La phase mobile débute (t=0) par un mélange méthanol/eau (70/30) pendant 10 min, ensuite ce rapport augmente pendant 4 min (t=14 min) pour atteindre un rapport méthanol/eau de 95/5, qui est maintenu pendant 11 min (t=25 min). Finalement, la colonne est stabilisée durant 5 min aboutissant à un temps d'analyse total de 30 min. Le débit est de 1 ml/min et la longueur d'onde est de 204 nm. Le dosage des constituants de l'HECG dans le surnageant et dans la suspension liposomiale est répété trois fois pour chaque lot. L'efficacité d'encapsulation est calculée en utilisant l'équation suivante :

$$EE\ (\%) = \frac{[\text{constituant de l'HECG}]_{total} - [\text{constituant de l'HECG}]_{libre}}{[\text{constituant de l'HECG}]_{total}} \times 100 \quad (1)$$

7.6.4. Détermination du rendement d'encapsulation de l'Eug

Le rendement d'encapsulation ou « loading rate » de l'Eug est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Rendement d'encapsulation}\ (\%) = \frac{\text{Masse de l'Eug incorporé dans les liposomes}}{\text{Masse de l'Eug initialement ajoutée}} \times 100 \quad (2)$$

La masse de l'Eug incorporé dans les liposomes est obtenue par soustraction de la masse de l'Eug libre de la masse totale de l'Eug en suspension liposomiale.

Dans le cas des liposomes préparés par la technique de double encapsulation, la masse initiale de l'Eug est la somme de la masse de l'Eug ajoutée dans la phase organique et celle ajoutée en tant que complexe d'inclusion HP-β-CD/Eug qui est déterminée par HPLC selon le protocole décrit dans le paragraphe 7.6.3.

7.6.5. Dosage des phospholipides

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

Une solution mère de dihydrogénophosphate de potassium de concentration 3,2 µmol/ml est préparée dans l'eau ultra-pure. Des aliquots sont prélevés à partir de la solution mère et dilués dans l'eau ultra-pure afin d'obtenir une gamme de solutions de dihydrogénophosphate de potassium de concentrations allant de 0,064 à 0,416 µmol/ml. La courbe d'étalonnage est obtenue en traçant l'absorbance correspondante en fonction la concentration de dihydrogénophosphate de potassium.

Le dosage des phospholipides est réalisé pour les suspensions liposomiales et pour les surnageants obtenus après ultracentrifugation à 100 000 g pendant 1 h à 4 °C. Des dilutions de 50 et 10 fois dans de l'eau ultra-pure sont effectuées respectivement pour les suspensions de liposomes contenant l'Eug et l'HECG et leurs surnageants. 500 µl de chaque échantillon (suspension liposomiale, surnageant et solution de dihydrogénophosphate de potassium) ont été prélevés et mélangés avec l'acide sulfurique 5M (400 µl) et l'ensemble est chauffé pendant 1 h à 200 °C. Après refroidissement à température ambiante, le peroxyde d'hydrogène 10 % (100 µl) est ajouté et le mélange est chauffé à 200 °C pendant 30 min jusqu'à l'obtention d'une solution claire. Après refroidissement à température ambiante, le molybdate d'ammonium (4,6 ml) est ajouté et le tube est agité vigoureusement par vortex. Dans une dernière étape, l'acide 4-amino-3-hydroxyl-1-naphtalène sulfonique (200 µl) est ajouté. Après agitation par vortex, l'ensemble est mis dans un bain-marie bouillant pendant 15 min. Après refroidissement à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 815 nm par un spectrophotomètre Nicolet Evolution 300 (Thermo electron corporation, Angleterre). Chaque tube est préparé trois fois. Le taux d'incorporation de phospholipides dans les liposomes est calculé selon l'équation suivante :

$$[PO_4^{3-}]_{liposomes}\ (\%) = \frac{[PO_4^{3-}]_t - [PO_4^{3-}]_{sur}}{[PO_4^{3-}]_t} \times 100 \quad (3)$$

$[PO_4^{3-}]_t$ et $[PO_4^{3-}]_{sur}$ sont respectivement les concentrations des phospholipides dans les suspensions liposomiales et les surnageants.

L'encapsulation pondérée de l'Eug (mole d'Eug/mole de phospholipides) est ainsi déduite.

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

Une goutte de suspension de liposomes est déposée sur une grille de cuivre revêtue de carbone. Après 2 min, l'excès de liquide est éliminé à l'aide d'un papier filtre. L'application d'une solution de contrastant de silicotungstate de sodium 1 % aboutit à l'apparition d'une coloration négative après 30 s à 1 min. L'excès de la solution de silicotungstate de sodium est éliminé à l'aide d'un papier filtre. La grille est séchée à température ambiante et ensuite observée au microscope électronique à transmission (Philips CM120, Eindhoven, Netherlands) au Centre Technologique des Microstructures (CTμ) à l'Université de Lyon (Villeurbanne, France). Les images sont prises à une accélération de 80 kV.

7.6.7. Etude de la stabilité des liposomes

7.6.7.1. Stabilité physico-chimique

Les liposomes témoins et encapsulant l'Eug et l'HECG préparés par la méthode d'injection d'éthanol ont été stockés dans des tubes en verre à 4 °C pendant 2 mois et ceux préparés par contacteur à membrane et pilote ont été stockés à 4 °C et à 25 °C pendant 2 mois. Les liposomes encapsulant les complexes d'inclusion et ceux préparés par la technique de double encapsulation ont été stockés à 4 °C pendant 1 mois. La stabilité physico-chimique est évaluée en comparant le diamètre moyen des vésicules, le pdI, le potentiel zêta et l'efficacité d'encapsulation des constituants de l'HECG après 1 ou 2 mois à ceux obtenus au jour de la préparation.

7.6.7.2 Photostabilité de l'Eug sous forme libre et encapsulée

Les suspensions liposomiales préparées à une concentration d'Eug de 2,5 mg/ml subissent une ultracentrifugation à 100 000 g pendant 1 h à 4 °C. Le surnageant est jeté et le culot est dissous dans l'eau. 100 µl sont prélevés à partir de la suspension obtenue et analysés par HPLC comme décrit ci-dessus pour déterminer la concentration de l'Eug dans les liposomes. Les suspensions sont diluées de nouveau dans l'eau pour aboutir à une concentration finale en Eug égale à 400 µg/ml.

Les solutions aqueuses de l'Eug libre (400 µg/ml) et les suspensions liposomiales encapsulant l'Eug (400 µg/ml) sont transférées dans des cuvettes en quartz et exposées au rayonnement UVC pendant 96 h. D'autre part, les solutions aqueuses de l'Eug libre (400 µg/ml) sont maintenues à l'obscurité pour la même période. 100 µL de chaque solution ou suspension liposomiale sont prélevés à des intervalles de temps différents (0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 30, 34, 48, 54, 58, 72, 78, 82 et 96 h) et la concentration de l'Eug est déterminée par HPLC selon la méthode décrite dans le paragraphe 7.6.3. L'étude de photostabilité est répétée trois fois. Les résultats sont exprimés en tant que pourcentage d'Eug restant, en utilisant l'équation suivante:

$$\text{Eug restant } (\%) = \frac{C_t}{C_0} \times 100 \qquad (4)$$

C_t et C_0 sont respectivement les concentrations de l'Eug au temps t et à t_0.

7.6.8. Détermination de l'activité anti-oxydante de l'Eug et l'HECG libres et encapsulés par piégeage du DPPH$^{\bullet}$

L'activité anti-oxydante par piégeage du radical DPPH$^{\bullet}$ est déterminée en utilisant la méthode de Brand-Williams et al. (1995) avec quelques modifications. Différentes formulations sont testées : 1) des solutions aqueuses de l'Eug et de l'HECG libres ; 2) des liposomes encapsulant l'Eug en utilisant les trois types de phospholipides; 3) des complexes d'inclusion HP-β-CD/Eug et HP-β-CD/HECG ; 4) des liposomes encapsulant les complexes d'inclusion HP-β-CD/Eug et HP-β-CD/HECG ; 5) des DCL_2 encapsulant l'Eug et l'HECG.

La concentration de l'Eug dans les culots obtenus par ultracentrifugation de ces liposomes est déterminée comme c'est décrit dans le paragraphe 7.6.7.2. Les complexes d'inclusion HP-β-CD/Eug et HP-β-CD/HECG subissent une sonication pendant 30 min à température ambiante, puis sont analysés par HPLC afin de déterminer la concentration de l'Eug dans ces complexes. Tous les échantillons sont dilués dans l'eau pour aboutir à une concentration finale en Eug égale à 400 µg/ml.

1 ml de chaque solution ou de suspension (400 µg/ml) sont mélangés avec 2 ml de la solution éthanolique de DPPH$^{\bullet}$ (0,125 mM) fraîchement préparée. Le mélange est incubé pendant 1 h à 25 °C à l'obscurité et ensuite centrifugé à 15 000 rpm pendant 30 min. Le surnageant est prélevé et l'absorbance est mesurée à 517 nm en utilisant un spectrophotomètre Nicolet evolution 300 (Thermo electron corporation, Angleterre).

Les échantillons qui serviront comme contrôle pour les solutions aqueuses de l'Eug ou l'HECG libre et les complexes d'inclusion HP-β-CD/Eug et HP-β-CD/HECG sont préparés par mélange de 1 ml d'eau ultra-pure avec 2 ml de la solution éthanolique de DPPH$^{\bullet}$. Ceux qui serviront comme contrôle pour les liposomes encapsulant l'Eug, les DCL et DCL_2 sont préparés respectivement par mélange de 1 ml de liposomes témoins ou des liposomes contenant les HP-β-CD libres avec 2 ml de la solution éthanolique de DPPH$^{\bullet}$. L'activité anti-oxydante de chaque échantillon est répétée trois fois et représentée par le pourcentage de piégeage du radical DPPH$^{\bullet}$ par l'Eug ou « scavenging activity » comme suit :

$$SA\% = \left(1 - \frac{A_S}{A_0}\right) x\, 100 \qquad (5)$$

SA, A_s et A_0 représente respectivement « scavenging activity », l'absorbance de l'échantillon et l'absorbance du control.

7.7. Analyse statistique

Afin d'évaluer les différences significatives entre les caractéristiques de différentes formulations liposomiales, le T-test (independent samples T-test) est effectué avec $p<0,05$ (résultat statistiquement significatif). Le test d'analyse de la variance (ANOVA) est utilisé pour évaluer les différences significatives entre l'activité anti-oxydante de l'Eug libre, l'HECG libre et leurs formes encapsulées.

PARTIE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 8 : Résultats et Discussion

Les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse sont présentés dans ce chapitre et discutés en regard à la littérature. Nous commençons tout d'abord par présenter l'effet des différents paramètres testés pour aboutir à la formulation liposomiale optimale (Sebaaly et al., soumis). Nous présentons ensuite les caractéristiques physico-chimiques, l'étude de stabilité physico-chimique, de photostabilité et l'activité anti-oxydante de l'Eug des liposomes préparés par la méthode d'injection d'éthanol à petite échelle (Sebaaly et al., 2015a). Nous présentons ensuite les résultats concernant les liposomes préparés par contacteur à membrane et pilote en les comparant à ceux obtenus à petite échelle (Sebaaly et al., 2015b). Nous terminons ce chapitre par les résultats relatifs aux liposomes encapsulant les complexes d'inclusion de l'HECG et l'Eug comparés à une simple incorporation dans les liposomes (Sebaaly et al., 2016) et ceux de la lyophilisation (Sebaaly et al., 2016; Sebaaly et al., soumis).

8.1. Optimisation des liposomes à petite échelle : effet de différents paramètres sur la taille et l'indice de polydispersité des liposomes préparés par injection d'éthanol

8.1.1. Effet de la concentration en phospholipides en absence du cholestérol

Nous avons choisi le Phospholipon 80H comme modèle de phospholipides. Une concentration de 50 mg/ml en Phospholipon 80H a été tout d'abord testée puisqu'elle a été démontrée optimale pour la préparation de liposomes constitués des phospholipides de type EPC (Jaafar-Maalej et al., 2010). A cette concentration, les Phospholipon 80H n'étaient pas solubles dans l'éthanol, et une agrégation des phospholipides est obtenue. La formation de larges vésicules est également obtenue à une concentration en EPC supérieure à 60 mg/ml (Jaafar-Maalej et al., 2010). En utilisant un mélange de phospholipides insaturés EPC et EPG, Gentine et al., 2012 ont montré que la concentration en lipides ne doit pas dépasser 20 à 25 mM en raison de leur limite solubilité dans les solvants organiques utilisés. Nous avons par la suite diminué la concentration en phospholipides de 50 à 10 mg/ml, ce qui a entraîné une diminution de la taille des vésicules.

8.1.2. Effet du cholestérol

Le cholestérol est souvent incorporé dans les liposomes puisqu'il améliore leur stabilité (Raffy et al., 1999 ; Tseng et al., 2007). Nous avons ainsi ajouté le cholestérol aux formulations liposomiales à différents rapports massiques phospholipide:cholestérol (10:0, 10:3 et 10:5) afin

d'améliorer leur homogénéité. En se basant sur les résultats obtenus par granulométrie, des larges et polydisperses liposomes sont obtenus en absence et en présence de 30 % de cholestérol (Figures 34 a et b). Les liposomes contenant 50 % du cholestérol ont montré une bonne homogénéité et reproductibilité (Figure 34 c)

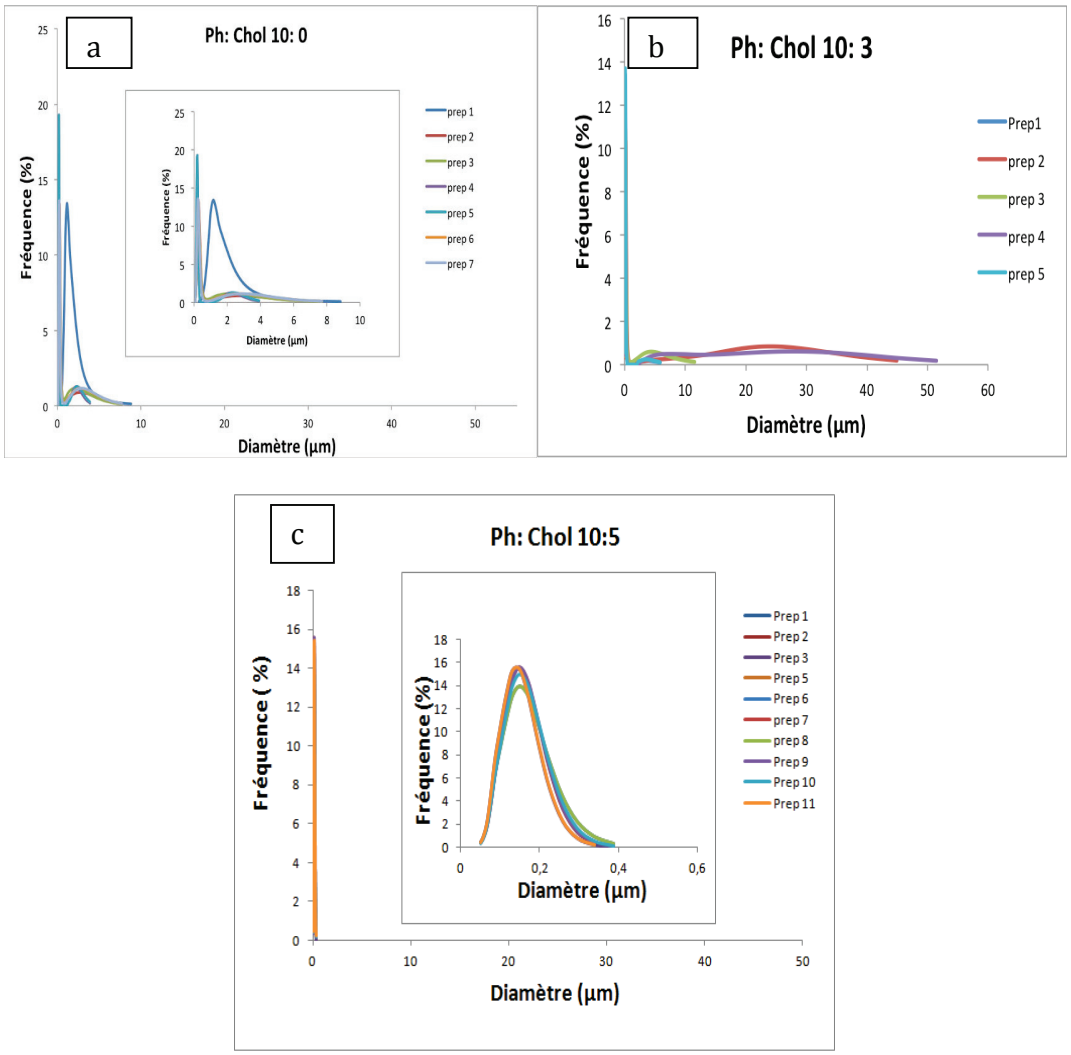


Figure 34: Taille des liposomes obtenue par granulométrie à différents rapports phospholipide:cholestérol 10:0 (a); 10:3 (b) et 10:5 (c).

La taille et le pdI des liposomes obtenus par DLS en absence et présence de cholestérol (Tableau 15) ont confirmé les résultats de granulométrie. Les liposomes ne contenant pas de cholestérol ont une taille et un pdI respectivement de l'ordre de 323 ± 48 nm et 0,30 ± 0,06 (Tableau 15).

L'ajout de ce dernier aux formulations dans un rapport massique de 50 % entraîne une diminution significative de la taille et du pdI des liposomes (Tableau 15). Une faible valeur de pdI est obtenue lors de la préparation des liposomes avec un rapport molaire de DPPC:Chol 10:2,8 (0,18 ± 0,02) par rapport à celle obtenue dans les liposomes constitués de DPPC uniquement (0,24 ± 0,02) (Kyrikou et al., 2005). Le pdI des liposomes constitués de SPC:Chol dans un rapport molaire 10:6 est de 0,09 ± 0,003, inférieur à celui obtenu dans les liposomes constitués de SPC uniquement (0,12 ± 0,001) (Parmentier et al., 2012). De ce fait, 50 % du cholestérol est ajouté aux formulations dans les expériences suivantes. De plus, la présence du cholestérol dans les liposomes constitués du DPPC améliore leur stabilité à 4 °C après un mois de stockage (Kyrikou et al., 2005).

Tableau 15 : Effet du cholestérol sur la taille, le pdI et le potentiel zêta des liposomes.

Phospholipide:Chol (masse/masse)	**Taille ± SD (nm)**	**pdI± SD**	**Potentiel zêta (mV) ± SD**
10:0	323 ± 48	0,30 ± 0,06	-40,1 ± 3,4
10:3	171 ± 32*	0,29 ± 0,02	-39,5 ± 2,7
10:5	210 ± 26*	0,25 ± 0,02	-33,2 ± 2,3

8.1.3. Effet de la concentration en phospholipides en présence du cholestérol

L'effet de différents paramètres comme la concentration en phospholipides, la vitesse d'agitation de la phase aqueuse, le rapport volumique éthanol:eau et la vitesse d'injection de la phase organique sur la taille et le pdI des liposomes est présenté dans le Tableau 16.

Les volumes des deux phases aqueuse et organique sont maintenus constants tandis que la concentration en phospholipides est modifiée (10, 20 et 30 mg/ml) afin d'étudier l'influence de ce paramètre sur la taille des vésicules.

L'augmentation de la concentration en phospholipides Phospholipon 80H de 10 à 30 mg/ml induit une augmentation significative de la taille et du pdI des liposomes (Tableau 16). Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant différents types de phospholipides DMPC ou DPPC (Pradhan et al., 2008), DPPC en combinaison avec DPPG (Gentine et al., 2012), Lipoid

S100 (Pons et al., 1993 ; Yang et al., 2012), EPC (Jaafar-Maalej et al., 2010 ; Yang et al., 2012), EPC en combinaison avec EPG (Gentine et al., 2012), POPC (Domazou et al., 2002 ; Stano et al., 2004), SPC (Justo et al., 2005) et Lipoid S75 (Yang et al., 2012). De plus, de nombreuses études ont montré que les suspensions liposomiales deviennent polydisperses à des concentrations élevées en lipides (Domazou et al., 2002 ; Yang et al., 2012, Gentine et al., 2012). En outre, la tendance des liposomes à s'agréger au cours de leur formation augmente avec la concentration élevée en lipides (Yang et al., 2012). Ce phénomène peut également entraîner une distribution de taille plus large.

Lasic et al. (1988) ont élucidé le mécanisme de formation des vésicules par la méthode d'injection d'éthanol. Au cours de la diffusion de l'éthanol dans la phase aqueuse, les phospholipides dissous dans la phase organique se regroupent à l'interface phase aqueuse/phase organique et forment des structures intermédiaires appelées fragments de bicouches planes (BPF) qui eux-mêmes en fusionnant forment des vésicules. Ce mécanisme est expliqué plus en détail par Yang et al. (2012) où une augmentation de la concentration en lipides dans la phase organique entraîne une forte concentration en BPF. Par conséquent, la courte distance entre les BPFs augmente la possibilité de formation de grandes vésicules en facilitant leur coalescence (Yang et al., 2012). Ceci peut expliquer l'augmentation de la taille des vésicules quelque soit le type de phospholipide utilisé.

Par conséquent, la concentration en phospholipides et en cholestérol est fixée respectivement à 10 et 5 mg/ml vue l'homogénéité de la population liposomiale obtenue.

Tableau 16 : Effet des différents paramètres sur la taille et le pdI des liposomes constitués de Phospholipon 80H.

Paramètres		**Taille des vésicules ± SD (nm)**	**pdI ± SD**
Phospholipides: Chol (mg/ml: mg/ml)	10:5	210 ± 26	0,25 ± 0,02
	20:10	323 ± 19*	0,28 ± 0,01
	30:15	356 ± 87*	0,47 ± 0,13
Vitesse d'agitation de la phase aqueuse (rpm)	100	272 ± 34	0,21 ± 0,02
	200	236 ± 7	0,24 ± 0,02
	400	210 ± 26	0,25 ± 0,02
	600	144 ± 7	0,22 ± 0,02
	800	127 ± 4	0,23 ± 0,002
	1000	103 ± 7	0,21 ± 0,02
Rapport volumique éthanol: eau (v/v)	0,25 (10 ml: 40 ml)	190 ± 16	0,23 ± 0,01
	0,5 (10 ml: 20 ml)	210 ± 26	0,25 ± 0,02
	1 (10 ml: 10 ml)	378 ± 30	0,29 ± 0,04
Vitesse d'injection de la phase organique (ml/min)	0,5	203 ± 6	0,26 ± 0,02
	1	210 ± 26	0,25 ± 0,02
	1,5	208 ± 10	0,25 ± 0,02
	2	209 ± 11	0,25 ± 0,02

8.1.4. Effet de la vitesse d'agitation de la phase aqueuse

Au cours de l'injection de la phase organique, la vitesse d'agitation de la phase aqueuse est variée entre 100 et 1000 rpm. Une augmentation de l'intensité du mélange entre les phases organique et aqueuse entraîne une diminution significative de la taille des vésicules (Tableau 16). Des résultats similaires ont été obtenus dans plusieurs études (Szoka et al., 1996 ; Justo et al., 2005 ; Jaafar-Maalej et al., 2010). De plus, une forte agitation ne montre pas un effet sur l'homogénéité du système puisque la valeur de pdI ne varie pas dans la gamme de vitesse d'agitation utilisée. En fait, l'intensité de la vitesse d'agitation détermine l'organisation et le mouvement des molécules de lipides dans la phase aqueuse (Szoka et al., 1996). Une agitation rapide entraîne une auto-organisation des phospholipides, empêchant leur agrégation et la formation de grandes vésicules.

La vitesse d'agitation de 400 rpm a été choisie pour les expériences suivantes, pour un compromis entre la taille et le pdI des vésicules formées.

8.1.5. Effet du rapport volumique éthanol/eau

Pour étudier l'effet du rapport volumique éthanol/eau sur la taille et le pdI des liposomes, différents rapports ont été utilisés 0,25; 0,5 et 1 (v/v). L'augmentation du rapport en volume éthanol/eau de 0,25 à 1 produit une légère augmentation de la taille et du pdI des liposomes constitués de Phospholipon 80H (Tableau 16). En variant le rapport éthanol/eau de 0,2 à 0,6 (v/v), une augmentation de la taille des vésicules constituées de SPC est également obtenue (Maitani et al., 2001). La variation du rapport éthanol/eau entre 0,1 et 1 (v/v) n'a pas provoqué une variation importante de la taille des liposomes constitués d'EPC (Jaafar-Maalej et al., 2010). Cependant, Yang et al. (2012) ont montré, en utilisant l'EPC, le Lipoid S75 et le Lipoid S100, que la taille des liposomes augmente pour un rapport éthanol/tampon phosphate supérieur à 0,2 (v/v), pour former des agrégats (> 500 nm) à un rapport de 0,5 (v/v). Il est important de noter que Yang et al. (2012) ont utilisé une concentration de lipides (40 mg/ml) supérieure à celle utilisée dans notre étude (10 mg/ml) expliquant la différence avec nos résultats.

Un rapport volumique éthanol/eau de 0,5 est choisi pour les expériences suivantes. Par rapport au rapport volumique de 0,25 qui conduit à des résultats similaires en termes de taille et de pdI, le rapport de 0,5 éthanol/eau permet de produire une suspension plus riche en liposomes.

8.1.6. Effet de la vitesse d'injection de la phase organique

La vitesse d'injection de la phase organique est variée entre 0,5 et 2 ml/min en la contrôlant à l'aide d'une pompe péristaltique. Les liposomes ont montré une distribution de taille similaire avec un pdI autour de 0,25 et un diamètre moyen autour de 210 nm (Tableau 16). Par conséquent, la vitesse d'injection ne montre pas d'effet ni sur la taille ni sur le pdI des liposomes. Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant différents types de phospholipides (Kremer et al., 1977 ; Pons et al., 1993 ; Szoka et al., 1996 ; Jaafar-Maalej et al., 2010 ; Song et al., 2011). La technique d'injection du solvant repose sur la diffusion du solvant de la phase organique en phase aqueuse et non pas sur la vitesse d'injection de la phase organique dans la phase aqueuse (Schubert et al., 2003). Toutefois, une faible vitesse d'injection peut provoquer une oxydation rapide des lipides et une distribution variable de tailles de particules résulte d'une vitesse

d’injection rapide (Song et al., 2011). Par conséquent, la vitesse d'injection est fixée à la valeur intermédiaire de 1 ml/min.

8.2. Effet de la composition et de l’hydrogénation des phospholipides sur la taille, le pdIet le potentiel zêta des liposomes témoins

En utilisant les conditions expérimentales optimales obtenues ci-dessus (concentration en phospholipides 10 mg/ml, concentration en cholestérol 5 mg/ml, vitesse d’agitation 400 rpm, rapport éthanol/eau 0,5 (v/v) et vitesse d’injection 1 ml/min), les liposomes témoins sont préparés par la méthode d’injection d’éthanol. Nous avons utilisé les phospholipides hydrogénés (Phospholipon 80H, Phospholipon 90H) et non-hydrogénés (Lipoid S100) en association avec le cholestérol afin de déterminer l'effet de l'hydrogénation et de la composition des phospholipides sur les caractéristiques et la stabilité des liposomes préparés.

Les tableaux 17, 18 et 19 présentent respectivement les caractéristiques des liposomes constitués de Phospholipon 80H, Phospholipon 90H et Lipoid S100 préparés à petite échelle. Des différences significatives sont observées entre les différents lots de liposomes, indiquant que la taille des vésicules dépend de la composition de la bicouche. En effet, les liposomes témoins constitués de Phospholipon 90H ont montré une taille moyenne de l’ordre de 275 ± 22 nm, supérieure à celle des liposomes témoins constitués de Phospholipon 80H (210 ± 26 nm) et de Lipoid S100 (225 ± 16 nm) (Tableaux 17, 18 et 19). En fait, les Phospholipon 80H et Phospholipon 90H hydrogénés contiennent diverses quantités de phosphatidylcholine (78,9 et 90 % respectivement), la même quantité de lysophosphatidylcholine (environ 4 %) et ils diffèrent par leur teneur en phosphatidyléthanolamine (PE). Ce dernier composé entre seulement dans la composition du Phospholipon 80H sous forme de phospholipides et lysophospholipides. La nature des groupements des têtes polaires des phospholipides peut affecter d’une manière significative la courbure de la membrane et par la suite la taille de vésicules (McMahon et al., 2005).

Tableau 17: Caractéristiques des liposomes constitués de Phospholipon 80H et encapsulant l'eugénol et l'HECG.

Phospholipon 80H									
Composition (m/m/m)	**$[Ph]_{liposome}$ (%)**	**Taille (nm)**	**pdI**	**Potentiel zêta (mV)**	**EE (%) Eug**	**EE (%) Eug-Ac**	**EE (%) Crph**	**RE Eug (%)**	**Mole Eug/mole Ph**
Ph/Chol/Eug (10:5:0)	91,6±4,09	210 ± 26 *204 ± 41*	0,25 ± 0,02 *0,25 ± 0,06*	-33,2 ± 2,3	-	-	-	-	-
Ph/Chol/Eug (10:5:1)	85,8±4,12*	244 ± 34* *265 ± 39*	0,22 ± 0,02 *0,21 ± 0,02*	-37,0 ± 2,4	57,9 ±0,17	-	-	26,9± 6,1	0,11±0,01
Ph/Chol/Eug (10:5:2,5)	91,7±5,56	260± 28* *288 ± 1*	0,23 ± 0,02 *0,25 ± 0,01*	-35,8 ± 6,2	67,9 ±1,51	-	-	25,7± 3,2	0,26±0,07
Ph/Chol/Eug (10:5:5)	84,4±4,86*	242 ±35* *234 ± 32*	0,24 ± 0,01 *0,29 ± 0,01*	-38,2 ± 2,9	77,4 ±1,62	-	-	19,9±1,9	0,43±0,06
Ph/Chol/Eug (10:5:7,5)	87,4±4,64	255 ±24* *254 ± 26*	0,27 ± 0,01 *0,21 ± 0,01*	-38,2 ± 6,9	81,2 ±1,02	-	-	16,6±1,3	0,52±0,02
Ph/Chol/Eug (10:5:10)	91,9±4,13	263 ±41* *244 ± 5*	0,24 ± 0,02 *0,19 ± 0,01*	-37,5 ±3,6	82,4 ±0,81	-	-	13,3± 0,8	0,55±0,01
Ph/Chol/Eug (10:5:12,5)	83,2±6,03*	289 ±35* *284 ± 8*	0,27 ± 0,04 *0,25 ± 0,01*	-34±1,3	84,7 ±1,73	-	-	13,5 ± 1,3	0,85±0,11
Ph/Chol/Eug (10:5:15)	84,1±7,13	305 ±76* *270 ± 49*	0,27 ± 0,03 *0,25 ± 0,05*	-33,6 ± 2,0	84,6 ±1,25	-	-	11,5 ± 0,6	0,99±0,09
Ph/Chol/HECG (10:5:1)	78,1±7,11*	238 ± 37* *231 ± 12*	0,24 ± 0,03 *0,33 ± 0,01*	-35,3 ± 4,5	56,8 ± 0,33	8,5 ± 0,0	70,5 ± 14,05	50,7 ±4,8	0,28±0,03
Ph/Chol/HECG (10:5:2,5)	78,7±5,25*	236 ± 28* *248 ± 54*	0,24 ± 0,02 *0,43 ± 0,01*	-32,2 ± 6,7	63,6 ± 2,14	14,2 ± 0,0	64,8 ± 0,38	32,6 ± 2,4	0,39±0,1
Ph/Chol/HECG (10:5:5)	84,1±6,85*	262 ± 12* *259 ± 28*	0,25 ± 0,02 *0,34 ± 0,01*	-31,2 ±4,6	70,1 ± 1,70	32,7 ± 2,89	78,3 ± 1,07	25,2± 1,4	0,52±0,16
Ph/Chol/HECG (10:5:7,5)	84,6±9,12*	281 ± 37* *312 ±13*	0,27 ± 0,01 *0,37 ± 0,02*	-35,5 ±2,6	73,7 ± 0,63	74,9 ± 0,73	81,9 ± 14,22	20,2 ± 0,9	0,82±0,28
Ph/Chol/HECG (10:5:10)	81,1±5,74	380 ± 69* *321 ± 4*	0,32 ± 0,09 *0,30 ± 0,03*	-28,2 ±1,6	73,9 ± 0,33	79,4 ± 2,12	81,2 ± 0,00	15,7 ± 0,4	0,90±0,23

Phospholipon 80H									
Composition (m/m/m)	**$[Ph]_{liposome}$ (%)**	**Taille (nm)**	**pdI**	**Potentiel zêta (mV)**	**EE (%) Eug**	**EE (%) Eug-Ac**	**EE (%) Crph**	**RE Eug (%)**	**Mole Eug/mole Ph**
Ph/Chol/HECG (10:5:12,5)	80,4±6,75*	375 ± 61* *334 ± 24*	0,33 ± 0,07 *0,26 ± 0,02*	-25,8 ±3,1	76,2 ± 0,55	82,4 ± 2,06	86,5 ± 0,00	14,4 ± 0,4	0,92±0,33
Ph/Chol/HECG (10:5:15)	69,5±5,65*	356 ± 55* *337 ± 19*	0,32 ± 0,04 *0,28 ± 0,02*	-29,7 ± 3,7	75,7 ± 1,76	84,9 ± 2,53	72,2 ± 13,21	12,7 ± 0,2	1,0±0,2

Chol: cholestérol ; Eug : eugénol ; HECG : huile essentielle de clou de girofle, pdI : Indice de polydispersité ; Ph: phospholipides.
EE (%) Eug, Eug-Ac and Crph: Efficacité d'encapsulation de l'eugénol, eugénol acétate et β-caryophyllène.
$[Ph]_{liposome}$ (%) : taux d'incorporation des phospholipides dans les liposomes.
RE Eug (%): rendement d'encapsulation de l'eugénol.
Les valeurs sont obtenues le jour de la préparation des liposomes. Les valeurs en italiques sont obtenues après 2 mois de stockage à 4 °C.
* indique une valeur significative ($P< 0,05$) en comparant à la valeur obtenue pour les liposomes témoins en absence de l'Eug et l'HECG.

De plus, les valeurs de potentiel zêta diffèrent dans les trois types de vésicules. Les liposomes témoins constitués de Phospholipon 90H ont montré une valeur de potentiel zêta légèrement négative de -5,5 ± 1,7 mV (Tableau 18) qui était en accord avec Castangia et al. (2013) (-6 ± 2 mV). Ceux constitués de Lipoid S100 possèdent une faible valeur de potentiel zêta de -3,9 ± 1,9 mV (Tableau 19) et sont en accord avec les données récemment publiées par Badran et al., (2013) (-3,7 ± 0,45 mV). En revanche, les liposomes témoins constitués de Phospholipon 80H ont montré un potentiel zêta négatif autour de -33,2 ± 2,3 mV (Tableau 17). La présence de PE dans la composition du Phospholipon 80H peut expliquer la valeur élevée du potentiel zêta comparée aux Phospholipon 90H et Lipoid S100. En outre, Roy et al. (1998) ont montré une relation linéaire entre le potentiel zêta et la concentration en PE, expliquant ainsi les différences dans les valeurs de potentiel zêta des trois lots de liposomes.

D'autre part, la présence d'une charge à la surface des liposomes empêche leur agrégation (Wiacek et al., 1999 ; Lyklema et al., 1987). Une charge membranaire neutre aboutit à des liposomes de plus grande taille (Roy et al., 1998, Gentine et al., 2012 ; Srisuk et al., 2012). Cela pourrait également expliquer la plus faible taille des vésicules obtenue dans le cas des liposomes constitués de Phospholipon 80H par rapport aux autres types de phospholipides.

Par ailleurs, les liposomes témoins possèdent une distribution de taille assez homogène (pdI ≤ 0,25) (Tableaux 17, 18 et 19). La plus faible valeur de pdI (0,12 ± 0,02) (Tableau 18), et donc la meilleure homogénéité, est obtenue avec les liposomes à base de Phospholipon 90H. Les liposomes témoins constitués de Lipoid S100 possèdent un pdI de 0,21 ± 0,03 (Tableau 19), tandis qu'un pdI plus élevé de l'ordre de 0,36 est obtenu pour les liposomes préparés avec le Lipoid S100 en absence du cholestérol par la méthode d'injection d'éthanol (Karn et al., 2011). Ce résultat peut également confirmer que l'addition du cholestérol pourrait produire une suspension liposomiale plus homogène.

Tableau 18: Caractéristiques des liposomes constitués de Phospholipon 90H et encapsulant l'eugénol et l'HECG.

Phospholipon 90H									
Composition (m/m/m)	**$[Ph]_{liposome}$ (%)**	**Taille (nm)**	**pdI**	**Potentiel zêta (mV)**	**EE (%) Eug**	**EE (%) Eug-Ac**	**EE (%) Crph**	**RE Eug (%)**	**Mole Eug/mole Ph**
Ph/Chol/Eug (10:5:0)	99,7±0,15	275 ± 22 *293 ± 13*	0,12 ± 0,02 *0,12 ± 0,03*	-5,5 ± 1,7	-	-	-	-	-
Ph/Chol/Eug (10:5:1)	98,4±0,35	297 ± 40 *223 ± 53*	0,09 ± 0,01 *0,11 ± 0,05*	-8,3 ± 1,2	54,5 ± 2,29	-	-	35,6 ± 6,0	0,20±0,03
Ph/Chol/Eug (10:5:2,5)	99,7±0,28	305 ± 22* *263 ± 34*	0,11 ± 0,02 *0,26 ± 0,09*	-8,1 ± 2,2	65,4 ± 2,26	-	-	31,5 ± 4,2	0,40±0,03
Ph/Chol/Eug (10:5:5)	99,6±0,63	322 ± 62*	0,14 ± 0,08	-12,2 ± 0,9	71,5 ± 1,07	-	-	23,9 ± 0,4	0,70±0,14
Ph/Chol/HECG (10:5:1)	98,8±0,31	310± 35* *312 ± 14*	0,11 ± 0,04 *0,10 ± 0,00*	-3,8 ± 1,3	50,5 ± 5,54	ND	98,9 ± 1,09	23,3 ± 6,5	0,13±0,03
Ph/Chol/HECG (10:5:2,5)	99,2±0,40	277 ± 26 *280 ± 24*	0,10 ± 0,03 *0,19 ± 0,06*	-4,2 ± 1,8	65,1 ± 1,69	26,5 ± 3,66	97,0 ± 7,9	24,3 ± 1,6	0,29±0,05
Ph/Chol/HECG (10:5:5)	100±0,03	328 ± 25*	0,09 ± 0,02	-3,1 ± 0,4	72,3 ± 2,54	36,6 ± 1,99	84,1± 17,5	23,5 ± 2,3	0,72±0,18

Chol: cholestérol ; ND : non détectable ; Eug : eugénol ; HECG : huile essentielle de clou de girofle, pdI : Indice de polydispersité ;
Ph: phospholipides.
EE (%) Eug, Eug-Ac and Crph: Efficacité d'encapsulation de l'eugénol, eugénol acétate et β-caryophyllène.
$[Ph]_{liposome}$ (%) : taux d'incorporation des phospholipides dans les liposomes.
RE Eug (%): rendement d'encapsulation de l'eugénol.
Les valeurs sont obtenues le jour de la préparation des liposomes. Les valeurs en italiques sont obtenues après 2 mois de stockage à 4 °C.
* indique une valeur significative (P< 0,05) en comparant à la valeur obtenue pour les liposomes témoins en absence de l'Eug et l'HECG.

Tableau 19: Caractéristiques des liposomes constitués de Lipoid S100 et encapsulant l'eugénol et l'HECG.

Lipoid S100									
Composition (m/m/m)	**$[Ph]_{liposome}$ (%)**	**Taille (nm)**	**pdI**	**Potentiel zêta (mV)**	**EE (%) Eug**	**EE (%) Eug-Ac**	**EE (%) Crph**	**RE Eug (%)**	**Mole Eug/mole Ph**
Ph/Chol/Eug (10 :5:0)	67,2 ± 10,0	225±16 *220± 7*	0,21 ± 0,03 *0,22 ± 0,06*	-3,9 ± 1,9	-	-	-	-	-
Ph/Chol/Eug (10:5:1)	86,3±1,74*	236 ± 21 *235 ± 1*	0,18 ± 0,01 *0,29 ± 0,01*	-3,6 ± 1,1	83,9 ± 3,1	-	-	77,7 ± 16,1	0,55±0,09
Ph/Chol/Eug (10:5:2,5)	91,8±1,98*	260 ± 5* *367± 13***	0,25 ± 0,04 *0,51 ± 0,05***	-3,5 ± 0,4	86,6 ± 1,4	-	-	46,9 ± 6,7	0,68±0,09
Ph/Chol/HECG (10:5:1)	75,2±3,97	237 ±23 *277 ± 2*	0,23 ± 0,08 *0,34 ± 0,04*	-4,2 ± 1,8	70,7 ± 6,7	67,8 ± 7,59	94,0 ± 3,76	61,4 ± 11,9	0,50±0,11
Ph/Chol/HECG (10:5:2,5)	85,9±7,53*	223 ±12 *366 ±24***	0,15 ± 0,02 *0,58 ± 0,11***	-3,6 ± 0,9	78,4 ± 2,5	71,2 ± 6,55	87,1 ± 0,93	52,0 ± 6,2	0,83±0,25

Chol: cholestérol ; Eug : eugénol ; HECG : huile essentielle de clou de girofle, pdI : Indice de polydispersité ; Ph: phospholipides.
EE (%) Eug, Eug-Ac and Crph: Efficacité d'encapsulation de l'eugénol, eugénol acétate et β-caryophyllène.
$[Ph]_{liposome}$ (%) : taux d'incorporation des phospholipides dans les liposomes.
RE Eug (%): rendement d'encapsulation de l'eugénol.
Les valeurs sont obtenues le jour de la préparation des liposomes. Les valeurs en italiques sont obtenues après 2 mois de stockage à 4 °C.
* indique une valeur significative (P< 0,05) en comparant à la valeur obtenue pour les liposomes témoins en absence de l'Eug et l'HECG.
** indique une valeur significative (P< 0,05) en comparant à la valeur obtenue immédiatement après la préparation.

8.3. Effet de l'eugénol et de l'HECG sur les caractéristiques des liposomes

L'Eug et l'HECG sont ajoutés à différentes concentrations allant de 1 à 15 mg/ml afin de déterminer leur effet sur les caractéristiques des liposomes.

Par rapport aux liposomes témoins, une augmentation significative de la taille des liposomes est obtenue à une concentration en Eug de 2,5 mg/ml (Tableaux 17, 18 et 19). A une concentration en Eug de 5 mg/ml, la taille des liposomes a continué à augmenter pour les phospholipides Phospholipon 80H et Phospholipon 90H (Tableaux 17 et 18), tandis qu'une large distribution de taille (pdI> 0,4) est obtenue avec le Lipoid S100. C'est ainsi que la plus forte concentration en Eug pour les liposomes constitués de Lipoid S100 est de 2,5 mg/ml (Tableau 19). La taille de Phospholipon 80H-liposomes augmente avec une concentration croissante en Eug de 7,5 à 15 mg/ml (Tableau 17). Un diamètre moyen supérieur à 800 nm et une distribution de taille très large (pdI> 0,5) sont obtenus pour les Phospholipon 90H-liposomes à une concentration en Eug de 7,5 mg/ml. Cette distribution de taille relativement large peut être attribuée à la formation de vésicules géantes ou des agrégats des liposomes (Domazou et al., 2002). Ainsi, lorsque la taille des vésicules est supérieure à 800 nm et/ou la valeur de pdI est au-dessus de 0,4, aucun ajout supplémentaire de l'Eug n'est effectué. L'accumulation de composés lipophiles dans la partie hydrophobe de la membrane perturbe les interactions entre les chaînes d'acides gras des phospholipides, ce qui conduit au gonflement de la bicouche (Sikkema et al., 1995). Ceci est en accord avec Fujisawa et al., 1982, qui ont mentionné que l'Eug, à forte concentration, exerce un effet solubilisant sur les liposomes multilamellaires constitués de la lécithine et du cholestérol.

De plus, l'addition d'HECG a également augmenté la taille des liposomes constitués de Phospholipon 80H et 90H (Tableaux 17 et 18) sans affecter la taille de Lipoid S100 liposomes (Tableau 19). D'autres HEs comme le cinéole, le limonène, le citral et leur mélange produisent une augmentation de la taille des liposomes formés de phosphatidylcholine de soja insaturée et préparés par hydratation du film lipidique (Dragicevic-Curicet al., 2009). Egalement, la taille des liposomes préparés par la méthode d'hydratation du film lipidique augmente avec le rapport lipide:l'huile de lavandin (Varona et al., 2011).

Récemment, l'interaction de cinq composés phénoliques : le propofol, le thymol, le carvacrol, le chlorothymol et l'eugénol, avec les liposomes constitués d'EPC est démontrée par ^{1}H RMN (Reiner et al., 2013). Ces phénols se localisent dans la région entre les groupes polaires des

phospholipides (molécule de choline), le squelette de glycérol et les premiers atomes des chaînes d'acides gras. En se basant sur ces données, nous avons proposé la Figure 35 pour illustrer l'incorporation de l'Eug dans les liposomes. Le cycle aromatique et le groupement allyle de l'Eug sont intercalés à l'intérieur de la bicouche lipidique, tandis que les groupements hydroxyles et méthoxy sont orientés vers les têtes polaires des phospholipides (Figure 35). Cette localisation réduit les forces de répulsion entre les groupements de tête polaires des phospholipides, ce qui diminue la mobilité des chaînes hydrocarbonées (Reiner et al., 2013). L'Eug a montré une forte interaction hydrophobe entre son groupe allyle ($-CH_2-CH=CH_2$) et les chaînes d'acides gras des phospholipides des liposomes (Fujisawa et al., 1988). Ainsi, une fois incorporé, l'Eug ne peut pas diffuser de la bicouche (Fujisawa et al., 1988), ce qui peut expliquer l'augmentation de la taille des vésicules (Tableaux 17, 18 et 19).

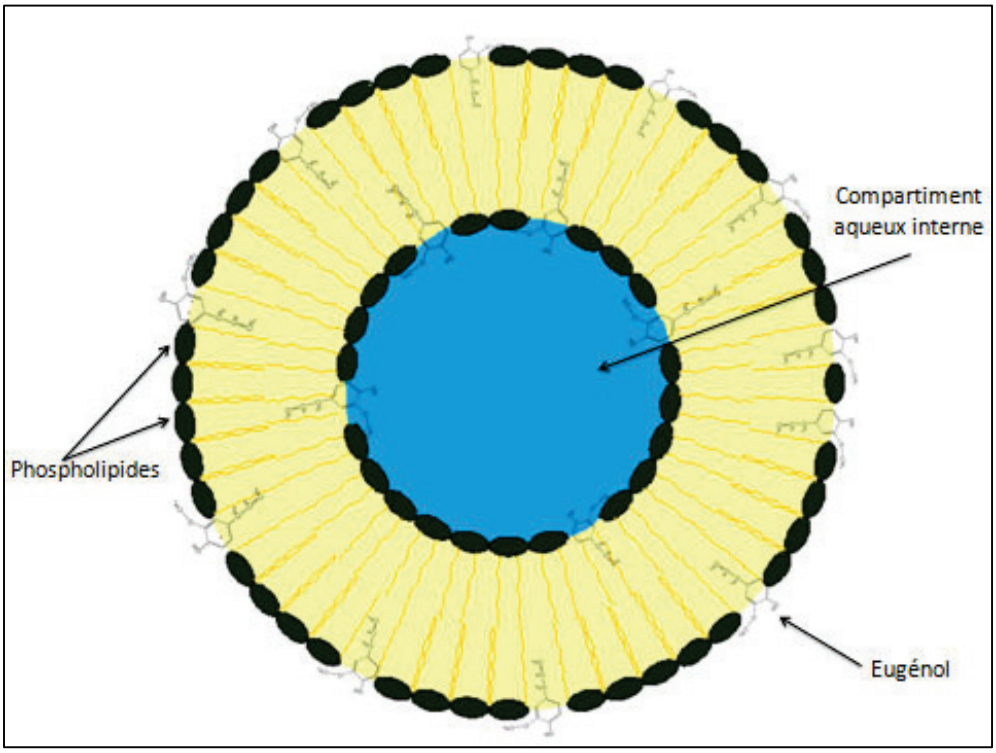


Figure 35 : Incorporation de l'eugénol dans les liposomes.

De plus, les valeurs de pdI et de potentiel zêta des liposomes encapsulant l'Eug et l'HECG ne diffèrent pas significativement de celles obtenues avec les liposomes témoins. L'HECG et l'Eug

n’affectent pas donc ni la distribution de taille des liposomes ni leur charge membranaire dans la gamme de concentration utilisée quelque soit le type de phospholipide (Tableaux 17, 18 et 19).

8.4. Détermination de l’efficacité d’encapsulation des constituants de l’HECG dans les liposomes par HPLC

La concentration en Eug, Eug-Ac et Crph dans les suspensions liposomiales et leurs surnageants est déterminée par HPLC comme il est décrit dans les matériels et méthodes (paragraphe 7.6.3).

La Figure 36A et B représente les chromatogrammes utilisés respectivement pour le dosage de l'Eug et l’HECG, où le thymol est utilisé comme étalon interne. Les temps de rétention de l’Eug, l’Eug-Ac, le Crph et le thymol sont respectivement de 3,62 ± 0,08, 4,76 ± 0,18, 19,44 ± 0,37 et 6,50 ± 0,14 min.

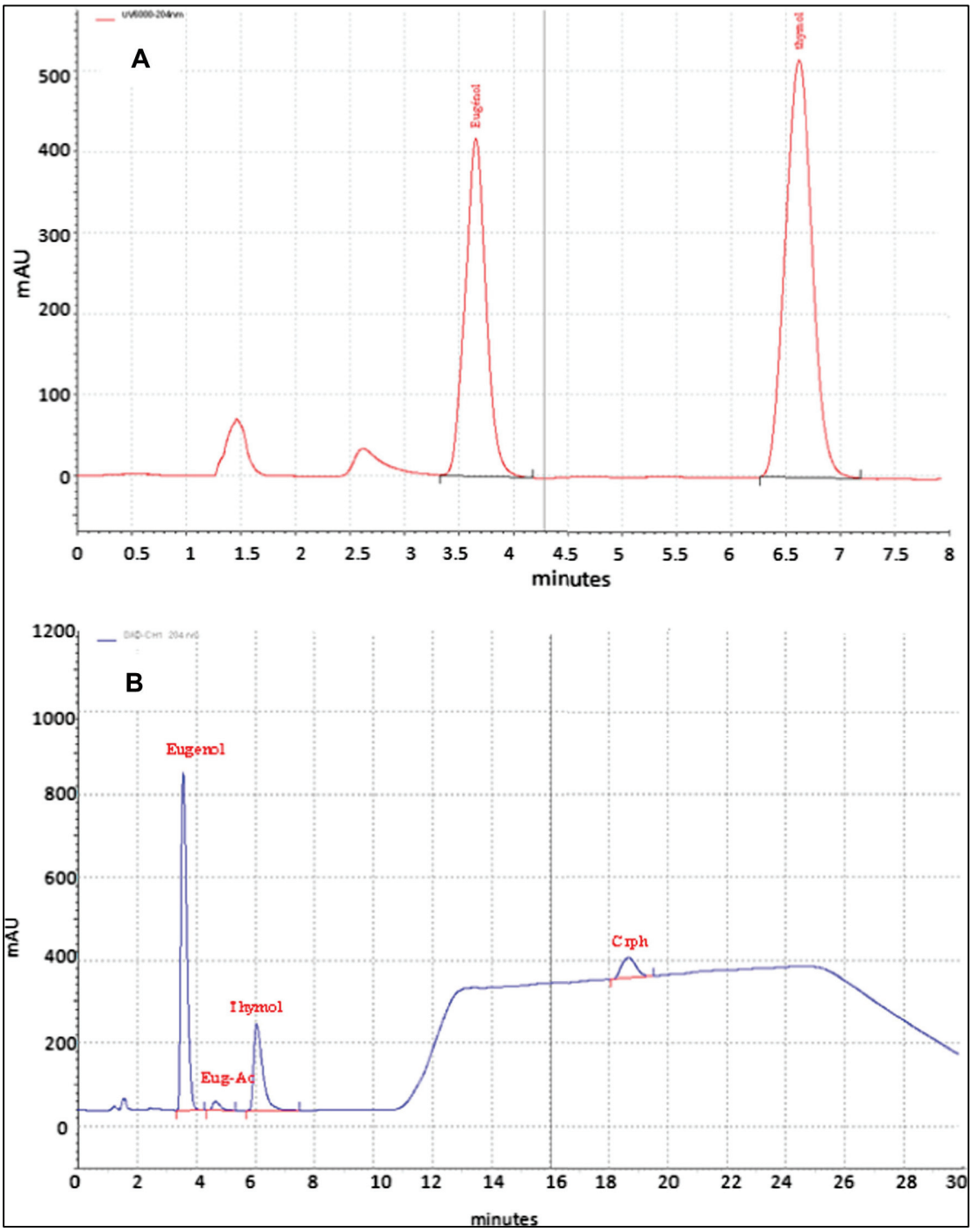


Figure 36: Les chromatogrammes utilisés pour le dosage de l'Eug (A) et l'HECG (B).

Les droites d'étalonnage et leurs équations utilisées pour le calcul des concentrations des constituants de l'HECG sont représentées dans la Figure 37.

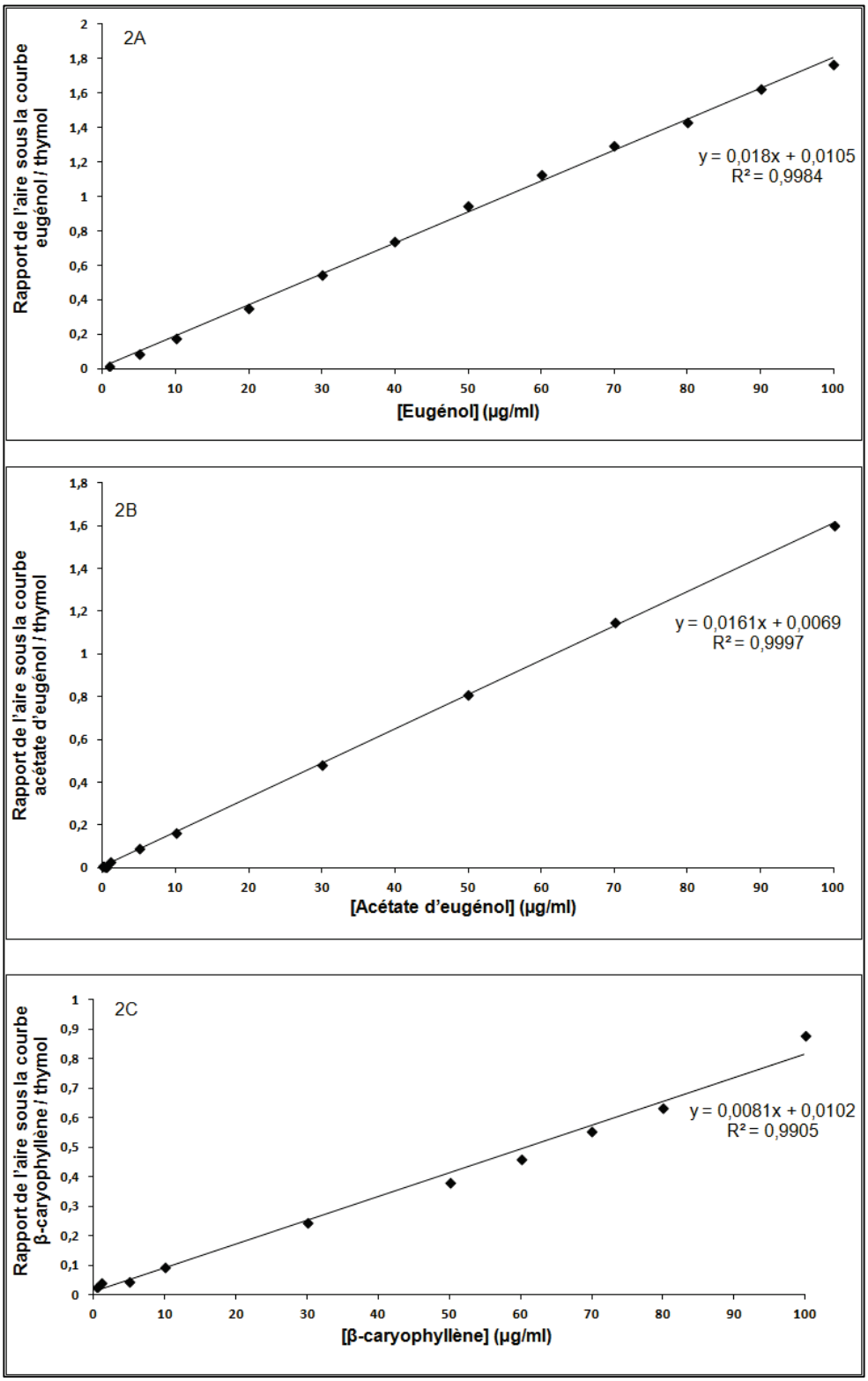


Figure 37: Courbes d'étalonnage utilisées pour le dosage de l'Eug (A), Eug-Ac (B) et Crph (C).

En utilisant les trois types de phospholipides, les résultats du dosage ont révélé que l'efficacité d'encapsulation de l'Eug dans les liposomes augmente avec la concentration croissante en Eug et en HECG dans la phase organique (Tableaux 17, 18 et 19). Le taux d'incorporation de l'Eug par mole de phospholipides augmente également de manière concentration-dépendante (Tableaux 17, 18 et 19). Un résultat similaire est obtenu avec l'HE de lavandin qui est davantage incorporée dans les liposomes en augmentant sa quantité ajoutée dans la phase organique (Varona et al., 2011). De plus, l'efficacité d'encapsulation de l'Eug était supérieure à celle obtenue lorsque l'Eug est un constituant de l'HECG (Tableaux 17, 18 et 19). Cette huile contient 93,5 % d'Eug, ce qui peut expliquer d'une part la valeur inférieure de l'efficacité d'encapsulation par rapport à l'Eug libre. D'autre part, les autres constituants de l'HECG, l'Eug-Ac et le Crph, qui sont plus hydrophobes que l'Eug, peuvent entrer en compétition avec l'Eug pour s'incorporer dans la bicouche lipidique.

Selon Sinico et al., 2005, l'hydrogénation des phospholipides n'a pas montré d'effet sur l'efficacité d'encapsulation de l'HE d'*Artemisia arborescens* dans les liposomes préparés par hydratation du film lipidique (74,1 ± 0,35 % et 71,4 ± 0,58 % pour respectivement des P90 MLV préparés à température ambiante et P90H MLV préparés à 60 °C) (Sinico et al., 2005). Les liposomes constitués de dioléylphosphatidylcholine insaturés ont montré une efficacité d'encapsulation de l'HE d'*Anethi fructus* de 77 %, inférieure à celle obtenue avec les liposomes constitués de DPPC saturés (97 %) (Ortan et al., 2009). Nos résultats ont montré des efficacités d'encapsulation d'Eug plus élevées pour les liposomes constitués de Lipoid S100 insaturés (Tableau 19) comparées à celles obtenues dans le cas des liposomes constitués de Phospholipon 80H et 90H saturés. Ceci s'est expliqué par le fait qu'une température plus élevée est exigée pendant la préparation des liposomes constitués de phospholipides hydrogénés, grâce à leur température de transition plus élevée, aboutissant probablement à la perte de l'Eug volatile.

8.5. Rendement d'encapsulation de l'eugénol

Parmi les trois types de phospholipides et à la même concentration en Eug, les valeurs du rendement d'encapsulation de l'eugénol les plus élevées ont été obtenues avec le Lipoid S100 (Tableaux 17, 18 et 19). En effet, les bicouches lipidiques constituées de Lipoid S100 insaturés

sont moins condensées et plus flexibles que celles constituées des phospholipides saturés Phospholipon 80H et 90H, conduisant à une incorporation plus élevée en Eug.

8.6. Détermination du taux d'incorporation des phospholipides en absence et présence de l'Eug et l'HECG

Afin de calculer l'encapsulation pondérée de l'Eug dans les liposomes qui est le nombre de mol d'Eug incorporé par mole de phospholipides dans les liposomes formés nous avons réalisé le dosage de phospholipides en utilisant la méthode de Bartlett (Bartlett, 1959). La concentration des phospholipides est déterminée dans la suspension liposomiale et dans les surnageants obtenus par ultracentrifugation. La courbe utilisée pour le calcul de la concentration en phospholipides est représentée dans la Figure 38.

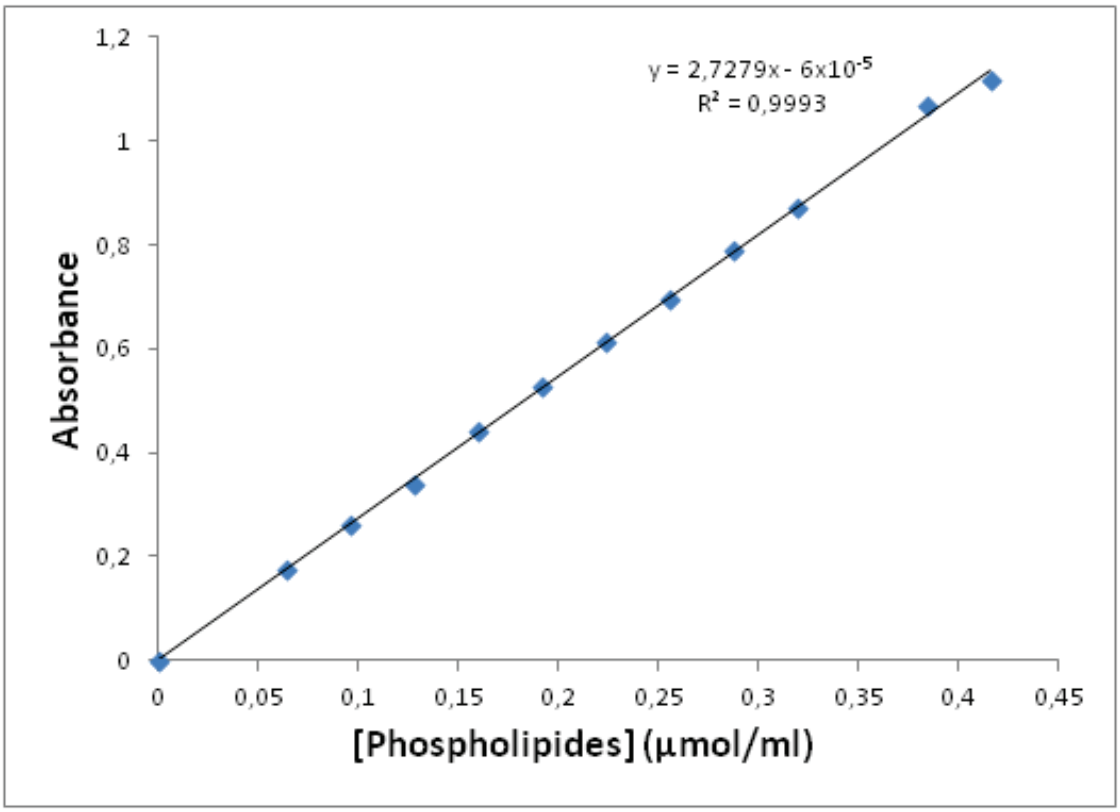


Figure 38: Courbe d'étalonnage utilisée pour le dosage des phospholipides.

Le taux d'incorporation des phospholipides était de 91,6 ± 4,09, 99,7 ± 0,15 et 67,2 ± 10,0 % pour les liposomes témoins constitués respectivement de Phospholipon 80H, Phospholipon 90H

et Lipoid S100 (Tableaux 17, 18 et 19). Cela montre que les phospholipides saturés participent davantage à la formation des liposomes que les phospholipides insaturés, et plus particulièrement le Phospholipon 90H en raison de sa teneur élevée en phosphatidylcholine (90 %) et sa simple composition.

En fonction du type de phospholipide utilisé, un effet variable de l'Eug sur le taux d'incorporation des phospholipides dans les liposomes est démontré.

Par comparaison aux liposomes témoins constitués de Phospholipon 80H, le dosage des phospholipides a montré que l'encapsulation des constituants de l'HECG ou l'Eug a entraîné une diminution significative du taux d'incorporation des phospholipides dans les liposomes (Tableau 17). En outre, une augmentation du taux d'incorporation de l'Eug par mole de phospholipides avec une concentration croissante en Eug (Tableau 17) suggère que l'Eug a pris la place des molécules lipidiques dans les liposomes, conduisant à 0,99 et 1 mole d'Eug/mole de phospholipides à la plus forte concentration en Eug ou l'HECG (Tableau 17). D'autres auteurs ont montré qu'en interagissant avec la membrane, le p-cymène et le carvacrol affectent la composition lipidique de la membrane en prenant la place des molécules lipidiques (Cristani et al., 2007). Indépendamment de leur localisation, la présence des monoterpènes peut générer des tensions et affecter la stabilité de la membrane liposomiale (Turina et al., 2006). Ceci peut aussi causer une faible incorporation des phospholipides dans les vésicules (Tableau 17). Contrairement au Phospholipon 90H et Lipoid S100, il est important de mentionner que le Phospholipon 80H est un mélange de phosphatidylcholine et de la phosphatidyléthanolamine ayant respectivement les groupements de tête polaire CH_2-CH_2-N $(CH_3)_3^+$ et CH_2-CH_2-NH_3^+. Cette hétérogénéité peut causer des espaces dans les bicouches formées de Phospholipon 80H, dans lesquels les constituants d'HECG peuvent entrer et perturber l'organisation des phospholipides dans les vésicules.

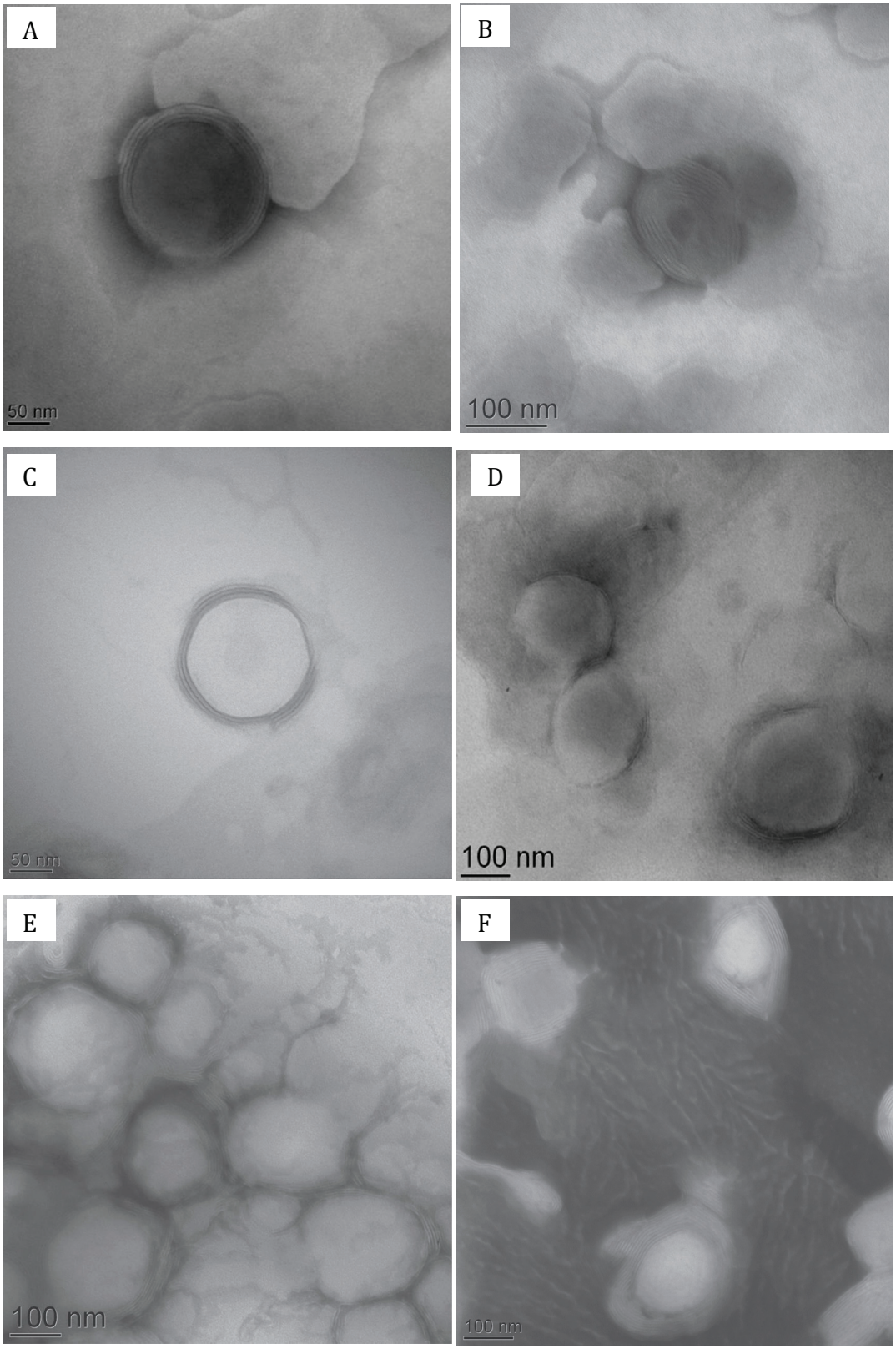
En utilisant le Phospholipon 90H, les résultats du dosage de phospholipide ont révélé que le surnageant en est dépourvu et qu'au moins 99 % de phospholipides sont capables de former des liposomes (Tableau 18). Les résultats n'ont pas montré un effet de l'Eug sur l'incorporation des phospholipides dans les liposomes.

En utilisant le Lipoid S100, l'Eug a amélioré l'incorporation des phospholipides dans les liposomes. Par rapport aux vésicules témoins constituées du Lipoid S100 (67,2 ± 10%), le taux d'incorporation des phospholipides dans les liposomes augmente significativement avec une concentration croissante en Eug (Tableau 19). L'Eug augmente la fluidité de la membrane des liposomes en diminuant la T_m des DPPC (Fujisawa et al., 1988; Manabe et al., 1987) et les variations d'enthalpie (ΔH) (Fujisawa et al., 1987). Une diminution de la viscosité de la monocouche lors de l'incorporation des composés phénoliques, y compris l'Eug, facilite davantage leur incorporation (Reiner et al., 2013). Par conséquent, nous pouvons aussi suggérer une augmentation du taux d'incorporation des phospholipides due à une augmentation de la fluidité de la membrane.

8.7. Morphologie des liposomes

Les liposomes préparés en absence et présence de l'Eug et de l'HECG par la méthode d'injection d'éthanol sont observés au microscope électronique à transmission. La Figure 39 représente les images obtenues pour ces différents lots de liposomes.

Les images de TEM obtenues pour les liposomes témoins constitués de Phospholipon 80H, Phospholipon 90H et Lipoid S100 révèlent la présence des vésicules sphériques, oligolamellaires, et de taille nanométrique conformément aux résultats de taille obtenus par DLS (Figure 39). D'un point de vue morphologique, il n'y a pas de différence observée entre les liposomes témoins et ceux encapsulant l'Eug ou l'HECG pour les trois types de phospholipides utilisés. Il faut noter que certaines structures non-sphériques sont observées avec le Lipoid S100 en présence d'Eug ou d'HECG (Figure 39 I).


A
50 nm
B
100 nm
C
50 nm
D
100 nm
E
100 nm
F
100 nm

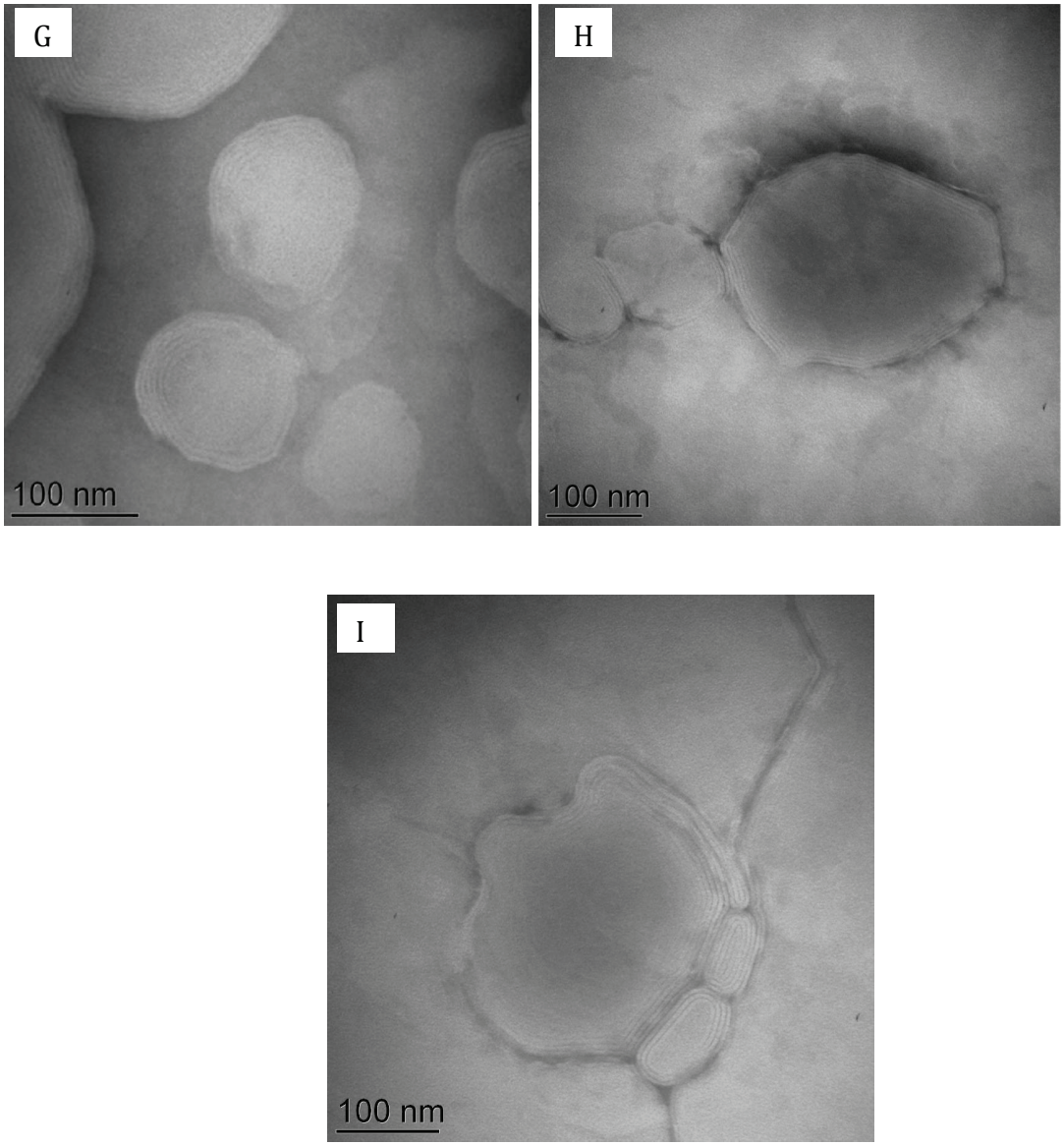


Figure 39 : Images obtenues par TEM pour des échantillons des suspensions liposomiales préparées par injection d'éthanol à petite échelle. (A,B,C) : des liposomes constitués de Phospholipon 80H témoins (A), encapsulant l'HECG à une concentration de 2,5 mg/ml (B) et l'Eug à 12,5 mg/ml (C). (D,E,F) : des liposomes constitués de Phospholipon 90H témoins (D), encapsulant l'HECG à une concentration de 1 mg/ml (E) et 2,5 mg/ml (F). (G,H,I) : des liposomes constitués de Lipoid S100 témoins (G) et encapsulant l'HECG à une concentration de 2,5 mg/ml (H, I).

8.8. Stabilité des liposomes

8.8.1. Stabilité physico-chimique

La stabilité des liposomes témoins et encapsulant l'Eug ou l'HECG préparés par la méthode d'injection éthanolique est examinée en déterminant la taille, le pdI et l'efficacité d'encapsulation des constituants de l'HECG après 2 mois de stockage à 4 °C. En utilisant les trois types de phospholipides, les liposomes témoins se sont montrés être stables et ont conservé leur taille et leur pdI durant leur stockage à 4 °C (Tableaux 17, 18 et 19). Les liposomes encapsulant l'Eug et l'HECG constitués des phospholipides saturés Phospholipon 80H et 90H (Tableaux 17 et 18) ont prouvé une plus grande stabilité que ceux constitués du Lipoid S100 insaturé. En fait, une augmentation de la taille et du pdI des Lipoid S100 liposomes est observée à une concentration en Eug ou HECG de 2,5 mg/ml (Tableau 19).

Toutefois, les valeurs de l'efficacité d'encapsulation des constituants de l'HECG déterminées après 2 mois de stockage à 4 °C étaient identiques à celles déterminées le jour de la préparation. Ceci montre que les liposomes protègent l'HECG durant leur stockage.

8.8.2. Photostabilité de l'Eug en solution aqueuse et dans les liposomes

La photostabilité de l'Eug en solution aqueuse et dans les liposomes est examinée après irradiation aux rayons UVC. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'Eug restant et présentés dans la Figure 40.

Les solutions aqueuses d'Eug conservées à température ambiante dans l'obscurité sont stables, avec plus de 80 % d'Eug demeurant en solution après 96 h d'irradiation. Une diminution remarquable de la concentration d'Eug est obtenue dans les solutions aqueuses exposées aux rayons UVC, où le pourcentage d'Eug restant est respectivement de 58 et de 2,9 % après 10 et 96 h. Les différents lots de liposomes protègent l'Eug contre la dégradation induite par l'irradiation aux rayons UVC. Ainsi, le pourcentage d'Eug restant après 10 h d'irradiation était de 82, 91 et 95 % pour les liposomes constitués respectivement de Phospholipon 80H, Phospholipon 90H et Lipoid S100 (Figure 40). Les Lipoid S100-liposomes présentent la meilleure protection contre l'irradiation aux rayons UVC (Figure 40), ceci peut être dû à la flexibilité de la membrane permettant une incorporation profonde de l'Eug dans la bicouche lipidique.

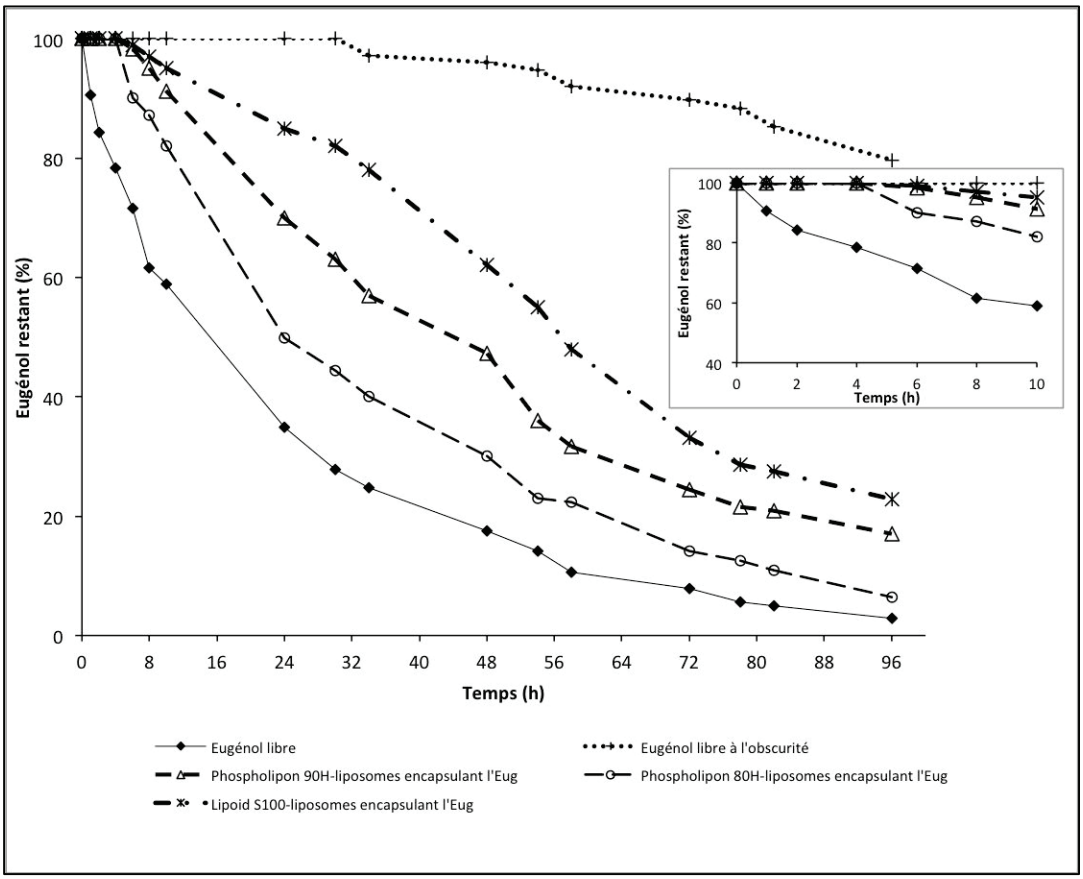


Figure 40 : Photostabilité de l'Eug libre en solution aqueuse et encapsulé dans les liposomes après irradiations aux rayons UVC.

8.9. Activité anti-oxydante de l'Eug libre et encapsulé dans les liposomes à petite échelle

L'activité anti-oxydante par piégeage du radical DPPH• de l'Eug libre et encapsulé dans les liposomes préparés à petite échelle a été étudiée (Figure 41). L'Eug a montré une activité anti-oxydante prononcée (79,3 %), qui est en accord avec la littérature (Ogata et al., 2000). Le mécanisme de l'activité anti-oxydante de l'Eug proposé par Brand-Williams et al (1995) est décrit dans le chapitre 4 (paragraphe 4.2.3.6.7).

Les liposomes constitués de Phospholipon 80H, Phospholipon 90H et Lipoid S100 encapsulant l'Eug ont présenté une activité du piégeage du radical DPPH• similaire à celle de l'Eug libre, indiquant une formulation de liposomes adéquate pour maintenir l'activité anti-oxydante de l'Eug. D'autre part, ce résultat obtenu peut également confirmer la localisation de l'Eug à l'interface hydrophobe-hydrophile avec ses groupements hydroxyles orientés vers les têtes polaires des phospholipides.

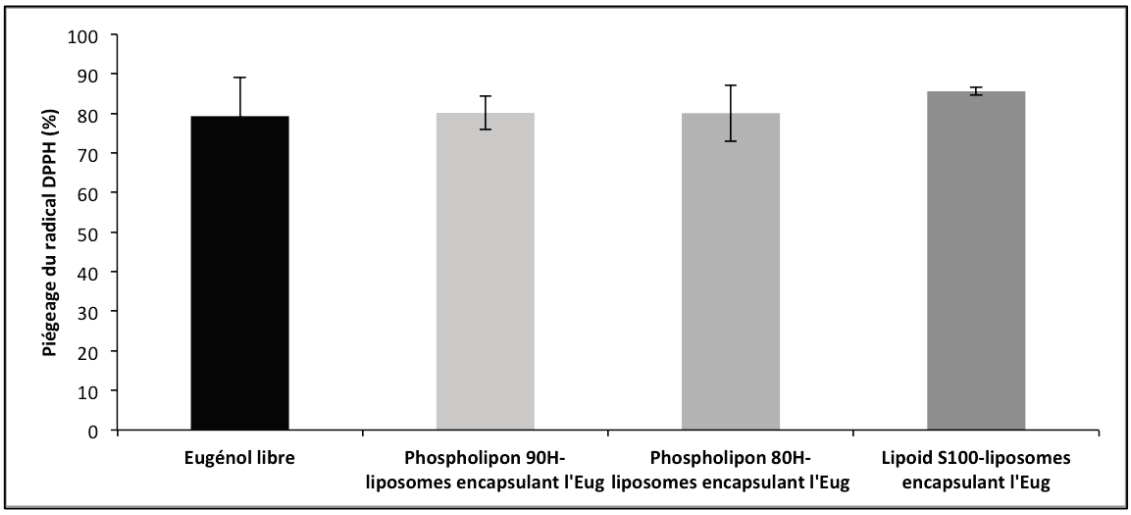


Figure 41: Activité anti-oxydante de l'Eug libre et encapsulé dans les liposomes constitués de Phospholipon 80H, Phospholipon 90H et Lipoid S100 par piégeage du radical DPPH•.

8.10. Production des liposomes encapsulant l'HECG et l'Eug à grande échelle

Nous avons optimisé la préparation des liposomes encapsulant l'HECG et l'Eug à petite échelle par la méthode d'injection d'éthanol. Nous avons démontré que tous les lots de liposomes constitués de différents types de phospholipides (Phospholipon 80H, Phospholipon 90H et Lipoid S100) à une concentration de 2,5 mg/ml protègent l'Eug contre la dégradation induite par les rayons UVC. De plus, ces différents lots de liposomes ont maintenu l'activité anti-oxydante des solutions aqueuses de l'Eug libre. Il est ainsi intéressant de produire des volumes plus importants de liposomes encapsulant ces deux principes actifs, à échelle industrielle.

Comme l'ajout du cholestérol était essentiel pour l'homogénéité des liposomes à petite échelle, il est important de noter que les vésicules préparées à grande échelle contiennent aussi du cholestérol dans leur formulation. En outre, selon le concept proposé par Lasic, 1988, les phospholipides dans la phase organique précipitent par dilution immédiate de l'éthanol dans la phase aqueuse, formant des fragments de bicouches planes qui produisent eux-mêmes des liposomes (Lasic, 1988). Le cholestérol est mélangé avec les phospholipides dans le solvant organique avant leur précipitation en BPF et la formation des liposomes. Il ne semble pas ainsi affecter le mécanisme de formation de liposomes par la méthode d'injection d'éthanol, même s'ils sont préparés à grande échelle.

8.10.1. Caractéristiques des liposomes témoins en termes de taille, pdI et potentiel zêta

Nous avons tout d'abord utilisé le contacteur à membrane pour produire des volumes intermédiaires de liposomes, en augmentant 20 fois les volumes des deux phases aqueuse et organique aboutissant à un volume final de préparation de 600 ml en 36 s.

Deux types de phospholipides (Phospholipon 90H et Lipoid S100) ont été utilisés. En comparant au Phospholipon 80H, les liposomes constitués de Lipoid S100 préparés à petite échelle ont présenté un meilleur effet protecteur de l'Eug contre les rayons UVC, une efficacité d'encapsulation et un rendement d'encapsulation de l'Eug élevés. Une protection de l'Eug contre la dégradation induite par les rayons UVC, une bonne homogénéité et stabilité des liposomes sont également obtenues avec le Phospholipon 90H à petite échelle.

Les liposomes témoins ont été tout d'abord maintenus sous agitation magnétique à différentes vitesse d'agitation (600, 800, 1000 et 1200 rpm), ensuite caractérisés en termes de taille et de pdI. La vitesse d'agitation de 600 rpm a été choisie pour les expériences suivantes, en permettant la préparation des vésicules homogènes (pdI = 0,093) et de petites tailles (214,2 nm). En outre, les liposomes témoins préparés à une vitesse d'agitation de 800, 1000 et 1200 rpm ont présenté respectivement une taille de 249,1 nm ; 274,8 et 312,9 nm et un pdI de 0,111 ; 0,100 et 0,193.

Les Figures 42 et 43 résument les caractéristiques (taille, pdI et potentiel zêta) des liposomes préparés par le contacteur à membrane en utilisant respectivement le Phospholipon 90H et le Lipoid S100. Préparés par le contacteur à membrane, les liposomes témoins présentent respectivement une taille moyenne, un pdI et un potentiel zêta de 270 ± 37 nm, 0,12 ± 0,03 et -3,9 ± 1,7 mV en utilisant le Phospholipon 90H (Figure 42) et 194 ± 34 nm, 0,23 ± 0,05 et -6,3 ± 0,6 mV en utilisant le Lipoid S100 (Figure 43). Ces paramètres sont proches de ceux obtenus à petite échelle en utilisant une pompe à seringue pour l'injection de la phase organique dans la phase aqueuse (Tableaux 18 et 19).

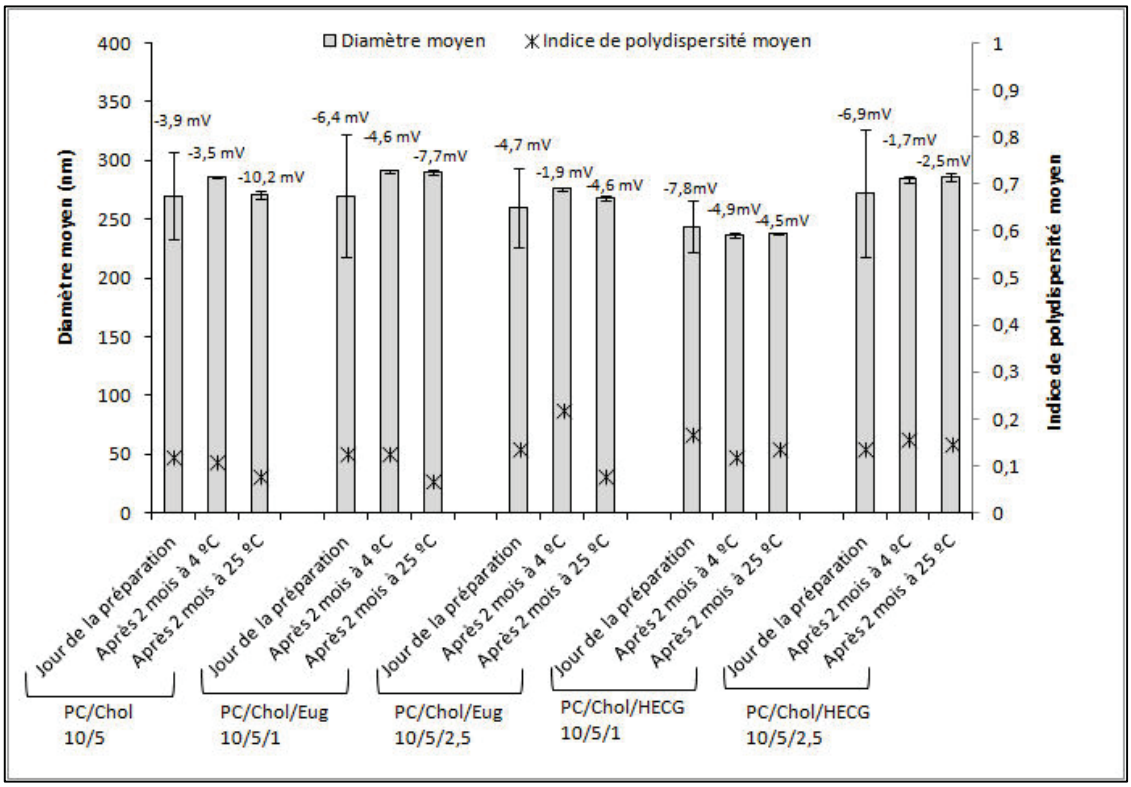


Figure 42: Caractéristiques des liposomes constitués de Phospholipon 90H encapsulant l'Eug et l'HECG préparés par contacteur à membrane le jour de la préparation et après 2 mois de stockage à 4 et 25 °C.

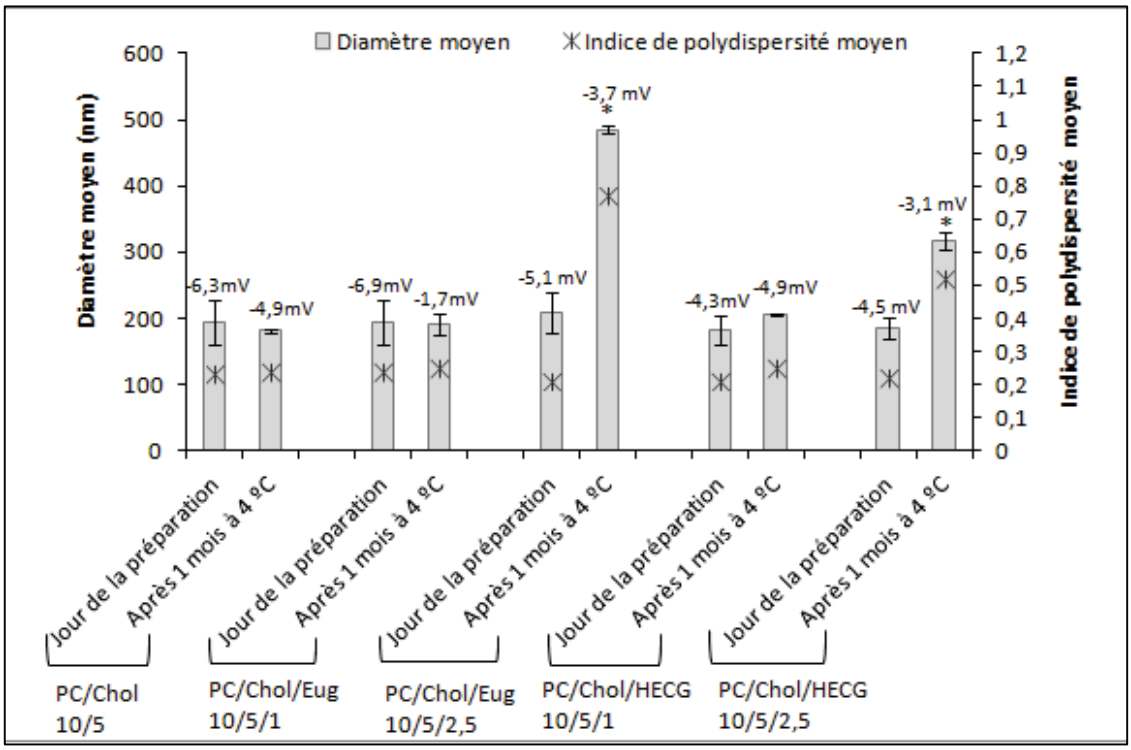


Figure 43: Caractéristiques des liposomes constitués de Lipoid S100 encapsulant l'Eug et l'HECG préparés par contacteur à membrane le jour de la préparation et après 1 mois de stockage à 4 °C.

Nous avons ensuite préparé, en utilisant le Phospholipon 90H, de plus grands volumes de liposomes par le pilote équipé d'une membrane, et ceci en augmentant 100 fois les volumes des deux phases aqueuse et organique par rapport à la méthode utilisée à petite échelle et 5 fois par rapport au contacteur à membrane conduisant à la préparation de 3 L de liposomes en environ 6 min. La suspension liposomiale est divisée en deux lots identiques de 1.5 L. L'éthanol est soit éliminé directement sur le pilote soit par évaporation rotative. Les caractéristiques en termes de taille, pdI et potentiel zêta des liposomes obtenus par le pilote en utilisant ces deux méthodes d'évaporation d'éthanol sont présentées dans la Figure 44.

Les liposomes témoins formés de Phospholipon 90H obtenus après évaporation de l'éthanol sur le pilote possèdent une taille moyenne de 247 ± 17 nm, un pdI de 0,12 ± 0,02 et un potentiel zêta de -8,7 ± 3,5 mV (Figure 44). Ces valeurs étaient similaires à celles obtenues par ce même procédé mais en utilisant le rotavapeur pour l'évaporation de l'éthanol (Figure 44), par le

contacteur à membrane (Figure 42) ou bien par la pompe à seringue à petite échelle (Tableau 18). L'évaporation de l'éthanol réalisée sur le pilote présente les avantages d'être un procédé continu et simple.

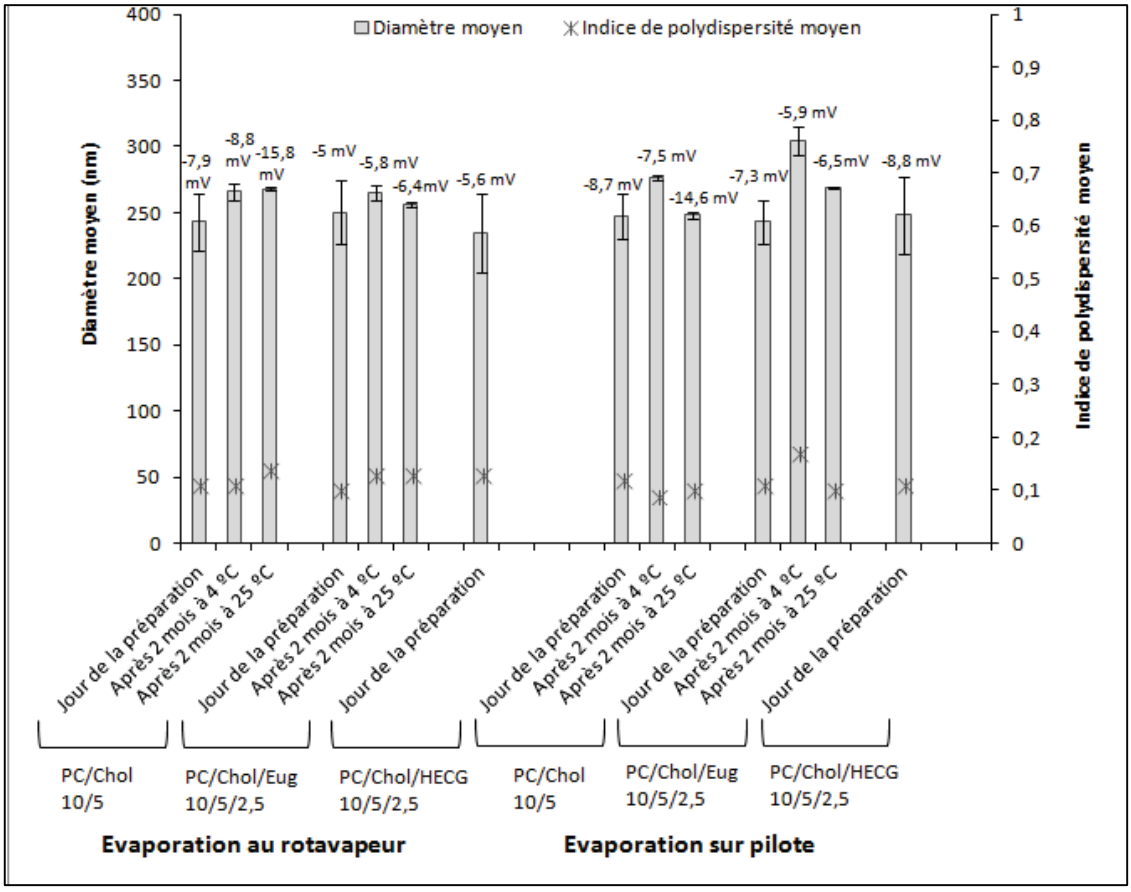


Figure 44 : Caractéristiques des liposomes constitués de Phospholipon 90H encapsulant l'Eug et l'HECG préparés par pilote et évaporés soit directement sur le pilote soit par évaporation rotative le jour de la préparation et après 2 mois de stockage à 4 et 25 °C.

8.10.2. Caractéristiques des liposomes encapsulant l'Eug et l'HECG en termes de taille, pdI et potentiel zêta

Des résultats similaires en terme de taille, de pdI et de potentiel zêta ont été obtenus pour les liposomes formés de Phospholipon de 90H et encapsulant l'Eug et l'HECG à une concentration de 2,5 mg/ml en utilisant le contacteur à membrane et le pilote quelque soit la méthode

d'évaporation (Figures 42 et 44). Ceci indique une reproductibilité et une efficacité des procédés de préparation à grande échelle.

Par rapport aux liposomes témoins, l'encapsulation de l'Eug et l'HECG n'a pas affecté significativement la taille des liposomes, le pdI et le potentiel zêta quelque soit le type de phospholipide et les méthodes de préparation utilisées à grande échelle (Figures 42, 43 et 44). L'incorporation d'autres molécules hydrophobes comme l'α-tocophérol dans des liposomes formés de Lipoid S100 et préparés par la méthode d'injection d'éthanol, le contacteur à membrane et le pilote équipé d'un tube et d'une membrane ne produit pas également de modification de la taille et du pdI des liposomes par rapport aux liposomes témoins (Charcosset et al., 2015).

D'autre part, en utilisant le contacteur à membrane et le pilote, les tailles des liposomes formés de Phospholipon 90H (Figures 42 et 44) et de Lipoid S100 (Figure 43) contenant l'Eug et l'HECG étaient plus petites que celles des liposomes préparés par la méthode d'injection d'éthanol à petite échelle (Tableaux 18 et 19). Ceci peut être expliqué par le fait que le contacteur à membrane et le pilote équipés d'une membrane pour l'injection améliorent le micromélange de la phase organique dans la phase aqueuse. Ces procédés permettent une production en continu de liposomes à grande échelle, et par conséquent peuvent améliorer les caractéristiques obtenues par la méthode d'injection d'éthanol (Laouini et al., 2012b).

8.10.3. Détermination de taux d'incorporation de phospholipides en absence et en présence de l'Eug et l'HECG

Les tableaux 20 et 21 présentent les caractéristiques (taux d'incorporation de phospholipides, efficacité d'encapsulation des constituants de l'HECG, rendement d'encapsulation de l'Eug et encapsulation pondérée de l'Eug) des liposomes encapsulant l'Eug et l'HECG préparés par contacteur à membrane en utilisant respectivement le Phospholipon 90H et Lipoid S100. Les caractéristiques des Phospholipon 90H-liposomes encapsulant l'Eug et l'HECG préparés par pilote sont présentées dans le Tableau 22. Le taux d'incorporation de phospholipides est déterminé selon l'équation 3 décrite dans les matériels et méthodes (paragraphe 7.6.5).

En utilisant le Phospholipon 90H, des quantités négligeables de phospholipides sont obtenues dans les surnageants des liposomes en absence et en présence de l'Eug et l'HECG quelque soit la méthode de préparation (contacteur à membrane ou pilote) et d'évaporation (évaporation par rotavapeur ou sur le pilote) des liposomes. En effet, le taux d'incorporation de phospholipides dans les liposomes était supérieur à 96% (Tableaux 20 et 22). Ces résultats ont indiqué que la quasi-totalité de la quantité de phospholipides est utilisée pour former des liposomes, ce qui confirme l'efficacité de la méthode. Ce résultat est également obtenu à petite échelle (Tableau 18).

Tableau 20: Caractéristiques des liposomes constitués de Phospholipon 90H et encapsulant l'Eug et l'HECG par contacteur à membrane.

Composition (m/m/m)	**$[Ph]_{liposome}$ (%)**	**Durée des préparations (s)**	**EE (%) Eug**	**EE (%) Eug-Ac**	**EE (%) Crph**	**RE Eug (%)**	**Mole Eug/Mole Ph**
Ph/Chol (10:5)	96,2 ± 2,19	36 ± 1,7	-	-	-	-	-
Ph/Chol/Eug (10:5:1)	97,8 ± 0,67	36 ± 1,7	84,3±5,4 *94,3±0,7***	-	-	61,7±9,2 *69,2±9,1*	0,38±0,15
Ph/Chol/Eug (10:5:2,5)	98,9 ± 0,5	36 ± 1,4	77,0±5,7 95,2±3,8**	-	-	59,5±7,8 *62,3±8,0*	0,56±0,04
Ph/Chol/HECG (10:5:1)	98,1 ± 1,47	36 ± 0,6	82,6±4,3 *97,1±0,3***	77,9±1,0 *81,7±0,2*	89,0±4,4 *90,7±5,0*	52,3±8,9 *61,3±9,1*	0,21±0,04
Ph/Chol/HECG (10:5:2,5)	97,9 ± 1,95	36 ± 1,8	76,1±9,9 *98,3±0,7***	73,8±0,7 *85,9±2,2*	84,9±8,4 *91,7±2,9*	57,0±2,1 *53,3±1,9*	0,48±0,10

Ph: phospholipides ; Chol: cholestérol ; Eug : eugénol ; HECG : huile essentielle de clou de girofle.EE (%) Eug, Eug-Ac and Crph: Efficacité d'encapsulation de l'eugénol, eugénol acétate et β-caryophyllène.
$[Ph]_{liposome}$ (%) : taux d'incorporation des phospholipides dans les liposomes.
RE Eug (%): rendement d'encapsulation de l'eugénol.
Les valeurs sont obtenues le jour de la préparation des liposomes. Les valeurs en italiques sont obtenues après 2 mois de stockage à 4 °C.
* indique une valeur significative (P< 0,05) en comparant à la valeur obtenue pour les liposomes témoins en absence de l'Eug et l'HECG.
** indique une valeur significative (P< 0,05) en comparant à la valeur obtenue immédiatement après la préparation.

Pour le Lipoid S100, les résultats de dosage de phospholipides obtenus à grande échelle (Tableau 21) étaient similaires à ceux obtenus à petite échelle (Tableau 19), où la présence d'Eug et d'HECG a induit une augmentation du taux d'incorporation des phospholipides dans les liposomes par comparaison aux liposomes témoins. Ceci peut être dû à la capacité de l'Eug à induire une augmentation dans la fluidité de la membrane. En se basant sur la théorie de Lasic (1988), en plus de la dissipation d'énergie dans le système, la présence de l'Eug dans la phase organique peut aider les BPFs à réduire l'exposition de leurs parties hydrophobes à l'environnement aqueux, ce qui entraîne la courbure de ces fragments donnant lieu à une structure quasi-sphérique.

Tableau 21: Caractéristiques des liposomes constitués de Lipoid S100 et encapsulant l'eugénol et l'HECG par contacteur à membrane.

Composition (m/m/m)	**$[Ph]_{liposome}$ (%)**	**Durée des préparations (s)**	**EE (%) Eug**	**EE (%) Eug-Ac**	**EE (%) Crph**	**RE Eug (%)**	**Mole Eug/Mole Ph**
Ph/Chol (10:5)	75,8±10,0	35 ± 1,2	-	-	-	-	-
Ph/Chol/Eug (10:5:1)	83,3±4,0	36 ± 2,5	92,1±3,5 *94,5±1,3*	-	-	69,5±0,4 *73,6±3,4*	0,45±0,1
Ph/Chol/Eug (10:5:2,5)	94,2±2,6*	36 ± 2,6	86,9±2,5 *87,8±5,6*	-	-	74,1±11,5 *74,7±10,6*	0,59±0,14
Ph/Chol/HECG (10:5:1)	82,6±4,4	36 ± 0,7	94,4±4,1 *93,8±4,4*	82,9±2,5 *81,1±1,7*	83,7±6,5 *84,3±4,2*	84,1±9,4 *83,6±9,1*	0,46±0,04
Ph/Chol/HECG (10:5:2,5)	93,1±2,0*	36 ± 1,2	85,9±4,2 *91,3±1,6*	81,2±0,7 *82,8±1,1*	82,2±6,1 *84,4±1,9*	48,7±3,6 *51,9±5,9*	0,44±0,06

Ph: phospholipides ; Chol: cholestérol ; Eug : eugénol ; HECG : huile essentielle de clou de girofle ; EE (%) Eug, Eug-Ac and Crph: Efficacité d'encapsulation de l'eugénol, eugénol acétate et β-caryophyllène.
$[Ph]_{liposome}$ (%) : taux d'incorporation des phospholipides dans les liposomes.
RE Eug (%): rendement d'encapsulation de l'eugénol.
Les valeurs sont obtenues le jour de la préparation des liposomes. Les valeurs en italiques sont obtenues après 2 mois de stockage à 4 °C.
* indique une valeur significative ($P< 0,05$) en comparant à la valeur obtenue pour les liposomes témoins en absence de l'Eug et l'HECG.
** indique une valeur significative ($P< 0,05$) en comparant à la valeur obtenue immédiatement après la préparation.

Tableau 22: Caractéristiques des liposomes constitués de Phospholipon 90H et encapsulant l'Eug et l'HECG par le pilote en utilisant les deux méthodes d'évaporation d'éthanol.

	Composition (m/m/m)	**$[Ph]_{liposome}$ (%)**	**EE (%) Eug**	**EE (%) Eug-Ac**	**EE (%) Crph**	**RE Eug (%)**	**Mole Eug/Mole Ph**
évaporation par rotavapeur	Ph/Chol 10:5	99,4±0,51	-	-	-	-	-
	Ph/Chol/Eug 10:5:2,5	98,2±1,32	78,2±8,1 *97,9±2,3***	-	-	63,5±10,3 *55,7±11,7*	0,53±0,16
	Ph/Chol/HECG 10:5:2,5	99,3±0,24	84,1±1,8 *98,2±0,6***	85,5±4,5 *82,3±13,1*	89,6±0,8 *88,7±6,2*	83,3±19,4/ *79,4±16,4*	0,86±0,19
évaporation Sur pilote	Ph/Chol 10:5	98,9±1,4	-	-	-	-	-
	Ph/Chol/Eug 10:5:2,5	98,9±0,23	77,3±6,5 *90,7±4,4***	-	-	58,2±19,7 *59,9±14,8*	0,63±0,32
	Ph/Chol/HECG 10:5:2,5	98,1±0,99	84,4±7,2 *97,7±2,6***	85,4±13,2 *87,3±10,1*	83,6±18,6 *88,7±7,1*	82,9±19,6 *90,2±11,7*	0,89±0,21

Ph: phospholipides ; Chol: cholestérol ; Eug : eugénol ; HECG : huile essentielle de clou de girofle ; EE (%) Eug, Eug-Ac and Crph: Efficacité d'encapsulation de l'eugénol, eugénol acétate et β-caryophyllène.
$[Ph]_{liposome}$ (%) : taux d'incorporation des phospholipides dans les liposomes.
RE Eug (%): rendement d'encapsulation de l'eugénol.
Les valeurs sont obtenues le jour de la préparation des liposomes. Les valeurs en italiques sont obtenues après 2 mois de stockage à 4 °C.
* indique une valeur significative (P< 0,05) en comparant à la valeur obtenue pour les liposomes témoins en absence de l'Eug et l'HECG.
** indique une valeur significative (P< 0,05) en comparant à la valeur obtenue immédiatement après la préparation.

8.10.4. Détermination de l'efficacité d'encapsulation des constituants de l'HECG dans les liposomes

L'efficacité d'encapsulation des constituants de l'HECG est déterminée selon l'équation 1 décrite dans les matériels et méthodes (paragraphe 7.6.3). Les résultats ont révélé que l'Eug, l'Eug-Ac et le Crph sont incorporés à des taux élevés dans les liposomes préparés par le contacteur à membrane et le pilote (Tableaux 20, 21 et 22). Ceci s'explique par l'hydrophobicité élevée des constituants de l'HECG.

Lors de l'addition de 2,5 mg/ml d'Eug, l'efficacité d'encapsulation de l'Eug était de 77,0±5,7, 78,2±8,1 et 77,3±6,5 % dans les liposomes formés de Phospholipon 90H préparés

respectivement par le contacteur à membrane, le pilote suivi par une évaporation rotative et le pilote avec l'évaporation directement sur le pilote (Tableaux 20 et 22). Ces résultats indiquent la reproductibilité de l'incorporation de l'Eug à grande échelle.

Quelle que soit la méthode ou l'échelle utilisée dans la préparation de liposomes, le type de phospholipides peut affecter l'efficacité d'encapsulation des constituants de l'HECG. Ainsi, préparés dans les mêmes conditions (même concentration en HECG dans la phase organique et même méthode de préparation de contacteur à membrane), les liposomes formés de Lipoid S100 insaturés présentent des taux d'encapsulation d'Eug plus élevés par rapport à ceux obtenus dans les liposomes constitués de Phospholipon 90H saturés (Tableaux 20 et 21). Nous suggérons une meilleure solubilisation des constituants de l'HECG dans le Lipoid S100 que dans le Phospholipon 90H en raison de la plus grande flexibilité des chaînes d'acides gras insaturés et de la fluidité de la membrane.

De plus, en utilisant les deux types de phospholipides Phospholipon 90H et Lipoid S100, les valeurs de l'efficacité d'encapsulation des constituants de l'HECG dans les liposomes étaient plus élevées à grande échelle (Tableaux 20, 21 et 22), comparées à celles obtenues à petite échelle (Tableaux 18 et 19). Procédés simples et continus, le contacteur à membrane et le pilote peuvent être considérés comme des méthodes de préparation efficaces utilisant le principe de l'injection éthanolique.

L'encapsulation de l'Eug est également exprimée en mole d'Eug par mole de phospholipides. Les valeurs sont présentées dans les Tableaux 20, 21 et 22.

8.10.5. Détermination du rendement d'encapsulation de l'Eug

Le rendement d'encapsulation de l'Eug est déterminé selon l'équation 2 décrite dans les matériels et méthodes (paragraphe 7.6.4). Les liposomes constitués de Phospholipon 90H présentent des valeurs de rendement d'encapsulation d'Eug entre 52 et 61 % (Tableau 20) et entre 58 et 83% (Tableau 22) lorsqu'ils sont préparés à grande échelle respectivement par contacteur à membrane et pilote. Ces valeurs supérieures à celles obtenues à petite échelle (entre 23 et 35 %) en utilisant le Phospholipon 90H (Tableau 18) confirment l'efficacité et l'application

de ces deux procédés à des fins industriels pour des composés volatils. De même, les valeurs de rendement d'encapsulation d'Eug dans les liposomes composés de Lipoid S100 sont également élevées (> 46%) à petite (Tableau 19) et à grande échelle en utilisant le contacteur à membrane (Tableau 21).

8.10.6. Morphologie des liposomes préparés à grande échelle

Des exemples des images obtenues par TEM pour les liposomes témoins et encapsulant l'Eug ou l'HECG préparés par contacteur à membrane en utilisant le Phospholipon 90H et le Lipoid S100 et par pilote sont présentées dans la Figure 45.

La Figure 45 confirme la formation des vésicules sphériques, multilamellaires et de tailles nanométriques préparées à grande échelle quelque soit la méthode de préparation et le type de phospholipides utilisés.

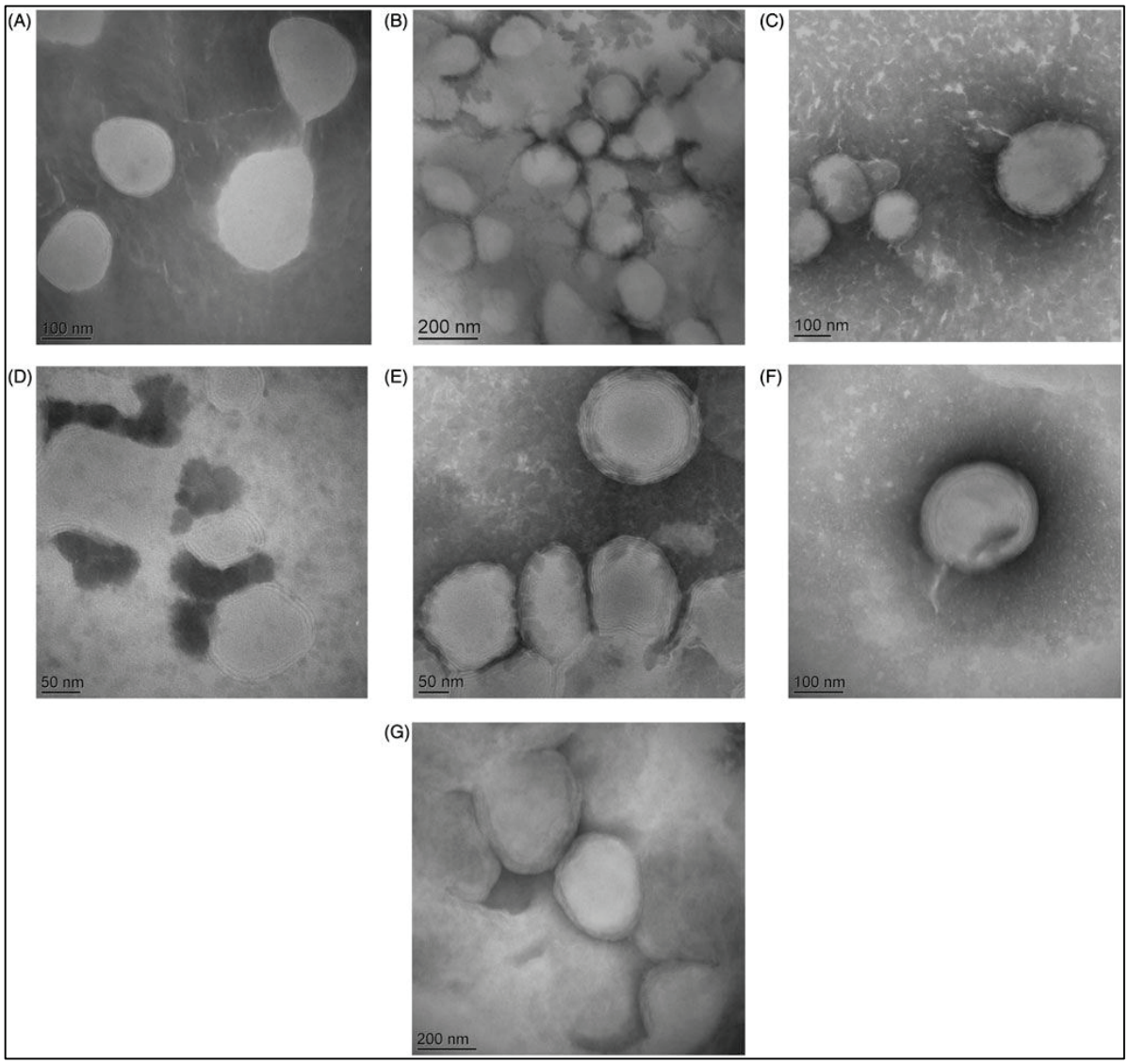


Figure 45: Images obtenues par TEM pour des échantillons des suspensions liposomiales préparées à grande échelle. (A,B,C) : des liposomes constitués de Phospholipon 90H témoins (A), encapsulant l'Eug à 2,5 mg/ml (B) et l'HECG à une concentration de 1 mg/ml (C) préparés par contacteur à membrane. (D,E) : des liposomes constitués de Lipoid S100 témoins (D), encapsulant l'HECG à une concentration de 2,5 mg/ml (E) préparés par contacteur à membrane. (F, G) : des liposomes constitués de Phospholipon 90H témoins (F), encapsulant l'Eug à 2,5 mg/ml (G) préparés par le pilote suivie par une évaporation de l'éthanol directement sur le pilote.

8.10.7. Stabilité des liposomes encapsulant l'Eug et l'HECG préparés à grande échelle

Notre étude a montré une stabilité des vésicules constituées de Lipoid S100 préparées par contacteur à membrane uniquement à une concentration en Eug et HECG de 1 mg/ml après 1 mois de stockage à 4 °C (Figure 43). Cependant une augmentation significative de la taille et du pdI des liposomes est obtenue à une concentration plus élevée en ces molécules (2,5 mg/ml) à grande (Figure 43) et à petite échelle (Tableau 19) après 1 mois de stockage à 4 °C. Ces résultats indiquent que la stabilité des liposomes dépend de la concentration initiale de la molécule à encapsuler dans la phase organique. C'est pourquoi les liposomes constitués de Lipoid S100 n'ont pas été préparés par le pilote.

Les liposomes composés de Phospholipon 90H encapsulant l'Eug et l'HECG préparés par contacteur à membrane (Figure 42) et pilote (Figure 44) sont stables après 2 mois de stockage à 4 et 25 ºC, où les valeurs de taille, de pdI et de potentiel zêta sont similaires à celles obtenues le jour de la préparation (Figures 42 et 44).

D'une manière surprenante, l'efficacité d'encapsulation des constituants de l'HECG déterminée après 2 mois de stockage à 4 °C était supérieure à celle obtenue le jour de la préparation (Tableaux 20 et 22). Pour expliquer ce phénomène, l'Eug est ajouté à une concentration de 2,5 mg/ml dans 10 ml de liposomes témoins composés de Phospholipon 90H et fraîchement préparés. L'incubation a été effectuée à 4 °C pendant 1 mois. L'efficacité d'encapsulation de l'Eug est trouvée égale à 97,5 ± 3,6 %. Étant une molécule hydrophobe avec un log P de l'ordre de 2,99 (Griffin et al., 1999), l'Eug rejoint les liposomes préformés expliquant ainsi l'incorporation élevée et l'augmentation de l'efficacité d'encapsulation de l'Eug après stockage à 4 °C.

En ce qui concerne le rendement d'encapsulation de l'Eug, les valeurs obtenues après 2 mois de stockage à 4 °C sont similaires à celles obtenues immédiatement après la préparation des liposomes (Tableaux 20, 21 et 22). Ainsi, les vésicules lipidiques préparées à grande échelle conservent le rendement d'encapsulation de l'Eug après stockage.

Selon les données de la littérature, les phospholipides saturés rendent la bicouche plus dense et plus rigide avec une minime possibilité de formation de pores au niveau de la membrane. Cela réduit la fuite du principe actif contenu dans les liposomes (Anderson et al., 2004), limite la fusion liposomiale (El-Kateb et al., 2008) et par conséquent augmente la stabilité des liposomes (Pietzyk et al., 2000). Par conséquent, ces résultats démontrent une bonne stabilité des liposomes composés de Phospholipon 90H préparés à grande échelle en utilisant le contacteur à membrane et le pilote. Les liposomes encapsulant l'Eug et l'HECG à petite échelle sont également stables à 4 °C après 2 mois de stockage (Tableau18).

8.11. Complexes d'inclusion de l'HECG et de l'Eug dans les liposomes

Afin d'augmenter davantage la stabilité et l'efficacité d'encapsulation des constituants de l'HECG, des complexes d'inclusion d'HP-β-CD/HECG et HP-β-CD/Eug ont été incorporés dans des liposomes constitués de Phospholipon 90H, formant ainsi un système combiné : complexe cyclodextrine/principe actif dans les liposomes ou DCL.

Un système en double encapsulation a été également préparé (DCL_2) où l'Eug ou l'HECG sont ajoutés dans la phase organique et leurs complexes d'inclusion dans la phase aqueuse. Le Phospholipon 90H a été choisi en raison de la stabilité élevée qu'il confère aux liposomes à petite et grande échelle, comparée à celle des phospholipides insaturés.

8.11.1. Caractéristiques des liposomes encapsulant les complexes d'inclusion de l'Eug et l'HECG en termes de taille, pdI et potentiel zêta

Le Tableau 23 résume les caractéristiques des DCL et DCL_2 encapsulant l'Eug préparés à petite et grande échelle. Les caractéristiques des DCL et DCL_2 encapsulant l'HECG sont présentées dans le Tableau 24. En utilisant le contacteur à membrane, 300 ml de liposomes ont été préparés en 22 s, en augmentant 10 fois les volumes des deux phases organique et aqueuse par rapport à la méthode d'injection éthanolique appliquée à petite échelle.

Les liposomes encapsulant les HP-β-CD libres, les DCL et les DCL_2 préparés à petite et grande échelle présentent une taille moyenne similaire (Tableaux 23 et 24). Bragagni et al. (2010) ont montré également une petite différence entre la taille moyenne des liposomes multilamellaires préparés par hydratation du film lipidique et encapsulant les complexes d'inclusion HP-β-CD

/prilocaïne (479 ± 51 nm) et la taille moyenne des liposomes préparés par la technique de double encapsulation (375 ± 46 nm) (Bragagni et al., 2010).

Tableau 23: Caractéristiques des systèmes DCL et DCL_2 encapsulant l'Eug par injection éthanolique et contacteur à membrane.

Méthode de préparation	Lots de liposomes	Taille (nm)	pdI	Potentiel zêta (mV)	RE Eug (%)
Injection éthanolique	Liposomes témoins	275±22 **1750±132****	0,12±0,02 **0,71±0,29****	-5,5±1,7 **-9,7±2,2**	-
	Liposomes encapsulant Eug	305±22 **5218±591****	0,11±0,02 **0,46±0,08****	-8,1±2,2 **-14,9±3,5**	31,5±4,2
	Liposomes encapsulant HP-β-CD	177±9* *172±8* **180±18**	0,115 ±0,03 *0,179±0,01* **0,180±0,08**	-12,0±1,7 *-14,4±1,9* **-9,0±2,2**	-
	DCL encapsulant Eug	202±16* *228±40* **209±14**	0,150±0,05 *0,263±0,09* **0,239±0,08**	-10,7±3,6 *-7,8±6,3* **-9,3±4,0**	63,54 ± 2,28
	DCL_2 encapsulant Eug	248±29* *639±145*** **793±37****	0,198±0,05 *0,718±0,17*** **0,683±0,24****	-13,5±1,9 *-6,8±9,5* **-9,3±3,5**	83,78 ± 8,65
Contacteur à membrane	Liposomes encapsulant HP-β-CD	206±9* *203±10* **ND**	0,141±0,02 *0,178±0,01* **ND**	-6,3±4,6 *-6,8±2,8* **ND**	-
	DCL encapsulant Eug	210±9* *203±7* **ND**	0,199±0,04 *0,239±0,02* **ND**	-5,1±1,6 *-8,8±1,9* **ND**	63,05 ± 9,49
	DCL_2 encapsulant Eug	226±160 *686±433*** **ND**	0,230±0,06 *0,806±0,24*** **ND**	-4,7±0,5 *-9,0±1,2* **ND**	88,26 ±14,15

Eug : eugénol ; HP-β-CD : hydroxypropyl béta cyclodextrine ; ND : non déterminé ;pdI : indice de polydispersité ; RE Eug (%) : rendement d'encapsulation de l'eugénol.
Les valeurs sont obtenues le jour de la préparation des liposomes. Les valeurs en italiques sont obtenues après 1 mois de stockage à 4 °C. Les valeurs en gras sont obtenues après lyophilisation et reconstitution des liposomes dans l'eau ultra-pure.
* indique une valeur significative (P< 0,05) en comparant à la valeur obtenue pour les liposomes témoins.
** indique une valeur significative (P< 0,05) en comparant à la valeur obtenue immédiatement après la préparation.

De plus, les DCL et DCL_2 encapsulant l'Eug et l'HECG préparés par contacteur à membrane ont une taille moyenne similaire à celle obtenue par injection éthanolique (entre 177 et 248 nm) (Tableaux 23 et 24), ce qui indique la reproductibilité du procédé de préparation. De même, les liposomes préparés par hydratation du film lipidique contenant les complexes d'inclusion HP-β-CD/bétaméthasone possèdent un diamètre moyen d'environ 200 nm (Piel et al., 2006).

D'autre part, les liposomes encapsulant les complexes d'inclusion HP-β-CD/Eug ou HP-β-CD/HECG (Tableaux 23 et 24) présentent une taille moyenne significativement inférieure à celle des liposomes encapsulant l'Eug ou HECG à petite échelle (Tableau 18) et à grande échelle (Figure 42). Ceci pourrait être dû à l'incorporation complète du cycle aromatique de l'Eug à l'intérieur de la cavité hydrophobe de l'HP-β-CD, empêchant ainsi l'interaction de l'Eug avec les chaînes d'acides gras des phospholipides dans la bicouche, et par conséquent réduisant l'effet de l'Eug sur la membrane. Par ailleurs, les complexes d'inclusion incorporés dans le compartiment aqueux des liposomes n'affectent pas la dimension des liposomes.

Les valeurs de pdI obtenues pour tous les lots de DCL et DCL_2 préparés à petite et grande échelle sont inférieures à 0,23 (Tableaux 23 et 24), ce qui indique que toutes les populations liposomiales préparées sont homogènes et monodisperses.

Les mesures de potentiel zêta ont montré qu'il n'existe pas de différence de charge membranaire entre les liposomes incorporant les HP-β-CD libres, les complexes d'inclusion de l'Eug et de l'HECG. En effet, la charge membranaire est principalement générée par le phospholipide qui est le même dans toutes les préparations de liposomes. Les valeurs obtenues pour tous les lots de DCL et DCL_2 sont légèrement négatives et comprises entre -5 et -13 mV (Tableaux 23 et 24).

Tableau 24: Caractéristiques des systèmes DCL et DCL_2 encapsulant l'HECG par injection éthanolique et contacteur à membrane.

Méthode de préparation	Lots de liposomes	Taille (nm)	pdI	Potentiel zêta (mV)	RE Eug (%)
Injection éthanolique	Liposomes encapsulant HP-β-CD	177±9 *172±8*	0,115 ±0,03 *0,179±0,01*	-12,0±1,7 *-14,4±1,9*	-
	DCL encapsulant HECG	199±14 *193±5*	0,167±0,03 *0,205±0,02*	-6,8±0,9 *-11,6±9,5*	54,22±2,36
	DCL_2 encapsulant HECG	216±36 *296±41*	0,209±0,08 *0,463±0,09***	-7,6±1,8 *-13,3±2,9*	79,2 ± 2,84
Contacteur à membrane	Liposomes encapsulant HP-β-CD	206±9 *203±10*	0,141±0,02 *0,178±0,01*	-6,3±4,6 *-6,8±2,8*	-
	DCL encapsulant HECG	197±16 *213±32*	0,177±0,06 *0,280±0,07*	-6,9±2,1 *-14,7±0,4*	59,74±4,67
	DCL_2 encapsulant HECG	207±22 *232±10*	0,175±0,06 *0,351±0,07***	-6,8±1,8 *-10,9±0,9*	74,94±15,56

HP-β-CD : hydroxypropyl-béta-cyclodextrine ; HECG : huile essentielle de clou de girofle ; pdI : indice de polydispersité.
RE Eug (%) : rendement d'encapsulation de l'eugénol.
Les valeurs sont obtenues le jour de la préparation des liposomes. Les valeurs en italiques sont obtenues après 1 mois de stockage à 4 °C.
** indique une valeur significative (P< 0,05) en comparant à la valeur obtenue immédiatement après la préparation.

La Figure 46 illustre l'incorporation de l'Eug dans les systèmes de DCL et DCL_2. Par ailleurs, en utilisant différentes techniques de spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (^1H, ^{13}C et 2D-ROESY RMN), certains auteurs ont démontré que le cycle aromatique de l'Eug pénètre dans la cavité des CDs par l'entrée large du cône, laissant les groupements méthoxy (MeO) et hydroxyle (OH) à l'extérieur, et ceci à un rapport molaire CD: Eug de 1:1 (Locci et al., 2004; Yang et al., 2005). L'Eug est incorporé à l'intérieur de la cavité de CD avec son groupe allyle soit plié vers le cycle aromatique (Locci et al., 2004) soit projeté à l'extérieur de l'entrée étroite de la cavité des CDs (Yang et al., 2005) (Figure 46 a).
De plus, en se basant sur les données obtenues par ^1H et ^{13}C RMN sur l'incorporation de l'Eug dans les liposomes (Fujisawa et al., 1988 ; Reiner et al., 2013), et lorsque la technique de double encapsulation est appliquée (Figure 46 b), les molécules d'Eug seraient incorporées dans la bicouche lipidique avec leur groupements hydroxyle et méthoxy situés vers les têtes polaires de

phospholipides et leur partie hydrophobe dont le cycle aromatique et le groupe allyle sont situés à l'intérieur de la bicouche lipidique (Figure 46 b).

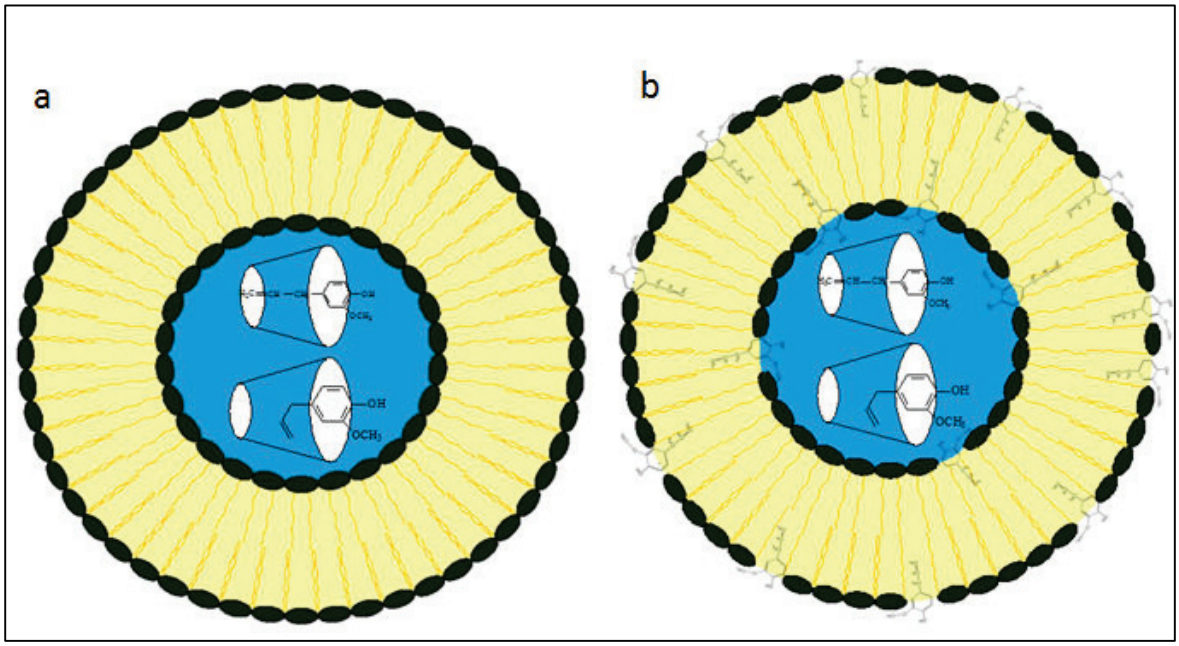


Figure 46: Incorporation de l'Eug dans les systèmes DCL (a) et DCL_2 (b).

8.11.2. Détermination de l'efficacité d'encapsulation des constituants de l'HECG

L'efficacité d'encapsulation des constituants de l'HECG déterminée le jour de la préparation des liposomes est maintenue après 1 mois de stockage à 4 ºC, pour tous les lots de liposomes préparés à petite et grande échelle (Figures 47 et 48). En comparant les deux procédés de préparation des liposomes, des valeurs similaires de l'efficacité d'encapsulation des constituants de l'HECG ont été obtenues pour les DCL et DCL_2 encapsulant l'Eug et l'HECG (Figures 47 et 48), ce qui indique la reproductibilité de l'incorporation de l'Eug.

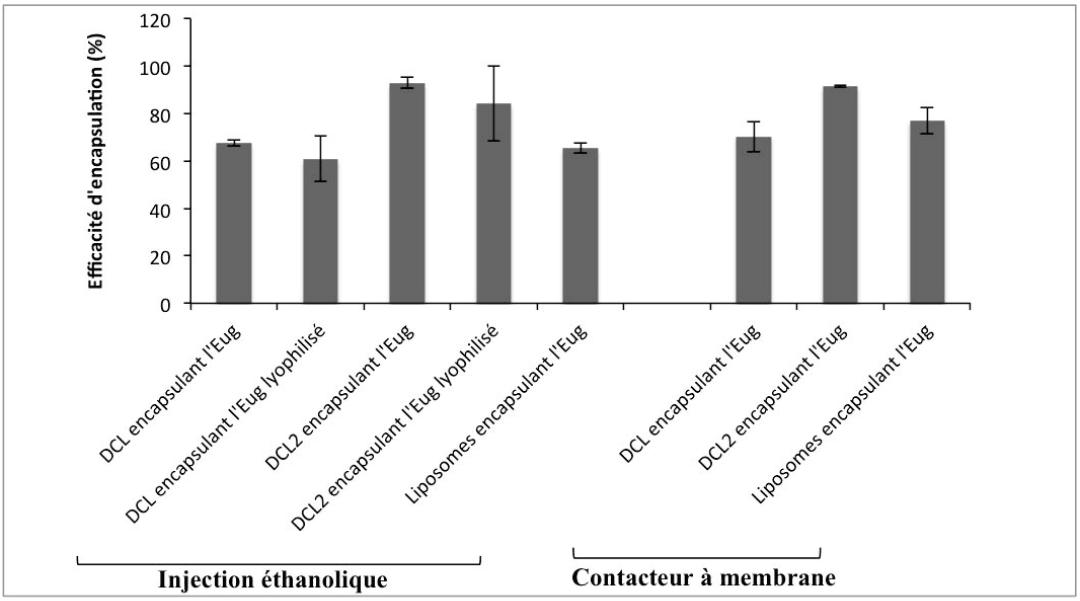


Figure 47: Efficacité d'encapsulation de l'Eug dans les DCL et DCL_2 préparés par injection éthanolique et contacteur à membrane en comparaison à celle obtenue par simple incorporation de l'Eug dans les liposomes à petite et grande échelle.

En outre, les DCL_2 incorporant l'Eug présentent des valeurs d'efficacité d'encapsulation significativement supérieures à celles obtenues avec les DCL à petite et grande échelle (Figure 47). Ceci est probablement dû à l'incorporation de l'Eug dans la bicouche lipidique et les complexes d'inclusion dans le compartiment aqueux des liposomes. En utilisant l'HECG, les DCL_2 ont montré une augmentation significative de l'efficacité d'encapsulation de l'Eug en comparant au DCL préparé à petite échelle, alors que cette différence n'était pas significative à grande échelle (Figure 48).

D'autre part, l'efficacité d'encapsulation de l'Eug obtenue par simple incorporation dans les liposomes était de 65 % à petite échelle (Tableau 18) et 77 % à grande échelle (Tableau 20) à une concentration de 2,5 mg/ml de l'Eug et l'HECG dans la phase organique. Les DCL_2 encapsulant l'Eug et l'HECG ont augmenté significativement l'efficacité d'encapsulation de l'Eug en comparant à celle obtenue par simple incorporation dans les liposomes préparés par injection éthanolique et contacteur à membrane (Figures 47 et 48). Des résultats similaires ont été rapportés dans la littérature. En effet, l'encapsulation des complexes d'inclusion HP-β-

CD/bétaméthasone (Piel et al., 2006), HP-β-CD/indométacine (Chen et al., 2007), HP-β-CD/prednisolone (Fatouros et al., 2001) et HP-γ-CD/curcumine (Dhule et al, 2012) dans les liposomes a montré des valeurs d'efficacité d'encapsulation plus élevées par rapport à celles obtenues avec les liposomes encapsulant les molécules libres (Piel et al., 2006; Chen et al., 2007; Fatouros et al., 2001; Dhule et al., 2012). Les DCLs ont été préparés soit par hydratation du film lipidique (Piel et al., 2006 ; Dhule et al., 2012) ou bien par déshydratation-réhydratation (Fatouros et al., 2001; Chen et al., 2007).

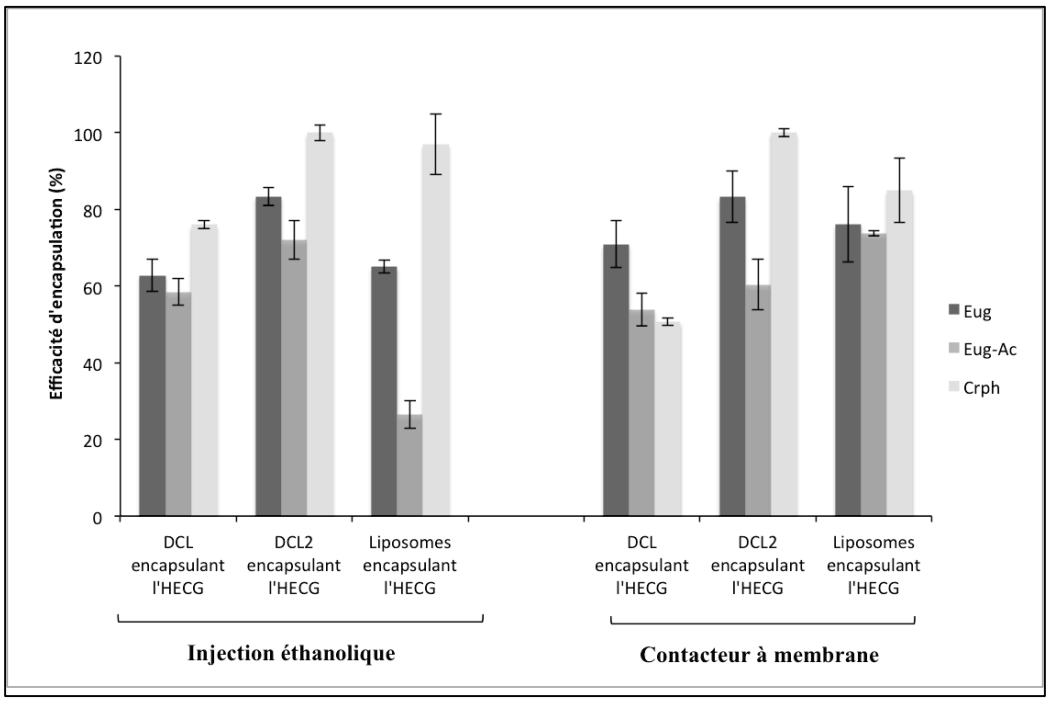


Figure 48 : Efficacité d'encapsulation des constituants de l'HECG dans les DCL et DCL_2 préparés par injection éthanolique et contacteur à membrane en comparaison à celle obtenue par simple incorporation de l'HECG dans les liposomes à petite et grande échelle.

8.11.3. Détermination du rendement d'encapsulation de l'Eug

Le rendement d'encapsulation de l'Eug pour les différents lots de liposomes est présenté dans les tableaux 23 et 24. En comparant les deux méthodes de préparation des liposomes (injection éthanolique et contacteur à membrane), des valeurs similaires de rendement d'encapsulation de l'Eug ont été obtenues pour les DCL et DCL_2 encapsulant l'Eug et l'HECG (Tableaux 23 et 24).

En outre, les DCL_2 incorporant l'Eug présentent des valeurs de rendement d'encapsulation de l'Eug significativement supérieures à celles obtenues avec les DCL à petite et grande échelle (Tableau 23). En utilisant l'HECG, les DCL_2 ont montré une augmentation significative du rendement d'encapsulation de l'Eug en comparant au DCL préparé à petite échelle, alors que cette différence n'était pas significative à grande échelle (Tableau 24).

Nous avons montré que le rendement d'encapsulation de l'Eug était de 24,3 et 31,5% à petite échelle (Tableau 18), 57,0 et 59,5 % à grande échelle en utilisant le contacteur à membrane (Tableau 20), pour les liposomes composés de Phospholipon 90H encapsulant respectivement l'HECG et l'Eug à 2,5 mg/ml. En comparant aux liposomes conventionnels préparés à petite échelle (Tableau 18), les DCL et DCL_2 encapsulant l'Eug et l'HECG améliorent le rendement d'encapsulation de l'Eug (Tableaux 23 et 24). A grande échelle, une augmentation du rendement d'encapsulation de l'Eug est également obtenue mais était uniquement significative pour les DCL_2 encapsulant l'Eug (Tableaux 23 et 24). L'augmentation du rendement d'encapsulation du principe actif dans les DCLs semble être due à la capacité des CDs à solubiliser les principes actifs hydrophobes dans leur cavité, et au DCL permettant leur incorporation dans la phase aqueuse des vésicules.

8.11.4. Morphologie des DCL et DCL_2

Les complexes d'inclusion d'HP-β-CD/Eug en solution aqueuse ont subi le même protocole de préparation des liposomes par injection d'éthanol, excepté le fait que la phase organique ne contient pas de phospholipides. Les images de TEM n'ont pas montré la formation des nanoparticules, ce qui confirme la production des systèmes DCLs. Cependant, des agrégats sont obtenus avec les complexes d'inclusion de β-CD/Eug (Hill et al., 2013; Seo et al., 2010). La différence entre ces résultats peut s'expliquer par le fait que l'HP-β-CD possède une solubilité aqueuse plus élevée que la β-CD et donc une plus faible tendance à s'agglomérer.

Les images obtenues par TEM pour les liposomes encapsulant les HP-β-CD libres, les DCL et DCL_2 encapsulant l'Eug à petite et grande échelle révèlent la présence des vésicules sphériques, de tailles nanométriques, unilamellaires et parfois oligo-lamellaires (Figures 49 et 50).

Des liposomes constitués de phosphatidylcholine de soja encapsulant les complexes d'inclusion HP-β-CD/bétaméthasone par la méthode d'hydratation du film lipidique sont également unilamellaires (Piel et al., 2006).

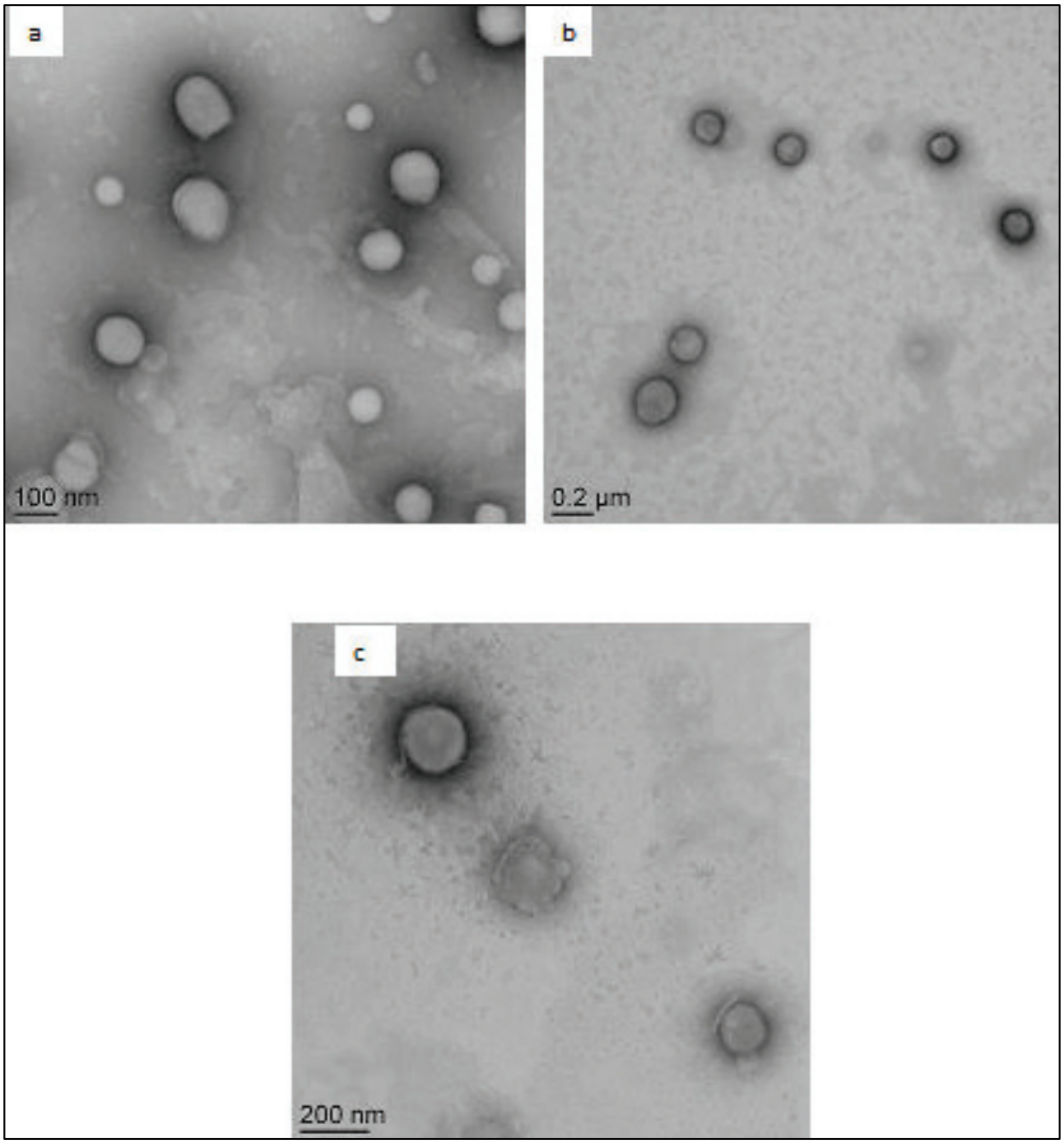


Figure 49 : Images obtenues par TEM pour des liposomes encapsulant des HP-β-CDs libres (a), des DCL (b), et DCL_2 (c) incorporant l'Eug préparés par injection éthanolique.

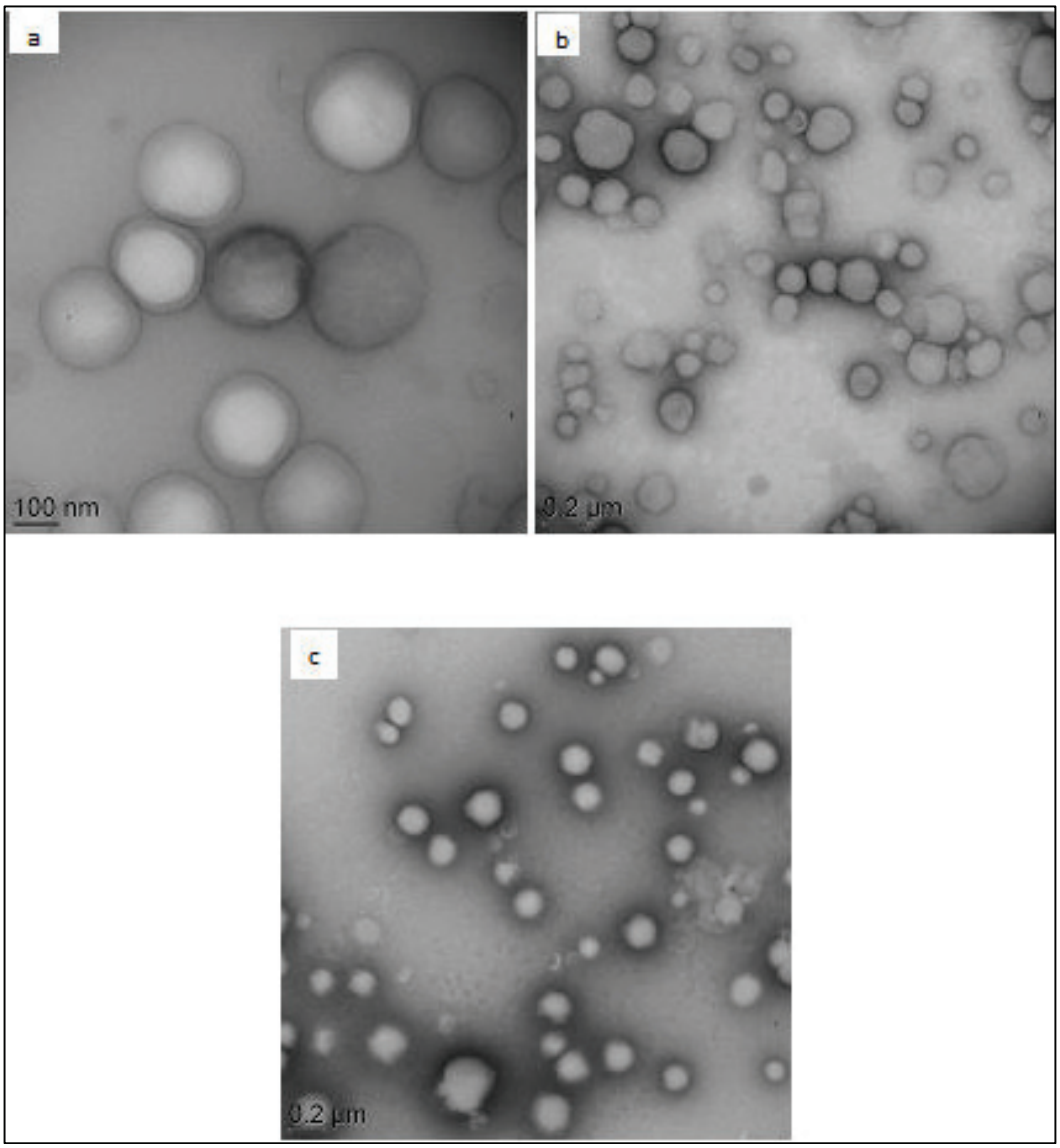


Figure 50 : Images obtenues par TEM pour des liposomes encapsulant des HP-β-CDs libres (a), des DCL (b), et DCL_2 (c) incorporant l'Eug préparés par contacteur à membrane.

8.11.5. Stabilité des DCL et DCL_2

Les mesures de taille, de pdI, et de potentiel zêta pour les liposomes encapsulant les HP-β-CDs libres, les DCLs encapsulant l'Eug et l'HECG à petite et grande échelle déterminées après 1 mois de stockage à 4 ºC sont similaires à celles obtenues le jour de la préparation (Tableaux 23 et 24). Cependant, les DCL_2 incorporant l'Eug et l'HECG par la technique de double encapsulation à petite et grande échelle sont instables après 1 mois de stockage à 4 °C, puisque la taille

moyenne des vésicules et/ou le pdI ont considérablement augmenté (Tableaux 23 et 24). Malgré que les DCL_2 étaient capables d'augmenter l'efficacité et le rendement d'encapsulation de l'Eug, les résultats de stabilité ont montré que les DCL_2 ne constituent pas une formulation adéquate pour l'encapsulation de l'HECG.

8.11.6. Activité anti-oxydante de l'Eug et l'HECG libres, leurs complexes d'inclusions, les DCL et DCL_2

L'activité de piégeage du radical DPPH• par l'Eug et l'HECG est déterminée selon l'équation 5 décrite dans les matériels et méthodes (paragraphe 7.6.8). L'activité anti-oxydante de l'Eug et de l'HECG sous forme libre et encapsulé (liposomes, complexes d'inclusion, DCL et DCL_2) est illustrée sur la Figure 51. Le test ANOVA est appliqué pour comparer l'activité anti-oxydante de ces différents lots.

L'HECG possède une forte activité anti-oxydante (Figure 51) qui est attribuée à l'Eug (Wei et al., 2010). De plus, les liposomes encapsulant l'Eug, les complexes d'inclusion de l'Eug et l'HECG, les DCL et DCL_2 encapsulant ces deux principes actifs maintiennent l'activité anti-oxydante aussi bien qu'une solution aqueuse d'Eug et d'HECG, puisqu'il n'y a pas de différences significatives entre les formes libres et encapsulées. Ceci s'explique par le fait que ni les CDs, ni les liposomes bloquent le groupement hydroxyle actif de l'Eug durant la préparation des complexes d'inclusion et des liposomes, qui reste à son tour disponible pour réagir avec les radicaux DPPH•. Puisque la molécule de DPPH est hydrophobe, il est possible que les radicaux DPPH • soient piégés par l'Eug à l'intérieur des liposomes, expliquant par ce fait l'activité anti-oxydante de l'Eug dans les systèmes DCLs.

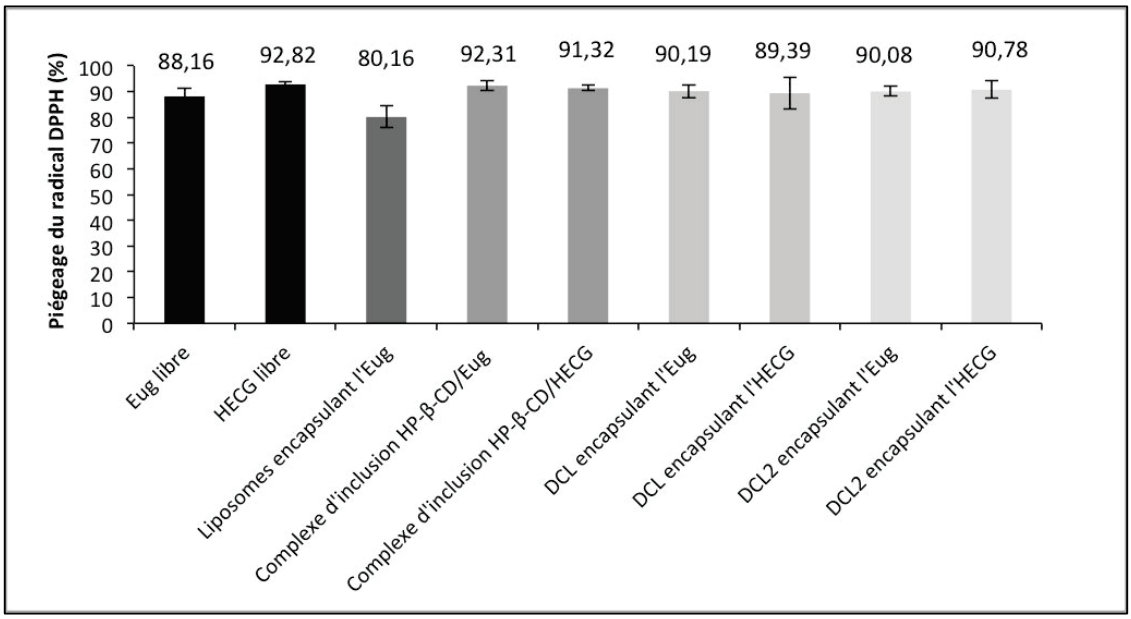


Figure 51 : Activité anti-oxydante de l'Eug et l'HECG sous forme libre et encapsulée (liposomes, complexes d'inclusion, DCL et DCL_2).

8.12. Lyophilisation des liposomes

Bien que la lyophilisation des liposomes est largement étudiée (Chen et al., 2010), maintenir une huile essentielle volatile dans un lyophilisat en dépit des pressions très basses appliquées représente une tâche difficile. Nous avons tenté d'atteindre cet objectif.

La lyophilisation des liposomes constitués de Phospholipon 90H témoins et encapsulant l'Eug, en absence de cryoprotecteur, a entraîné une augmentation significative de la taille moyenne et du pdI des vésicules (Tableau 25).

Afin de garantir une meilleure stabilité des liposomes composés de Phospholipon 90H et encapsulant l'Eug et préserver leurs caractéristiques durant la lyophilisation, différents cryoprotecteurs sont testés: deux disaccharides (saccharose et tréhalose), un oligosaccharide (HP-β-CD) et un polysaccharide (maltodextrine Glucidex 6D et 19D). De plus, une molécule chargée positivement (stéarylamine) qui peut éviter la fusion des liposomes au cours de la

lyophilisation en augmentant la répulsion entre les phospholipides, et un alcool gras (alcool cétylique) qui est un agent épaississant, sont également ajoutés.
Lors de l'addition de l'alcool cétylique dans la phase organique à diverses concentrations (0,5; 1,5 et 1,7 % en masse), une augmentation de la taille moyenne des vésicules encapsulant l'Eug (>1400 nm) et du pdI (> 0,36) est obtenue avant la lyophilisation, qui peut être due à la capacité de l'alcool cétylique à agir en tant qu'émulsifiant, détruisant ainsi les liposomes. En outre, lorsque les maltodextrines Glucidex 6D et 19D (ayant un dextrose équivalent DE respectivement de 6 et 19) sont ajoutées soit pendant (dans la phase aqueuse) ou après la préparation des liposomes dans un rapport massique sucre:phospholipide respectivement de 8:1 et 6:1, une taille moyenne des vésicules (>400 nm) et un pdI (>0,5) sont également obtenus avant la lyophilisation. Ceci est probablement dû à la composition des maltodextrines en plusieurs unités de D-glucose, pouvant déstabiliser les liposomes. Pour cela, les formulations liposomiales encapsulant l'Eug contenant l'alcool cétylique ou les maltodextrines n'ont pas été lyophilisées.

Les caractéristiques des liposomes constitués de Phospholipon 90H et encapsulant l'Eug avant et après lyophilisation en utilisant comme cryoprotecteurs: le saccharose, le tréhalose et la stéarylamine sont présentées dans le Tableau 25. Avant la lyophilisation, les valeurs de taille, pdI et potentiel zêta obtenues pour les liposomes encapsulant l'Eug en présence de chaque cryoprotecteur ne diffèrent pas de celles obtenues pour les liposomes encapsulant l'Eug en absence de ces cryoprotecteurs (Tableau 25).

La lyophilisation des formulations liposomiales contenant l'Eug, dans lesquelles le saccharose ou le tréhalose sont ajoutés pendant ou après la préparation des liposomes dans un rapport massique sucre:phospholipide de respectivement 8:1 et 6:1 et la stéarylamine à une concentration de 0,5 mg/ml, a produit des particules macroscopiques avec une taille moyenne et un pdI supérieur à 351 nm et 0,6 respectivement (Tableau 25). Pour ces préparations dont les caractéristiques physico-chimiques des liposomes ont été fortement détériorées après lyophilisation, l'efficacité d'encapsulation de l'Eug n'a pas été déterminée.

Tableau 25: Effet des cryoprotecteurs sur la taille, pdI, et potentiel zêta des liposomes constitués de Phospholipon 90H encapsulant l'Eug avant et après lyophilisation.(a) et (b) implique l'addition des cryoprotecteurs respectivement pendant et après la préparation des liposomes.

	Avant lyophilisation			**Après lyophilisation**		
Composition (m/m/m/m)	**Taille (nm)**	**pdI**	**Potentiel zêta (mV)**	**Taille (nm)**	**pdI**	**Potentiel zêta (mV)**
Ph 90H/Chol/Eug/cryoprotecteur 10/5/0/0	239 ± 31	0,11±0,01	-5,9±3,7	1750 ± 132*	0,71±0,29*	-9,7 ± 2,2
Ph 90H/Chol/Eug/cryoprotecteur 10/5/2,5/0	244 ± 31	0,13±0,03	-3,9±1,6	5218 ± 591*	0,46±0,08*	-14,9 ± 3,5
Ph 90H/Chol/Eug/saccharose (a) 10/5/2,5/80	283 ± 30	0,11 ± 0,02	-5,0 ± 1,4	616 ± 151*	0,82 ± 0,17*	-9,6 ± 1,2
Ph 90H/Chol/Eug/saccharose (b) 10/5/2,5/60	258 ± 32	0,10 ± 0,02	-6,2± 3,5	351 ± 117*	0,60 ± 0,21*	-10,3 ± 1,9
Ph 90H/Chol/Eug/tréhalose (a) 10/5/2,5/80	259 ± 35	0,11 ± 0,01	-5,6 ± 1,0	427 ± 73*	0,76 ± 0,12*	-9,4 ± 1,7
Ph 90H/Chol/Eug/tréhalose (b) 10/5/2,5/60	264 ± 30	0,12 ± 0,02	-4,7 ± 1,2	433 ± 42*	0,73 ± 0,06*	-9,9 ± 1,3
Ph 90H/Chol/Eug/Stéarylamine 10/5/2,5/0,5	239 ± 11	0,31 ± 0,06	+55 ± 13,0	2641 ±2202*	0,75 ± 0,09*	+35 ± 8,7

Chol: cholestérol; Eug: eugénol; pdI: indice de poyldispersité; Ph: phospholipides ; 90H: Phospholipon 90H.
Les valeurs obtenues après lyophilisation sont comparées à celles avant lyophilisation et * indique une valeur $P< 0,05$ significative.

Le Tableau 26 présente les caractéristiques des liposomes constitués de Phospholipon 90H encapsulant l'Eug avant et après lyophilisation en utilisant l'HP-β-CD comme cryoprotecteur.

Dans le cas d'HP-β-CD ajouté soit pendant ou après la préparation des liposomes à différents rapports massiques oligosaccharide:phospholipide, les mesures de taille, pdI et potentiel zêta montrent la stabilité des liposomes encapsulant l'Eug après lyophilisation et reconstitution dans l'eau ultra-pure (Tableau 26). De plus, l'efficacité d'encapsulation de l'Eug est maintenue élevée après lyophilisation des liposomes contenant l'HP-β-CD à faibles rapports oligosaccharide:phospholipide (6:1 et 8:1) (Tableau 26).

Parmi plusieurs cryoprotecteurs utilisés (le saccharose, le tréhalose, les maltodextrines, la stéralymanine et l'alcool cétylique), ces résultats montrent que les formulations liposomiales contenant l'HP-β-CD maintiennent *in situ* l'Eug volatile en dépit du vide appliqué.

Tableau 26: Caractéristiques des liposomes constitués de Phospholipon 90H encapsulant l'Eug avant et après lyophilisation en utilisant l'HP-β-CD comme cryoprotecteur. (a) et (b) implique l'addition du cryoprotecteur respectivement pendant et après la préparation des liposomes.

	Avant lyophilisation				**Après lyophilisation**			
Composition (m/m/m/m)	**Taille (nm)**	**pdI**	**Potentiel zêta (mV)**	**EE Eug (%)**	**Taille (nm)**	**pdI**	**Potentiel zêta (mV)**	**EE Eug (%)**
Ph 90H/Chol/Eug/ HP-β-CD (a) 10/5/2,5/80	194 ± 8	0,20±0,03	-3,3±1,6	77,0±3,4	212±27	0,21±0,02	-4,4±0,08	73,9±0,33
Ph 90H/Chol/Eug/ HP-β-CD (a) 10/5/2,5/160	180 ± 19	0,22±0,05	-3,7±1,8	45,7± 6,1	204±31	0,24±0,06	-6,1±1,5	44,1±7,1
Ph 90H/Chol/Eug/ HP-β-CD (b) 10/5/2,5/60	162 ± 9	0,18±0,03	-5,2±1,2	76,7±7,9	212±29	0,29±0,06	-8,7±3,9	61,3±8,1
Ph 90H/Chol/Eug/ HP-β-CD (b) 10/5/2,5/120	165 ± 6	0,23±0,02	-3,2±0,8	43,4±11,3	179±7	0,17±0,02	-8,6±3,6	40,4±8,1

Chol: cholestérol; Eug: eugénol; EE : efficacité d'encapsulation ; pdI: indice de poyldispersité; Ph: phospholipides ; 90H: Phospholipon 90H ; HP-β-CD: hydroxypropyl-béta-cyclodextrine.
Les valeurs obtenues après lyophilisation sont comparées à celles avant lyophilisation et * indique une valeur $P< 0,05$ significative.

En outre, nous avons également testé si le système mixte DCL et DCL_2 est stable lors de la lyophilisation. Les liposomes préparés en absence de l'Eug contenant les HP-β-CDs libres dans un rapport massique oligosaccharide:phospholipide 5:1 ainsi que les liposomes encapsulant les complexes d'inclusion HP-β-CD/Eug lyophilisés et reconstitués dans l'eau ultra-pure présentent une taille moyenne, un pdI et un potentiel zêta similaires à ceux obtenus avant la lyophilisation (Tableau 23). Ces résultats indiquent la capacité de l'HP-β-CD et le complexe d'inclusion à protéger les liposomes et l'Eug pendant la lyophilisation. Cela peut être dû à la capacité de l'HP-β-CD à former une matrice amorphe emprisonnant les liposomes, ce qui empêche leur agrégation. En outre, une liaison hydrogène entre l'oligosaccharide et les groupes polaires de liposomes peut se produire, les protégeant ainsi lors de la lyophilisation (Chen et al., 2010).

Cependant, la lyophilisation des DCL_2 encapsulant l'Eug a entraîné une augmentation significative de la taille moyenne et de pdI en comparant aux valeurs obtenues avant lyophilisation (Tableau 23). Ceci peut être expliqué par le fait que la présence de l'Eug dans la bicouche lipidique peut perturber l'interaction entre les liposomes et les CDs sur la partie externe de vésicules. Ce mécanisme est proposé par Maestrelli et al. (2010).

Par ailleurs, la lyophilisation des DCL et DCL_2 n'a pas montré de changement significatif au niveau de l'efficacité d'encapsulation de l'Eug en comparant aux valeurs obtenues avant lyophilisation (Figure 47). Ceci indique qu'au cours de la lyophilisation, le système DCL protège l'Eug en l'intégrant dans la cavité hydrophobe de l'HP-β-CD.

Finalement, les images obtenues par TEM après lyophilisation pour les liposomes encapsulant l'HP-β-CD et les DCL encapsulant l'Eug (Figures 52 a et b) montrent que les liposomes unilamellaires sphériques sont conservés. Ceci prouve que les DCLs sont stables pendant la lyophilisation.

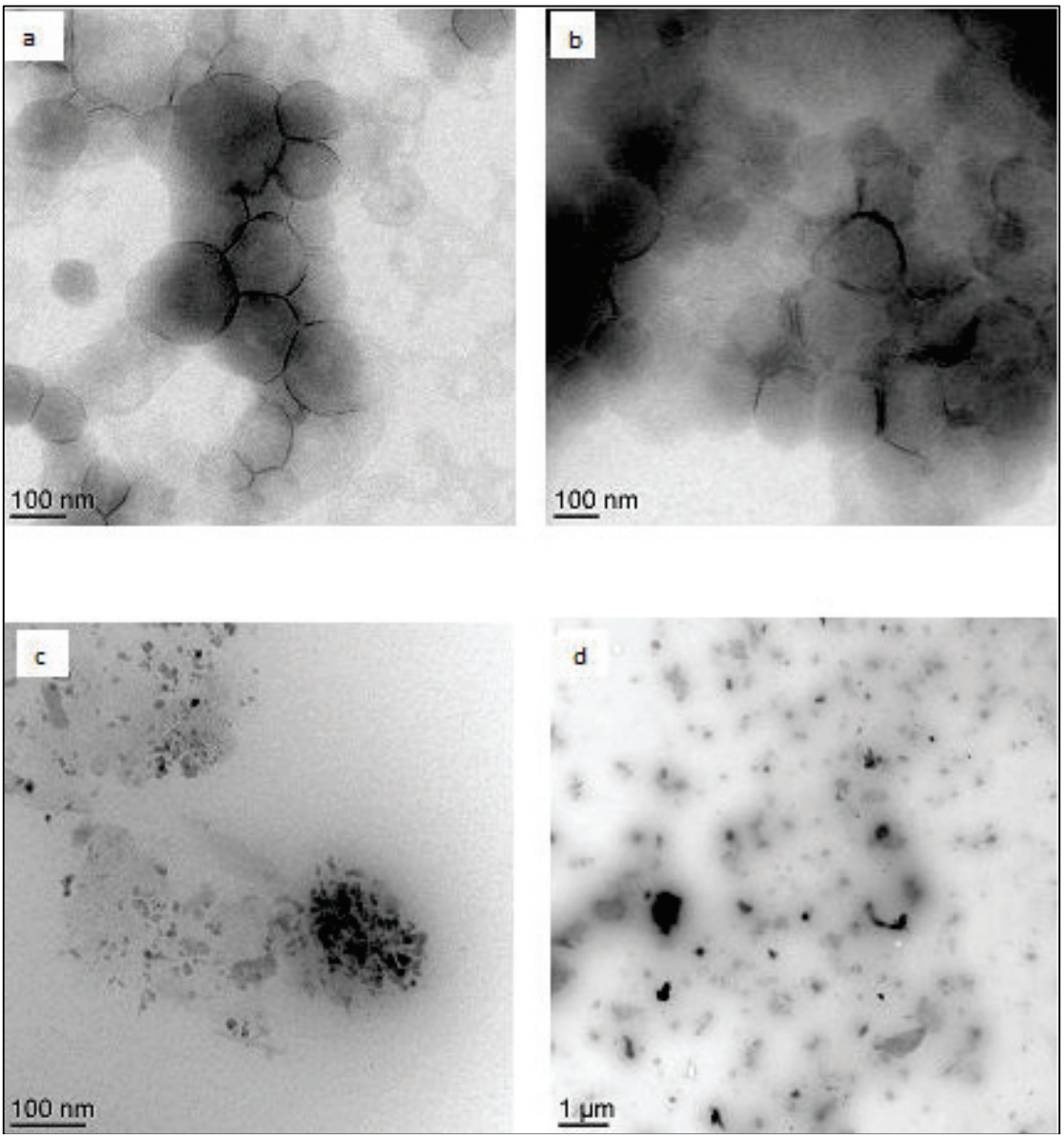


Figure 52 : Images obtenues par TEM pour les liposomes encapsulant les HP-β-CDs libres (a), les DCL (b), et DCL_2 (c, d) incorporant l'Eug après lyophilisation et reconstitution dans l'eau ultra-pure.

Les images de TEM obtenues après lyophilisation des DCL_2 préparés par la technique de double encapsulation ont prouvé une perte des structures liposomiales et une tendance pour la formation des agglomérats (Figures 52 c et d). Ces résultats ont indiqué que les DCL_2 ne constituent pas une formulation adéquate pour l'encapsulation de l'HECG.

Conclusion et perspectives

L'huile essentielle de clou de girofle et son constituant majeur l'eugénol sont des composés aromatiques naturels qui se caractérisent par un large spectre d'activités biologiques. Toutefois, les constituants de l'HECG sont volatils, sensibles aux conditions environnementales et faiblement solubles dans l'eau. Dans ce travail, nous avons préparé et caractérisé des liposomes encapsulant ces deux principes actifs ainsi que leurs complexes d'inclusion à l'échelle du laboratoire et à grande échelle.

La première partie de notre travail a porté sur la préparation des liposomes à petite échelle, par la méthode d'injection d'éthanol, afin de trouver les conditions expérimentales optimales. Les résultats ont démontré que le cholestérol est essentiel pour assurer l'homogénéité des liposomes. Par ailleurs, la taille des liposomes augmente avec l'augmentation de la concentration en phospholipides et du rapport volumique éthanol:eau, et avec la diminution de la vitesse d'agitation de la phase aqueuse. La vitesse d'injection de la phase organique n'affecte ni la taille ni le pdI des liposomes.

Dans une deuxième partie de notre travail, nous avons préparé les liposomes en absence et présence de différentes concentrations de l'HECG et l'Eug en utilisant trois types de phospholipides, dont deux sont saturés (Phospholipon 80H, Phospholipon 90H) et le troisième est insaturé (Lipoid S100). L'effet de l'hydrogénation et de la composition des phospholipides sur les caractéristiques des liposomes est recherché. La présence du phosphatidyléthanolamine dans la composition du Phospholipon 80H conduit à une augmentation du potentiel zêta et une diminution de la taille des vésicules. L'incorporation de l'Eug et l'HECG dans les liposomes préparés à petite échelle provoque une augmentation de leur taille quelque soit le type de phospholipide. Le taux d'incorporation des phospholipides saturés dans les liposomes est supérieur à celui des phospholipides insaturés. Le taux d'incorporation des phospholipides insaturés peut être augmenté en présence de l'Eug grâce à la capacité de cette molécule à augmenter la fluidité membranaire. Le dosage par HPLC a montré que les liposomes constitués de Lipoid S100 présentent une efficacité d'encapsulation et un rendement d'encapsulation de l'Eug les plus élevés. Ceci peut être dû à la température élevée utilisée pendant la préparation des

liposomes constitués de phospholipides hydrogénés, aboutissant probablement à la perte de l'Eug volatile. Les liposomes encapsulant l'Eug et l'HECG constitués des phospholipides saturés sont plus stables à 4 °C pendant 2 mois de stockage que ceux constitués du Lipoid S100 insaturé. Nos résultats ont montré que la taille des liposomes dépend du degré de la saturation des phospholipides et de la concentration initiale d'Eug dans la phase organique. Par ailleurs, les liposomes composés de ces trois types de phospholipides et encapsulant l'Eug à une concentration de 2,5 mg/ml protègent l'Eug de la dégradation induite par les rayons UV et maintiennent l'activité anti-oxydante d'une solution aqueuse d'Eug libre.

Dans une troisième partie de notre étude, 600 ml de liposomes encapsulant l'HECG et l'Eug sont préparés à grande échelle, par la technique du contacteur à membrane en utilisant le Phospholipon 90H et le Lipoid S100 en 36 s. De plus grands volumes (3 L) de liposomes sont préparés en environ 6 min par pilote en utilisant le Phospholipon 90H. Ce volume est divisé à moitié pour évaporer l'éthanol soit par évaporation rotative ou bien directement sur pilote. Comparés à petite échelle, des résultats similaires en termes de taille moyenne des vésicules, pdI, potentiel zêta, morphologie et taux d'incorporation des phospholipides ont été obtenus à grande échelle et quelque soit la méthode d'évaporation obtenue. Ceci indique la reproductibilité et l'efficacité de ces procédés de préparation des liposomes. De plus, une amélioration de l'efficacité d'encapsulation des constituants de l'HECG et du rendement d'encapsulation de l'Eug est obtenue en comparant à petite échelle. Les images obtenues par TEM ont confirmé la formation des vésicules sphériques oligolamellaires pour les liposomes témoins et ceux encapsulant l'Eug et l'HECG préparés par seringue, contacteur à membrane et pilote. Les liposomes constitués de Phospholipon 90H préparés par contacteur à membrane et pilote sont prouvés également être stables à 4 et 25 °C pendant 2 mois de stockage.

Dans une quatrième partie de notre travail, les complexes d'inclusion d'HP-β-CD/HECG et d'HP-β-CD/Eug sont préparés dans une solution aqueuse. Ces derniers ont été ensuite encapsulés dans des Phospholipon 90H-liposomes, formant ainsi un système combiné « drug in cyclodextrin in liposomes, DCL », par la méthode d'injection d'éthanol à petite échelle et le contacteur à membrane à grande échelle. Les deux méthodes de préparation ont aboutit à des résultats similaires en terme de taille, pdI, potentiel zêta, efficacité d'encapsulation et rendement

d'encapsulation de l'Eug. Des « double loaded liposomes » ou DCL_2 sont préparés par la technique de double encapsulation en ajoutant l'HECG et l'Eug dans la phase organique et leurs complexes d'inclusion dans la phase aqueuse. Nos résultats ont montré que les DCL et DCL_2 encapsulant l'Eug et l'HECG possèdent une taille moyenne inférieure à celle obtenue par simple incorporation de ces deux principes actifs dans les liposomes. Ces systèmes mixtes améliorent le rendement d'encapsulation de l'Eug et maintiennent l'activité anti-oxydante de l'Eug, par rapport aux liposomes préparés par la méthode conventionnelle. Les images obtenues par TEM des liposomes préparés à petite et grande échelle avec l'HP-β-CD et les complexes d'inclusion de l'Eug et l'HECG prouvent la formation de vésicules sphériques, uni et oligo-lamellaires. Les liposomes encapsulant l'HP-β-CD et les DCL encapsulant l'Eug et l'HECG sont stables à 4 °C pendant 1 mois de stockage, contrairement aux DCL_2.

Dans une dernière partie de ce travail, nous avons étudié la lyophilisation des liposomes constitués de Phospholipon 90H contenant l'Eug à une concentration de 2,5 mg/ml. Nous avons évalué la taille, le pdI, le potentiel zêta et l'efficacité d'encapsulation de l'Eug avant et après lyophilisation. Différents cryoprotecteurs ont été testés comme le saccharose, tréhalose, maltodextrine, stéralymanine, alcool cétylique et HP-β-CD. Nos résultats ont montré que l'HP-β-CD ajoutée, à différents rapports massiques oligosaccharide:phospholipide, pendant et après la préparation des liposomes encapsulant l'Eug était le meilleur cryoprotecteur. Par ailleurs, nous avons testé la capacité du système mixte (DCL et DCL_2) à protéger l'Eug durant la lyophilisation. Contrairement aux DCL_2 préparés par la technique de double encapsulation, les liposomes témoins contenant l'HP-β-CD et les DCLs encapsulant l'Eug conservent leurs caractéristiques physico-chimiques après lyophilisation. Les images obtenues par TEM des liposomes témoins encapsulant l'HP-β-CD et des DCL encapsulant l'Eug confirment leur stabilité après lyophilisation. Nous avons réussi à préparer des formulations liposomiales en forme de poudre contenant des molécules volatiles en dépit des pressions très basses appliquées lors de la lyophilisation.

Il est important de noter que l'HECG et l'Eug sont des composés naturels et que les liposomes sont constitués de phospholipides naturels, la lécithine de soja. De plus, la taille des vésicules obtenue est ainsi trouvée adéquate pour des applications cosmétiques, pharmaceutiques et

agroalimentaires (Mozafari et al., 2008; Nastruzzi et al., 1993; Woodle, 1995). Nos résultats ont montré que les liposomes constituent un système d'encapsulation adéquat de l'HECG et l'Eug en maintenant leur activité anti-oxydante *in vitro*. Comme perspectives de ce travail, il serait intéressant de tester l'activité antimicrobienne de l'Eug sous forme de complexe d'inclusion, encapsulée dans les DCL et les liposomes et de les comparer avec celle de l'Eug libre.

D'autres constituants des huiles essentielles pourraient être sujets à des études similaires pour vérifier si les systèmes d'encapsulation utilisés dans notre thèse pourront aboutir à des résultats similaires.

Le degré de volatilité d'un constituant d'une huile essentielle pourrait affecter l'efficacité d'encapsulation, sa solubilité dans l'eau… Il serait ainsi important de comparer une gamme de produits pour déterminer les paramètres qui contrôlent l'efficacité d'encapsulation du principe actif (solubilité aqueuse, volatilité, taux d'encapsulation dans la CD…).

Des études de pénétration des liposomes au niveau cutané pourraient être envisagées afin d'examiner l'intérêt de l'utilisation des vésicules lipidiques encapsulant l'HECG pour des applications cosmétiques. Dans ce but, des liposomes déformables contenant des tensioactifs ou « edge activators » pourraient être préparés. Leur effet pourrait être comparé à celui des liposomes conventionnels.

Des études de cinétique de libération de l'HECG et l'Eug encapsulées dans des conditions biologiques bien déterminées sont envisagées ultérieurement.

Il est nécessaire d'étudier la stabilité des lyophilisats des liposomes contenant l'Eug à long terme.

Les liposomes conventionnels, les complexes d'inclusion d'HP-β-CD/HECG et d'HP-β-CD/Eug, les DCL et DCL_2 pourraient être incorporés dans des aliments. Nous envisageons évaluer l'effet de l'encapsulation sur la préservation des qualités organoleptiques des aliments et leur conservation à long terme.

Références

Abdelwahed W, Degobert G, Stainmesse S, Fessi H, 2006. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. Advanced Drug Delivery Reviews 58, 1688-1713.

Abeywardena M, Allen T, Charnock J, 1983. Lipid-protein interactions of reconstituted membrane-associated adenosinetriphosphatases. Use of a gel-filtration procedure to examine phospholipid-activity relationships. Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes 729, 62-74.

Agashe H, Sahoo K, Lagisetty P, Awasthi V, 2011. Cyclodextrin-mediated entrapment of curcuminoid 4-[3,5-bis(2-chlorobenzylidene-4-oxo-piperidine-1-yl)-4-oxo-2-butenoic acid] or CLEFMA in liposomes for treatment of xenograft lung tumor in rats. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 84, 329-337.

Akbarzadeh A, Sadabady RR, Daaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, Samiei M, Kouhi M, Nejati-Koshki K, 2013. Liposome: classification, preparation, and applications. Nanoscale Research Letters 8, 102-110.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, 2002. Molecular biology of the cell. 4ed. New York: Garland Science.

Ali SM, Khan AA, Ahmed I, Musaddiq M, Ahmed KS, Polasat H, Rao LV, Habibullah CM, Sechi LA, Ahmed N, 2005. Antimicrobial activities of Eugenol and Cinnamaldehyde against the human gastric pathogen Helicobacter pylori. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials 4, 1-7.

Alikhani-Koupaci M, 2015. Liposomal and edible coating as control release delivery systems for essential oils: comparison of application on storage life of fresh-cut banana. Quality Assurance and Safety of Crops & Foods, 7, 175-185.

Allen TM, Cullis PR, 2013. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. Advanced Drug Delivery Reviews 65, 36-48.

Alma MH, Ertas M, Nitz S, Kollmannsberger H, 2007. Chemical composition and content of essential oil from the bud of cultivated Turkish clove (Syzygium aromaticum L). Bioresources 2, 265-269.

Alpes H, Allmann K, Plattner H, Reichert J, Rick R, Schulz S, 1986. Formation of large unilamellar vesicles using alkyl maltoside detergents. Biochimica et Biophysica Acta 862, 294-302.

Anderson TG, Tan A, Ganz P, Seelig J, 2004. Calorimetric measurement of phospholipid interaction with methyl-beta-cyclodextrin. Biochemistry 43, 2251-2261.

Aoshima H, Hamamoto K, 1999. Potentiation of GABAA receptors expressed in Xenopus oocytes by perfume and phytoncid. Bioscience Biotechnolology and Biochemistry 63, 743-748.

Arenas DM, Acevedo AM, Mendez LV, Kouznetsov VV, 2011. Scavenger activity evaluation of the clove bud essential Oil (Eugenia caryophyllus) and eugenol derivatives employing ABTS+• decolorization. Scientica Pharmaceutica 7, 779-791.

Arima H, Hagiwara Y, Hirayam F, Uekama K, 2006. Enhancement of antitumor effect of doxorubicin by its complexation with ɣ-cyclodextrin in pegylated liposomes. Journal of Drug Targeting 14, 225-232.

Arun R, Ashok Kumar CK, Sravanthi VVNSS, 2008. Cyclodextrins as drug carrier molecule : a review. Science Pharmaceutics 76, 567-598.

Arung ET, Matsubara E, Kusuma IW, Sukaton E, Shimizu K, Kondo R, 2011. Inhibitory components from the buds of clove (Syzygium aromaticum) on melanin formation in B16 melanoma cells. Fitoterapia 82, 198-202.

Ascenso A, Cruz M, Euleterio C, Carvalho FA, Santo FA, Marques HC, Simoes S, 2013. Novel tretinoin formulations: A drug-in-cyclodextrin-in liposome approach. Journal of Liposome Research 23, 211-219.

Asgharian B, Cadenhead DA, Goddard ED, 1988. The Sequestering of Surfactants from Insoluble Monolayers by α-, β - and γ-Cyclodextrins. Colloids and Surfaces 34, 143-149.

Astray G, Mejuto JC, Morales J, Rial-Otero R, Simal-Gándara J, 2010. Factors controlling flavors binding constants to cyclodextrins and their applications in food. Food Research International 43, 1212-1218.

Atger VM, Moya MD, Stoudt GW, Rodrigueza WV, Phillips MC, Rothblat GH, 1997. Cyclodextrins as catalysts for the removal of cholesterol from macrophage foam cells. Journal of Clinical Investigation 99, 773-780.

Atsumi T, Fujisawa S, Tonosaki K, 2005. A comparative study of the antioxidant/prooxidant activities of eugenol and isoeugenol with various concentrations and oxidation conditions. Toxicology in Vitro 19, 1025-1033.

Ayala-Zavala JF, Del-Toro Sanchez L, Alvarez-Parrilla E, Gonzalez-Aguilar GA, 2008. High relative humidity in-package of fresh-cut fruits and vegetables: advantage or disadvantage considering microbiological problems and antimicrobial delivering systems? Journal of Food Science 73, 41-47.

Bachiega TF, de Sousa JPB, Bastos JK, Sforcin JM, 2012. Clove and eugenol in noncytotoxic concentrations exert immunomodulatory/anti-inflammatory action on cytokine production by murine macrophages. Journal of pharmacy and pharmacology 64, 610-616.

Badran M, Elsayed A, 2013. Formulation, characterization and in-vitro skin penetration of charged flexible liposomes containing carboxyfluorscein as hydrophilic model drug. Asian Journal of Pharmaceutical and Health Sciences 3, 640-647.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M, 2008. Biological effects of essential oils – a review. Food and Chemical Toxicology 46, 446-475.

Bangham AD, Standish MM, Watkins JC, 1965. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. Journal of Molecular Biology 13, 238-252.

Barenholz Y, 2012. Doxil-the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. Journal of Controlled Release 160, 117-134.

Barquero AA, AlcheÂ LE, Coto CE, 1997. Antiviral activity of meliacine on the replication of a thymidine kinase deficient mutant of herpes simplex virus type 1 alone and in combination with acyclovir. International Journal of Antimicrobial Agents 9, 49-55.

Bartlett G, 1959. Phosphorus assay in column chromatography. Journal of Biological Chemistry 234, 466-468.

Baskaran Y, Periyasamy V, Venkatraman AC, 2010. Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats. Toxicology 268, 204-212.

Batist G, Ramakrishnan G, Rao CS, Chandrasekharan A, Gutheil J, Guthrie T, Shah P, Khojasteh A, Nair MK, Hoelzer K, Tkaczuk K, Park YC, Lee LW, 2001. Reduced cardiotoxicity and preserved antitumor efficacy of liposome-encapsulated doxorubicin and cyclophosphamide compared with conventional doxorubicin and cyclophosphamide in a randomized, multicenter trial of metastatic breast cancer. Journal of Clinical Oncology 19, 1444-1454.

Batzri S, Korn ED, 1973. Single bilayer liposomes prepared without sonication. Biochimica et Biophysica Acta 298, 1015-1019.

Benencia F, Courre`ges MC, 2000. In vitro and in vivo activity of eugenol on human herpesvirus. Phytotherapy Research 14, 495-500.

Bennett A, Stamford IF, Tavares IA, Jacobs S, Capasso F, Mascolo N, 1988. The biological activity of eugenol, a major constituent of nutmeg (Myristica fragrans): studies on prostaglandins, the intestines and other tissues. Phytoterapy Research 3, 124-130.

Bernat V, Ringard-Lefebvre C, Le Bas G, Lesieur S, 2007. Action of alpha-cyclodextrin on phospholipid assemblies. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry 57, 113-119.

Besenicar MP, Bavdek A, Kladnik A, Macek P, Anderluh G, 2008. Kinetics of cholesterol extraction from lipid membranes by methyl-β-cyclodextrin-A surface plasmon resonance approach. Biochimica et Biophysica Acta Biomembrane 1778, 175-184.

Bethanis K, Tzamalis P, Tsorteki F, Kokkinou A, Christoforides E, Mentzafos D, 2013. Structural study of the inclusion compounds of thymol, carvacrol and eugenol in β- cycodextrin by X-ray crystallography. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry 77, 163-173.

Bhardwaj U, Burgess D, 2010. Physicochemical properties of extruded and non-extruded liposomes containing the hydrophobic drug dexamethasone. International Journal of Pharmaceutics 388, 181-189.

Biju SS, Ahuja A, Khar RK, 2005. Tea tree oil concentration in follicular casts after topical delivery: determination by high performance thin layer chromatography using a perfused bovine udder model. Journal of Pharmaceutical Sciences 94, 240-245.

Blach P, Fourmentin S, Landy D, Cazier F, Surpateanu G, 2008. Cyclodextrins : a new efficient absorbent to treat waste gas streams. Chemosphere, 70, 374-380.

Bortolomeazzi R, Verardo G, Liessi A, Callea A, 2010. Formation of dehydrodiisoeugenol and dehydrodieugenol from the reation of isoeugenol and eugenol with DPPH radical and their role in the radical scavenging activity. Food Chemistry 118, 256-265.

Boulmedarat L, Piel, G, Bochot, A, Lesieur S, Delattre L, Fattal, E, 2005. Cyclodextrin mediated drug release from liposomes dispersed within a bioadhesive gel. Pharmaceutical Research 22, 962-971.

Bowden R, Chandrasekar P, White M.H, Li X, Pietrelli L, Gurwith M, Van Burik JA, Laverdiere M, Safrin S, Wingard JR, 2002. A double-blind, Randomized, controlled trial of amphotericin B colloidal dispersion versus amphotericin B for treatment of invasive aspergillosis in immunocompromised patients. Clinical Infectious Diseases 35, 359-366.

Bragagni M, Maestrelli F, Mennini N, Ghelardini C, Mura P, 2010. Liposomal formulations of prilocaine: Effect of complexation with hydroxypropyl-β-cyclodextrin on drug anesthetic effect. Journal of Liposome Research 20, 315-322.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C, 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT - Food Science and Technology 28, 25-30

Bressler NM, Group VIPTS, 2001. Verteporfin therapy of subfovealchoroidal neovascularization in age-related macular degeneration: two-year results of a randomized clinical trial including lesions with occult with no classic choroidal neovascularization -verteporfin in photodynamic therapy report 2. Americain Journal of Ophthalmology 131, 541-560.

Bullerman LB, Lieu FY, Seier SA, 1977. Inhibition of growth and aflatoxin production of cinnamon and clove oils: Cinnamic aldehyde and eugenol. Journal of Food Science 42, 1107-1109.

Burt S, 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods-A review. International Journal of Food Microbiology 94, 223-253.

Capasso R, Pinto L, Vuotto ML, Di Carlo G, 2000. Preventive effect of eugenol on PAF and ethanol-induced-gastric mucosal damage. Fitoterapia 71, 131-137.

Castangia I, Manca ML, Matricardi P, Sinico C, Lampis S, Fernandez-Busquets X, Fadda AM, Manconi M, 2013. Effect of diclofenac and glycol intercalation on structural assembly of phospholipid lamellar vesicles. International Journal of Pharmaceutics 456, 1-9.

Cavalcanti IM, Mendonça EA, Lira MC, Honrato SB, Camara CA, Amorim RV, Filho JM, Rabello MM, Hernandes MZ, Ayala AP, Santos-Magalhães NS, 2011. The encapsulation of β -lapachone in 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin inclusion complex into liposomes: A physicochemical evaluation and molecular modeling approach. European Journal of Pharmaceutical Sciences 44, 332-340.

Cevc G, Blume G, 1992. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. Biochimica et Biophysica Acta, 1104, 226-232.

Chaieb K, Hajlaoui H, Zmantar T, Kahla-Nakbi AB, Mahmoud R, Mahdouani K, Bakhrouf A, 2007. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, Eugenia caryophyllata (Syzigium aromaticum L. Myrtaceae): a short review. Phytotherapy Research 21, 501-506.

Challa R, Ahuja A, Ali J, Khar RK, 2005. Cyclodextrins in drug delivery: An updated review. AAPS Pharmscitech 6, 329-357.

Charcosset C, Juban A, Valour JP, Urbaniak S, Fessi H, 2015. Preparation of liposomes at large scale using the ethanol injection method: Effect of scale-up and injection devices. Chemical Engineering Research and Design 94, 508-515.

Chatterjee D, Bhattacharjee P, 2013. Comparative evaluation of the antioxidant efficacy of encapsulated and un-encapsulated eugenol-rich clove extracts in soybean oil: shelf-life and frying stability of soybean oil. Journal of Food Engineering 117, 545-550.

Chaudhury A, Das S, Lee RFS, Tan KB, Kiong Ng W, Tan RBH, Chiu GNC, 2012. Lyophilization of cholesterol-free PEGylated liposomes and its impact on drug loading by passive equilibration International Journal of Pharmaceutics 430, 167-175.

Chen C, Han D, Cai C, Tang X, 2010. An overview of liposome lyophilization and its future potential. Journal of Controlled Release 142, 299-311.

Chen F, Shi Z, Neoh KG, Kang ET, 2009. Antioxidant and antibacterial activities of eugenol and carvacrol-grafted chitosan nanoparticles. Biotechnology and Bioengineering 104, 30-38.

Chen H, Gao J, Wang F, Liang W, 2007. Preparation, characterization and pharmacokinetics of liposomes-encapsulated cyclodextrins inclusion complexes for hydrophobic drugs. Drug Delivery 14, 201–208.

Cho JS, Kim TH, Lim JM, Song JH, 2008. Effects of eugenol on Na+ currents in rat dorsal root ganglion neurons. Brain Research 1243, 53-62.

Cho NJ, Hwang LY, Solandt JJR, Frank CW, 2013. Comparison of Extruded and Sonicated Vesicles for Planar Bilayer Self-Assembly. Materials 6, 3294-3308.

Choi MJ, Soottitantawat A, Nuchuchua O, Min SG, Ruktanonchai U, 2009. Physical and light oxidative properties of eugenol encapsulated by molecular inclusion and emulsion–diffusion method. Food Research International 42, 148-156.

Christian AE, Byun HS, Zhong N, Wanunu M, Marti T, Furer A, Diederich F, Bittman, R, Rothblat GH, 1999. Comparison of the capacity of β-cyclodextrin derivatives and cyclophanes to shuttle cholesterol between cells and serum lipoproteins. Journal of Lipid Research 40, 1475-1482.

Christian AE, Haynes MP, Phillips MC, Rothblat GH, 1997. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. Journal of Lipid Research 38, 2264-2272.

Coimbra M, Isacchi B, Van Bloois L, Torano JS, Ket A, Wu X, Broere F, Metselaar JM, Rijcken CJ, Storm G, Bilia R, Schiffelers RM, 2011. Improving solubility and chemical stability of natural compounds for medicinal use by incorporation into liposomes. International Journal of Pharmaceutics 416, 433-442.

Cortés-Rojas DF, Souza C RF, Oliveira WP, 2014. Encapsulation of eugenol rich clove extract in solid lipid carriers. Journal of Food Engineering 127, 34-42.

Cox DV, Mann CM, Markham JL, 2001. Interactions between components of the essential oil of Melaleuca alternifolia. Journal of Applied Microbiology 91, 492–497.

Cristani M, D'Arrigo M, Mandalari G, Castelli F, Sarpietro MG, Micieli D, Venuti V, Bisignano G, Saija A, Trombetta D, 2007. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with

model membranes: implications for their antibacterial activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55, 6300-6308.

Crowe JH, Hoekstra FA, Nguyen KH, Crowe LM, 1996. Is vitrification involved in depression of the phase transition temperature in dry phospholipids. Biochimica et Biophysica Acta 1280, 187-196.

D'Arrigo P, Servi S, 2010. Synthesis of lysophospholipids. Molecules 15, 1354-1377.

Darwis Y, Kellaway IW, 2002. The lyophilisation and aerosolisation of liposomes for pulmonary drug administration. STP Pharma Sciences 12, 91-96.

Deamer D, Bangham AD, 1976. Large volume liposomes by an ether vaporization method. Biochimica et Biophysica Acta 443, 629-634.

Debouzy JC, Fauvelle F, Crouzy S, Girault L, Chapron Y, Göschl M, Gadelle A, 1998. Mechanism of alpha-cyclodextrin induced hemolysis. 2. A study of the factors controlling the association with serine-, ethanolamine-, and choline-phospholipids. Journal of Pharmaceutical Sciences 87, 59-66.

Demetzos C, 2008. Differential Scanning Calorimetry (DSC): a tool to study the thermal behavior of lipid bilayers and liposomal stability. Journal of Liposome Research 18, 159-173.

Detoni CB, de Oliveira DM, Santo IE, Pedro AS, El-Bacha R, Da Silva Velozo E, Ferreira D, Sarmento B, de Magalhães Cabral-Albuquerque EC, 2012. Evaluation of thermal-oxidative stability and antiglioma activity of Zanthoxylum tingoassuiba essential oil entrapped into multi- and unilamellar liposomes. Journal of Liposome Research 22,1-7.

Devi KP, Nisha SA, Sakthivel R, Pandian SK, 2010. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against Salmonella typhi by disrupting the cellular membrane. Journal of Ethnopharmacology 130, 107–115.

Dhule SS, Penfornis P, Frazier T, Walker R, Feldman J, Tan G, He J, Alb A, John V, Pochampally R, 2012. Curcumin-loaded ɣ-cyclodextrin liposomal nanoparticles as delivery vehicles for osteosarcoma. Nanomedicine 8, 440–451.

Dias NC, Nawas MI, Poole CF, 2003. Evaluation of a reversed-phase column (Supelcosil LC-ABZ) under isocratic and gradient elution conditions for estimating octanol-water partition coefficients. Analyst 128, 427-433.

Domazou A, Luigi-Luisi P, 2002. Size distribution of spontaneously formed liposomes by the alcohol injection method. Journal of Liposome Research 12, 205-220.

Dragicevic-Curic N, Scheglmann D, Albrecht V, Fahr A, 2009. Development of different temoporfin-loaded invasomes-novel nanocarriers of temoporfin: characterization, stability and in vitro skin penetration studies. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 70, 198-206.

Drulis-Kawa Z, Dorotkiewicz-Jach A, 2010. Liposomes as delivery systems for antibiotics. International Journal of Pharmaceutics 387,187-198.

Du WX, Olsen CW, Avena-Bustillos RJ, McHugh TH, Levin CE, Friedman M, 2009. Effects of allspice, cinnamon, and clove bud essential oils in edible apple films on physical properties and antimicrobial activities. Journal of Food Science 74, 372-378.

Dua JS, Rana AC, Bhandari AK, 2012. Liposome: methods of preparation and applications. International Journal of Pharmaceutical Studies and Research 3, 14-20.

Edris AE, Malone FRC, 2012. Preferential solubilization behaviours and stability of some phenolic-bearing essential oils formulated in different microemulsion systems. International Journal of Cosmetic Science 34, 441-450.

El Asbahani A, Miladi K, Badri W, Sala M, Aït Addi EH, Casabianca H, El Mousadik A, Hartmann D, Jilale A, Renaud FNR, Elaissari A, 2015. Essential oils: from extraction to encapsulation. International Journal of Pharmaceutics 483, 220-243.

El Hag EA, El Nadi AH, Zaiton AA, 1999. Toxic and growth retarding effects of three plant extracts on Culex pipiens larvae (Diptera: Culicidae). Phytotherapy Research 13, 388-392.

El-Kateb N, Cynober L, Chaumeil JC, Dumortier G, 2008. L-cysteine encapsulation in liposomes: effect of phospholipids nature on entrapment efficiency and stability. Journal of Microencapsulation 25, 399-413.

Fatouros DG, Hatzidimitriou K, Antimisiaris SG, 2001. Liposomes encapsulating prednisolone and prednisolone–cyclodextrin complexes: Comparison of membrane integrity and drug release. European Journal of Pharmaceutical Sciences 13, 287-296.

Fattal E, Couvreur P, Puisieux F. Méthodes de préparation des liposomes. In Delattre J, Couvreur P, Puisieux F, Philippot JR, Schuber F. les liposomes : Aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques. Paris : les éditions INSERM, 1993, 7-42.

Fauvelle F, Debouzy JC, Crouzy S, Göschl M, Chapron Y, 1997. Mechanism of alpha-cyclodextrin-induced hemolysis. 1. The two-step extraction of phosphatidylinositol from the membrane. Journal of Pharmaceutical Sciences 86, 935-943.

Fei L, Yi-cheng D, Xing-qian Y, Yu-ting D, 2011. Antibacterial effect of cinnamon Oil combined with thyme or clove oil. Agricultural Sciences in China 10, 1482-1487.

Fichi G, Flamini G, Giovanelli F, Otranto D, Perrucci S, 2007. Efficacy of an essential oil of Eugenia caryophyllata against Psoroptes cuniculi. Experimental Parasitology 115, 168–172.

Fischer IU, Von UN, Suh GE, Dengler HJ, 1990. The metabolism of eugenol in man. Xenobiotica 20, 209-222.

Friedman M, Henika PR, Mandrell RE, 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against Campylobacter jejuni, Escherichia coli, Listeria monocytogenes, and Salmonella enterica. Journal of Food Protection 65, 1545-1560.

Fu Y, Chen L, Zu Y, Liu Z, Liu X, Liu Y, Yao L, Efferth T, 2009. The Antibacterial Activity of Clove Essential Oil Against Propionibacterium acnes and Its Mechanism of Action. Archives of Dermatology 145, 86-88.

Fujisawa S, Kadoma Y, Komoda Y, 1988. ^{1}H and ^{13}C NMR studies of the interaction of eugenol, phenol, and triethyleneglycol dimethacrylate with phospholipid liposomes as a model system for odontoblast membranes. Journal of Dental Research 67, 1438-1441.

Fujisawa S, Kadoma Y, Masuhara E, 1982. Action of drugs, detergents, and monomers on liposomes. Journal of Dental Research 61, 1206-1210.

Fujisawa S, Kadoma Y, Masuhara E, 1987. A calorimetric study of the interaction of synthetic phospholipid liposomes with lipidsoluble small molecules used as dental materials and devices. Journal of Biomedical Materials Research 21, 89-98.

Gallucci N, Casero C, Oliva M, Zygadlo J, Demo M, 2006. Interaction between terpenes and penicillin on bacterial strains resistant to beta-lactam antibiotics. Molecular Medicinal Chemistry 10, 30-32.

Gambling D, Hughes T, Martin G, Horton W, Manvelian G, 2005. A comparison of Depodur, a novel, single-dose extended-release epidural morphine, with standard epidural morphine for pain relief after lower abdominal surgery, Anesthesia Analgesia 100, 1065-1074.

Garg A, Singh S, 2011. Enhancement in antifungal activity of eugenol in immunosuppressed rats through lipid nanocarriers. Colloid and surfaces B: Biointerfaces 87, 280-288.

Gayinsky S, Davidson PM, McClements DJ, Weiss J, 2008. Formulation and characterization of phytophenol-carrying antimicrobial microemulsions. Food Biophysics 3, 54-65

Gentine P, Bubel A, Crucifix C, Bourel-Bonnet L, Frisch B, 2012. Manufacture of liposomes by isopropanol injection: characterization of the method. Journal of Liposome Research 22, 18- 30.

Ghanbarzadeh S, Valizadeh H, Zakeri-Milani P, 2013. The effects of lyophilization on the physico-chemical stability of sirolimus liposomes. Advanced Pharmaceutical Bulletin 3, 25- 29.

Gharib R, Greige-Gerges H, Fourmentin S, Charcosset C, Auezova L, 2015. Liposomes incorporating cyclodextrin-drug inclusion complexes: Current state of knowledge. Carbohydrate polymers 129, 175-186.

Ghosh R, Nadiminty N, Fitzpatrick JE, William L, Thomas A, Slaga J, Kumar AP, 2005. Eugenol causes melanoma growth suppression through inhibition of E2F1 transcriptional activity. Journal of Biological Chemistry 280, 5812-5819.

Gill AO, Holley RA, 2006. Disruption of Escherichia coli, Listeria monocytogenes and Lactobacillus sakei cellular membranes by plant oil aromatics. International Journal of Food Microbiology 108, 4-12.

Gillet A, Gammenous AC, Evrard B, Piel G, 2009. Development of a new tipocal system: Drug-in-cyclodextrin-in-deformable liposome. International Journal of Pharmaceutics 380, 174-180.

Glantz MJ, Jaeckle KA, Chamberlain MC, Phuphanich S, Recht L, Swinnen LJ, Maria B, LaFollette S, Schumann GB, Cole BF, Howell SB, 1999. A randomized controlled trial comparing intrathecal sustained-release cytarabine (DepoCyt) to intrathecal methotrexate in patients with neoplastic meningitis from solid tumors. Clinical Cancer Research, 5, 3394–3402.

Glavas-Dodova M, Fredro-Kumbaradzi E, Goracinova K, Simonoska M, Calis S, Trajkovic-Jolevska S, Hincal AA, 2005. The effects of lyophilization on the stability of liposomes containing 5-FU. International Journal of Pharmaceutics 291, 79-86.

Gomes C, Moreira R, Perez EC, 2011. Poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles with entrapped trans-cinnamaldehyde and eugenol for antimicrobial delivery applications. Journal of Food Science 76, 16-24.

Gómez-Estaca J, Lo´pez de Lacey A, Lo´ pez-Caballero ME, Go´ mez-Guille´n MC, Montero P, 2010. Biodegradable gelatin–chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. Food Microbiology 27,889-896.

Goodner K L, 2008. Practical retention index models of OV-101, DB-1, DB-5, and DB-Wax for flavor and fragrance compounds. Food Science and Technology-LWT 41, 951-958.

Grammenos A, Bahri MA, Guelluy PH, Piel G, Hoebeke M, 2009. Quantification of Randomly-methylated-β-cyclodextin effect on liposome: an ESR study. Biochemical and Biophysical Research Communications 390, 5-9.

Grauby-Heywang C, Turlet JM, 2008. Study of the interaction of β-cyclodextrin with phospholipid monolayers by surface pressure measurements and fluorescence microscopy. Journal of Colloid and Interface Science 322, 73-78.

Greige-Gerges H, Sebaaly C, 2015. Essential oils encapsulation technologies: application to cloves. Book, Lambert Academic Publishing.

Griffin S, Grant Wyllie S, Markham J, 1999. Determination of octanol-water partition coefficient for terpenoids using reversed-phase high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A 864, 221-228.

Grit M, Zuidam NJ, Underberg WJM, Crommelin DJA, 1993. Hydrolysis of partially saturated egg phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions and the effect of cholesterol incorporation on hydrolysis kinetics, Journal of Pharmacy and Pharmacology 45, 490-495

Guenette SA, Uhland FC, Hélie P, Beaudry F, Vachon P, 2007b. Pharmacokinetics of eugenol in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Aquaculture 266, 262-265.

Guenette, SA, Beaudry F, Marier JF, Vachon P, 2006. Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in male Sprague–Dawley rats. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 29, 265–270.

Guennette SA, Ross A, Marier JF, Beaudry F, Vachon P, 2007a. Pharmacokinetics of Eug and its effect on thermal hypersensitivity in rats. European Journal of pharmacology 562, 60-67.

Gulçin I, Elmastaş M, Aboul-Enein HY, 2012. Antioxidant activity of clove oil-A powerful antioxidant source. Arabian Journal of Chemistry 5, 489-499.

Habib MJ, Asker AF, 1991. Photostabilization of riboflavin by incorporation into liposomes. Journal of Parenteral Science and Technology 45, 124-127.

Hagiwara Y, Arima H, Hirayam F, Uekama K, 2006. Prolonged retention of doxorubicin in tumor cells by encapsulation of ɣ-cyclodextrin in pegylated liposomes. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry 14, 65-68.

Halder S, Mehta AK, Mediratta PK, Sharma KK, 2011. Essential oil of clove (Eugenia caryophyllata) augments the humoral immune response but decreases cell mediated immunity. Phytotherapy Research 25, 1254-1256.

Hamed SF, Sadek Z, Edris A, 2012. Antioxidant and antimicrobial activities of clove bud essential oil and eugenol nanoparticles in alcohol-free microemulsion. Journal of Oleo Science 61, 641-648.

Hamilton RL Jr, Goerke J, Guo LS, Williams MC, Havel RJ, 1980. Unilamellar liposomes made

with the French pressure cell: a simple preparative and semiquantitative technique. Journal of Lipid Research 21, 981-992.

Hann IM, Prentice HG, 2001. Lipid-based amphotericin B: a review of the last 10 years of use. International Journal of Antimicrobial Agents 17, 161-169.

Hatzi, P, Mourtas, S, Klepetsanis, PG, Antimisiaris, SG, 2007. Integrity of liposomes in presence of cyclodextrins: Effect of liposome type and lipid composition. International Journal of Pharmaceutics 333, 167-176.

Haynes MP, Phillips MC, Rothblat GH, 2000. Efflux of cholesterol from different cellular pools. Biochemistry 39, 4508-4517.

HDVB, 2012. National Library of Medicine, TOXNET. Eugenol. Hazardous substances data bank [online]. Available at http://toxnet.nlm.nih.gov (Accessed: January 12, 2012).

Hemaiswarya S, Doble M, 2009. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. Phytomedicine 16, 997-1005.

Hernández-Moreno, D, Soffers A EMF, Wiratno, Falke HE, Rietjens IMCM, Murk AJ, 2013. Consumer and farmer safety evaluation of application of botanical pesticides in black pepper crop protection. Food and Chemical Toxicology 56, 483-490.

Herzog C, Hartmann K, Künzi V, kürsteiner O, Mischler R, Lazar H, Glück, 2009. Eleven years of Inflexal V-a virosomal adjuvanted influenza vaccine. Vaccine 27, 4381-4387.

Hill L, Gomes C, Taylor TM, 2013. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and C bud extracts) for antimicrobial delivery applications. LWT-Food Science and Technology 51, 86-93.

Ho SH, Cheng LPL, Sim KY, Tan HTW, 1994. Potential of cloves (Syzygium aromaticum) (L.) Merr. and Perry as a grain protectant against Tribolium castaneum (Herbst) and Sitophilus zeamais Motsch. Postharvest Biology and Technology 4, 179-183.

Hong-Li Y, Hao-sun Z, Zheng P, 2004. Determination of vanillin, eugenol and isoeugenol by RP-HPLC. Chromatographia 60, 709-713.

Hosseini M, Asl MK, Rakhshandeh H, 2011. Analgesic effect of clove essential oil in mice. Avicenna Journal of Phytomedicine 1, 1-6.

Huang Z, London E, 2013. Effect of cyclodextrin and membrane lipid structure upon cyclodextrin-lipid interaction. Langmuir 29, 14631-14638.

Hussein G, Miyashiro H, Nakamura N, Hattori M, Kakiuchi N, Shimotohno K, 2000. Inhibitory effects of Sudanese medical plant extracts on hepatitis C virus (HCV) protease. Phytotherapy Research 14, 510-516.

Immordino ML, Dosio F, Cattel L, 2006. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. International Journal of Nanomedecine 1, 297-315.

Irie T, Uekama K, 1997. Pharmaceutical applications of cyclodextrins III. Toxicological issues and safety evaluation. Journal of Pharmaceutical Sciences, 86, 147-162

Irie Y, Keung WM, 2003. Rhizoma acori graminei and its active principles protect PC-12 cells from the toxic effect of amyloid-β peptide. Brain Research 963, 282-289.

Jaafar-Maalej C, Charcosset C, Fessi H, 2011. A new method for liposome preparation using a membrane contactor. Journal of Liposome Research 21, 213-220.

Jaafar-Maalej C, Diab R, Andrieu V, Elaissari A, Fessi H, 2010. Ethanol injection method for hydrophilic and lipophilic drug-loaded liposome preparation. Journal of Liposome Research 20, 228-243.

Jaganathan SK, Mazumdar A, Mondhe D, Mandal M, 2011. Apoptotic effect of eugenol in human colon cancer cell lines. Cell Biology International 35, 607-615.

Jain SK, Gupta Y, Jain A, Bhola M, 2007. Multivesicular liposomes bearing celecoxib-β-cyclodextrin complex for transdermal delivery. Drug Delivery 14, 327-335.

Jirovetz L, Buchbauer G, Stoilova I, Stoyanova A, Krastanov A, Schmidt E, 2006. Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil. Journal of Agricaltural and Food Chemistry 54, 6303-6307.

Jung BO, Chung SJ, Lee SB, 2006. Preparation and characterization of eugenol-grafted chitosan hydrogels and their antioxidant activities. Journal of Applied Polymer Science 90, 3500-3506.

Justo OR, Moraes AM, 2005. Kanamycin incorporation in lipid vesicles prepared by ethanol injection designed for tuberculosis treatment. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 57, 23-30.

Justo OR, Moraes AM, 2010. Economical feasibility evaluation of an ethanol injection liposome production plant. Chemical Engineering and Technology 33, 15-20.

Justo OR, Moraes AM, 2011. Analysis of process parameters on the characteristics of liposomes prepared by ethanol injection with a view to process scale-up: Effect of temperature and batch volume. Chemical Engineering and Technology 89, 785-792.

Karn PR, Vanic Z, Pepic I, Škalko-Basnet N, 2011. Mucoadhesive liposomal delivery systems: the choice of coating material. Drug Development and Industrial Pharmacy 37, 482-488.

Kaszuba M, Corbett J, Watsenn FM, Jones A, 2010. High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. Philosophical Transactions of the Royal Society A 368, 4439-4451.

Kaur G, Athar M, Alam MS, 2010. Eugenol precludes cutaneous chemical carcinogenesis in mouse by preventing oxidative stress and inflammation and by inducing apoptosis. Molecular Carcinogenesis 49, 290–301.

Kayaci F, Ertas Y, Uyar T, 2013. Enhanced thermal stability of eugenol by cyclodextrin inclusion complex encapsulated in electrospoun polymeric nanofibers. Journal of Agricultural and Food Chemistry 61, 8156-8165.

Kfoury M, Landy D, Auezova L, Greige-Gerges H, Fourmentin S, 2014. Effect of cyclodextrin complexation on phenylpropanoids solubility and antioxidant activity. Beilstein Journal of Organic Chemistry 10, 2322-2331.

Khan MSA, Ahmad I, 2012. Biofilm inhibition by Cymbopogon citratus and Syzygium aromaticum essential oils in the strains of Candida albicans. Journal of Ethnopharmacology 140, 416-423

Kilsdonk EP, Yancey PG, Stoudt GW, Bangerter FW, Johnson WJ, Phillips MC, Rothblat GH, 1995. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. Journal of Biological Chemistry

270, 17250-17256.

Kim EH, Kim HK, Ahn YJ, 2003. Acaricidal activity of clove bud oil compounds against dermatophagoides farinae and dermatophagoides pteronyssinus (acari: phyroglyphidae). Journal of Agricaltural and Food Chemistry 51, 885-889.

Kim JR, Sharma S, 2011. Acaricidal activities of clove bud oil and red thyme oil using microencapsulation against HDMs. Journal of Microencapsulation 28, 82-91.

Kim S, Nga W, Shena S, Donga Y, Tan R, 2009. Phase behavior, microstructure transition, and antiradical activity of sucrose laurate/propylene glycol/ the essential oil of Melaleuca alternifolia/water microemulsions. Colloids Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 348, 289-297.

Kim SI, Yi JH, Tak JH, Ahn YJ, 2004. Acaricidal activity of plant essential oils against dermanyssus gallinae (acari: dermanyssudae). Veterniary Parasitology 120, 297-304.

Kontogiannopoulos KN, Tsermentseli SK, Assimopoulou AN, Papageorgiou VP, 2014. Sterically stabilized liposomes as a potent carrier for shikonin. Journal of Liposome Research 24, 230-240.

Kouidhi B, Zmantar T, Bakhrouf A. 2010. Anticarciogenic and cytotoxic activity of clove essential oil (Eugenia caryophyllata) against a large number of oral pathogens. Annals of Microbiology 60, 1-6.

Kozam G, 1977. The effect of eugenol on nerve transmission. Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology 44, 799-805.

Kremer JM, Esker MW, Pathmamanoharan C, Wiersema PH, 1977. Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection method. Biochemistry 16, 3932-3935.

Kriegel C, Kit KM, McClements DJ, Weiss J, 2009. Nanofibers as carrier systems for antimicrobial microemulsions. Part I: Fabrication and characterization. Langmuir 25, 1154-1161.

Kriegel C, Kit KM, McClements DJ, Weiss J, 2010. Nanofibers as carrier systems for antimicrobial microemulsions. Part II. Release characteristics and antimicrobial activity. Journal of Applied Polymer Science 118, 2859-2868.

Kumaravelu P, Dakshinamoorthy D P, Subramaniam S, Devaraj H, Devaraj NS, 1995. Effect of eugenol on drug-metabolizing enzymes of carbon tetrachlorideintoxicated rat liver. Biochemical Pharmacology 49, 1703-1707.

Kurokawa M, Hozumi T, ,Basnet P, Nakano M, Kadota S, Namba T, Kawana T, Shiraki K, 1998. Purification and characterization of eugeniin as an anti-herpesvirus compound from Geum japonicum and Syzygium aromaticum. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 284, 728-735.

Kyrikou I, Georgopoulos A, Hatziantoniou S, Mavromoustakos T, Demetzos C, 2005. A comparative study of the effects of cholesterol and sclareol, bioactive labdane type diterpene, on phospholipid bilayers. Chemistry and Physics of Lipids 133, 125-134.

Ladd T L, Stinner BR, Krueger HR, 1983. Eugenol, a new attractant for the northern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) Diabrotica spp. Journal of Economic Entomology 76, 1049-1051.

Lampman RL, Metcalf R L, 1988. The comparative response of Diabrotica species (Coleoptera: Chrysomelidae) to volatile attractants. Environmental Entomology 17, 644-648.

Laouini A, Charcosset C, Fessi H, Holdich RG, Vladisavljević G, 2013a. Preparation of liposomes: A novel application of microengineered membranes - From laboratory scale to large scale. Colloids and Surfaces B 112, 272-278.

Laouini A, Charcosset C, Fessi H, Holdich RG, Vladisavljević GT, 2013b. Preparation of liposomes: a novel application of microengineered membranes-Investigation of the process parameters and application to the encapsulation of vitamin E. Royal Society of Chemistry Advances 3, 4985-4994.

Laouini A, Jaafar-Maalej C, Gandoura-Sfar S, Charcosset C, Fessi H, 2012b. Spironolactone-loaded liposomes produced using a membrane contactor method: an improvement of the ethanol injection technique. Colloid and Polymer Science 139, 23-28.

Laouini A, Jaafar-Maalej C, Limayem-Blouza I, Sfar S, Charcosset C, Fessi H, 2012a. Preparation, characterization and applications of liposomes: State of the art. Journal of Colloid Science and Biotechnology 1, 147-168.

Laouini A, Jaafar-Maalej C, Sfar S, Charcosset C, Fessi H, 2011. Liposome preparation using a hollow fiber membrane contactor-Application to spironolactone encapsulation. International Journal of Pharmaceutics 415, 53-61.

Lapinski MM, Castro-Forero A, Greiner AJ, Ofoli RY, Blanchard GJ, 2007. Comparison of liposomes formed by sonication and extrusion: rotational and translational diffusion of an embedded chromophore. Langmuir 23, 11677-11683.

Lasic DD, 1988. The mechanism of vesicle formation. Biochemical Journal 256, 1-11.

Lee KG, Shibamoto T, 2001. Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds [Syzygium aromaticum (L.) Merr. et Perry]. Food Chemistry 74, 443-448.

Lee MH, Yeon KY, Park CK, Li HY, Fang Z, Kim MS, Choi SY, Lee SJ, Lee S, Park K, Lee JH, Kim JS, Oh SB, 2005. Eugenol inhibits calcium currents in dental afferent neurons. Journal of Dental Research 84, 848-851.

Lee MY, Min SG, You SK, Choi MJ, Hong GP, Chun JY, 2013. Effect of β-cyclodextrin on physical properties of nanocapsules manufactured by emulsion-diffusion method. Journal of Food Engineering 119, 588-594.

Lee YY, Hung SL, Pai SF, Lee YH, Yang SF, 2007. Eugenol suppressed the expression of lipopolysaccharide induced proinflammatory mediators in human macrophages. Journal of Endodontics 33, 698-702.

Liang H, Yuan Q, Vriesekoop F, Lv F, 2012. Effects of cyclodextrins on the antimicrobial activity of plant-derived essential oil compounds. Food Chemistry 135, 1020-1027.

Liolios CC, Gortzi O, Lalas S, Tsaknis J, Chinou I, 2009. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of Origanum dictamnus L. and in vitro antimicrobial activity. Food Chemistry 112, 77-83.

Lionnet L, Beaudry F, Vachon P, 2010. Intrathecal eugenol administration alleviates neuropathic pain in male Sprague-Dawley rats. Phytotherapy research 24, 1645-1653.

Lipowsky R, Sackmann E, 1995. Structure and dynamics of membranes, Elsevier Sci. B.V.

Liu Q, Niu H, Zhang W, Mu H, Sun C, Duan J, 2015. Synergy between thymol, eugenol, berberine, cinnamaldehyde and streptomycin against planktonic and biofilm-associated food-borne pathogens. Letters in Applied Microbiology 60, 421-430.

Liu W, Ye A, Liu C, Liu W, Singh H, 2012. Structure and integrity of liposomes prepared from milk- or soybean-derived phospholipids during in vitro digestion. Food Research International 48, 499-506.

Locci E, Lai S, Piras A, Marongiu B, Lai A, 2004. ^{13}C-CPMAS and ^{1}H-NMR study of the inclusion complexes of β-cyclodextrin with carvacrol, thymol, and eugenol prepared in supercritical carbon dioxide. Chemistry and biodiversity 1, 1354-1366.

Loftsson T, Brewster ME, 2011. Pharmaceutical applications of cyclodextrins : effects on drug permeation through biological membranes. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 63, 1119-1135.

Loftsson T, Duchene D, 2007. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. International Journal of Pharmaceutics 329, 1-11.

Lorin A, Flore C, Thomas A, Brasseur R, 2004. Les Liposomes: description, fabrication et applications. Biotechnology, Agronomy, Society and Environment 8, 163-176.

Louie GV, Baiga TJ, Bowman ME, Koeduka T, Taylor JH, Spassova SM, Pichersky E, Noel JP, 2007. Structure and reaction mechanism of basil eugenol synthase. PLOS One 10, 993.

Loukas YL, Jayasekera P, Gregoriadis G, 1995. Novel liposome based multicomponent systems for the protection of photolabile agents. International Journal of Pharmaceutics 117, 85-94.

Loukas YL, Vraka V, Gregoriadis G, 1998. Drugs, in cylodextrins, in liposomes: A novel approach to the chemical stability of drugs sensitive to hydrolysis. International Journal of Pharmaceutics 162,137–142.

Lyklema J, Fleer GJ, 1987. Electrical contributions to the effect of macromolecules on colloid stability. Colloids and Surfaces 25, 357-368.

MacDonald RC, MacDonald RI, Menco BPM, Takeshita K, Subbarao NK, Hu LR, 1991. Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. Biomembranes 1061, 297-303.

Machado M, Costa P, de Oliveira AP, Tilia C, de Souza JP, de Sousa JPB, Bastos JK, de Andrade SF, 2011. Gastroprotective activity of essential oil of the Syzygium aromaticum and its major component eugenol in different animal models. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 383,149-158.

Madani F, Peralvarez-Marin A, Graslund A, 2011. Liposome model systems to study the endosomal escape of cell-penetrating peptides: Transport across phospholipid membranes induced by a proton gradient. Journal of Drug Delivery 2011, 1-8.

Maeda H, Dudareva N, 2012. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. The Annual Review of Plant Biology 63, 73-105.

Maestrelli F, Gonzalez-Rodriguez ML, Rabasco AM, Ghelardini C, Mura P, 2010. New drug-in cyclodextrin-in deformable liposomes formulations to improve the therapeutic efficacy of local anaesthetics. International Journal of Pharmaceutics 395, 222–231.

Maestrelli F, Gonzalez-Rodriguez ML, Rabasco AM, Mura P, 2005. Preparation and characterisation of liposomes encapsulating ketoprofen–cyclodextrin complexes for transdermal drug delivery. International Journal of Pharmaceutics 298, 55-67.

Maestrelli F, Gonzalez-Rodriguez ML, Rabasco AM, Mura P, 2006. Effect of preparation technique on the properties of liposomes encapsulating ketoprofen–cyclodextrin complexes aimed for transdermal delivery. International Journal of Pharmaceutics 312, 53-60.

Magalhães CB, Riva DR, DePaula LJ, Brando-Lima A, Koatz VL, Leal-Cardoso JH, Zin WZ, Faffe DS, 2010. In vivo anti-inflammatory action of eugenol on lipopolysaccharide-induced lung injury. Journal of Applied Physiology 108, 845-851.

Maitani Y, Soeda H, Junping W, Takayama K, 2001. Modified ethanol injection method for liposomes containing β-sitosterol β-D-glucoside. Journal of Liposome Research 11, 115-125.

Manabe A, Nakayama S, Sakamoto K, 1987. Effects of essential oils on erythrocytes and hepatocytes from rats and dipalmitoyl phosphatidylcholine-liposomes. Japanese Journal of Pharmacology 44, 77-84.

Manitto P, Monti D, Gramatica P, 1974. Biosynthesis of Phenylpropanoid Compounds. Part 1.l Biosynthesis of Eugenol in Ocimum basilicum L. Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 1, 1727-1731.

Markowitz K, Moynihan M, Liu M, Kim S, 1992. Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol. A clinically oriented review. Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology 73, 729-737.

Marya CM, Satija G, Avinash J, Nagpal R, Kapoor R, Ahmad A, 2012. In vitro inhibitory effect of clove essential oil and its two active principles on tooth decalcification by apple juice. International Journal of Dentistry 2012, 1-6.

Matsingou C, Demetsoz C, 2007. The perturbing effect of cholesterol on the interaction between labdanes and DPPC bilayers. Thermochimica Acta, 452, 116-123.

Maxfield FR, Tabas I, 2005. Review, Role of cholesterol and lipid organization in disease. Nature 438, 612-621.

McCormack B, Gregoriadis G, 1994. Drugs-in-cyclodextrins-in-liposomes: A novel concept in drug delivery. International Journal of Pharmaceutics 112, 249-258.

McCormack B, Gregoriadis G, 1998. Drugs-in-cyclodextrins-in-liposomes: an approach to controlling the fate of water in soluble drugs in vivo. International Journal of Phamaceutics, 162, 59-69.

McMahon HT, Gallop JL, 2005. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodeling. Nature 438, 590-596.

Metherel AH, Hogg RC, Buzikievich LM, Stark KD, 2013. Butylatedhydroxytoluene can protect polyunsaturated fatty acids in dried blood spots from degradation for up to 8 weeks at room temperature. Lipids in Health and Disease 12, 22.

Meunier JP, Cardot JM, Gauthier P, Beyssac E, Alric M, 2006. Use of rotary fluidized-bed technology for development of sustained-release plant extracts pellets: potential application for feed additive delivery. Journal of Animal Science 84, 1850-1859.

Mills T, Huang J, Feigenson G and Nagle J, 2009. Effects of cholesterol and unsaturated DOPC lipid on chain packing of saturated gel-phase DPPC bilayers. General Physiology Biophysics 28, 126-139.

Miyazawa M, Hisama M, 2003. Antimutagenic activity of phenylpropanoids from Clove (Syzygium aromaticum). Journal of Agricultural and Food Chemistry 51, 6413-6422.

Moghimipour E, Aghel N, Mahmoudabadi AZ, Ramezani Z, Handali S, 2012. Preparation and characterization of liposomes containing essential oil of Eucalyptus camaldulensis leaf. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products 7,117-122.

Mosca M, Ceglie A, Ambrosone L, 2011. Effect of membrane composition on lipid oxidation in liposomes. Chemistry and Physics of Lipids 164, 158-165.

Mosher G, Thompson DO, 2000. Complexation and Cyclodextins. In: Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Volume 19, Swarbrick, J. and Boylan, J.C.E. (Eds.), Marcel Dekker, New York, 49-88.

Mozafari MR, Johnson C, Hatziantoniou S, Demetzos C, 2008. Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. Journal of Liposome Research 18, 309-327.

Muggia F, Hainsworth J, Jeffers S, Groshen S, Tan M, Greco FA, 1996. Liposomal doxorubicin (Doxil) is active against refractory ovarian cancer. Americain Society of Clinical Oncology 15, 287.

Müller M, Pape HC, Speckmann EJ, Gorji A, 2006. Effect of eugenol on spreading depression and epileptiform discharges in rat neocortical and hippocampal tissues. Neuroscience 140, 743-751.

Naeff R, 1996. Feasibility of topical liposome drugs produced on an industrial scale. Advanced Drug Delivery Reviews 18, 343-347.

Nangle MR, Gibson TM, Cotter MA, Cameron NE, 2006. Effects of eugenol on nerve and vascular dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. Planta Medica 72, 494-500.

Nasir A, Harikimar SL, Amanpreet K, 2012. Cyclodextrins: an excipient tool in drug delivery. International Research Journal of Pharmacy 3, 44-50.

Nasongkla, N, Wiedmann AF, Bruening A, Beman M, Ray D, Bornmann WG, Boothman DA, Gao J, 2003. Enhancement of Solubility and Bioavailability of β-Lapachone using Cyclodextrin Inclusion Complexes. Pharmaceutical Research 20, 1626-1636.

Nastruzzi C, Esposito E, Menegatti E, Walde P, 1993. Use and stability of liposomes in dermatological preparations. Journal of Applied Cosmetology 11, 77-91

Nguyen DH, Taub D, 2002. Cholesterol is essential for macrophage inflammatory protein 1b binding and conformational integrity of CC chemokine receptor 5. Blood 99, 4298-4306.

Nishijo J, Shiota S, Mazima K, Inoue Y, Mizuno H, Yoshida J, 2000. Interactions of cyclodextrins with dipalmitoyl, distearoyl, and dimyristoyl phosphatidyl choline liposomes. A study by leakage of carboxyfluorescein in inner aqueous phase of unilamellar liposomes.

Chemical and Pharmaceutical Bulletin 48, 48-52.

Nishizuka Y, 1992. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. Science 258, 607-614.

NIST, 2011. NIST chemistry WebBook: NIST standard reference database number 69.

Nonsee K, Supitchaya C, Thawien W, 2011. Antimicrobial activity and the properties of edible hydroxypropyl methylcellulose based films incorporated with encapsulated clove (Eugenia caryophyllata thumb oil. International Food Research Journal 18, 1531-1541.

Nuchuchua O, Saesoo S, Sramala I, Puttipipathachorn S, Soottitantawat A, Ruktanonchai U, 2009. Physicochemical investigation and molecular modeling of cyclodextrin complexation mechanism with eugenol. Food Research International 42, 1178-1185.

O'Neil, M.J. (ed.). The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., 2006, p. 665.

Ogata M, Hoshi M, Urano S, Endo T, 2000. Antioxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric compounds. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 48, 1467-1469.

Ohakubo T, Shibata M, 1997. The selective capsaicin receptor antagonist capsazepine abolishes the antinociceptive actions of eugenol and guaiacol. Journal of Dental Research 76, 848-851.

Ohvo H, Slotte JP, 1996. Cyclodextrin-mediated removal of sterols from monolayers: effects of sterol structure and phospholipids on desorption rate. Biochemistry 35, 8018-8024.

Opdyke DLJ, 1975. Monographs on fragrance and raw materials: eugenol. Food and Cosmetics Toxicology 13, 545-547.

Ortan A, Campeanu G, Dinu-Pirv C, Popesc L, 2009. Studies concerning the entrapment of Anethum graveolens essential oil in liposomes. Romanian Biotechnological Letters 14, 4411-4417.

Overhage J, Steinbüchel A, Priefert H, 2003. Highly Efficient Biotransformation of Eugenol to Ferulic Acid and Further Conversion to Vanillin in Recombinant Strains of Escherichia coli. Applied and Enviromental Microbiology, 69, 6569-6576.

Ozcan MM, Arslan D, 2011. Antioxidant effect of essential oils of rosemary, clove and cinnamon on hazelnut and poppy oils. Food Chemistry 129, 171-174.

Ozturk A, Ozbek H, 2005. The anti-inflammatory activity of Eugenia caryophyllata essential oil: an animal model of anti-inflammatory activity. European Journal of General Medecine 2, 159-163.

Pan IF, Mendoza M, Maté JI, 2013. Whey protein isolate edible films with essential oils incorporated to improve the microbial quality of poultry. Journal of the Science of Food and Agriculture 93, 2986-2994.

Pan IF, Royo M, Maté JI, 2012. Antimicrobial activity of whey protein isolate edible films with essential oils against food spoilers and foodborne pathogens. Journal of Food Science 77, 383-390.

Pandey BN, Lathika KM, Mishra KP, 2006. Modification of radiation-induced oxidative damage in liposomal and microsomal membrane by eugenol. Radiation Physics and Chemistry 75, 384-391.

Park BS, Song YS, Yee SB, Lee BG, Seo SY, Park YC, Kim JM, Kim HM, Yoo YH, 2005. Phospho-ser 15-p53 translocates into mitochondria and interacts with Bcl-2 and Bcl-x in eugenol-induced apoptosis. Apoptosis 10, 193-200.

Parmentier J, Thomas N, Müllertz A, Fricker G, Rades T, 2012. Exploring the fate of liposomes in the intestine by dynamic in vitro lipolysis. International Journal of Pharmaceutics 437, 253-363.

Pawar VC, Thaker VS, 2006. In vitro efficacy of 75 essential oils against Aspergillus niger. Mycoses 49, 316-323.

Pérez-Coneza D, Cao J, Chen L, McLandsborough L, Weiss J, 2011. Inactivation of Listeria monocytogenes and Escherichia coli O157:H7 Biofilms by Micelle-Encapsulated Eugenol and Carvacrol. Journal of Food Protection 74, 55-62.

Perrucci S, Macchioni G, Cioni PL, Flamini G, Morelli I, 1995. Structure/activity relationship of some natural monoterpenes as acaricides against Psoroptes cuniculi. Journal of Natural Products 8, 1261-1264.

Pessoa LM, Morais SM, Bevilaqua CM, Luciano JHS, 2002. Anthelmintic activity of essential oil of Ocimum gratissimum Linn and eugenol against Haemonchus contortus. Veterinary Parasitology 109, 59-63.

Petre CE, Dittmer DP, 2007. Liposomal daunorubicin as treatment for Kaposi's sarcoma, International Journal of Nanomedicine 2, 277-288.

Pham TT, Jaafar-Maalej C, Charcosset C, Fessi H, 2012. Liposome and niosome preparation using a membrane contactor for scale up. Colloids Surfaces B 94, 15-21.

Pharmacopée Européenne, 2010. 7ème édition. Strasbourg: Conseil de l'Europe.

Piel G, Piette M, Barillaro V, Castagne D, Evrard B, Delattre L, 2006. Betamethasonein-cyclodextrin-in-liposome: the effect of cyclodextrins on encapsulation efficiency and release kinetics. International Journal of Pharmaceutics 312, 75-82.

Pietzyk B, Henschke K, 2000. Degradation of phosphatidylcholine in liposomes containing carboplatin in dependence on composition and storage conditions. International Journal of Pharmaceutics 196, 215-218.

Pike LJ, Casey L, 2002. Cholesterol levels modulate EGF receptor-mediated signaling by altering receptor function and trafficking. Biochemistry 41, 10315-10322.

Pino JA, Marbot R, Aguero J, Fuentes V, 2001. Essential oil from buds and leaves of clove (Syzigium aromaticum L. Merr. et Perry) Grown in Cuba. Journal of Essential Oil Research 13, 278-279.

Pinto E, Silva LV, Calvaeiro C, Salgueiro L, 2009. Antifungal activity of the clove essential oil from Syzygium aromaticum on Candida Aspersgillus and dermatophyte species. Journal of Medical Microbiology 58, 1454-1462.

Pokharkar VB, Shekhawat PB, Dhapte VV, Mandpe LP, 2011. Development and optimization of eugenol loaded nanostructured lipid carriers for periodontal delivery. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 3, 138-143.

Ponce A, Roura S, Moreira Mdel R, 2011. Essential oils as biopreservatives: different methods for the technological application in lettuce leaves. Journal of Food Science 76, 35-40.

Pons M, Poradada M, Estelrich J, 1993. Liposomes obtained by the ethanol injection method. International Journal of Pharmaceutics 95, 51-56.

Popovici C, Saykova I, Tylkowski B, 2009. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. Revue de Génie Industriel 4, 25-39

Pradhan P, Guan J, Lu D, Wang PG, Lee J, Lee RJ, 2008. A facile microfluidic method for production of liposomes. Anticancer Research, 28, 943-948.

Prado JM, Prado GHC, Meireles MAA, 2011. Scale-up study of supercritical fluid extraction process for clove and sugarcane residue. Journal of Supercritical Fluids 56, 231-237.

Prashar A, Locke IC, Evans CS, 2006. Cytotoxicity of clove (Syzygium aromaticum) oil and its major components to human skin cells. Cell Proliferation 39, 241-248.

Puglisi G, Fresta M, Ventura CA, 1996. Interaction of natural and modified β- cyclodextrins with a biological membrane model of dipalmitoylphosphatidylcholine. Journal of Colloid and Interface Science 180, 542-547.

Purwaningsih E, Schubert R, 2004. The preparation of liposomes derived from mixed micelles of lecithin added by sodium cholate, followed by dialyzing using hemoflow high flux F60S. Makara Serie Kesehatan 8, 49-52.

Puskas I, Barcza L, Szente L, Csempesz F, 2006. Features of the interaction between cyclodextrins and colloidal liposomes. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry 54, 89-93.

Raffy S, Teissie J, 1999. Control of lipid membrane stability by cholesterol content. Biophysical Journal 76, 2072-2080.

Rafler G, Jobmann M, 1994. Controlled release systems of biodegradable polymers, 2nd communication: Microparticle preparation by spray drying. Drugs made in Germany 37, 115-119.

Raghavenra H, Diwakr BT, Lokesh BR, Naidu KA. 2006. Eugenol-The active principle from cloves inhibits 5- lipoxygenase activity and leukotriene- C4 in human PMNL cells. prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 74, 23-27.

Raina VK, Srivastava SK, Aggarwal KK, Syamasundar KV, Kumar S, 2001. Essential oil composition of Syzygium aromaticum leaf from Little Andaman, India. Flavour and Fragrance Journal 16, 334-336.

Rao SR, Ravishankar GA, 1999. Biotransformation of isoeugenol to vanilla flavour metabolites and capsaicin in suspended and immobilized cell cultures of Capsicum frutescens: study of the influence of β-cyclodextrin and fungal elicitor. Process Biochemistry 35, 341-348.

Rastogi SC, Johansosn JD, Frosch P, Menne T, Bruze M, Lepoittevin JP, Dreier B, Andersen KE, White IR ,1998. Deodorants on the European markets: quantitative chemical analysis of 21 fragrances. Contact Dermititis 38, 29-35.

Reiner G, Fraceto LF, De Paula E, Perillo M. Garcia D, 2013. Effects of gabaergic phenols on phospholipid bilayer as evaluated by ^{1}H NMR. Journal of Biomaterials Nanobiotechnology 4, 28-34.

Reiner GN, Labuckas DO, Garcia DA, 2009. Lipophilicity of some gabaergic phenols and related compounds determined by HPLC and partition coefficients in different systems. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 49, 686-691.

Riaz M, 1996. Liposome preparation method. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences 9, 65-77.

Rigaud JL, Chami M, Lambert O, Levy D, Ranck JL, 2000. Use of detergents in two-dimensional crystallization of membrane proteins. Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes 1508, 112-128.

Rodrigues TG, Fernandes AJr, Sousa JP, Bastos JK, Sforcin JM, 2009. In vitro and in vivo effects of clove on pro-inflammatory cytokines production by macrophages. Natural Product Research 23, 319-326.

Rodriguez MA, Pytlik R, Kozak T, Chhanabhai M, Gascoyne R, Lu B, Deitcher SR, Winter JN. 2009. Vincristine sulfate liposomes injection (Marqibo) in heavily pretreated patients with refractory aggressive non-Hodgkin lymphoma: report of the pivotal phase 2 study. Cancer 115, 3475-3482.

Rongen HA, Bult A, Van Bennekom WP, 1997. Liposomes and immunoassays. Journal of Immunological Methods 204, 105-133.

Rothblat GH, Llera-Moya M, Atger V, Kellner-Weibel G, Williams DL, Phillips MC, 1999. Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. Journal of Lipid Research 40, 781-796.

Roy M, Gallardo M, Estelrich J, 1998. Influence of size on electrokinetics behavior of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine lipids vesicles. Journal of Colloid and Interface Science 206, 512-517.

Ruberto G, Baratta MT, 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. Food Chemistry 69, 167-174.

Ruozi B, Belleti D, Tombesi A, Tosi G, Bondioli L, Forni F, Vandelli MA, 2011. AFM, ESEM, TEM, and CLSM in liposomal characterization: a comparative study. International Journal of Nanomedicine 6, 557-563.

Sajomsang W, Nuchuchua O, Gonil P, Saesoo S, Sramala I, Soottitantawat A, Puttipipatkhachorn S, Ruktanonchai UR, 2012. Water-soluble β cyclodextrin grafted with chitosan and its inclusion complex as a mucoadhesive eugenol carrier. Carbohydrate Polymers, 89, 623-631.

Sajomsang W, Nuchuchua O, Saesoo S, Gonil P, Chaleawlert-umpon S, Pimpha N, Sramala I, Soottitantawat A, Puttipipatkhachorn S, Ruktanonchai UR, 2013. A comparison of spacer on water-soluble cyclodextrin grafted chitosan inclusion complex as carrier of eugenol to mucosae. Carbohydrate Polymers 92, 321-327.

Santin JR, Lemos M, Klein-Junior LC, Machado ID, Costa P, de Oliveira AP, Tilia C, de Souza JP, de Souza JP, Bastos JK, de Andrade SF, 2011. Gastroprotective activity of essential oil of the

Syzygium aromaticum and its major component eugenol in different animal models. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 383, 149-158.

Saviuc C, Grumezescu AM, Banu O, Chifiriuc C, Mihaiescu D, Balaure P, Lazar V, 2012. Biocompatible magnetic MWCNTs based on phytocomponents from Eugenia carryophyllata. Revista de Chimie 63, 531-535.

Schubert MA, Müller-Goymann CC, 2003. Solvent injection as a new approach for manufacturing lipid nanoparticles-evaluation of the method and process parameters. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 55, 125-131.

Sebaaly C, Charcosset C, Stainmesse S, Fessi H, Greige-Gerges H, 2016. Clove essential oil-in-cyclodextrin-in-liposomes in the aqueous and lyophilized states: from laboratory to large scale using a membrane contactor. Carbohydrates polymers,138, 75-85.

Sebaaly C, Greige-Gerges H, Agusti G, Fessi H, Charcosset C, 2015b. Large scale preparation of clove essential oil and eugenol loaded liposomes using a membrane contactor and a pilot plant. Journal of Liposome Research 23, 1-13.

Sebaaly C, Greige-Gerges H, Stainmesse S, Fessi H, Charcosset C. Effect of composition, hydrogenation of phospholipids and lyophilization on the characteristics of eugenol-loaded liposomes prepared by ethanol injection method. Submitted.

Sebaaly C, Jraij A, Fessi H, Charcosset C, Greige-Gerges H, 2015a. Preparation and characterization of clove essential oil loaded liposomes. Food Chemistry 178, 52-62.

Seo EJ, Min SG, Choi MJ, 2010. Release characteristics of freeze-dried eugenol encapsulated with β-cyclodextrin by molecular inclusion method. Journal of Microencapsulation 27, 496-505.

Shah B, Davidson P.M, Zhong Q, 2013. Nanodispersed eugenol has improved antimicrobial activity against Escherichia coli O157:H7 and Listeria monocytogenes in bovine milk. International Journal of Food Microbiology 161, 53-59.

Shah B, Davidson PM, Zhong Q, 2012. Encapsulation of eugenol using Maillard-type conjugates to form transparent and heat stable nanoscale dispersions. LWT-Food Science and Technology 49, 139-148.

Shashi K, Satinder K, Bharat P, 2012. A complete review on: Liposomes. International Research Journal of Pharmacy 3, 10-16.

Sherry M, Charcosset C, Fessi H, Greige-Gerges H, 2013. Essential oils encapsulated in liposomes: a review. Journal of Liposome Research 23, 268-275.

Shimoda K, Kondo Y, Nishida T, Hamada H, Nakajima N, 2006. Biotransformation of thymol, carvacrol and eugenol by cultured cells of Eucalyptus perriniana. Phytochemistry 67, 2256-2261.

Shinde U, Nagarsenker M, 2011. Microencapsulation of eugenol by gelatin-sodium alginate complex coacervation. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences 73, 311-315.

Sikkema J, de Bont JAM, Poolman B, 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiological Reviews 59, 201-222.

Silva R, Ferreira H, Little C, Cavaco-Paulo A, 2010. Effect of ultrasound parameters for unilamellar liposome preparation. Ultrasonics Sonochemistry 17, 628-632.

Simon JA, Group ES, 2006. Estradiol in micellar nanoparticles: the efficacy and safety of a novel

transdermal drug-delivery technology in the management of moderate to severe vasomotor symptoms. Menopause 13, 222-231.

Singh J, Baghotia A, Goel SP, 2012. Eugenia caryophyllata Thunberg (Family Myrtaceae): A Review. International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences 3, 1469-1475.

Sinico C, De-Logu A, Lai F, Valenti D, Manconi M, Loy G, Bonsignore L, Fadda AM, 2005. Liposomal incorporation of Artemisia arborescens L. essential oil and in vitro antiviral activity. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 59, 161-168.

Skalko BN, Pavelic Z, Becirevic LM, 2000. Liposomes containing drug and cyclodextrin prepared by the one-step spray-drying method. Drug Development and Industrial Pharmacy 26, 1279-1284.

Skalko N, Brandl M, Bedirevid-Ladan M, Filipovid-Greie J, Jalsenjak I, 1996. Liposomes with nifedipine and nifedipine cyclodextrin complex: Calorimetrical and plasma stability comparison. European Journal of Pharmaceutical Sciences 4, 359-366.

Song J, Shi F, Zhang Z, Zhu F, Xue J, Tan X, Zhang L, Jia X, 2011. Formulation and evaluation of celastrol-loaded liposomes. Molecules 16, 7880-7892.

Sorgi FL, Huang L, 1996. Large scale production of DC-Chol cationic liposomes my microfluidization. International Journal of Pharmaceutics 144, 131-139.

Srisuk P, Thongnopnua P, Raktanonchai U, Kanokpanont S, 2012. Physico-chemical characteristics of methotrexate-entrapped oleic acid-containing deformable liposomes for in vitro transepidermal delivery targeting psoriasis treatment. International Journal of Pharmaceutics 427, 426-434.

Srivastava AK, Srivastava SK, Syamsundar KV, 2005. Bud and leaf essential oil composition of Syzygium aromaticum from India and Madagascar. Flavour and Fragrance Journal 20, 51–53.

Sriwongsitanont S, Ueni M, 2011. Effect of freeze thawing process on the size and lamellarity of PEG-Lipid liposomes. The Open Colloid Science Journal 4, 1-6.

Stano P, Bufali S, Pisano C, Bucci F, Barbarino M, Santaniello M, Carminati P, Luisi PL, 2004. Novel Camptothecin Analogue (Gimatecan)-Containing Liposomes Prepared by the Ethanol Injection Method. Journal of Liposome Research 14, 87-109.

Stark B, Pabst G, Prassl R, 2010. Long-term stability of sterically stabilized liposomes by freezing and freeze-drying: effects of cryoprotectants on structure. European Journal of Pharmaceutical Sciences 41, 546-555.

Storm G, Crommelin DJA, 1998. Liposomes: Quo Vadis? Pharmaceutical Science and Technology Today 1, 19-31.

Suratkar V, Mahapatra S, 2000. Solubilization site of organic perfume molecules in sodium dodecyl sulfate micelles: new insights from proton NMR studies. Journal of Colloid Interface Science 225, 32-38.

Suriyarak S, Weiss J, 2014. Cutoff Ostwald ripening stability of alkane-in-water emulsion loaded with eugenol. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 446, 71-79.

Sutili FJ, Kreutz LC, Noro M, Gressler LT, Heinzmann BM, De Vargas AC, Baldisserotto B, 2014. The use of eugenol against Aeromonas hydrophila and its effect on hematological and immunological parameters in silver catfish (Rhamdia quelen). Veterinary Immunology and Immunopathology 157, 142-148.

Suzuki Y, Sugiyama K, Furuta H, 1985. Eugenol-mediated superoxide generation and cytotoxicity in guinea pig neutrophils. Japanese Journal of Pharmacology 39, 381-386.

Sze A, Erickson D, Ren L, Li D, 2003. Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current-time relationship in electroosmotic flow. Journal of Colloid and Interface Science 261, 402-410.

Szente L, Szejtli J. Highly soluble cyclodextrin derivatives : Chemistry, properties and trends in development, 1999. Advance Drug Delivery Reviews 36, 17-38.

Szjetli J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry, 1998. Chemical Reviews 98, 1743-1753.

Szoka F, Papahadjopoulos D, 1978. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse phase. Proceeding to the National Academy of Sciences 75, 4194-4198.

Szoka FC, 1996. Preparation of liposome and lipid complex compositions. USA Patent no.: 5549910.

Tajuddin AS, Latif A, Qasmi IA, 2003. Aphrodisiac activity of 50% ethanolic extracts of Myristica fragrans Houtt. (nutmeg) and Syzygium aromaticum (L) Merr. & Perry. (clove) in male mice. acomparative study. BMC Complement. Alternative Med. 3, 6.

Takino T, Konishi K, Takakura Y, Hashida M, 1994. Long circulating emulsion carrier systems for highly lipophilic drugs. Biological and Pharmaceutical Bulletin 17, 121-125.

Tchakalova, V, Testard F, Wong K, Parker A, Bencze´di D, Zemb T, 2008. Solubilization and interfacial curvature in microemulsions, I: interfacial expansion and co-extraction of oil. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 331, 31–39.

Teixeira B, Marques A, Ramos C, Neng NR, Nogueira JMF, Saraiva JA, Nunes ML, 2013. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. Industrial Crops and Products 43, 587-595.

Thompson D, Constantin-Teodosiu D, Norbeck K, Svensson B, Molde´us P, 1989. Metabolic activation of eugenol by myeloperoxidase and polymorphonuclear leukocytes. Chemical Research in Toxicology 2, 186-192.

Thompson DC, Constantin-Teodosiu D, Egestad B, Mickos H, Molde´us P, 1990. Formation of glutathione conjugates during oxidation of eugenol by microsomal fractions of rat liver and lung. Biochemical Pharmacology 39, 1587-1595.

Tomaino A, Cimino F, Zimbalatti V, Venuti V, Sulfaro V, De Pasquale A, Saija A, 2005. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. Food Chemistry 89, 549-554.

Traikia M, Warschawski DE, Recouvreur M, Cartaud J, Devaux PF, 2000. Formation of unilamellar vesicles by repetitive freeze-thaw cycles: characterization by electron microscopy

and 31P-nuclear magnetic resonance. European Biophysics Journal 29, 184-195.

Trang T, McNaull B, Quirion R, Jhamandas K, 2004. Involvement of spinal lipoxygenase metabolites in hyperalgesia and opioid tolerance. European Journal of Pharmacology 491, 21–30.

Trongtokit Y, Rongsriyam Y, Komalamisra N, Apiwathnasorn C, 2005. Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. Phytotherapy Research 19, 303-309.

Trotta M, Peira E, Carlotti ME, Gallarate M, 2004. Deformable liposomes for dermal administration of methotrexate. International Journal of Pharmaceutics, 270, 119-125.

Tsamaloukas A, Szadkowska H, Slotte JP, Heerklotz H, 2005. Interactions of cholesterol with lipid membranes and cyclodextrin characterized by calorimetry. Biophysical Journal 89, 1109-1119.

Tseng LP, Liang HJ, Chung TW, Huang YY, Liu DZ, 2007. Liposomes incorporated with cholesterol for drug release triggered by magnetic field. Journal of Medical and Biological Engineering 27, 29-34.

Turina AV, Nolan MV, Zygadlo JA, Perillo MA, 2006. Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. Biophysical Chemistry 122, 101-113.

Usonis V, Bakasénas V, Valentelis R, Katiliene G, Vidzeniene D, Herzog C, 2003. Antibody titres after primary and booster vaccination of infants and young children with a virosomal hepatitis A vaccine (Epaxal). Vaccine 21, 4588-4592.

Valenti D, De Logu A, Loy G, Sinico, C, Bonsignore L, Cottiglia F, Garau D, Fadda AM, 2001. Liposome- incorporated Santolina insularis essential oil: preparation, characterization, and in vitro antiviral activity. Journal of Liposome Research 11, 73-90.

Van den Hoven JM, Metselaar JM, Gert Storm G, Beijnen JH, Nuijen B, 2012. Cyclodextrin as membrane protectant in spray-drying and freeze-drying of PEGylated liposomes. International Journal of Pharmaceutics 438, 209-216.

Varona S, Martín A´, Cocero MJ, 2011. Liposomal incorporation of Lavandin essential oil by a thin-film hydration method and by particles from gas saturated solutions. Industrial and Engineering Chemistry Research 50, 2088-2097.

Vazquez BI, Fente C, Franco CM, Vazquez MJ, Cepeda A, 2001. Inhibitory effects of eugenol and thymol on penicillium citrinum strains in culture media and cheese. International Journal of Food Microbiology 67, 157-163.

Vemuri S, Yu CD, Wangsatorntanakun V, Roosdorp N, 1990. Large-scale production of liposomes by a microfluidizer. Drug Development and Industrial Pharmacy 16, 2243-2256.

Vernin G, Vernin E, Metzger J, Pujol L, Parkanyi C, 1994. GC-MS Analysis of clove essential oils. In Spices Herbs and Edible Fungi, Charalambous G (ed.). Elsevier Science: Amsterdam, 483-500.

Villiers A, 1891, Sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyrique. Comptes-rendus de l'acaddémie des sciences 112, 536-38.

Vladisavljević G, Kobayashi I, Nakajima M, Williams RA, Shimizu M, Nakashima T, 2007. Shirasu porous glass membrane emulsification: characterization of membrane structure by high-

resolution X-ray microtomography and microscopic observation of droplet formation in real time. Journal of Membrane Science 302, 243-253.

Wagner A, Platzgummer M, Kreismayr G, Quendler H, Stiegler G, Ferko B, Vecera G. Vorauer-Uhl K, Katinger H, 2006. GMP production of liposomes: a new industrial approach. Journal of Liposome Research 16, 311-319.

Wagner A, Vorauer-Uhl K, 2010. Liposome technology for industrial purposes. Journal of Drug Delivery 2011, 1-9.

Wagner A, Vorauer-Uhl K, Katinger H, 2002a. The cross flow injection technique: an improvement of the ethanol injection method. Journal of Liposome Research 12, 259-270.

Wagner A, Vorauer-Uhl K, Kreismayr G, Katinger H, 2002b. Enhanced protein loading into liposomes by the multiple crossflow injection technique. Journal of Liposome Research 12, 271-283.

Walsh SE, Maillard JY, Russell AD, Catrenich CE, Charbonneau DL, Bartolo RG, 2003. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and negative bacteria. Journal of Applied Microbiology 94, 240-247.

Walsh TJ, Hiemenz JW, Seibel NL, Perfect JR, Horwith G, Lee L, Silber JL, DiNubile MJ, Reboli A, Bow E, Lister J, Anaissie EJ, 1998. Amphotericin B lipid complex for invasive fungal infections: analysis of safety and efficacy in 556 cases, Clinical Infectious Diseases 26, 1383-1396.

Wang CH, Huang YY, 2003. Encapsulating protein into preformed liposomes by ethanol-destabilized method. Artificial cells, blood substitutes, and biotechnology 31, 303-312.

Wang T, Li B, Si H, Chen L, 2011. Release characteristics and antibacterial activity of solid state eugenol/β-cyclodextrin inclusion complex. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry 71, 207-213.

Watabe N, Tokuoka Y, Kawashima N, 2013. Stability of O/W emulsion with synthetic perfumes oxidized by singlet oxygen. Journal of Chemistry 2013, 1-8.

Wei A, Shibamoto T, 2010. Antioxidant/lipoxygenase inhibitory activities and chemical compositions of selected essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58, 7218–7225.

Weinstein JN, Leserman LD, 1984. Liposomes as drug carriers in cancer chemotherapy. Pharmacology and Therapeutics 24, 207-233.

Wen Z, You X, Jiang L, Liu B, Zheng Z, Pu Y, Cheng B, 2011. Liposomal incorporation of rose essential oil by a supercritical process. Flavour and Fragrance Journal 26, 27-33.

Wendakoon CN, Sakaguchi M, 1993. Combined effect of sodiumchloride and clove on growth and biogenic-amine formation of Enterobacter aerogenes in mackerel muscle extract. Journal of Food Protectection 56, 410-413.

Wenqiang G, Shufen L, Ruixiang Y, Shaokun T, Can Q, 2007. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and three other traditional extraction methods. Food Chemistry 101, 1558-1564.

Wiacek A, Chibowski E, 1999. Zeta potential, effective diameter and multimodal size distribution in oil/water emulsion. Colloids and Surfaces A 159, 253-261.

Wie MB, Won MH, Lee KH, Shin JH, Lee JC, Suh HW, Song DK, Kim YH, 1997. Eugenol protects neuronal cells from excitotoxic and oxidative injury in primary cortical cultures. Neuroscience Letters 225, 93-96.

Wolkers WF, Oldenhof H, Tablin F, Crowe JH, 2004. Preservation of dried liposomes in the presence of sugar and phosphate. Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes 1661, 125-134.

Won MH, Lee JC, Kim YH, Song DK, Suh HW, Oh YS, Kim JH, Shin TK, Lee YJ, Wie MB, 1998. Postischemic hypothermia induced by eugenol protects hippocampal neurons from global ischemia in gerbils. Neuroscience Letters 254, 101-104.

Woodle MC, 1995. Sterically stabilized liposome therapeutics. Advanced Drug Delivery Reviews 16, 249-265.

Woranuch S, Yoskan R, 2013a. Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: I. Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation. Carbohydrate Polymers 96, 578-585.

Woranuch S, Yoskan R, 2013b. Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: II. Application in bio-based plastics for active packaging. Carbohydrate Polymers 96, 586-592.

Xia S, Xu S, 2005. Ferrous sulfate liposomes: preparation, stability and application in fluid milk. Food Research International 38, 289-296.

Xing Y, Xu Q, Li X, Che Z, Yun J, 2012. Antifungal activities of clove oil against rhizopus nigricans, aspergillus flavus and penicilloium citrinum in vitro and in wounded fruit test. Journal of Food Safety 32, 84-93.

Yancey PG, Rodrigueza WV, Kilsdonk EP, Stoudt GW, Johnson WJ, Phillips MC, Rothblat GH, 1996. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. Demonstration of kinetic pools and mechanism of efflux. Journal of Biological Chemistry 271, 16026-16034.

Yang K, Delaney JT, Ulrich S, Schubert US, Fahr A, 2012. Fast high-throughput screening of temoporfin-loaded liposomal formulations prepared by ethanol injection method. Journal of Liposome Research 22, 31-41.

Yang LJ, Yang B, Chen W, Huang R, Yan SJ, Lin J, 2010. Host-guest system of nimbin and β-cyclodextrin or its derivatives: Preparation, characterization, inclusion mode, and solubilization. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58, 8545-8552.

Yang Y, Song LX, 2005. Study on the inclusion compounds of eugenol with α-, β-,ɣ- and heptakis (2,6-di-O-methyl)-β-cyclodextrins. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry 53, 27-33.

Yang YC, Lee SH, Lee WJ, Choi DH, Ahn YJ, 2003. Ovicidal and adulticidal effects of Eugenia caryophyllata bud and leaf oil compounds on Pediculus capitis. Journal of Agricultural Food Chemistry 51,4884-4888.

Yoo CB, Han KT, Cho KS, Ha J, Park HJ, Nam JH, Kil UH, Lee KT, 2005. Eugenol isolated from the essential oil of Eugenia caryophyllata induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. Cancer Letters 225, 41-52.

Yoshida PA, Yokota D, Foglio MA, Rodrigues RA, Pinho SC, 2010. Liposomes incorporating essential oil of Brazilian cherry (Eugenauniflora L.): characterization of aqueous dispersions and lyophilized formulations. Journal of Microencapsulation 27, 416-425.

Zafar N, Fessi H, Elaissari A, 2014. Cyclodextrin containing biodegradable particles: From preparation to drug delivery applications. International Journal of Pharmaceutics 461, 351-366.

Zhan H, Tao-Jiang Z, Wang Y, Li R, Shu Dong T, 2008. Molecular microcapsules and inclusion interactions of eugenol with β-cyclodextrin and its derivatives. European Food Research and Technology 227, 1507-1513.

Zheng GQ, Kenney PM, Lam LKT, 1992. Sesquiterpenes from clove (Eugenia caryophyllata) as potential anticarcinogenic agents. Journal of Natural Products 55, 999-1003.

Zhong J, Yao X, Li DL, Li LQ, Zhou LF, Huang HL, Min LS, Li J, Fu FF, Dai LC, 2013. Large-scale preparation of midkine antisense oligonucleotides nanoliposomes by a cross-flow injection technique combined with ultrafiltration and high-pressure extrusion procedures. International Journal of Pharmaceutical 441, 712-720.

Zhu Q, Guo T, Xia D, Li X, Zhu C, Li H, Ouyang D, Zhang J, Gan Y, 2013. Pluronic F127-modified liposome-containing tacrolimus-cyclodextrin inclusion complexes: Improved solubility, cellular uptake and intestinal penetration. Journal of Pharmacy and Pharmacology 65, 1107-1117.

Zidovetzki R, Levitan I, 2007. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: Evidence, misconceptions and control strategies. Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes 1768, 1311-1324.