NNT2018LYSE1102

**THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**
opérée au sein de
**L'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale** N° accréditation
**Ecole Doctorale de Chimie de Lyon**

**Spécialité de doctorat** : Génie Pharmacotechnique
**Discipline** : Biochimie/Biotechnologie

Soutenue publiquement le 20/06/2018, par :
**Samar KADDAH**

# Effet du cholestérol sur les propriétés physiques des membranes liposomiales de type dipalmitoylphosphatidylcholine: application aux triterpènes tétra- et pentacycliques

Devant le jury composé de :

| | |
|---|---|
| Mme. Mingeot Marie-Paule, Pr, Université Catholique de Louvain | Rapporteure |
| M. Tinland Bernard, Dr CNRS, Université Aix Marseille | Rapporteur |
| M. Fessi Hatem, Pr, Université Lyon 1 | Président du jury |
| Mme. Khreich Nathalie, Dr, Université Libanaise | Examinatrice |
| M. Michel Jean-Philippe, MDC, Université Paris 11 | Examinateur |
| Mme. Charcosset Catherine, Dr CNRS, Université Lyon 1 | Directrice de thèse |
| Mme. Greige Hélène, Pr, Université Libanaise | Directrice de thèse |

**UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1**

| | |
|---|---|
| **Président de l'Université** | **M. le Professeur Frédéric FLEURY** |
| Président du Conseil Académique | M. le Professeur Hamda BEN HADID |
| Vice-président du Conseil d'Administration | M. le Professeur Didier REVEL |
| Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire | M. le Professeur Philippe CHEVALIER |
| Vice-président de la Commission Recherche | M. Fabrice VALLÉE |
| Directrice Générale des Services | Mme Dominique MARCHAND |

***COMPOSANTES SANTE***

| | |
|---|---|
| Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard | Directeur : M. le Professeur G.RODE |
| Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux | Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON |
| Faculté d'Odontologie | Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS |
| Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques | Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA |
| Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation | Directeur : M. X. PERROT |
| Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine | Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT |

***COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE***

| | |
|---|---|
| Faculté des Sciences et Technologies | Directeur : M. F. DE MARCHI |
| Département Biologie | Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD |
| Département Chimie Biochimie | Directeur : Mme C. FELIX |
| Département GEP | Directeur : M. Hassan HAMMOURI |
| Département Informatique | Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE |
| Département Mathématiques | Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV |
| Département Mécanique | Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID |

| | |
|---|---|
| Département Physique | Directeur : M. le Professeur J-C PLENET |
| UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives | Directeur : M. Y.VANPOULLE |
| Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon | Directeur : M. B. GUIDERDONI |
| Polytech Lyon | Directeur : M. le Professeur E.PERRIN |
| Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique | Directeur : M. G. PIGNAULT |
| Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1 | Directeur : M. le Professeur C. VITON |
| Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education | Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE |
| Institut de Science Financière et d'Assurances | Directeur : M. N. LEBOISNE |

## Remerciements

A l'issue de mon travail de recherché, je suis convaincue que la thèse est loin d'être un travail solitaire. Je n'aurais jamais pu réaliser ce travail sans le soutien d'un grand nombre de personnes.

En premier lieu, je tiens à remercier ma directrice de thèse, Madame Hélène Greige, pour la confiance qu'elle m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail, pour ces conseils pertinents et pour ses compétences scientifiques qui m'ont aidé à progresser dans mon travail et surtout pour sa franchise et sa modestie. J'ai beaucoup appris à ses côtés.

J'adresse mes chaleureux remerciements à ma directrice de thèse, Madame Catherine Charcosset, pour ses qualités scientifiques, sa gentillesse, son écoute et son attention qui ont été prépondérantes pour la réussite de la thèse.

Je tiens à remercier Professeur Hatem Fessi de m'avoir accueillie au sein du LAGEP. Je suis touchée par sa sympathie, son écoute et surtout par ses conseils pertinents lors du suivi de ma thèse.

J'adresse également mes sincères remerciements à Madame Nathalie Khreich pour ses conseils scientifiques et son soutien à la fois scientifique et amical.

Je tiens vivement à remercier les membres ayant accepté de faire partie de mon jury de thèse. Un grand merci aux professeurs Monsieur Bernard Tinland et Madame Marie-Paule Mingeot qui ont accepté d'être rapporteur pour ce travail. Je remercie également Monsieur Jean-Philippe Michel pour avoir être présent en tant qu'examinateur.

Je remercie sincèrement Monsieur LHoussein Khrouz pour m'avoir aidé à réaliser les mesures de RPE. Mon sujet de thèse a pris un nouveau versant.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à tout le personnel du Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (LAGEP) (Lyon, France), de l'Ecole Normale Supérieure de Lyon (ENS) (Lyon, France) et de la Plateforme de l'École Doctorale des Sciences et de Technologie (EDST) (Hadath, Liban) pour votre soutien à réaliser ce travail.

Je remercie l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF) (projet de coopération scientifique inter-universitaire (PCSI)) et l'organisation El Nour pour avoir financé cette thèse.

Une pensée très chaleureuse à tous mes ami(e)s du laboratoire des Molécules Bioactives Rola, Riham, Joyce, Elissa, Mohammad et Carla ainsi que mes collègues du LAGEP Ben, Marion, Camille, Océane et Romain. Des moments resteront gravés dans ma mémoire.

Je tiens à adresser ma profonde reconnaissance à tout ma famille qui m'a toujours soutenue et conseillée tout au long de mon parcours, mes parents, mes deux sœurs et ma belle-famille.

Enfin, pour terminer, je tiens à remercier mon fiancé, Mohammad, pour sa présence, sa confiance, son soutien et surtout sa patience qui m'a accordée durant ce périple de trois ans, et bien entendu pour son amour….

Nul ne peut atteindre l'aube sans passer par le chemin de la nuit

« Gibran Khalil Gibran »

**Sommaire**


Liste des figures…… 6
Liste des tableaux…… 9
Liste des abréviations et symboles…… 10
Résumé…… 12
Abstract…… 13
Introduction générale…… 15
**Chapitre I. Synthèse bibliographique**……..…… 17
I.1. Introduction sur les membranes biologiques…….. 17
I.2. Structure et composition des membranes biologiques……... 18
I.3. Des modèles biologiques aux modèles biomimétiques……. 23
I.4. Les propriétés dynamiques des membranes……... 30
I.4.1. Le thermotropisme des lipides…… 30
I.4.2. Rôle du cholestérol dans la transition de phase…….. 36
I.4.3. Les radeaux lipidiques…… 41
I.4.4. Rôle du cholestérol dans les radeaux lipidiques……. 43
I.5. Perméabilité membranaire……. 44
I.5.1. Les techniques de perméabilisation…… 44
I.5.2. Les techniques d'étude de la perméabilité membranaire…… 45
I.5.3. Effet du cholestérol et des triterpènes sur la perméabilité membranaire……. 46
I.6. Fluidité membranaire……. 50
I.6.1. Les techniques d'étude de la fluidité membranaire……. 50
I.6.2. Effet du cholestérol et des triterpènes sur la fluidité membranaire……. 51
**Chapitre II. Objectifs et stratégie de travail**…… 60
**Chapitre III. Discussion générale**……. 66
Article 1. Cholesterol modulates the liposome membrane fluidity and permeability for a hydrophilic molecule…… 71
Article 2. Impact of liposome membrane composition and experimental protocol design on drugs-modulating membrane permeability and fluidity: Application to glucocorticoids……... 82
Article 3. Progestogens affect the liposome membrane permeability: an insight into the effect cholesterol content and the period of incubation…….. 114
Article 4. Effect of membrane composition and period of incubation on the liposome membrane fluidity and permeability: Application to oleanolic acid and erythrodiol……. 147
Discussion générale…….. 174
Conclusions et perspectives…….. 190

**Liste des figures**

**Figure 1.** Modèle de la mosaïque fluide…….18
**Figure 2.** Structure des sphingolipides……...20
**Figure 3**. Distribution asymétrique des lipides membranaires……20
**Figure 4.** Les protéines membranaires illustrées selon leur disposition dans bicouche lipidique……..21
**Figure 5.** (A) Formule chimique du cholestérol. (B) Représentation schématique de l'insertion du cholestérol dans la membrane……...22
**Figure 6.** Structure d'un liposome……...24
**Figure 7.** Représentation schématique des liposomes classés selon la taille et lamellarité…….....25
**Figure 8.** Préparation des liposomes par la méthode d'évaporation en phase inverse……26
**Figure 9**. (A) Structure chimique de la DPPC. (B) les composantes de la molécule de DPPC : une tête polaire et une queue hydrophobe formée de deux chaînes d'acides gras à 16 atomes de carbone……..31
**Figure 10**. (A) Diagramme de phase de la DPPC en fonction de la température et du taux d'hydratation. $L_{\beta'}$: phase lamellaire gel (dite aussi solide-ordonnée ($S_o$)), $L_\alpha$ : phase lamellaire fluide, $P_{\beta'}$ : phase gel ridé intermédiaire, $Q_\alpha$: phase cubique et $H_\alpha$ : phase hexagonale (Oldfield & Chapman, 1971). (B) Thermogramme des phases lamellaires de la DPPC déterminé par la calorimétrie différentielle à balayage (DSC)……32
**Figure 11.** Les phases non-lamellaires de la DPPC. (A) phase hexagonale ($H_\alpha$), (B) phase cubique ($Q_\alpha$). Ces phases relatives à la membrane de DPPC sont formées pour des hautes températures (80˚C) et à faible teneur en eau (< 10% en masse)……32
**Figure 12.** Les paramètres thermodynamiques du pic de transition principal de DPPC déterminés par DSC. $T_p$ : pic de la pré-transition, $T_m$ : pic de la température de transition de phase principale, $\Delta H_p$ : enthalpie molaire de la pré-transition, $\Delta H_m$: enthalpie molaire de la transition principale et $\Delta T_{1/2}$ : largeur à mi-hauteur du pic de transition……..34
**Figure 13.** (A) Diagramme de phase de DPPC en fonction de la température et du taux en CHOL obtenu à partir de la calorimétrie différentielle à balayage (DSC) et la résonance magnétique nucléaire. $S_o$ : phase solide-ordonnée ou phase gel, $L_d$ : phase liquide-désordonnée, $L_o$ : phase liquide-ordonnée. (B) Thermogramme de la membrane de DPPC en fonction de la température et du taux en CHOL déterminé par DSC. (C) Mesures de RMN du deutérium (RMN-$^2$H) effectuées à 38˚C pour des liposomes de DPPC en fonction du taux en CHOL……..37
**Figure 14.** Représentation schématique des deux faces de la molécule de cholestérol. La face lisse α se trouve du côté du groupement hydroxyle et la face rugueuse β se trouve du côté des deux groupements méthyles et de la chaîne aliphatique en position C17……..38

**Figure 15.** Représentation schématique des radeaux lipidiques. (A) les radeaux planaires. (B) les cavéoles……...42
**Figure 16.** Structure des triterpènes pentacycliques. (A) acide oléanolique. (B) acide ursolique…….48
**Figure 17.** Structure chimique de la cucurbitacine E…….48
**Figure 18.** Structure chimique des saponines de l'acide oléanolique……49
**Figure 19.** Mouvements des phospholipides dans une bicouche lipidique……...50
**Figure 20.** Les paramètres de la RPE. (A) structure chimique de la 5-DSA et l'écart hyperfin $2A_{max}$ déterminé à partir du spectre 5-DSA. (B) structure chimique de la 16-DSA et le temps de corrélation $\tau_c$ déterminé à partir du spectre 16-DSA. $W_0$ : largeur de la raie centrale à mi-hauteur, $h_0$ et $h_{-1}$ : amplitudes des pics de centre- et de haut champ, respectivement……..52
**Figure 21.** Schéma de synthèse des oxystérols……...54
**Figure 22.** Structure chimique des triterpènes pentacycliques. (A) α-amyrine, (B) lupéol, (C) taraxérol.
**Figure 23.** Structure des glucocorticoïdes. (A) bétaméthasone, (B) dexaméthasone, (C) cortisol, (D) prednisolone……56
**Figure 24.** Structure des stéroïdes. (A) 17-β-estradiol, (B) acétate de cyprotérone, (C) finastéride…..57
**Figure 25. (A)** Préparation des liposomes chargés de triterpènes et des liposomes préformés et exposés aux triterpènes. **(B)** Caractérisation des liposomes en termes de taille, d'homogénéité et de composition par des méthodes analytiques, microscopiques et analytiques……64
**Figure 26.** Structure de base des triterpènes. (A) triterpènes tétracycliques, (B) triterpènes pentacycliques…….175

**Liste des tableaux**

**Tableau 1……36**
Tableau récapitulatif des températures de transition de phase ($T_m$) de certains phospholipides.
**Tableau 2……174**
Les différents motifs structuraux des triterpènes tétra- et pentacycliques
**Tableau 3……176**
Les constantes de libération $K_1$ obtenues des formulations de DPPC (CHOL% 0 et 2,5) exposées ou non aux triterpènes
**Tableau 4……178**
Les constantes de libération $K_1$ obtenues des formulations de DPPC (CHOL% 5, 10, 20 et 25) exposées ou non aux triterpènes
**Tableau 5……180**
Les constantes de libération $K_1$ obtenues des formulations de DPPC (CHOL% 30, 50 et 100) exposées ou non aux triterpènes
**Tableau 6……182**
Les constantes de libération $K_2$ obtenues des formulations de DPPC (CHOL% 0 et 2,5) exposées ou non aux triterpènes.
**Tableau 7……184**
Les constantes de libération $K_2$ obtenues des formulations de DPPC (CHOL% 5, 10, 20 et 25) exposées ou non aux triterpènes.
**Tableau 8……186**
Les constantes de libération $K_2$ obtenues des formulations de DPPC (CHOL% 30, 50 et 100) exposées ou non aux triterpènes.
**Tableau 9……188**
Effet des triterpènes sur la perméabilité de la membrane.

**Liste des abréviations et symboles**

Å : ångström

AFM : atomic force microscopy, pour microscopie à force atomique

C : cortisol

CHOL : cholestérol

Cn : cortisone

DLS : dynamic light scattering, pour diffusion dynamique de la lumière

DMPC : 1,2-dimyristoyl-sn-glycéro-3-phosphorylcholine

DOPC : 1,2-dioleoyl-sn-glycvro-3-phosphocholine

DPH : 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène

DPPC : dipalmitoylphosphatidylcholine

DRX : diffraction des rayons X

DRM : detergent-resistant membrane, pour membrane résistante aux détergents

DPH : 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène

DSC : differential scanning calorimetry, pour calorimétrie différentielle à balayage

DYG : dydrogestérone

EE: efficacité d'encapsulation

ER: eryhthrodiol

FA : fludrcortisone acétate

$F_0$ : fluorescence intrinsèque au temps to

$F_t$ : fluorescence intrinsèque au temps to

$F_{max}$ : fluorescence maximale

GRs : glucocorticoïdes

GUVs: giant unilamellar vesicles, pour vésicules unilamellaires géantes

HPLC : high performance liquid chromatography, pour chromatographie liquide haute performance

$L_{\beta'}$ : phase lamellaire gel

$L_\alpha$ : phase lamellaire fluide

$L_o$ : phase liquide-ordonnée

$L_d$ phase liquide-désordonnée

LUVs : large unilamellar vesicles, pour vésicules unilamellaires larges

MLVs : multilamellar vesicles, vésicules multilamellaires

MP : méthylprednisolone

MPA : medroxyprogestérone acétate

MPG : medroxyprogestérone

OA : oleanolic acid, pour acide oléanolique

$P_{\beta'}$ : phase gel ridé intermédiaire

P : prednisone

PA : principe actif

PL : prednisolone

POPC : 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine

REV: reverse phase evaporation, pour évaporation en phase inverse

RMN : résonance magnétique nucléaire

RPE : résonance paramagnétique électronique

$S_o$ : phase solide-ordonnée

SM : sphingomyéline

SRB : sulforhodamine B

SUVs : small unilamellar vesicles, pour petites vésicules unilamellaires

TEM : transmission electron microscopy, pour microscopie électronique en transmission

$T_m$ : température de transition principale

$T_p$ : température de pré-transition

TEMPO : 2,2,6,6-(tétramethylpiperidin-1-yl) oxidanyl

TMA-DPH: 4-triméthyl-ammonio-1,6- diphényl-1,3,5-hexatriène

TTP: triterpène

**Résumé**

Les triterpènes sont des molécules naturelles à 30 atomes de carbone issus de la cyclisation du squalène. Les corticoïdes et les progestatifs sont les triterpènes tétracycliques dotés d'une grande importance thérapeutique. Les triterpènes pentacycliques dont l'acide oléanolique et l'erythrodiol sont largement répandus dans le règne végétal et reconnus pour leurs diverses propriétés biologiques. Dans ce travail de thèse, l'effet des triterpènes sur la fluidité et la perméabilité des liposomes de type dipalmitoyphosphatidylcholine est étudié. Le taux en cholestérol est un facteur pris en considération. L'objectif vise à trouver une relation entre les propriétés physiques des membranes et la physico-chimie des molécules triterpéniques. Nous avons préparé des liposomes encapsulant une molécule hydrophile fluorescente, la sulforhodamine B (SRB), en absence et en présence des triterpènes par la technique d'évaporation en phase inverse selon deux approches expérimentales. On distingue les liposomes préformés à différents taux en cholestérol et exposés aux triterpènes et les liposomes chargés en triterpènes et préparés à un seul taux en cholestérol. Les cinétiques de libération de la SRB obtenues des liposomes préformés sont analysées par le modèle de Higuchi en se basant sur le profil biphasique des courbes des cinétiques de libération. Les études de fluidité sont réalisées par la résonance paramagnétique électronique (RPE) pour des liposomes préformés de DPPC à différents taux en cholestérol encapsulant les triterpènes et marqués par deux sondes 5- et 16-DSA.

En outre, nous avons caractérisé les liposomes chargés des triterpènes en termes de taille, d'homogénéité et de composition. Sachant que les phospholipides, le cholestérol et les triterpènes sont hautement incorporés dans les liposomes, un rendement d'encapsulation faible est obtenu en présence de la 17-hydroxyprogestérone, progestérone et la medroxyprogestérone acétate. En présence des triterpènes, la distribution de taille des liposomes est proche à celle des liposomes témoins à l'exception de l'acide oléanolique et l'erythodiol ayant une taille de trois fois supérieure à celles des liposomes blancs. Les liposomes subissent une transition d'une forme irrégulière à une forme régulière pour un taux en cholestérol supérieure à 5%. Les études de perméabilité et de fluidité montrent que le taux en cholestérol, les motifs structuraux et la concentration des triterpènes, la période d'incubation et l'approche expérimentale adoptée représentent des facteurs primordiaux dans la modulation de l'effet des triterpènes sur la fluidité et la perméabilité de la membrane.

Mots clés : acide oléanolique, cholestérol, corticoïdes, erythrodiol, Higuchi, liposomes, progestatifs, résonance paramagnétique électronique, spectroscopie de fluorescence.

## Abstract

Triterpenes are natural molecules with 30 carbon atoms resulting from the cyclization of squalene. Corticosteroids and progestins are tetracyclic triterpenes known for their therapeutic properties. Pentacyclic triterpenes as oleanolic acid and erythrodiol are widespread in the plant kingdom, and recognized for their various biological properties. In this work, the effect of triterpenes on the fluidity and permeability of liposomes composed of dipalmitoyphosphatidylcholine is studied. The concentration of cholesterol is a factor taken into consideration. The objective is to find a relationship between the physical properties of membranes and the physico-chemistry of triterpenic molecules. We have prepared liposomes encapsulating a fluorescent hydrophilic molecule, sulforhodamine B (SRB), in the absence and presence of triterpenes by reverse phase evaporation technique according to two experimental approaches. There are preformed liposomes prepared at different concentrations of cholesterol and exposed to triterpenes and triterpenes-loaded liposomes prepared at a single level of cholesterol. The release kinetics of SRB obtained from preformed liposomes are analyzed by the Higuchi model based on the biphasic profile of the release kinetics curves. The fluidity studies are performed by electron paramagnetic resonance (EPR) for preformed liposomes of DPPC at different concentrations of cholesterol exposed to triterpenes and labeled with two 5- and 16-DSA probes.

In addition, triterpenes-loaded liposomes were characterized in terms of size, homogeneity and composition. Phospholipids, cholesterol and triterpenes are highly incorporated in liposomes, however, low loading rate is obtained in the presence of 17-hydroxyprogesterone, progesterone and medroxyprogesterone acetate. In the presence of triterpenes, the size distribution of liposomes is close to that of the control,s with the exception of oleanolic acid and erythodiol where the liposomes size was three times greater than that of the controls. Liposomes undergo a transition from an irregular to a regular form when the cholesterol content is greater than 5%. Permeability and fluidity studies show that the cholesterol content, the concentration and structural features of triterpenes, the incubation period and the experimental approach design are important factors in modulating the effect of triterpenes on the fluidity and permeability of the membrane.



Keywords: oleanolic acid, cholesterol, corticosteroids, erythrodiol, Higuchi, liposomes, progestins, electron paramagnetic resonance, fluorescence spectroscopy.

# Introduction générale

## Introduction générale

Les triterpènes (TTPs) sont des composés en C30 issus de la cyclisation du 2,3-epoxysqualène (H. Zhao et al., 2016). L'utilisation de ces molécules dans le domaine pharmaceutique, cosmétique et alimentaire représente un enjeu capital dans le domaine de la recherche des substances naturelles en raison de la faible solubilité aqueuse de ces produits et de leur faible biodisponibilité. Malgré tout cela, on trouve de nombreux médicaments à base de stéroïdes en thérapeutique comme les corticostéroïdes et les progestatifs. Les TTPs s'impliquent dans des mécanismes génomiques et non-génomiques. L'interaction des TTPs avec les membranes est qualifiée de « non-génomique » suite à la modulation des propriétés physiques des membranes. Dans ce contexte, des modèles biologiques telles que les membranes des granulocytes (Lamche et al., 1990), spermatozoïdes (Sharma, Sarwa, & Mazumder, 2014), hépatiques (Kapitulnik, Weil, & Rabinowitz, 1986) et intestinales (Brasitus, Dudeja, Dahiya, & Halline, 1987) et des modèles membranaires synthétiques comme les caco-2 (Chen et al., 2016), le système PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) (Bennion et al., 2017), les monocouches (Knobloch, Suhendro, Zieleniecki, Shapter, & Köper, 2015) et les bicouches lipidiques (Alves et al., 2017) sont utilisés pour cet objectif. En outre, les liposomes constituent un bon modèle membranaire.

Dans notre travail, nous nous intéressons à étudier l'effet des TTPs sur la fluidité et la perméabilité de la membrane des liposomes de type dipalmitoyphosphatidylcholine (DPPC). Une série de TTPs tétracycliques y compris les glucocorticoïdes (GRs) (cortisol (C), cortisone (Cn), fludrocortisone acétate (FA), prednisone (P), prednisolone (PL), méthylprednisolone (MP)) et les progestatifs (progestérone (PG), 17- et 21-hydroxyprogestérone (17- et 21-OH PG), medroxyprogestérone (MPG), medroxyprogestérone acétate (MPA), dydrogestérone (DYG)) et les TTPs pentacycliques (acide oléanolique (OA) et erythrodiol (ER)) sont choisis. Ce choix relève du large spectre d'action des TTPs tétra- et pentacycliques y compris les propriétés anti-inflammatoires (Ayeleso & Matumba, 2017; Ozbakir, Crielaard, Metselaar, Storm, & Lammers, 2014), cardioprotectrices (Dharwadkar, Chitterusu, Dharwadkar, Chenmarathy, & Dharwadkar, 2017; Senthil, Sridevi, & Pugalendi, 2007) et anti-tumorigènes (Allouche et al., 2011; Goncharov et al., 2017), etc.

Cependant, les travaux de la littérature se concentrent à étudier l'effet des principes actifs sur la dynamique des membranes formées d'une composition définie. L'originalité de ce travail réside dans l'étude des effets des TTPs sur les propriétés physiques des membranes présentant différents taux en cholestérol (CHOL). Par ailleurs, les propriétés physiques, structurales et dynamiques des membranes sont largement modulées par la présence de CHOL. Quant aux TTPs, leur similarité structurale avec le CHOL les rendent de bons candidats à moduler les propriétés physiques des membranes. En outre, l'effet des TTPs sur les propriétés dynamiques des membranes sont faiblement traités dans les travaux

de la littérature bien que leurs activités biologiques puissent être étroitement liées aux propriétés des membranes.

Au cours de ce travail, nous avons préparé des liposomes de types LUVs formés d'un mélange binaire de DPPC et de CHOL. Deux approches expérimentales sont adoptées au cours de cette étude. On distingue les liposomes de DPPC:CHOL chargés de TTPs et les liposomes de DPPC préformés présentant différents taux en CHOL. Différents techniques calorimétriques, spectroscopiques et microscopiques sont utilisées pour caractériser les liposomes en termes de taille, homogénéité et morphologie ainsi que le taux d'incorporation et le rendement d'encapsulation des DPPC et du CHOL ainsi que l'efficacité d'encapsulation et le rendement d'encapsulation des TTPs. Les études de perméabilité sont réalisées par la spectroscopie de fluorescence à travers le suivi de la libération d'un fluorophore hydrophile, la sulforhodamine B, au cours du temps à 37˚C. Les différentes cinétiques de libération de la SRB sont analysées par des modèles mathématiques. Quant aux études de fluidité, la résonance paramagnétique électronique (RPE) est utilisée afin d'évaluer les changements que peut subir une membrane dans la région polaire et hydrophobe de la membrane.

Ce manuscrit est organisé en trois chapitres. Le premier chapitre comporte une synthèse bibliographique portant sur la composition de la membrane biologique, les liposomes, les propriétés dynamiques des membranes y compris la perméabilité et la fluidité membranaire. Le chapitre 2 comporte les objectifs et la stratégie expérimentale adoptée dans notre travail. Le chapitre 3 présente les quatre articles de recherche dont un publié, un soumis et deux autres en cours de préparation et une discussion globale des résultats à l'égard des travaux de la littérature.

Ce manuscrit se termine par une conclusion et des perspectives pouvant faire suite à ce travail.

# Chapitre I

# Synthèse bibliographique

I.1. Introduction sur les membranes biologiques

L'étude des membranes biologiques est une approche conceptuelle pour mieux comprendre au niveau cellulaire, les processus du vivant. A part leur rôle de cloisonnement, les membranes biologiques interviennent dans de nombreux processus indispensable à la vie comme les phénomènes de transport, la transduction des signaux, les processus de conversion d'énergie, etc. Le modèle de « mosaïque fluide » a été élaboré par Singer et Nicolson en 1972 pour représenter la dynamique et la structure des membranes biologiques (Singer & Nicolson, 1972) (Figure 1). Ce modèle décrit les membranes biologiques comme étant une matrice bidimensionnelle constituée de phospholipides dans laquelle s'insère les protéines membranaires. Les lipides y sont en perpétuel mouvement de diffusion latérale via le mouvement brownien (Lipowsky & Sackmann, 1995) alors que les protéines se déplacent plus lentement. Cette structure est hétérogène à la fois dans l'espace et dans le temps ce qui justifie le terme « mosaïque ». Ce modèle a été largement accepté jusqu'à l'apparition de la notion des microdomaines lipidiques ou radeaux lipidiques, appelés encore « rafts » (Simons & Ikonen, 1997). La complexité des membranes biologiques et leurs interactions avec les composants intra- et extracellulaires rendent les investigations difficiles. De nombreux modèles de membranes biomimétiques ont été développés dans le but de comprendre les caractéristiques chimiques et fonctionnelles des membranes biologiques.

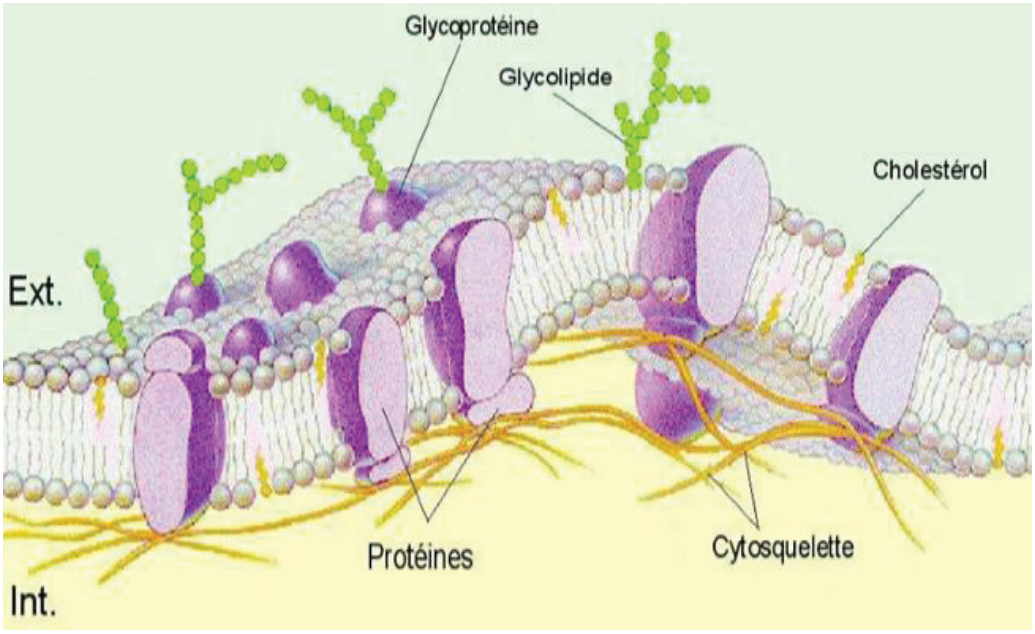



**Figure 1.** Modèle de la mosaïque fluide

## I.2. Structure et composition des membranes biologiques

### I.2.1. Les lipides membranaires

Les lipides membranaires représentent entre 30 et 50% en fraction molaire des constituants membranaires totaux selon le type de membranes. On distingue trois familles de lipides: les glycérophospholipides (ou phospholipides), les sphingolipides et les stérols. Ce sont des molécules amphiphiles constituées d'une tête hydrophile et d'une partie hydrophobe.

Les phospholipides sont néanmoins les composants majeurs des membranes. La variabilité vis-à-vis des phospholipides repose sur la nature du phospholipide en question qui change en fonction de la tête polaire, la longueur et le degré d'insaturation des chaînes aliphatiques. Cette diversité des phospholipides est à l'origine de la complexité de la structure membranaire y compris leurs propriétés physiques. Les molécules de phosphatidylcholine (PC) et de phosphatidyléthanolamine (PE) sont les plus représentées dans les membranes biologiques de l'ordre de 50% et de 25% des phospholipides membranaires, respectivement (Van Meer, 2005). La dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) a été sélectionnée comme représentante des PC dans notre étude.

Les sphingolipides (Figure 2) forment une famille de lipides caractérisée par la présence d'un squelette de sphingosine : un amino-alcool possédant une longue chaîne hydrocarbonée généralement saturée (de 18 à 24 carbones dans le cas des sphingolipides des mammifères). Le greffage d'un groupement polaire sur la fonction alcool primaire permet ainsi d'obtenir les sphingolipides dont la céramide, les sphingophospholipides dont la sphingomyéline (SM) et les sphingoglycolipides. La SM représente entre 5 et 20% des phospholipides membranaires totaux (Simons & Van Meer, 1988). Elle représente un tiers des lipides constitutifs de la myéline, la gaine protectrice des nerfs. Le groupement polaire de la SM correspond à un phosphocholine ou un phosphoéthanolamine, un monosaccharide (cas des cérébrosides) ou un oligosaccharide (cas des gangliosides). Les cérébrosides en particulier, les galactocérébrosides sont présents dans le système nerveux des mammifères. En revanche, cette classe des lipides est notamment impliquée dans la formation des radeaux lipidiques(Simons & Ikonen, 1997).

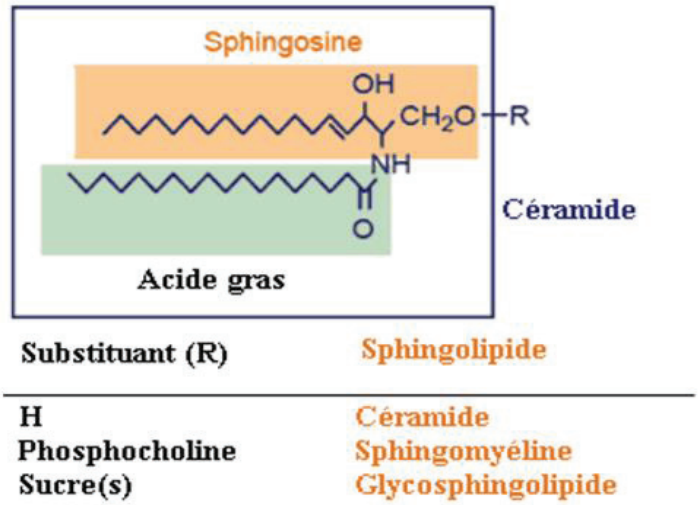



**Figure 2.** Structure des sphingolipides (Coste, 2006)

On note que la répartition des lipides diffère d'une cellule à une autre. Au sein d'une même cellule, la distribution des lipides est asymétrique (Yamaji-Hasegawa & Tsujimoto, 2006) et ceci est associée une asymétrie de fonction; d'où la complexité des membranes biologiques. Notons bien que cette asymétrie est primordiale. Elle contribue au potentiel électrique et la stabilité mécanique des membranes ainsi que l'ancrage des protéines. Elle permet aussi la courbure de la membrane en cas de fusion membranaire permettant ainsi la modification de l'activité des protéines membranaires. La perte de cette asymétrie déclenche l'apoptose ou l'apparition de phospholipides spécifiques du feuillet opposé (Savill, Dransfield, Gregory, & Haslett, 2002). On note que la majorité des études d'asymétrie des lipides membranaires sont réalisées sur des cellules érythrocytaires humaines (Cogan & Schachter, 1981; Daleke, 2003). La figure 3 montre une représentation schématique de la distribution asymétrique des lipides dans une membrane plasmique (cas des érythrocytes).

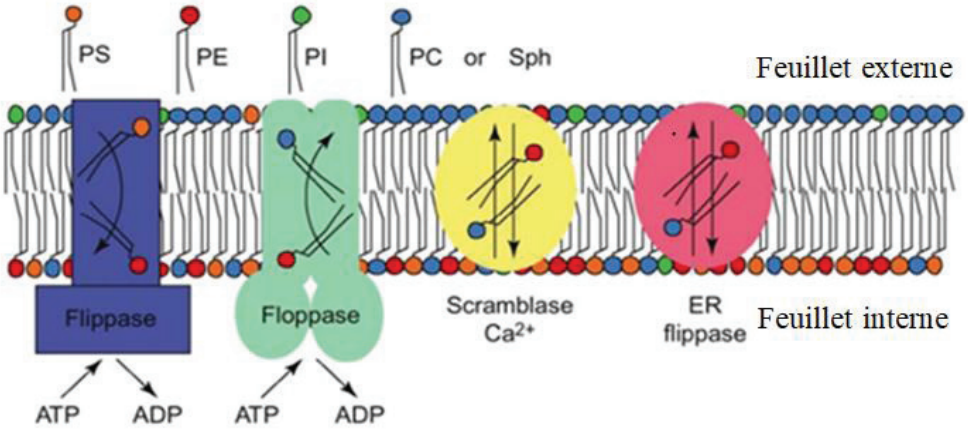



**Figure 3**. Distribution asymétrique des lipides membranaires (Graham, 2004).

D’après la figure 3, On remarque que l’asymétrie des lipides membranaires est assurée par les protéines translocases. Les flippases assurent le mouvement des lipides du feuillet externe vers le feuillet interne. Les floppases assurent le mouvement inverse et les scramblases peuvent donner aux lipides un mouvement bidirectionnel (Daleke, 2003). Quant à la distribution des lipides, la phosphatidylcholine et la sphingomyéline sont localisées de façon prédominante dans le feuillet extracellulaire, contrairement à la phosphatidylsérine (PS) et la phosphatidyléthanolamine (PE) qui sont localisées dans le feuillet interne de la bicouche lipidique (Devaux, 1991). On retrouve également des lipides mineurs tels que la phosphatidylinositol (PI) et l’acide phosphatidique qui sont majoritairement présents dans le feuillet interne de la membrane plasmique alors que les glycosphingolipides sont rencontrés davantage dans le feuillet externe (Bretscher, 1972).

### I.2.2. Les protéines membranaires

Les protéines membranaires sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques comme le transport, l’adhésion et la communication à travers des canaux entre le milieu intra- et extracellulaire. Elles participent également à la courbure et la stabilité des membranes. Les protéines représentent jusqu’à 75% de la masse de la membrane plasmique mitochondriale (Meisinger et al., 2001) et 25% dans une fibre myélinisée. La proportion des protéines par rapport aux lipides est très variable selon le type de membranes. D’une manière générale, plus le ratio « protéines/lipides » est élevé, plus la membrane présente une activité biologique importante. En se basant sur la nature de leurs interactions avec les membranes, les protéines membranaires sont classées en deux catégories: les protéines intrinsèques et les protéines extrinsèques (Figure 4).

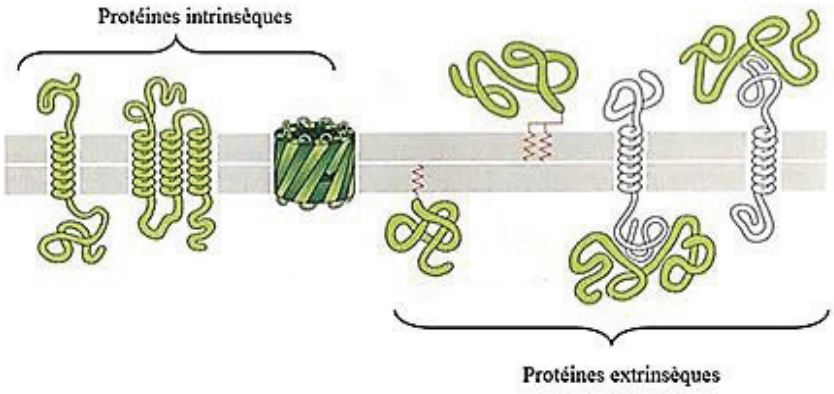



**Figure 4.** Les protéines membranaires illustrées selon leur disposition dans bicouche lipidique (Harmouche, 2013)

Les protéines intrinsèques (dites aussi intégrales ou transmembranaires) sont les protéines qui s'étendent sur toute l'épaisseur de la bicouche lipidique. D'autres sont ancrées sur l'un des deux feuillets de la bicouche par des liaisons covalentes. La glycosylphosphatidylinositol (GPI) est un exemple type d'ancre qui relie certaines protéines par des liaisons covalentes.

Les protéines extrinsèques (périphériques) sont associées à la membrane par des liaisons faibles (force électrostatique, liaison hydrogène) et n'interagissent pas avec le cœur hydrophobe de la bicouche lipidique. On note que l'hétérogénéité de la membrane régule spatialement la distribution des protéines membranaires.

### I.2.3. Les stérols

Les stérols représentent la troisième classe des lipides membranaires. Le cholestérol (CHOL) est le stérol le plus abondant chez les mammifères ayant des proportions comprises entre 7 et 55% en fraction molaire dans les cellules des eucaryotes (Van Meer, Voelker, & Feigenson, 2008; Yeagle, 1991). Il est substitué par d'autres types de stérols chez les plantes (stigmastérol et sitostérol) et les eucaryotes inférieurs (ergostérol chez la levure). La structure de base du CHOL est formée de quatre cycles rigides (A, B, C et D) et plans en configuration trans (Figure 5.A).

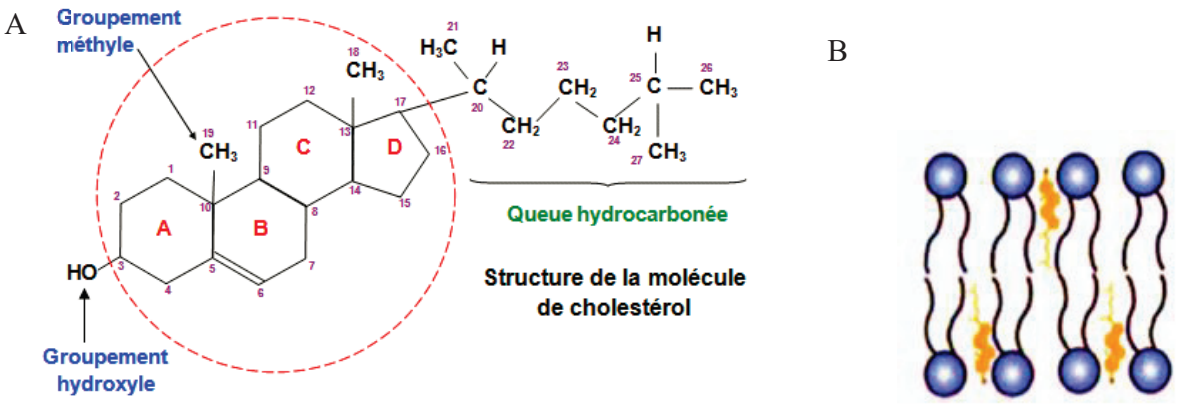



**Figure 5.** (A) Formule chimique du cholestérol. (B) Représentation schématique de l'insertion du cholestérol dans la membrane (Choi et al., 2014)

Dans la molécule de CHOL, on distingue un groupement hydroxyle en position C3, deux groupements méthyles en positions C10 et C13 et une chaîne aliphatique en position C17 formée de huit carbones asymétriques. Le long axe de la molécule est perpendiculaire au plan de la membrane où le groupement

hydroxyle s'oriente vers le milieu aqueux alors que la partie hydrophobe s'oriente vers le cœur de la membrane (chaînes acyles) (Figure 5.B). La géométrie conique de la molécule de CHOL lui confère des propriétés spécifiques. La petite tête polaire permet au CHOL d'interagir de manière privilégiée avec certains lipides possédant une grande tête polaire pour le protéger de l'eau. On parle alors de l'effet parapluie (Umbrella model). De plus, le noyau cyclique plan et rigide permet d'ordonner les chaînes aliphatiques des lipides avoisinants, ce qui va engendrer une diminution de l'aire occupée par les molécules de lipides. De même, le CHOL subit le phénomène de flip-flop entre les deux feuillets de la membrane ce qui explique la répartition hétérogène du CHOL dans la membrane. A forte concentration, le CHOL favorise la formation des microdomaines ou les structures rafts (Simons & Ikonen, 1997).

## I.3. Des modèles biologiques aux modèles membranaires biomimétiques

### I.3.1. Introduction aux liposomes

Les propriétés physiques retrouvées dans les modèles biologiques ne peuvent pas être reproduites telles que l'asymétrie de distribution des lipides, la courbure de la membrane, les interactions protéines-protéines, etc. Pour cette raison, des modèles membranaires sont développés. Elles représentent un outil indispensable à la compréhension de l'organisation, la structure et les propriétés dynamiques des membranes biologiques et les interactions qui entrent en jeu.

Les liposomes, découverts par Alec Bangham au début des années 60, sont principalement utilisés comme modèles membranaires pour l'étude de la structure et les propriétés des membranes biologiques (Bangham, Standish, & Watkins, 1965). Les liposomes (Figure 6) sont des vésicules sphériques formées d'un ou de plusieurs types de phospholipides entourant un cœur aqueux. Ils ont la capacité d'encapsuler des molécules hydrophiles et lipophiles dans la cavité aqueuse et la bicouche lipidique, respectivement (Agarwal et al., 2016; Meister, Finger, Hause, & Blume, 2014). Quant aux molécules amphiphiles, elles s'insèrent à l'interface entre la cavité aqueuse et la bicouche lipidique. L'efficacité d'encapsulation des molécules hydrophiles dépend du volume de l'espace interne aqueux alors que le volume de la bicouche lipidique affecte celui des molécules lipophiles.

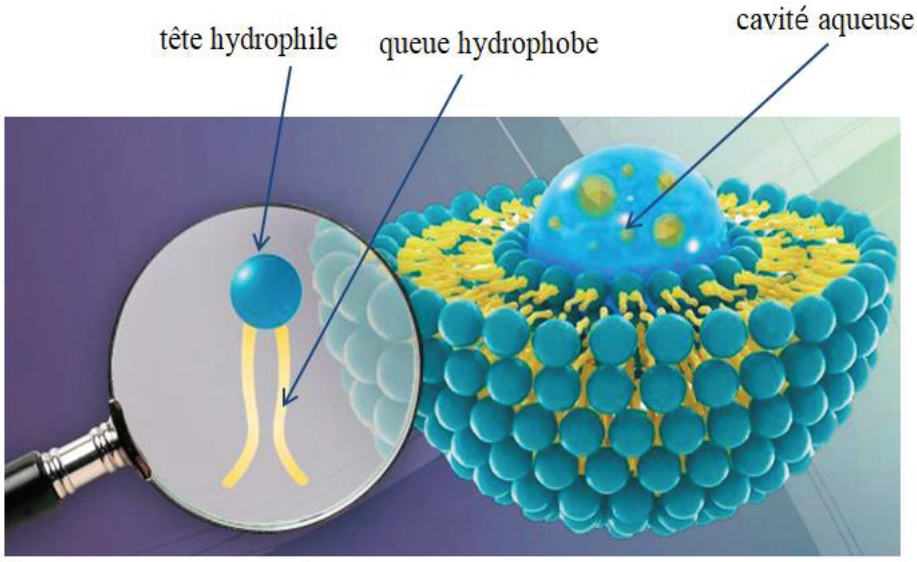



**Figure 6.** Structure d'un liposome.

Les liposomes représentent l'une des premières plateformes utilisées en médecine (Wang et al., 2012). Ils peuvent être utilisés comme vecteurs de thérapie génique en encapsulant des gènes ou des plasmides. Les liposomes peuvent aussi être employés pour exposer des protéines virales à leur surface, dans ce cas on les appelle des virosomes et sont donc utilisés comme vaccins. Ils sont utilisés également comme vecteurs de substances pharmaceutiques ainsi que dans le domaine agro-alimentaire (affinage du fromage) (Khanniri et al., 2016). A part leurs natures non-toxiques, biocompatibles et non-immunogènes, les liposomes sont administrés selon plusieurs voies. On distingue la voie pulmonaire, topique ou parentérale (intraveineuse). Selon la voie d'administration, différents types de formulations liposomiales peuvent être envisagées. On distingue les suspensions, les aérosols, les formes semi-solides ou les poudres sèches (Lasic & Martin, 1990).

Quant au relargage des molécules d'intérêt à partir de ces nanovecteurs, plusieurs facteurs sont pris en considération :

- La concentration et le temps d'administration du principe actif.
- Le principe actif doit rester chimiquement et physiquement stable dans la formulation liposomiale.
- Le coefficient de partition du principe actif, dit aussi coefficient de partage, et qui signifie la distribution du principe actif entre la phase aqueuse et la phase organique. Ce paramètre est étroitement lié à la taille et aux contraintes engendrées par les structures vésiculaires.

I.3.2. Classification des liposomes

Dépendamment du diamètre et du nombre de bicouches lipidiques (lamellarité) des liposomes, on distingue les structures vésiculaires suivantes:

Pour les liposomes unilamellaires, on retrouve : les liposomes de petites tailles (SUVs, pour Small Unilamellar Vesicles) ayant une taille comprise entre 20 et 100 nm, les liposomes de grandes tailles (LUVs, pour Large Unilemellar Vesicles) ayant une taille comprise entre 100 et 1000 nm et les liposomes géantes (GUVs, pour Giant Unilamellar Vesicles) ayant une taille supérieure à 1000 nm. Pour les liposomes multilamellaires, on distingue : les MLVs (multilamellar vesicles) ayant une taille comprise entre 1 et 10 µm et les vésicules multivésiculaires (MVVs, pour multivesicular vesicles) formées de plusieurs vésicules non concentriques encapsulées dans une seule bicouche lipidique (Figure 7) (Lorin, Flore, Thomas, & Brasseur, 2004).

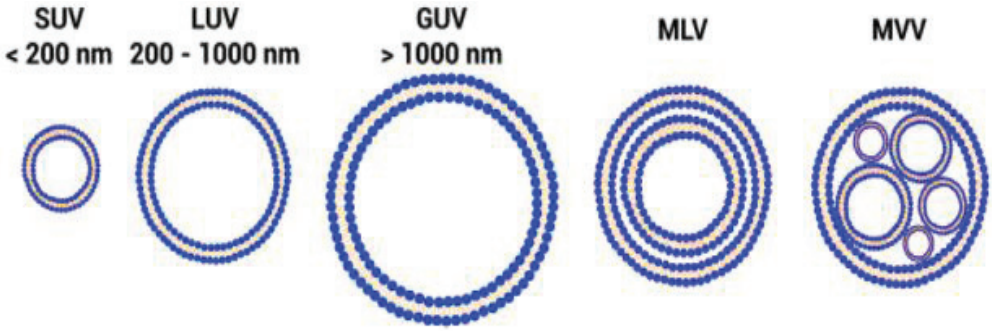



**Figure 7.** Représentation schématique des liposomes classés selon la taille et lamellarité.

Notons bien que la taille des liposomes est fortement affectée par la nature chimique et la concentration des phospholipides qui les composent (Wagner & Vorauer-Uhl, 2011). La taille et la lamellarité peuvent être contrôlées par des actions mécaniques telles que la sonication (Woodbury, Richardson, Grigg, Welling, & Knudson, 2006) et l'extrusion (Berger, Sachse, & Bender, 2001). L'extrusion des liposomes peut s'effectuer selon deux méthodes :

La première méthode consiste à faire passer la suspension liposomiale à travers des membranes de polycarbonate. Ceci favorise le réarrangement des vésicules pour aboutir à des vésicules de tailles proches de celles des pores de la membrane (Lapinski, Castro-Forero, Greiner, Ofoli, & Blanchard, 2007). L'extrusion se fait à une température supérieure à la température de transition de phase du lipide

et à des pressions modérées (100-250 psi) (MacDonald et al., 1991). Dans notre travail, le dispositif utilisé est l'Avanti mini-extrudeur.

La deuxième méthode consiste à utiliser la presse de French. Ce dispositif permet d'effectuer l'extrusion à très haute pression (20000 psi) et à température ambiante (Hamilton, Goerke, Guo, Williams, & Havel, 1980).

I.3.3. Les méthodes de préparation des liposomes

Les méthodes de préparation des liposomes sont nombreuses et se divisent en quatre groupes (Akbarzadeh et al., 2013; Rongen, Bult, & Van Bennekom, 1997). On cite :

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.

Dans notre étude, les liposomes sont préparés par la technique d'évaporation en phase inverse (REV, pour reverse phase evaporation) (Figure 8) en absence et en présence des triterpènes.

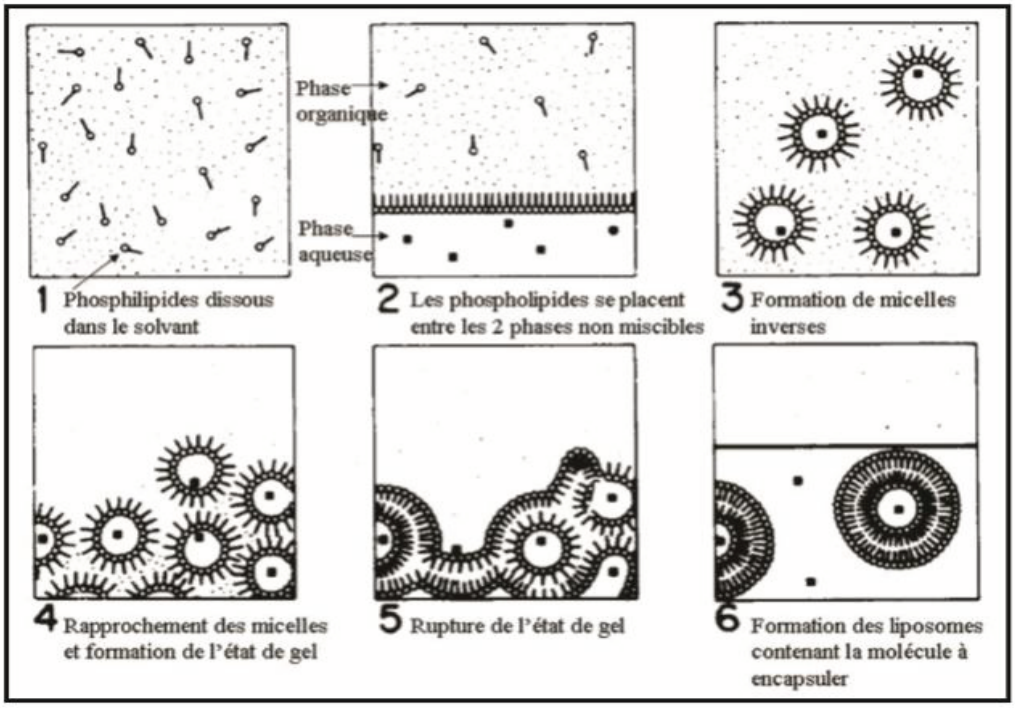



**Figure 8.** Préparation des liposomes par la méthode d'évaporation en phase inverse (Szoka & Papahadjopoulos, 1978)

Cette technique élaborée par Szoka et Papahadjopoulos (1978) consiste à dissoudre les phospholipides dans un mélange de solvants organiques (chloroforme/diéthyl-éther/méthanol) et d'y ajouter la phase aqueuse dans un rapport phase aqueuse/phase organique allant de 1/3 à 1/6. Dans cette situation, les phospholipides se placent à l'interface entre les deux phases non miscibles. Le mélange va ensuite subir une sonication sous flux d'azote dans des conditions de températures contrôlées. Les phospholipides s'organisent sous forme de micelles inversées entourant un compartiment aqueux. Le solvant organique est ensuite éliminé par évaporation sous pression réduite ce qui va induire un réarrangement des micelles et la formation d'un film lipidique. Les monocouches de phospholipides se rapprochent pour former les bicouches de liposomes. Cette méthode permet d'obtenir des liposomes de type LUVs constitués d'une grande cavité aqueuse permettant ainsi une efficacité d'encapsulation importante des molécules hydrophiles (65%) (Szoka & Papahadjopoulos, 1978).

### I.3.4. Caractérisation des liposomes

Pour aboutir à des formulations de caractéristiques définies, les liposomes doivent être caractérisés en termes de morphologie, structure et composition.

#### I.3.4.1. La taille et morphologie des liposomes

La taille moyenne et la distribution de taille sont des paramètres qui doivent être modulées en fonction des propriétés recherchées des liposomes. La taille moyenne des liposomes est influencée par la composition lipidique et la méthode de préparation. Dans notre travail, on a eu recours à la diffusion dynamique de la lumière (DLS, pour Dynamic Light Scattering), dite aussi la spectroscopie de corrélation photonique (PCS). C'est la technique la plus répandue pour déterminer la taille moyenne d'une dispersion de liposomes allant de 0,6 à 6000 nm. Cette technique est connue par sa simplicité de mise en œuvre et ses capacités de mesures basées sur le mouvement Brownien des particules.

La distribution de taille des liposomes peut être aussi déterminée par la granulométrie laser. Elle permet la mesure de la taille des particules en se basant sur leurs rayons, autrement dit la distribution de taille est déterminée par la fréquence statistique en fonction de la taille des liposomes. Cette technique permet de mesurer des tailles de dispersions comprises entre 0,01 et 3000 μm.

Quant à la morphologie des liposomes, les techniques de microscopie électronique permettent d'effectuer l'observation de la forme des liposomes (Meister et al., 2014). Ces techniques fournissent des informations sur l'épaisseur de la bicouche lipidique et la distance inter-lamellaire. Dans notre étude, la microscopie électronique à transmission (TEM) est utilisée pour déterminer par le biais de la coloration négative la morphologie des vésicules. Cette technique est basée sur les électrons transmis pour former l'image de l'échantillon en termes de taille et de nombre de lamelles (Jain & Shastri, 2011). De même, la microscopie à force atomique (AFM) est une technique d'imagerie directe à résolution nanométrique qui nous renseigne sur la morphologie et la stabilité des vésicules (Ruozi et al., 2009).

### I.3.4.2. L'homogénéité des liposomes

L'homogénéité de la population liposomiale est déterminée par l'indice de polydispersité (PdI) déterminé par DLS. Pour les résultats obtenus par la granulométrie laser, on a eu recours au calcul du facteur « span » : Span = $\frac{d90 - d10}{d50}$ (Nasr, Taha, & Hathout, 2013) où d90, d50 et d10 correspondent aux diamètres cumulatifs à 90%, 50% et 10%, respectivement. Pour des valeurs de span inférieures à 0,4, la distribution de la taille des liposomes est considérée comme monodispersée (Hamishehkar et al., 2015; Zhou, Liu, Zhang, & Fan, 2012).

### I.3.4.3. Le potentiel zêta

La charge des liposomes est une caractéristique importante qui détermine la stabilité et l'efficacité d'encapsulation des liposomes. Elle varie selon le type de phospholipides qui forment les liposomes. L'attraction électrostatique entre les bioactifs chargés et les liposomes est un moyen d'accroître l'efficacité d'encapsulation (Filion & Phillips, 1997; Nagahiro, Mora, Boasquevisque, Scheule, & Patterson, 2000). La densité de charge des surfaces liposomiales et l'affinité de liaison des différents ions à des vésicules lipidiques peuvent être déterminées par mesure d'un paramètre appelé, potentiel zêta. L'électrophorèse laser Doppler (ELD) est une technique également utilisée pour mesurer la mobilité électrophorétique des liposomes (Filion & Phillips, 1997).

I.3.4.4. La lamellarité des liposomes

La lamellarité est le nombre de bicouches lipidiques entourant l'espace aqueux interne des vésicules lipidiques. L'observation microscopique directe donne des informations sur la lamellarité des liposomes (Mozafari, 2006). La résonance magnétique nucléaire (RMN) (Hope, Bally, Webb, & Cullis, 1985; Yamauchi et al., 2007) et la résonance paramagnétique électronique (RPE) (Pentak et al., 2008) sont également utilisées pour déterminer la lamellarité des liposomes. L'augmentation de la lamellarité induit une augmentation de la résistance à la perméation du principe actif (Shimanouchi, Ishii, Yoshimoto, Umakoshi, & Kuboi, 2009a).

I.3.4.5. La composition des liposomes

I.3.4.5.1. Efficacité d'encapsulation et taux de rendement du principe actif

L'efficacité d'encapsulation (EE) d'un principe actif dépend des propriétés liées à la bicouche lipidique et des molécules à encapsuler ainsi que la méthode de préparation des liposomes (Akbarzadeh et al., 2013). Afin de déterminer la quantité incorporée du principe actif dans la suspension liposomiale, il est nécessaire de séparer les molécules libres. Des méthodes physiques sont ainsi utilisées comme la centrifugation où les molécules de faible poids moléculaire sont recueillies dans le surnageant (Varona, Martín, & Cocero, 2011). La chromatographie de filtration sur gel et la dialyse sont des techniques également utilisées pour séparer les fractions retenues dans les liposomes des fractions libres (Yang, Delaney, Schubert, & Fahr, 2012). L'EE du principe actif (PA) est calculée de la façon suivante (Kunastitchai, Pichert, Sarisuta, & Müller, 2006) :

$$\text{EE (\%)} = \frac{Quantité\ totale\ du\ PA\ dans\ la\ suspension\ liposomiale - \ Quantité\ libre\ du\ PA}{Quantité\ totale\ du\ PA\ dans\ la\ suspension\ liposomiale} \text{ x } 100.$$

Quant au rendement d'encapsulation (loading rate (LR)), il est déterminé en se basant sur la masse incorporée du principe actif et de la masse initialement ajoutée à la suspension liposomiale. Le rendement d'encapsulation est calculé de la façon suivante :

$$\text{LR (\%)} = \frac{Masse\ incorporée\ du\ PA\ dans\ les\ liposomes}{Masse\ initale\ du\ PA} \text{ x } 100.$$

I.3.4.5.2. Dosage des lipides

Des techniques chromatographiques telles que la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), la chromatographie gazeuse (GC) et la chromatographie sur couche mince (CCM) peuvent être utilisées pour séparer et quantifier les lipides composant les bicouches lipidiques (Shimada, Nemoto, Shida, Oshima, & Yamagishi, 2008). Dans notre étude, la méthode de Bartlett est utilisée pour déterminer le taux d'incorporation des phospholipides. Elle 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 qui sera analysé à 815 nm.
Quant au cholestérol, il peut être dosé par HPLC. Dans notre étude, une méthode enzymatique colorimétrique est utilisée pour le dosage du CHOL et cette technique sera détaillée dans l'article 2 (chapitre 3).

I.3.4.6. La stabilité colloïdale

La courbure de la bicouche et la rigidité de la membrane sont généralement considérées lors des études de la formation et stabilité des liposomes. Un apport d'énergie s'effectue lors de la formation de liposomes par sonication, homogénéisation ou par le chauffage et par conséquent favorise la courbure de la membrane. Le degré de courbure membranaire varie en fonction du type des lipides, ainsi que de l'absence ou la présence des stérols. En parallèle, la stabilité chimique repose sur la capacité des liposomes à maintenir le niveau d'efficacité d'encapsulation face à des changements environnementaux (pH, composition de l'électrolyte, présence d'agents oxydants et de tensio-actifs comme les surfactants, le CHOL et les sels biliaires) (Couvreur et al., 1979). L'HPLC a été introduite pour évaluer la composition des liposomes et par la suite la stabilité des liposomes (Zuidam, Lee, & Crommelin, 1993).
Pour conclure, la caractérisation des liposomes est nécessaire pour optimiser les formulations afin d'augmenter l'efficacité clinique de ces nanovecteurs.

## I.4. Les propriétés dynamiques des membranes

### I.4.1. Le thermotropisme des lipides

La dynamique des membranes est reliée à la structure et la géométrie des lipides (cylindrique ou conique), aux conditions de température et d'hydratation ainsi qu'au volume moléculaire occupé par les têtes polaires (y compris l'inclinaison par rapport au plan de la membrane) et les chaînes hydrophobes des acides gras (degré d'insaturation et le nombre d'isomérisation trans-gauche).

Dans notre étude, la dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) ($C_{40}H_80NO_8P$) est le lipide membranaire utilisé (Figure 9). C'est est un phospholipide zwitterionique thermotrope. Il est le constituant majeur des membranes biologiques et rentre majoritairement dans la composition des liposomes. Ce phospholipide présente une géométrie cylindrique ayant une partie hydrophile formée par la choline et le phosphate et une partie hydrophobe composée de deux chaînes d'acides gras saturés de 16 atomes de carbone.

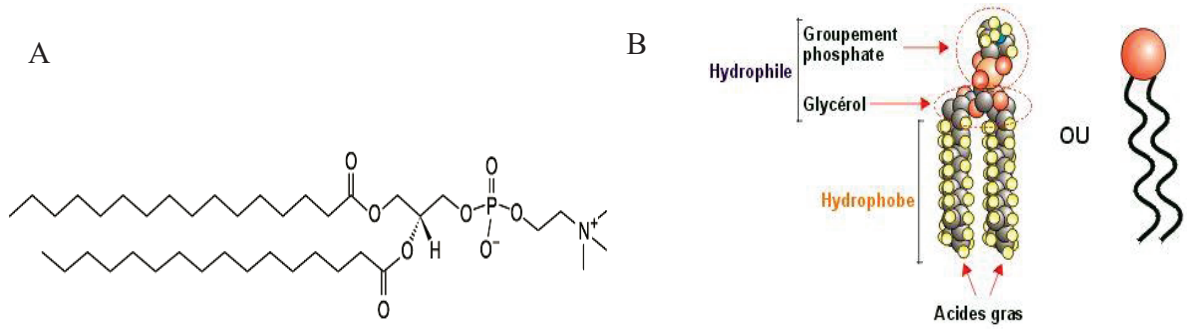



**Figure 9**. (A) Structure chimique de la DPPC. (B) les composantes de la molécule de DPPC : une tête polaire et une queue hydrophobe formée de deux chaînes d'acides gras à 16 atomes de carbone.

La DPPC a été largement caractérisée dans la littérature. Elle s'hydrate facilement et forme uniquement des phases lamellaires aux températures physiologiques. Le diagramme de phase de la DPPC a été établi par les techniques de diffraction des rayons X et par analyse enthalpique différentielle (AED) en fonction de la température et du taux d'hydratation. Le diagramme de phase de la DPPC est présenté dans la figure 10.A.

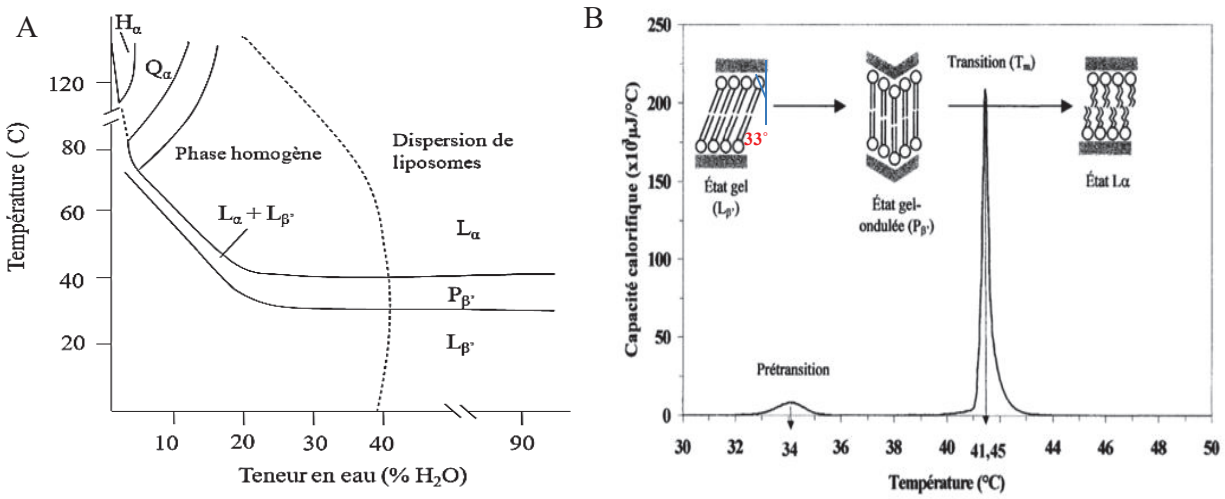



**Figure 10**. (A) Diagramme de phase de la DPPC en fonction de la température et du taux d'hydratation. $L_{\beta'}$: phase lamellaire gel (dite aussi solide-ordonnée ($S_o$)), $L_\alpha$ : phase lamellaire fluide, $P_{\beta'}$ : phase gel ridé intermédiaire, $Q_\alpha$: phase cubique et $H_\alpha$ : phase hexagonale (Oldfield & Chapman, 1971). (B) Thermogramme des phases lamellaires de la DPPC déterminé par la calorimétrie différentielle à balayage (DSC).

La figure 10.A présente les différents états de phase de la membrane de DPPC en fonction de la température et du taux d'hydratation. On remarque que pour des faibles teneurs en eau (< 10% en masse) et pour des hautes températures (> 80˚C), des phases cubiques ($Q_\alpha$) et hexagonales ($H_\alpha$) sont formées, autrement dit les phases non-lamellaires de la DPPC. Dans la phase hexagonale, les lipides forment des cylindres empilés dans un motif hexagonal où les têtes polaires sont orientées vers l'intérieur en contact avec l'eau (phase hexagonale dite aussi de type II) (Figure 11). Par ailleurs, dans la phase cubique, les lipides sont multiconnectés en forme d'une éponge à trois dimensions.




**Figure 11.** Les phases non-lamellaires de la DPPC. (A) phase hexagonale ($H_\alpha$), (B) phase cubique ($Q_\alpha$). Ces phases relatives à la membrane de DPPC sont formées pour des hautes températures (80˚C) et à faible teneur en eau (< 10% en masse) (Decher & Hong, 1991)

Pour une teneur en eau supérieure à 40% en masse, les propriétés du système membranaire ne dépendent plus de la teneur en eau mais essentiellement de la température.
Pour des teneurs en eau supérieure à 20%, on distingue des phases lamellaires suivantes : la phase lamellaire gel, $L_{\beta'}$ ; la phase lamellaire fluide, $L_{\alpha}$ ; et la phase ridé intermédiaire, $P_{\beta'}$. Les propriétés de ces phases seront expliquées ci-après. La ligne en pointillée (Figure 10.A) indique la quantité maximale d'eau absorbée par le système avant un déphasage. Ces différents états de phases sont adoptés en fonction de la température. C'est le thermotropisme des lipides qui se caractérise par une température de transition de phase ($T_m$). Elle est définie comme étant la température pour laquelle les variations d'enthalpie contrebalancent le gain d'entropie généré principalement par le désordre conformationnel des chaînes. Autrement dit, c'est le passage d'un état ordonné à un état désordonné. Ceci se produit à la température de transition de phase de de 41˚C.

Afin de comprendre les propriétés des phases lamellaires de la membrane de DPPC, un thermogramme est présenté dans la figure 10.B. Dans cette figure, on distingue les différents états de phase de la membrane de DPPC caractérisés par la calorimétrie différentielle à balayage (DSC, pour Differential Scanning Calorimetry) en dessous et en dessus de la température de transition de phase. C'est une transition endothermique du premier ordre où on distingue les phases lamellaires suivantes :
A basse température ($T < T_m$), la phase lamellaire gel ($L_{\beta'}$) (dite aussi solide-ordonnée ($S_o$)) existe et se caractérise par des chaînes hydrocarbonées parallèles entre elles et en configuration trans (« tout-trans » ou « all-trans »). Les interactions de van der Waals entre les chaînes d'acides gras sont fortes et la diffusion translationelle des lipides est faible. Ceci est dû à l'inclinaison des chaînes d'acides gras de 33˚ par rapport au plan de la bicouche (Figure 10.B).
Une élévation de la température du système permet un accroissement de la mobilité moléculaire et la probabilité d'une isomérisation trans-gauche augmente. La phase gel ($L_{\beta'}$) se transforme en une phase gel ondulée ($P_{\beta'}$) (Ripple phase) (Heimburg, 2000) dans laquelle la structure lamellaire est conservée mais la bicouche présente des ondulations périodiques permettant ainsi d'augmenter la surface des têtes polaires. Cette phase apparaît à une température de pré-transition ($T_p$) de 34,6˚C.

Au-delà de la température de transition de phase ($T > T_m$), les phospholipides passent d'une configuration ordonnée à une configuration désordonnée. C'est la phase lamellaire fluide ($L_{\alpha}$) où la diffusion rotationnelle est plus importante. Cet état se caractérise par la présence de nombreux conformères gauches le long des chaînes acyles et par conséquent, un désordre moléculaire se produit.

La fluidité membranaire augmente et ceci est associée à une diminution de l'épaisseur de la membrane (de 39.4 à 26.3 Å) (Y. P. Zhang, Lewis, Hodges, & McElhaney, 1992).

La diminution de l'épaisseur de la membrane hydrophobe suite à la transition de phase gel-liquide a été mise en évidence par plusieurs techniques. L'analyse des profils de densité électronique des liposomes de DPPC acquise par la diffraction des rayons X montre une diminution de l'épaisseur d'environ 5 Å entre les phases gel et la phase liquide mesurées respectivement à 24˚C et 50˚C (Sun, Tristram-Nagle, Suter, & Nagle, 1996). Ceci est en accord avec des mesures de microscopie à force atomique (AFM) réalisées sur des bicouches de DPPC et qui montre une diminution de l'épaisseur de la membrane de 6 Å suite à la transition de la phase gel (22 ˚C) et la phase liquide (55˚C) (Leonenko, Finot, & Cramb, 2006).

En parallèle, il est important de comprendre les différents paramètres thermodynamiques reliés à la pré-transition de phase ainsi qu'à la transition de phase principale (Figure 12). Le changement des paramètres calorimétriques reflète les propriétés physicochimiques des phospholipides. Ce changement est attribué à l'incorporation des molécules exogènes dans la bicouche phospholipidique (Cong, Liu, Liang, Wang, & Luo, 2009; Todd P W McMullen & McElhaney, 1995)

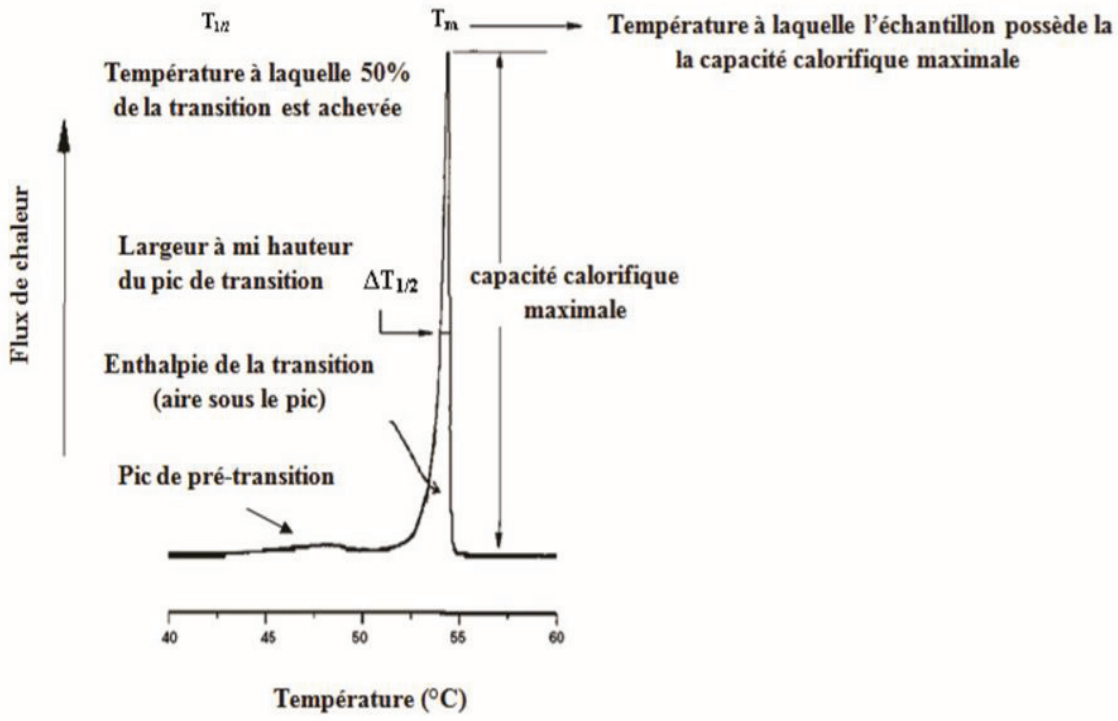



**Figure 12.** Les paramètres thermodynamiques du pic de transition principal de DPPC déterminés par DSC. $T_p$ : pic de la pré-transition, $T_m$ : pic de la température de transition de phase principale, $\Delta H_p$ : enthalpie molaire de la pré-transition, $\Delta H_m$: enthalpie molaire de la transition principale et $\Delta T_{1/2}$ : largeur à mi-hauteur du pic de transition.

La figure 12 présente les propriétés calorimétriques des deux pics de transition de phase caractérisées par DSC. On distingue les paramètres suivants : $T_p$, $\Delta H_p$, $T_m$, $\Delta H_m$ et $\Delta T_{1/2}$. Comme déjà mentionné, $T_m$ est la température de transition de phase détectée à 41˚C. $\Delta T_{1/2}$ correspond à la largeur à mi-hauteur du pic de transition. Elle est un indice de la coopérativité de la transition des chaînes acyles des phospholipides. Plus le pic est étroit, $\Delta T_{1/2}$ est plus petite et la coopérativité est plus élevée (Cong et al., 2009). $\Delta H$ correspond à la quantité d'énergie absorbée au cours de la transition pour le passage d'une phase lipidique à une autre. On distingue la $\Delta H_p$ qui est l'enthalpie de la pré-transition alors que la $\Delta H_m$ est relative à l'enthalpie molaire de la transition principale. Une augmentation de la $\Delta H_m$ est associée à l'augmentation de la fluidité de la membrane et du nombre de conformères gauches (El Maghraby, Williams, & Barry, 2005). Un déplacement du pic de la pré-transition ($T_p$) et/ou une disparition ainsi qu'une diminution de la $\Delta H_p$ indique une interaction des molécules avec les têtes polaires des phospholipides (Demetzos, 2008).

En général, $T_m$ est affectée par la longueur des chaînes et le degré d'insaturation ainsi que la nature du groupement polaire (Silvius, Read, & McElhaney, 1979). Plus les chaînes sont longues, plus la $T_m$ est élevée (Tableau 1). Les doubles liaisons en conformation trans augmentent la $T_m$ (effet ordre) (Brown & London, 2000). Par exemple, la DPPC dont la chaîne alkyle présente 16 atomes de carbones présente une $T_m$ de 41,5˚C alors que la DMPC ayant une chaîne alkyle à 14 atomes de carbone possède une $T_m$ de 23˚C. En revanche, les doubles liaisons en conformation cis et qui sont plus proches du monde du vivant, diminuent la $T_m$. Par exemple, la DOPC et la DSPE possèdent 18 atomes de carbones ; la DOPC ayant une insaturation possède une $T_m$ de -22˚C alors que la $T_m$ relative à la DSPE est de 74˚C. Par ailleurs, la $T_m$ pour des chaînes identiques est affectée par la nature des têtes polaires et leur orientation par rapport au plan de la bicouche. Sachant que la DPPC et la DPPG possèdent la même longueur des chaînes acyles (16 atomes de carbones), la tête polaire de DPPG (glycérol) fait diminuer la $T_m$ (40˚C vs 41,5˚C pour la DPPC) ; la différence entre les têtes polaires des lipides produit des interactions intramoléculaires différentes (Lindblom et al., 1991) et par conséquent une $T_m$ différente. Pour des mélanges de lipides miscibles, la température de transition du système sera intermédiaire entre celles des lipides purs (Garidel & Blume, 1998).

**Tableau 1**

Tableau récapitulatif des températures de transition de phase ($T_m$) de certains phospholipides.

| Phospholipide | Abbréviation | Longueur de la chaîne acyle:nombre d'insaturations | Tm (˚C) |
|---|---|---|---|
| Dimyristoylphosphatidylcholine | DMPC | 14:0 , 14:0 | 23 |
| Dioléylphosphatidylcholine | DOPC | 18:1 , 18:1 | -22 |
| Dipalmitoylphosphatidylcholine | DPPC | 16:0 , 16:0 | 41,5 |
| Dipalmitoylphosphatidylglycérol | DPPG | 16:0 , 16:0 | 41 |
| Dipalmitoylphoshphatidyléthanolamine | DPPE | 16:0 , 16:0 | 63 |
| Distéaroylphosphatidyléthanolamine | DSPE | 18:0 , 18:0 | 74 |

(Ishida, Takanashi, Doi, Yamamoto, & Kiwada, 2002)

On note que la plupart des lipides d'origine naturelle sont insaturés et par conséquent, la température de transition de phase des membranes est proche de 37˚C.

I.4.2. Rôle du cholestérol dans la transition de phase

Le caractère amphiphile du CHOL permet à la molécule de s'insérer dans la bicouche lipidique. En utilisant la technique de la résonance magnétique nucléaire (RMN) du CHOL deutéré, ce dernier s'oriente vers le cœur hydrophobe de la membrane par sa partie hydrophobe alors que le groupement hydroxyle s'oriente vers les têtes polaires des phospholipides (Dufourc, Smith, & Jarrell, 1984).

I.4.2.1. Cas d'un mélange binaire DPPC:CHOL

De nombreuses études portent sur l'effet du CHOL sur la transition de phase gel-fluide dans le cas d'un mélange binaire composé de DPPC:CHOL. Plusieurs diagrammes de phase de DPPC:CHOL sont proposés dans la littérature (Sankaram & Thompson, 1991; Vist & Davis, 1990). Parmi eux, le diagramme de phase élaboré par Vist et Davis est considéré comme référence. Par des mesures de DSC couplées à des mesures de RMN du deutérium (RMN-$^2$H) sur des membranes synthétiques des liposomes de type MLVs, Vist et Davis ont construit le diagramme de phase de DPPC en fonction de la température et de la concentration en CHOL (Figure 13.A) (Vist & Davis, 1990).

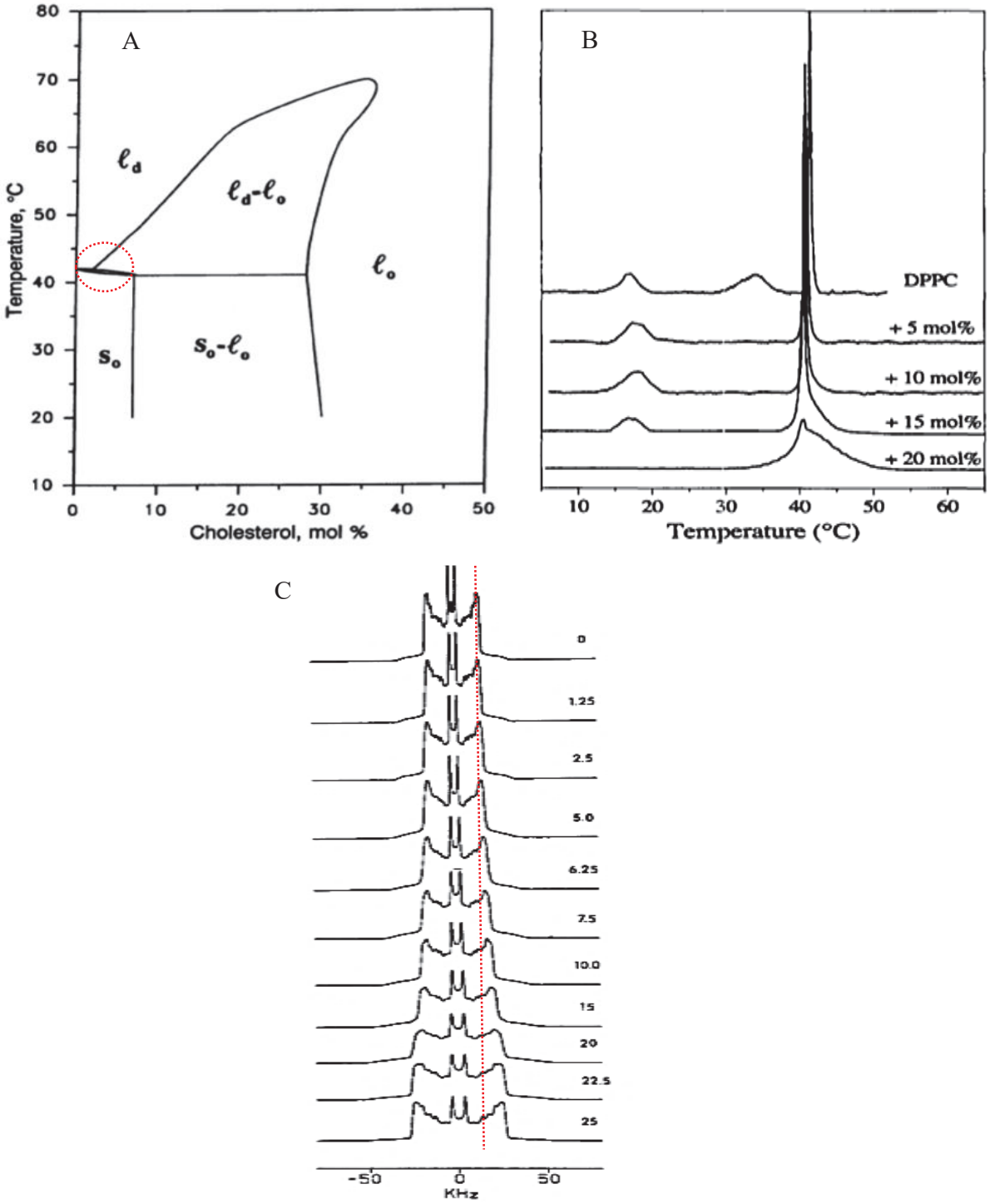



**Figure 13.** (A) Diagramme de phase de DPPC en fonction de la température et du taux en CHOL obtenu à partir de la calorimétrie différentielle à balayage (DSC) et la résonance magnétique nucléaire. $S_o$ : phase solide-ordonnée ou phase gel, $L_d$ : phase liquide-désordonnée, $L_o$ : phase liquide-ordonnée. (B) Thermogramme de la membrane de DPPC en fonction de la température et du taux en CHOL déterminé par DSC (Todd P W McMullen & McElhaney, 1995). (C) Mesures de RMN du deutérium (RMN-$^2$H) effectuées à 38˚C pour des liposomes de DPPC en fonction du taux en CHOL (Sankaram & Thompson, 1991; Vist & Davis, 1990)

Le diagramme de phase de la membrane de DPPC élaboré en fonction de la température et du taux en CHOL est présenté dans la figure 13.A. Dans ce diagramme on distingue cinq zones.
Pour des concentrations faibles en CHOL (< 7 mol%), la membrane existe dans un état de gel ou solide-ordonné ($S_o$). A l'état de gel, le CHOL augmente le mouvement des lipides suite à un écartement des têtes polaires et par conséquent inhibe le compactage des chaînes en configuration trans. En augmentant la température du système, deux phases en équilibre coexistent aux alentours de 41˚C (la ligne horizontale marquée par un cercle) : la phase $S_o$ et la phase liquide-désordonnée ($L_d$). Au-delà de 41˚C, une seule phase $L_d$ est atteinte.

Pour des concentrations intermédiaires en CHOL comprises entre 7 et 30 mol%, la phase gel coexiste avec des domaines riches en CHOL relatives à la phase liquide-ordonnée ($L_o$) ($T < T_m$). C'est la zone $S_o/L_o$ où les chaînes relatives à l'état $L_o$ sont moins ordonnées que celles présentes en phase gel. En revanche, la phase $L_o$ coexiste avec la phase $L_d$ pour des températures supérieures à $T_m$. C'est la zone $L_o/L_d$. Dans la zone contenant des concentrations intermédiaires en CHOL, une augmentation de l'épaisseur hydrophobe de la bicouche lipidique et un effet de condensation et de rigidification de la membrane est observé (Bhattacharya & Haldar, 2000). Cette observation est également mise en évidence par des mesures d'isothermes de compression sur des monocouches de phospholipides/CHOL ou de SM/CHOL (Stottrup & Keller, 2006). Cet effet de condensation se fait par la face lisse α du CHOL (Figure 14) (Róg, Pasenkiewicz-Gierula, Vattulainen, & Karttunen, 2009). A titre indicatif, l'effet de condensation par le CHOL est d'autant plus faible que les phospholipides sont insaturés comme il est moins miscible avec ces derniers (Brzustowicz, Cherezov, Caffrey, Stillwell, & Wassall, 2002).

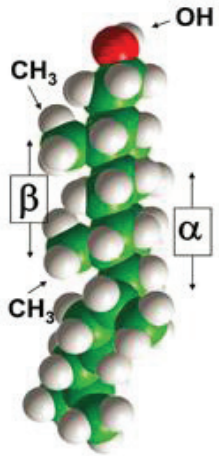



**Figure 14.** Représentation schématique des deux faces de la molécule de cholestérol. La face lisse α se trouve du côté du groupement hydroxyle et la face rugueuse β se trouve du côté des deux groupements méthyles et de la chaîne aliphatique en position C17 (Rose & Hanson, 1980).

Au-delà de 30 mol% en CHOL et quelle que soit la température, la phase liquide-ordonnée $L_o$ est atteinte. Dans cette situation, les chaînes acyles présentent des propriétés intermédiaires entre celles de la phase $S_o$ et $L_d$ : elles sont ordonnées et allongées au maximum comme dans la phase gel et présentent une mobilité latérale analogue à la phase $L_d$. Par ailleurs, la surface de la membrane est moins compressible mais la tension à la rupture augmente de façon significative en présence de CHOL (Needham & Nunn, 1990). Afin d'expliquer la coexistence des phases et surtout pour les concentrations intermédiaires en CHOL (7-30 mol%), une étude récente est menée par Redondo-Morata et collaborateurs (2012) sur l'effet du CHOL sur la transition de phase d'une membrane de DPPC par DSC couplée à l'AFM. Les résultats montrent que la membrane de DPPC présente une structure hétérogène suite à la présence de domaines pauvres et riches en CHOL (Redondo-Morata, Giannotti, & Sanz, 2012)et ceci est associé à la coexistence des phases observée sur le diagramme de Vist et Davis.

McMullen et McElhaney (1995) ont étudié l'effet du CHOL sur les paramètres thermodynamiques d'une membrane de type DPPC. La membrane présente deux pics de transitions : un pic de pré-transition ($T_p$) à 34˚C et un pic de transition principale $T_m$ à 41˚C. L'incorporation de 5 mol% de CHOL montre une disparition du pic de pré-transition (Figure 13.B). Ceci est principalement associée à une transformation structurale au niveau des têtes polaires des phospholipides : c'est la transition de phase de l'état gel à l'état gel-ondulé. Pour des concentrations supérieures à 5% en CHOL, plusieurs changements sont observés au niveau de pic de transition principal : un élargissement de la base de la transition de phase vers la droite et une diminution de l'aire sous le pic sont observés (Todd P W McMullen & McElhaney, 1995). Une diminution de l'enthalpie suite à l'augmentation du taux de CHOL signifie une diminution de la coopérativité entre les chaînes des phospholipides. Ce comportement a été expliqué par la notion de « mismatch » : la température de transition de phase diminue comme la molécule de CHOL présente une longueur hydrophobe de 17.5 Å (T. P W McMullen, Lewis, & McElhaney, 1993) et qui est plus petite que celle de la molécule de DPPC qui est de 19.5 Å (Y. P. Zhang et al., 1992). Pour des concentrations en CHOL supérieures à 15 mol%, une diminution du pic de transition de phase est observée. Dans cette situation, la phase $L_o$ est atteinte confirmant ainsi les résultats du diagramme de phase de Vist et Davis.

En parallèle, l'augmentation de l'ordre des chaînes et l'effet de condensation engendré par l'addition du CHOL a été mis en évidence par des mesures RMN du deutérium (RMN-$^2$H) (Vist & Davis, 1990). La figure 13.C présente le spectre RMN d'une suspension de liposomes de DPPC à différents taux en CHOL. Cette technique nous informe sur le degré d'organisation moléculaire des chaînes acyles.

L'atome du deutérium possède un spin de I=1 ce qui engendre un moment quadrupolaire dû à la distribution asymétriques des charges autour du noyau. L'interaction entre le moment quadrupolaire et le gradient de champ permet d'obtenir deux raies de résonance dans le spectre RMN. L'écartement de ce doublet est appelé « écart quadrupolaire » ou aussi « éclatement quadrupolaire ». Par hypothèse, si le désordre d'un système augmente, les éclatements quadrupolaires deviennent plus petits. A partir du spectre RMN, on remarque que l'addition du CHOL entraîne un élargissement des écarts quadrupolaires et par conséquent la mobilité des liaisons C-$^{2}$H diminue. Ceci confirme l'effet de condensation du CHOL observé dans le diagramme de Vist et Davis (1990) (Figure 13.A) ainsi que dans le thermogramme de McMullen et collaborateurs (1995).

L'effet du CHOL sur la transition de phase de la membrane de DPPC a été également étudié par l'anisotropie de fluorescence. Cette technique permet de mesurer le degré de liberté des sondes fluorescentes au sein de la membrane (Rodrıguez S, Garda HA, Heinzen H, 1997). La 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH) et ses dérivées tels que la 4-triméthyl-ammonio-1,6- diphényl-1,3,5-hexatriène (TMA-DPH) sont les sondes fluorescentes les plus utilisées dans les études de la dynamique des membranes. La DPH s'insère au sein de la bicouche lipidique alors que la TMA-DPH possède un groupement amine chargé positivement ancré à la surface de la membrane. Le degré de polarisation de fluorescence défini ainsi par l'anisotropie « r » est calculé par l'équation suivante : $r = \frac{I\| - I\perp}{I\| + 2I\perp}$

où $I\|$ et $I\perp$ représentent les intensités de fluorescences émises parallèlement et perpendiculairement, respectivement, au rayon incident. Le CHOL induit une légère diminution du degré de polarisation des deux sondes à l'état de gel ($T < T_m$) alors qu'une forte augmentation de l'anisotropie est observée à forte concentration en CHOL. Les mêmes observations sont retrouvées en utilisant autres sondes telles que les sondes lipidiques à fluorophore pyrène comme la lécithine-pyrène utilisée pour la détection de la transition de phase gel-fluide dans la membrane de type DPPC (Galla & Hartmann, 1980).

La récupération de fluorescence après photoblanchiment (FRAP, pour Fluorescence Recovery after photobleaching) est utilisée pour déterminer la mobilité latérale des lipides dans les membranes (Jacobson, Hou, & Wojcieszyn, 1978). Dans une expérience de FRAP, la membrane est marquée avec une sonde lipidique fluorescente. Les molécules lipidiques fluorescentes sont réparties uniformément dans l'échantillon à l'état initial. À un temps donné t, une région choisie de la membrane est illuminée fortement à l'aide d'un faisceau laser durant quelques secondes afin de photoblanchir les molécules fluorescentes, ce qui entraîne une extinction de la fluorescence dans cette région. On mesure ensuite l'intensité de fluorescence de l'échantillon en fonction du temps (Rayan, Guet, Taulier, Pincet, &

Urbach, 2010). Si les molécules sont mobiles, la région photoblanchie récupère progressivement de la fluorescence suite au déplacement des molécules fluorescentes provenant des régions adjacentes non photoblanchies. Au contraire, si les molécules sont immobiles, les molécules fluorescentes des régions adjacentes ne vont pas diffuser vers la région photoblanchie et par conséquent, la fluorescence restera éteinte dans cette zone. L'analyse de l'intensité de fluorescence en fonction du temps permet d'accéder au coefficient de diffusion latérale (D) qui est une caractéristique de la vitesse de déplacement des lipides au sein de la membrane (Axelrod, Koppel, Schlessinger, Elson, & Webb, 1976). Selon une étude menée par Filippov et collaborateurs, l'addition du CHOL (0-35 mol%) dans le système DMPC/CHOL engendre une structure compacte et par la suite une augmentation du coefficient de diffusion (Filippov, Orädd, & Lindblom, 2003) indiquant une transition de phase dans le système de l'état $S_o$ à l'état $L_o$.

Bien que le CHOL favorise la formation de la phase $L_o$, la capacité des chaînes aliphatiques à s'apparier avec le squelette rigide du CHOL engendre la formation des microdomaines ayant une structure particulière différente du reste de la membrane (Simons & Ikonen, 1997). Par conséquent, la phase $L_o$ présente un intérêt particulier comme elle est représentative de l'organisation des membranes plasmiques de mammifères et sert de base à la formation des radeaux lipidiques ou structures « rafts ».

### I.4.3. Les radeaux lipidiques

Les premières études relatives au concept de radeaux lipidiques portent sur les membranes plasmiques des cellules épithéliales polarisées (Simons & Van Meer, 1988). L'hypothèse des radeaux lipidiques a été formulée par la suite par Simons et Ikonen (1997) en se basant sur des expériences de solubilisation des membranes à froid (4˚C) par un détergent non ionique, le Triton X-100 (1%). Ces études montrent que les radeaux lipidiques sont formés par une association latérale des sphinglolipides au niveau du feuillet exoplasmique de la membrane golgienne où les espaces entre les chaînes lipidiques sont comblés par des molécules de CHOL, avançant là un rôle possible pour cette organisation membranaire particulière (Simons & Ikonen, 1997; Simons & Van Meer, 1988). Ces complexes lipidiques de faible densité issus de la solubilisation se forment et présentent la propriété de flotter après ultracentrifugation sur gradient de densité. Ce sont les domaines résistants à la solubilisation ou les DRMs (Detergent-Resistant Membranes). Les rafts membranaires ont été corrélés aux domaines $L_o$ existants dans les membranes modèles (London, 2002).

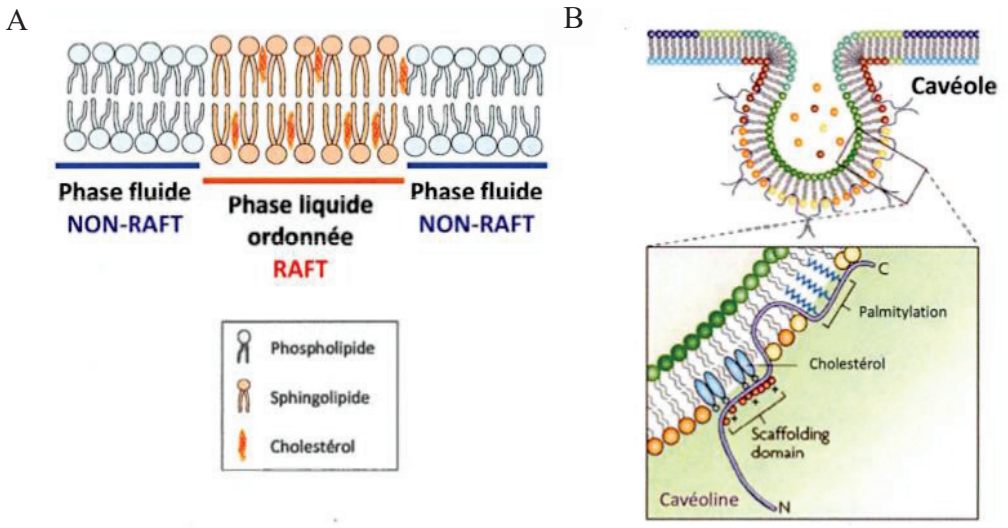



**Figure 15.** Représentation schématique des radeaux lipidiques. (A) les radeaux planaires. (B) les cavéoles. (Parton & Simons, 2007)

Dans la figure 15, on distingue deux types de radeaux lipidiques. La figure 15.A montre des radeaux planaires formés par des entités rafts et non-rafts. Les entités rafts correspondent aux domaines riches en CHOL et SL et la membrane se trouve en $L_o$ (London, 2002). Les entités non-rafts sont les domaines pauvres en CHOL et généralement associés à des lipides insaturés (Shaikh et al., 2006).
Quant aux cavéoles (Figure 15.B), ce sont des invaginations de la membrane plasmique (conformation en épingle à cheveu). La stabilité des cavéoles est conférée par une protéine dite cavéoline qui retient le CHOL dans ces microdomaines. Les cavéoles sont notamment impliqués dans l'endocytose et l'exocytose. Les cavéoles sont le seul type de raft morphologiquement identifiable. La taille des cavéoles est comprise entre 25 et 150 nm (Thorn, 2003).

Notons bien que la taille et la durée de vie des radeaux lipidiques présents sur les deux feuillets de la membrane est différente. Les radeaux associés au feuillet interne de la membrane sont petits et instables de l'ordre de la milliseconde. Ces petits radeaux forment néanmoins des domaines plus grands et stables après l'activation des récepteurs; la durée de vie de ces domaines sera de l'ordre de quelques minutes. Les radeaux associés au feuillet externe de la membrane sont instables et de courte durée de vie. De même, ces entités dynamiques vont créer une hétérogénéité de structure donc les effets d'interface ne sont pas négligeables : une frontière (ligne de tension) se crée entre les microdomaines et rétrécie avec le temps, ce qui rend la caractérisation de la dynamique des radeaux lipidiques un véritable défi. Pour identifier les radeaux lipidiques, on a recours à plusieurs techniques d'imageries.

Le suivi des particules uniques (SPT, pour Single Particle Tracking) est une technique qui permet de suivre la mobilité translationelle d'un ou de plusieurs lipides dans la membrane via de marqueurs spécifiques tels que les billes de latex ou les particules d'or (Kusumi & Suzuki, 2005). Le suivi du mouvement d'une particule individuelle nécessite l'utilisation d'une « caméra-vidéo » ayant une grande cadence de prise d'images et l'utilisation d'algorithmes permettant de localiser une particule avec une grande précision. Cependant, il est possible d'observer la diffusion latérale des molécules au sein des membranes modèles contenant des structures raft. Des radeaux de petites tailles ont été identifiés par SPT de l'ordre de 2-10 nm (Dietrich et al., 2001).

La microscopie à force atomique (AFM, atomic force microscopy) est une technique qui permet d'étudier des microstructures membranaires de l'ordre de 1 à 10 nm. Une cartographie de la membrane est réalisée en mesurant les forces de déflection qui s'exercent sur une fine aiguille se trouvant avec une très grande proximité de l'objet à cartographier. Cette technique a été utilisée sur des membranes modèles de type bicouche plane (Milhiet et al., 2001) ainsi que sur des membranes de cellules vivantes pour visualiser les microdomaines. Par exemple, la caractérisation des microdomaines dans le système POPC:CHOL (3:1) suite à l'addition du CHOL (20-55 mol%) a été réalisée par la technique AFM. De même, la variation de l'épaisseur hydrophobe de la membrane a été caractérisée par AFM. Cette technique permet de détecter l'épaisseur de l'ordre 0,5-1 nm (Milhiet et al., 2001).

La technique d'imagerie de fluorescence FRET est une méthode de transfert d'énergie de fluorescence qui permet d'observer la proximité de deux marqueurs qui se sont éloignés de l'ordre de de 1-10 nm (Nichols, 2003). Les radeaux lipidiques dans le système PC/SM/CHOL ont été identifiés par la méthode FRET (De Almeida, Loura, Fedorov, & Prieto, 2005). On ajoute aussi des mesures de FRAP qui peuvent être utilisées dans la caractérisation des structures rafts.

### I.4.4. Rôle du cholestérol dans les radeaux lipidiques

#### I.4.4..1. Cas du mélange binaire DPPC:CHOL

Prenons l'exemple du diagramme de phase réalisé par Vist et Davis. Comme déjà mentionné, le CHOL à forte concentration favorise la formation de la phase fluide $L_o$ et par la suite l'émergence des microdomaines ayant une dynamique différente de celle du reste de la membrane.
Il est important de mentionner que le mésappariement hydrophobe dans une membrane est responsable de la formation des régions distinctes ayant une morphologie, une taille, une composition ainsi qu'une

durée de vie spécifique. Par ailleurs, ce mésappariement hydrophobe n'est maintenu qu'en présence d'une immiscibité entre les lipides et qui est généralement derrière la séparation de phase (gel-liquide) et la formation des microdomaines. Par ailleurs, l'immiscibilité est faible dans le mélange DPPC:CHOL et la phase $L_o$ est considérée comme homogène. Par conséquent, le mésappariement hydrophobe est faible et la durée de vie des microdomaines dans le mélange binaire DPPC:CHOL est très limitée, ce qui rend leur caractérisation complexe. Cette observation a été confirmée par une étude récente menée par Javanainen et collaborateurs qui ont pu montrer par simulation atomique que les bords (ligne de tension) qui délimitent les microdomaines dans le mélange binaire sont très réduit (Javanainen, Martinez-Seara, & Vattulainen, 2017). Ceci favorise le rétrécissement et la disparition des microdomaines, d'où le recours au mélange ternaire pour la compréhension de ce processus.

### I.4.4.2. Cas d'un mélange ternaire

Les études effectuées par Silvius et collaborateurs ont montré que l'immiscibité liquide-liquide ($L_d/L_o$) est plus favorisée dans les mélanges ternaires (Silvius, 2003). Ces mélanges contiennent deux types de phospholipides ayant une température de transition différente. Un exemple type d'un modèle ternaire est constitué de chaînes de DOPC ($T_m$ = - 20°C) ayant une insaturation et une mobilité latérale élevée qui coexistent avec les chaînes saturées de DPPC ayant une faible mobilité latérale. L'addition du CHOL favorise ainsi la séparation de phase. Dans cette situation, l'épaisseur de la bicouche n'est pas la même à tout point de la membrane et ceci est dû à une orientation spécifique du CHOL dans les mélanges ternaires. Comme les phospholipides insaturés (DOPC) sont les constituants majeurs de la phase $L_d$, le CHOL s'oriente par sa face rugueuse β vers les domaines de $L_d$ alors que la face lisse α du CHOL s'oriente vers les domaines de la phase $L_o$. Le maintien de la coexistence des phases par le CHOL permet ainsi la persistance des microdomaines. Cette orientation n'existe pas dans un mélange binaire. En revanche, la ligne de tension qui sépare ces microdomaines est beaucoup plus importante ce qui rend leur caractérisation plus facile (Javanainen et al., 2017).

## I.5. Perméabilité membranaire

La membrane joue le rôle d'une barrière physique et pourtant elle est considérée comme une barrière sélective. La perméabilité membranaire permet un échange contrôlé entre l'intérieur et l'extérieur de l'édifice membranaire. Elle dépend d'une part des caractéristiques du soluté (taille, polarité, coefficient de partition, etc.) et d'autre part des paramètres relatifs à la membrane tels que la composition (Shinoda,

2016), l'organisation des lipides (Raffy & Teissié, 1999), la polarité (Dumas, Lebrun, Peyron, Lopez, & Tocanne, 1999) ainsi que l'épaisseur (Nagle, Mathai, Zeidel, & Tristram-Nagle, 2008).

Dans une membrane biologique, on distingue trois types de transfert : le transfert passif, le transfert actif et les processus d'endocytose et d'exocytose. Le passage de l'eau (à travers les aquaporines) et les ions à travers une membrane se fait par une diffusion passive dépendamment du gradient de concentration. Quant au transfert actif, il s'effectue avec une consommation d'énergie couplant l'hydrolyse d'ATP au transfert des molécules. Les processus d'endocytose et d'exocytose interviennent dans le cas de transfert de grosses molécules. Notons bien que l'équilibre entre la composition interne et externe de la membrane n'est maintenu qu'avec des gradients de charges, ce qui entraîne la création d'un potentiel membranaire régulant la perméabilité de la membrane.
Dans la littérature, les études de perméabilité sont réalisées sur des cellules du vivant aussi bien sur des modèles membranaires. Dans les années 1990, Hidalgo et collaborateurs (1990) ont introduit une technique biologique permettant de mesurer l'absorption intestinale des molécules actives à partir de lignées cellulaires issues d'un adénocarcinome du côlon humain; c'est le test Caco-2 (Hidalgo, Raub, & Borchardt, 1989). En parallèle, le système PAMPA (PAMPA, pour Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) introduit par Kansy et collaborateurs (1998) permet de mesurer la diffusion passive des molécules à tester en utilisant un filtre hautement poreux imbibé dans une solution de lécithine de jaune d'œuf dans du n-dodecane (Kansy, Senner, & Gubernator, 1998). Ces techniques sont coûteuses comme les cellules sont difficiles à maintenir. La complexité des membranes naturelles rend difficile l'étude d'une fonction distincte d'où le recours aux membranes synthétiques pour les études de perméabilité.

Dans cette partie, nous présentons les techniques de perméabilisation des membranes et les méthodes d'étude de la perméabilité membranaire. Dans certains cas, il est intéressant de perturber l'intégrité de la membrane afin d'optimiser les formulations permettant la diffusion contrôlée des molécules d'intérêt thérapeutique. Ceci permettrait d'établir une corrélation entre les propriétés physiques des membranes et la structure-activité du principe actif en question. Différents techniques de perméabilisation sont développées

### I.5.1. Les techniques de perméabilisation des membranes

Parmi les méthodes les plus courantes, on retrouve l'électroperméabilisation qui consiste à appliquer un champ électrique à une membrane. Cette technique a connu un succès dans la vectorisation des

plasmides dans de nombreux tissus (Mauroy et al., 2012). On retrouve également l'électrofusion qui est une technique complémentaire à l'électroperméabilisation. Les cellules sont mises en contact et la fusion se produit (Zimmermann, 1982). Avec la déstructuration de la membrane, la formation des pores est fort probable facilitant la diffusion du principe actif.

En parallèle, les détergents sont utilisés pour perméabiliser et solubiliser les membranes (Helenius & Simons, 1975). Ceci se produit grâce aux caractères tensioactifs des détergents en modifiant la tension superficielle des membranes. Le mécanisme de la solubilisation des membranes dépend de la nature et la concentration du détergent ainsi que la composition des membranes. Le Triton X-100, le Brij 80 et le lubrol sont les détergents les utilisés.

Les peptides antimicrobiens sont des peptides à caractère amphiphile dont le type d'interaction avec la membrane plasmique ressemble à celle des molécules tensioactives. Ils ont la capacité de former des pores ce qui provoque la distorsion des lipides et la formation des pores (García, Takagi, & Boettiger, 1998) pour faciliter le passage des molécules.

La technique d'aspiration par micropipettes (Evans, 1983) est une méthode très performante pour étudier les propriétés mécaniques des membranes. Comme son nom l'indique, la vésicule est aspirée par une micropipette ce qui permet d'accéder au calcul du module de compressibilité « K » qui est directement lié à la perméabilité de la membrane.

La microinjection permet l'injection de petits volumes dans un tissu biologique en utilisant une micropipette qui déstabilise la membrane (Y. Zhang & Yu, 2008). L'injection se fait une seule fois à la cellule ce qui limite le rendement de cette technique.

On retrouve également les polymères amphiphiles (exemple les Amphibols) qui permettent la perméabilisation des membranes (Gao et al., 2012). Ces polymères contiennent des groupements hydrophiles et hydrophobes et s'auto-assemblent-en des structures globulaires compactes et présentent des propriétés tensioactives.

### I.5.2. Les techniques d'étude de la perméabilité membranaire

La technique de spectroscopie de fluorescence est utilisée pour étudier la perméabilité des membranes à travers le suivi de la cinétique d'un fluorophore (Shimanouchi, Ishii, Yoshimoto, Umakoshi, & Kuboi, 2009b). La sulforhodamine (SRB) (Bischof et al., 1995), la calcéine (Ahumada, Calderon, & Lissi, 2016; Berquand, Fa, Dufrêne, & Mingeot-Leclercq, 2005) et la carboxyfluorésceine (R. J. Lee, Wang, Turk, & Low, 1998) sont les fluorophores les plus couramment utilisés dans les études de perméabilité. Encapsulé à forte concentration, le fluorophore va subir le phénomène « d'auto-quenching » et le signal de fluorescence est minimal. Le suivi de l'évolution de la fluorescence en fonction du temps permet

d'évaluer le changement qu'a subi la perméabilité membranaire en absence et en présence d'un principe actif selon de rapport suivant (Han, Ko, Park, Jin, & Kim, 1997) :
$((Ft-F_0)/F_{max}$ x 100) où $F_t$ est la fluorescence intrinsèque de la suspension au temps t, $F_0$ est la fluorescence initiale mesurée au temps $t_0$ et $F_{max}$ est la fluorescence maximale obtenue en présence du détergent non ionique, comme le Triton X-100 (1%).

I.5.3. Effet du cholestérol et des triterpènes sur la perméabilité membranaire

L'effet du CHOL sur la perméabilité de la membrane de DPPC de type MLVs a été étudié par électropermeabilisation couplée à la spectroscopie de fluorescence (Raffy & Teissié, 1999). L'augmentation du taux en CHOL de 0 à 29 mol% induit une réduction de la libération de la calcéine à 21˚C suite à la diminution de la perméabilité de la membrane favorisée par l'effet condensant du CHOL. Afin de perméabiliser la membrane de DPPC, l'augmentation du champ électrique de 0,6 à 6KV/cm permet ainsi la libération de la calcéine ce qui explique que la perméabilité de la membrane de DPPC est affectée par le taux en CHOL (Raffy & Teissié, 1999).

L'effet du cholestérol sur la perméabilité de la membrane a été étudié par la technique d'aspiration par micropipettes. Par cette technique, une étude menée par Tierny et collaborateurs en 2005 sur l'effet du CHOL sur la perméabilité de la membrane des liposomes de DPPC de type GUVs en se basant sur le module de compressibilité « K », montre que l'augmentation du taux en CHOL de 10 à 18 mol% fait augmenter la valeur de K de 300 à 1100 mN/m. Cette variation importante de la valeur de K est due à la transition de phase de l'état $S_o$ de l'état $S_o/L_d$ associée à l'effet de condensation du cholestérol et la diminution de la perméabilité membranaire (Tierney, Block, & Longo, 2005).

Quant aux triterpènes, leurs effets sur la perméabilité des membranes ont été étudiés par la spectroscopie de fluorescence. L'effet des TTPs pentacycliques tels que l'acide oléanolique et l'acide ursolique sur la perméabilité des liposomes de DPPC de type LUVs a été étudié par le suivi de la libération de la calcéine à 25 et 42˚C (Han et al., 1997). Les structures de ces triterpènes sont présentées dans la figure 16.




**Figure 16.** Structure des triterpènes pentacycliques. (A) acide oléanolique. (B) acide ursolique (Han et al., 1997).

Les résultats montrent une diminution de la libération de la calcéine des liposomes encapsulant l'acide oléanolique et l'acide ursolique ce qui signifie que ces deux TTPs exercent un effet stabilisant sur la membrane liposomiale. L'effet stabilisant est aussi dose-dépendant (Han et al., 1997).

L'effet de la cucurbitacine E (cuc E) (Figure 17), un métabolite secondaire des cucurbitacées, sur la perméabilité des liposomes de type LUVs formés de DPPC/DPPG/DPPE/CHOL (5/0,5/0,25/5) a été étudié par le suivi de la libération de la SRB à 4 et 37˚C. La structure de ce TTP tétracyclique est présentée dans la figure 17.

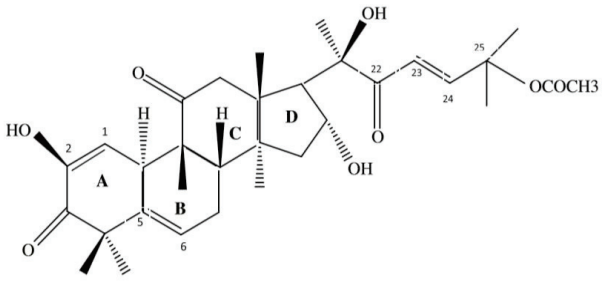



**Figure 17.** Structure chimique de la cucurbitacine E (Habib et al., 2013)

Les résultats montrent que la cuc E (DPPC/DPPG/DPPE/CHOL/cuc E) (5/0,5/0,25/5/1,2) perméabilise la membrane des liposomes à 37C˚ et ceci peut dû à la structure hautement oxygénée de la cuc E permettant l'interaction avec les têtes polaires des phospholipides (Habib et al., 2013) et par la suite la déstabilisation de la membrane.

L'effet d'une série de glucuronides de l'acide oléanolique a été étudié sur la perméabilité de la membrane des liposomes de type SUVs formés de phosphatidylcholine d'œuf en absence et en présence de cholestérol (Hu, Konoki, & Tachibana, 1996), par le suivi la libération de la calcéine à 25°C.

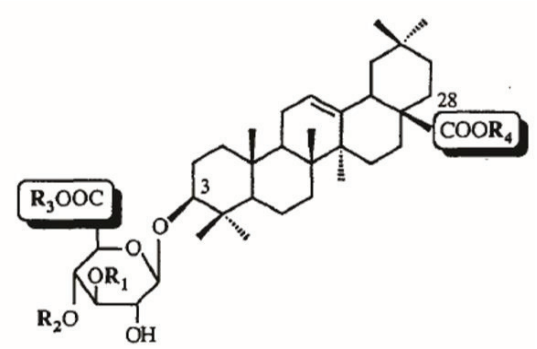



**Figure 18.** Structure chimique des saponines de l'acide oléanolique (Hu et al., 1996).

La figure 18 présente la structure chimique des saponines de l'acide olénaolique. En se basant sur cette structure, on distingue quatre groupes de saponines triterpéniques qui diffèrent par la nature chimique du résidu sucre en position C3 et la présence ou non d'un résidu glycosyl en position C28.

Les saponines du groupe 1 sont glycosylés en position C3 avec le carboxyle de l'acide glucuronide sous forme non estérifiée. En absence du CHOL, les saponines du groupe 1 n'ont pas d'effet sur la perméabilité membranaire.

Les saponines du groupe 2 ont leur acide glucuronique en position C3 estérifié par un groupement alkyle. En absence du CHOL, les saponines du groupe 2 perméabilisent la membrane et ceci peut être dû à l'hydrophobicité de la molécule.

Les saponines du groupe 3 sont glycosylés en position C3 et C28 et le groupe carboxyle de l'acide glucuronique en position C3 est libre. En absence du CHOL, les saponines du groupe 3 perméabilisent la membrane suite à l'estérification en position C3 et la glycosylation en position C28 favorisant ainsi les liaisons avec la bicouche lipidique.

Les saponines du groupe 4 sont glycosylés en position C3 et C28 et le groupe carboxyle de l'acide glucuronique au C-3 est estérifié par un groupe alkyle. En absence du CHOL, les saponines du groupe 4 perméabilisent la membrane.

En présence du CHOL, les saponines du groupe 1 affectent la perméabilité membranaire alors que les effets des saponines du groupe 2, 3 et 4 sont réduits sur la perméabilité de la membrane.

Ces résultats montre que le CHOL interagit avec les saponines du groupe 1 et par la suite perméabilisent la membrane alors que les saponines du groupe 2, 3 et 4 interagissent avec la membrane comme des détergents non spécifiques (Hu et al., 1996).

I.6. Fluidité membranaire

La fluidité de la membrane est un facteur primordial qui assure la souplesse de la structure membranaire ainsi que sa résistance mécanique. La mobilité des composants de la membrane est animée par un ensemble de mouvements présenté dans la figure 19.

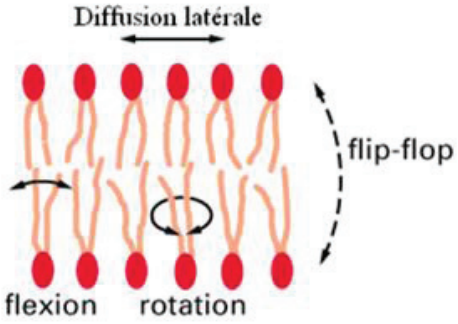



**Figure 19.** Mouvements des phospholipides dans une bicouche lipidique.

Dans la figure 19, on distingue les différents mouvements que peut subir un constituant membranaire. On retrouve la flexion, la rotation, la diffusion latérale et le mouvement de flip-flop. Ce dernier est nommé aussi la diffusion transversale qui se produit par le biais de la flipase, une enzyme permettant de changer de feuillet. Tout changement dans l'architecture moléculaire engendre des modifications au niveau de la fluidité membranaire.

L'amplitude des mouvements dépend de certains facteurs tels que la température, la composition de la membrane, le degré de saturation et la longueur des chaînes carbonées. Quant aux insaturations, ils vont induire des inflexions au niveau des chaînes et par conséquent la fluidité membranaire augmente. La température de transition de phase ($T_m$) joue également un rôle important dans la modulation de la dynamique des membranes. En dessous de la $T_m$ des lipides, la membrane se retrouve dans un état de gel (ordre) où la fluidité diminue. En dessus de la $T_m$, la membrane se retrouve dans un état fluide comme les chaînes d'acides gras sont dans un état désordonné et par la suite la fluidité augmente (de Meyer &

Smit, 2009). De même, l'existence des microdomaines (rafts) vont conditionner la fluidité de la membrane.

I.6.1. Les techniques d'étude de la fluidité membranaire

Dans la littérature, l'effet du CHOL et des TTPs sur la fluidité des membranes synthétiques et naturelles a été étudié par des techniques diverses. Parmi ces techniques, on retrouve :

La calorimétrie différentielle à balayage (DSC) est une technique qui reflète le comportement thermodynamique de la membrane en se basant sur la température de pré-transition et de transition (Demetzos, 2008). Cette technique est détaillée dans la page 35.

L'anisotropie de fluorescence est une technique qui permet d'étudier la fluidité et l'ordre des lipides à travers des sondes fluorescentes (Caudron, Zhou, England, Ollivon, & Prognon, 2007). La polarisation de fluorescence a été détaillée dans le paragraphe (I.4.2.1). La 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH) est une sonde qui s'intègre au sein de la membrane (Han et al., 1997) alors que la 1-(4-triméthyl-ammoniumphényl)-6-phényl-1,3,5-hexatriène (TMA-DPH) est une molécule amphipatique qui se localise à l'interface hydrophile de la bicouche (Rodríguez, Garda, Heinzen, & Moyna, 1997). L'anisotropie est inversement proportionnelle à la fluidité (Park, Oh, Mun, & Han, 2006).

La spectroscopie RAMAN est une technique qui permet d'étudier les interactions des molécules exogènes avec les bicouches lipidiques ainsi que la structure des phospholipides (Fox, Uibel, & Harris, 2007). En se basant sur les changements d'intensités des pics de diffraction Raman des vésicules phospholipidiques, la conformation des chaînes acyles, ainsi que l'ordre intra et intermoléculaire de la membrane sont déterminés (Fox et al., 2007).

La spectroscopie infrarouge à transformé de Fourrier (FTIR) est une technique utilisée dans les études de fluidité. Cette technique permet d'étudier l'influence d'un principe actif sur la structure et la dynamique de la membrane par le suivi des changements de conformation et l'état d'hydratation des différentes régions des phospholipides en fonction de la température (D. C. Lee & Chapman, 1986).

La résonance paramagnétique électronique (RPE) est une technique spectroscopique utilisée pour les études de fluidité. Elle est reconnue également pat la résonance du spin électronique (RSE). Cette méthode fournit une multitude de renseignements sur la structure électronique, la géométrie et le comportement dynamique des membranes (Budai, Szabó, Szögyi, & Gróf, 2003; Martínez Sarrasague, Cimato, Rubin de Celis, & Facorro, 2012; Stepien, Polit, & Wisniewska-Becker, 2015). La technique RPE se base sur l'incorporation d'une molécule paramagnétique au sein d'une bicouche lipidique. Les sondes les plus couramment utilisées sont les acides doxylstéariques (n-DSA; n = 5, 7, 10, 12, 14 et 16)

(Voszka, Szabó, Csík, Maillard, & Gróf, 2005). Le terme « n » désigne le groupement nitroxyle (NO) (appelé aussi nitroxyde) du marqueur (spin) ayant un électron non apparié qui se fixe à différentes positions de la chaîne carbonée. D'autres sondes sont également utilisées comme le TEMPO et les analogues du cholestérol comme la cholestane et l'androstane. Dans notre travail, la méthode RPE est utilisée pour étudier l'effet du CHOL et des TTPs sur la fluidité des liposomes de DPPC à travers deux sondes : la 5- et la 16-DSA. Ces deux sondes possèdent un électron non apparié au niveau du 5$^{ème}$ carbone (5-DSA) tout près des têtes polaires des phospholipides et au niveau du 16$^{ème}$ carbone (16-DSA) au cœur de la bicouche lipidique (Martínez Sarrasague et al., 2012) (Figure 20). Le spectre RPE enregistré est la dérivée première de la courbe d'absorption et qui représente l'énergie absorbée en fonction du champ magnétique. Le spectre obtenu reflète les fluctuations au niveau du microenvironnement de la sonde. Ces fluctuations sont quantifiées en termes de paramètre d'ordre (S) et de temps de corrélation ($\tau_c$). Le paramètre d'ordre (S) est calculé par le rapport ($h_o/h_{-1}$) utilisé comme indice de la fluidité de la membrane. Si les valeurs du paramètre d'ordre (S) sont grandes, ceci indique que la rotation du spin dans la bicouche lipidique est faible et par la suite la fluidité membranaire diminue (Kazushi Tsuda, Kinoshita, & Nishio, 2002). Il est important de mentionner que le spectre 5-DSA montre un profil anisotrope (Figure 20.A). Ce profil rend l'estimation du paramètre d'ordre (S) difficile en raison de la probabilité d'obtenir des pics superposés. Dans notre travail, le paramètre d'ordre (S) a été substitué par l'écart hyperfin ($2A_{max}$) (dit aussi division hyperfine maximale). $2A_{max}$ est déterminé à partir de la largeur des pics les plus éloignés obtenus par le spectre de 5-DSA (Figure 20.A) (Subongkot & Ngawhirunpat, 2015). La valeur de $2A_{max}$ est exprimée en Gauss (G).

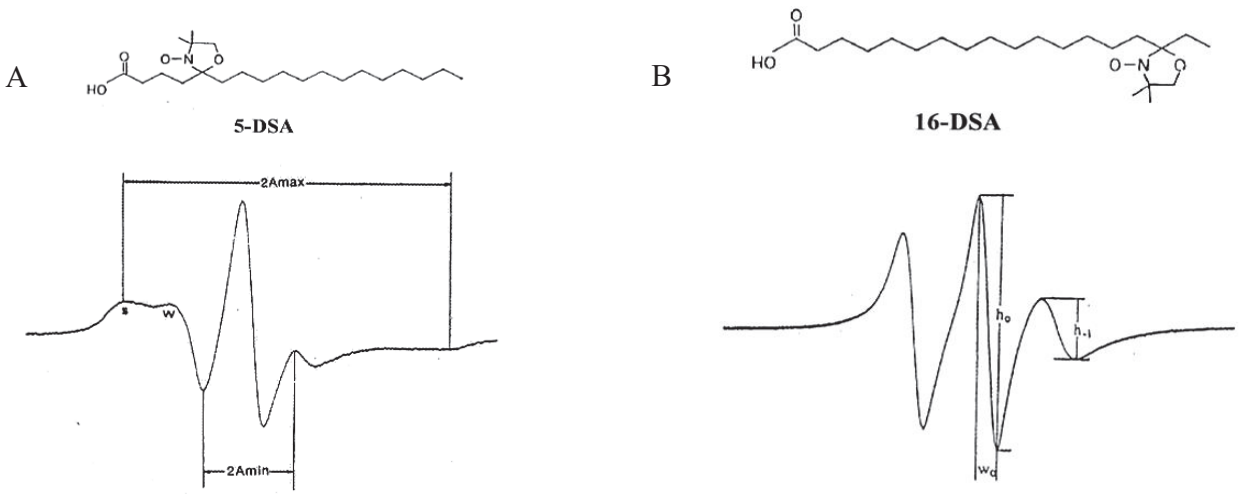



**Figure 20.** Les paramètres de la RPE. (A) structure chimique de la 5-DSA et l'écart hyperfin $2A_{max}$ déterminé à partir du spectre 5-DSA. (B) structure chimique de la 16-DSA et le temps de corrélation $\tau_c$ déterminé à partir du spectre 16-DSA. $W_0$ : largeur de la raie centrale à mi-hauteur, $h_0$ et $h_{-1}$ : amplitudes des pics de centre- et de haut champ, respectivement.

Le temps de corrélation ($\tau_c$) correspond au temps que met la sonde pour parcourir un radian de rotation (57°). La rotation de la sonde sur elle-même définit un cône ($10^{-10} < \tau_c < 10^{-9}$ s). Un cône large signifie que la sonde présente peu de contraintes, le temps de corrélation obtenue est faible et la fluidité de la membrane augmente. $\tau_c$ est déterminé à partir du spectre 16-DSA (mouvement isotrope) (Figure 20.B). Ce paramètre est calculé par l'équation suivante (Keith, Bulfield, & Snipes, 1970):
$\tau_c = (6.5\text{x}10^{-10})$ x $W_0$ x $[(h_0/h_{-1})^{0.5} - 1]$ où $W_0$ correspond à largeur de la raie centrale à mi-hauteur, $h_0$ et $h_{-1}$ correspondent aux amplitudes des pics de centre- et de haut champ, respectivement. Notons bien que les deux paramètres $2A_{max}$ et $\tau_c$ sont inversement proportionnels à la fluidité (Coderch et al., 2000).

I.6.2. Effet du cholestérol et des triterpènes sur la fluidité membranaire

La présence du cholestérol montre par DSC un effet fluidifiant de la membrane à l'état de gel ($T < T_m$) alors qu'une rigidification se produit à l'état fluide ($T > T_m$). Ceci a été observé pour des membranes de DPPC (Redondo-Morata et al., 2012; Saito & Shinoda, 2011; Vist & Davis, 1990). Ces observations sont corrélées à ceux obtenues par anisotropie de fluorescence de la DPH et la TMA-DPH où les valeurs de l'anisotropie des deux sondes diminuent légèrement à l'état de gel et augmentent fortement à l'état fluide (Han et al., 1997). Ceci montre que le CHOL augmente la fluidité membranaire (désordre) pour des températures inférieures à $T_m$ alors que l'effet inverse est observé pour des températures supérieures à $T_m$.

L'effet du CHOL sur la fluidité de la membrane de DPPC a été étudié par la technique RPE. Les paramètres de la RPE tels que l'écart hyperfin ($2A_{max}$) et le temps de corrélation ($\tau_c$) montrent une diminution à l'état gel. En augmentant la température du système, ces paramètres augmentent. Ceci confirme que le CHOL fluidifie la membrane à l'état gel et la rigidifie à l'état fluide (Voszka et al., 2005; L. Zhao, Feng, Kocherginsky, & Kostetski, 2007).

Il est important de mentionner que les substitutions au niveau du noyau stérol peuvent moduler son effet sur la fluidité membranaire. Un exemple type des substitutions sur le noyau stérol porte sur des oxystérols. Par définition, ce sont des dérivés du cholestérol produits par oxydation enzymatique du cholestérol au niveau de la chaîne latérale ou par oxydation non enzymatique au niveau du noyau stérol (Olsen, Schlesinger, Ory, & Baker, 2011). Un schéma de synthèse des oxystérols est présenté dans la figure 21. L'effet des oxystérols sur fluidité de la membrane des liposomes formés de DPPC ou des mélanges binaires de DPPC:DOPC (1:1) et de DOPC:SM (3:2) (Massey & Pownall, 2006) a été étudié par anisotropie de fluorescence du DPH. Les 25- et 27-hydroxycholestérol sont les oxystérols oxydés au

niveau de chaîne latérale alors que les 7 β-hydroxycholestérol et 7-ketocholestérol sont oxydés au niveau du noyau stéroïde (Figure 21).

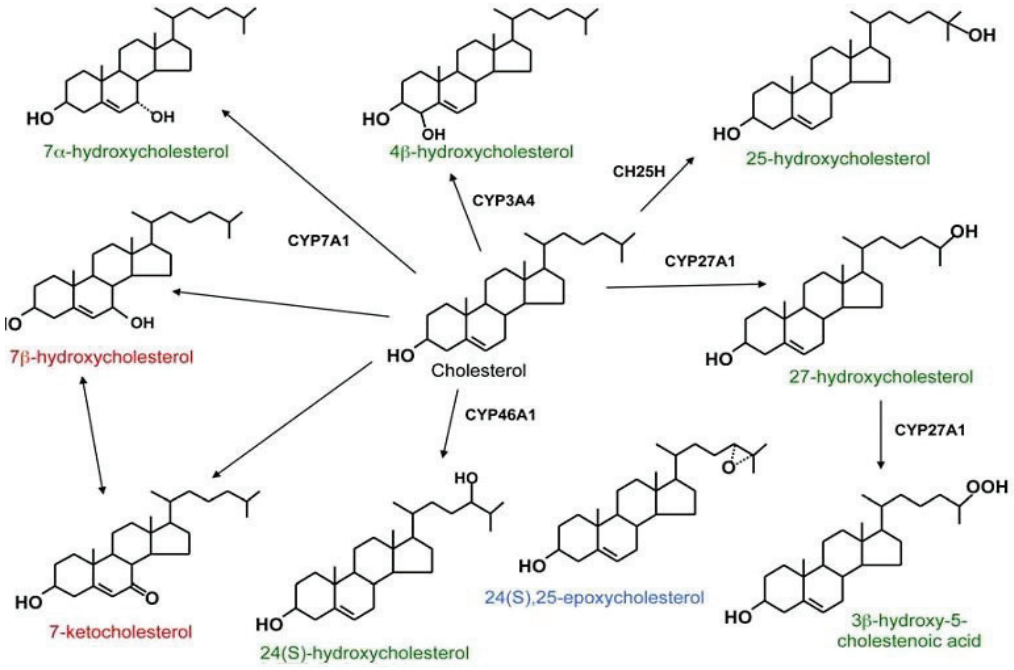



**Figure 21.** Schéma de synthèse des oxystérols (Olkkonen & Hynynen, 2009)

En comparant avec le cholestérol et à l'état gel ($T < T_m$), le 7 β-hydroxycholestérol diminue considérablement les valeurs de polarisation de DPH alors que les autres oxystérols diminuent la polarisation de DPH de la même manière que celle du CHOL. Ceci implique une augmentation de la fluidité de la membrane liposomiale et de façon importante en présence du 7 β-hydroxycholestérol. A l'état fluide ($T > T_m$) et en comparant avec le CHOL, les oxystérols diminuent la fluidité de la membrane des liposomes et de façon plus importante que le CHOL et plus spécifiquement en présence du 7-ketocholestérol. La localisation du groupement hydroxyle sur le noyau stérol module l'effet de la molécule en question sur les propriétés des membranes.

Quant aux TTPs, comme ils présentent des similarités structurales avec le CHOL, ils seront qualifiés comme de bons candidats à modifier les propriétés physiques des membranes. Ceci a été mis en évidence par plusieurs techniques. Leurs effets sur la fluidité des membranes naturelles bien que synthétiques ont été étudiés par des techniques diverses.

Une étude menée par Rodriguez et collaborateurs sur l'effet d'une série de TTPs pentacycliques tels que l'α-amyrine, le lupéol et le taraxérol (Figure 22) sur la fluidité des liposomes en présence de CHOL a été réalisé par anisotropie de fluorescence du DPH et TMA-DPH (Rodríguez et al., 1997).

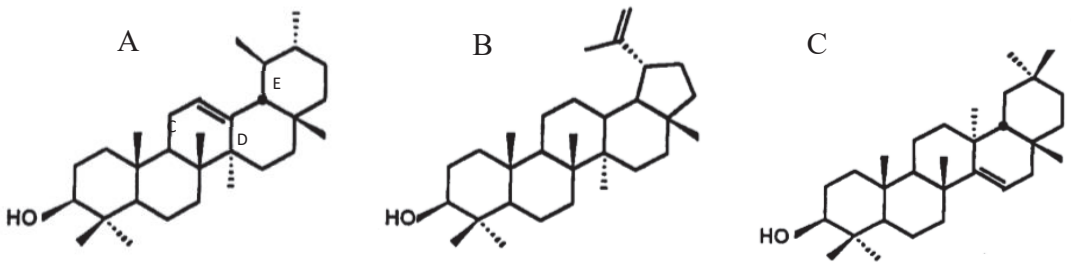



**Figure 22.** Structure chimique des triterpènes pentacycliques. (A) α-amyrine, (B) lupéol, (C) taraxérol (Rodríguez et al., 1997)

La figure 22 présente la structure des TTPs pentacycliques. Ils diffèrent par les substitutions aux niveaux des cycles C, D et E. A l'état gel et en comparant avec le CHOL, l'α-amyrine diminue les valeurs de l'anisotropie des deux sondes de façon importante. La diminution des valeurs de l'anisotropie pour les deux sondes était moins importante pour le lupéol. L'effet du taraxérol sur la fluidité membranaire était similaire à celui du lupéol à l'exception qu'il n'affecte pas les valeurs de l'anisotropie de la DPH. Ces TTPs présentent une structure non plane ce qui défavorise les interactions de van der Waals avec la bicouche lipidique et par conséquent, le désordre des chaînes acyles augmente en phase gel.
A l'état fluide ($T > T_m$) et en comparant avec le CHOL, l'augmentation des valeurs de l'anisotropie des deux sondes était moins importante en présence de l'α-amyrine. Des effets similaires sont produits par le lupéol. En revanche, les valeurs de l'anisotropie des deux sondes ne changent pas en présence du taraxérol. Ces résultats montrent que l'α-amyrine est moins efficace à produire l'effet condensant en comparant au CHOL et ceci est associé à l'absence de planéité et de la chaîne latérale (Rodríguez et al., 1997).

Une étude sur l'effet de deux autres TTPs pentacycliques tels que l'acide oléanolique et l'acide ursolique sur la fluidité des liposomes de DPPC a été réalisé par anisotropie de fluorescence du DPH et TMA-DPH (Han et al., 1997). En comparant avec le CHOL, ces deux TTPs n'affectent pas la fluidité de la membrane des liposomes à l'état gel ($T < T_m$) alors qu'ils diminuent la fluidité de la membrane à l'état fluide. Ces deux TTPs agissent de la même manière que le CHOL en diminuant le mouvement des chaînes acyles des lipides à l'état fluide.
Quant aux TTPs tétracycliques, leurs effets sur la fluidité des membranes naturelles et synthétiques ont été largement discutés dans la littérature. On retrouve aussi la technique d'anisotropie de fluorescence de la DPH pour étudier l'effet des corticoïdes sur la fluidité des membranes.

L'effet d'une série de glucocorticoïdes (GR) telle que de la bétaméthasone, la dexaméthasone, le cortisol et la prednisolone encapsulée à 0,1 mol% (DPPC:GR 100:0,1) (Figure 23) sur la fluidité de la membrane des liposomes de type MLVs montre une diminution des valeurs de l'anisotropie de fluorescence de la DPH et pour des températures comprises entre 30 et 50˚C (Ghosh, Pore, Basu, De, & Nandy, 1996). Les GRs engendrent une augmentation de la fluidité de la membrane des liposomes.

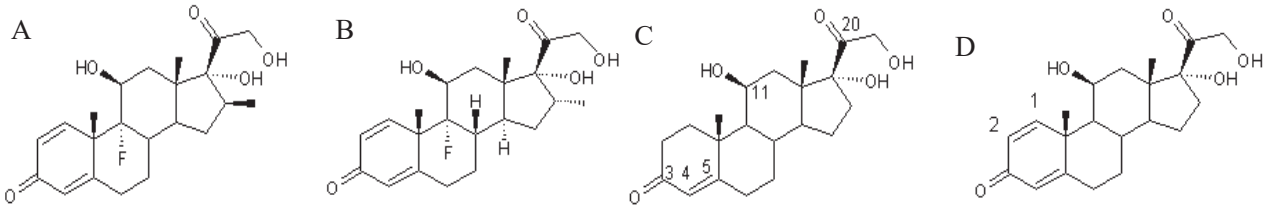



**Figure 23.** Structure des glucocorticoïdes. (A) bétaméthasone, (B) dexaméthasone, (C) cortisol, (D) prednisolone.

Quant au déxamethasone, il fluidifie aussi les membranes naturelles. Administré à 100 µg/jour par 100 g du poids corporel pendant quatre jours, il engendre une augmentation de la fluidité de la membrane de bordure en brosse chez le rat adulte (Brasitus et al., 1987) ainsi que celle des hépatocytes du rat (Kapitulnik et al., 1986).

L'effet fluidifiant des GRs a été observé dans d'autres travaux. Par anisotropie de fluorescence de DPH, la prednisolone et le cortisol encapsulé à 1; 2,5 et 10 mol% dans des liposomes de DPPC montrent une augmentation de la fluidité membranaire (diminution des valeurs de polarisation) pour des températures de 28, 41 et 50˚C (Abboud, Charcosset, & Greige-Gerges, 2016). Des résultats similaires ont été démontrés pour la fludrocortisone acétate (les mêmes ratios molaires de DPPC:CHOL) (Abboud et al., 2016) et pour le cortisol (DPPC:cortisol 100:0,1) (Ghosh et al., 1996).

Une étude menée par Whiting et collaborateurs sur l'effet des hormones stéroïdiennes y compris la progestérone, la 17-β-estradiol; un dérivé naturel du métabolisme du CHOL (via la testostérone), et la testostérone sur la fluidité des membranes synthétiques de DPPC et naturelles y compris la membrane synaptosomique et du réticulum endoplasmique (chez les rats et lapins). Les résultats de l'anisotropie de fluorescence de la DPH montrent que la 17-β-estradiol augmente la fluidité des membranes synthétiques et naturelles. En revanche, la progestérone favorise l'ordre des membranes alors que la testostérone ne présente aucun effet sur la mobilité des membranes (Whiting, Restall, & Brain, 2000).

L'effet des progestatifs sur la fluidité des liposomes de DPPC a été étudié par la technique FTIR. Des études menées par Korkmaz et collaborateurs (2005) montrent que La progestérone (PG) stabilise les membranes de DPPC de type MLVs à de très petites et grandes concentrations (1, 12, 18 et 24 mol%). Par contre, la PG montre un effet fluidifiant à des concentrations intermédiaires (3, 6 et 9 mol%) (Korkmaz, Kirbiyik, & Severcan, 2005). Une autre étude menée par Abboud et collaborateurs (2015) sur l'effet d'une série de progestatifs tels que la PG, 17- et 21-OH PG, DYG, MP et la MPA (1/2,5/5/10 et 25 mol%) sur la fluidité des liposomes de DPPC de type MLVs montre la MPA augmente la fluidité de la membrane des liposomes pour les deux phases gel (28˚C) et liquide (50˚C). En revanche, les progestatifs y compris la PG, 17- et 21-OH PG et la MP stabilisent la membrane à l'état gel. La PG, MP et la 21-OH PG stabilisent la membrane à l'état liquide. La DYG, la 21-OH PG et la PG stabilisent la membrane à la transition de phase (41˚C) (Abboud, Greige-Gerges, & Charcosset, 2015).
Récemment, une étude menée par Abboud et collaborateurs (2016) sur l'effet des TTPs tétra- (cortisol, prednisolone et FA) et pentacycliques (uvaol et ER) sur la fluidité des liposomes de DPPC par la technique FTIR montre un effet fluidifiant des TTPs pentacycliques plus important que celui des TTPs tétracycliques. Ceci a été confirmé par des techniques complémentaires à la FTIR telles que la DSC et la spectroscopie RAMAN (Abboud et al., 2016).

L'effet de trois hormones stéroïdiennes y compris la 17-β-estradiol et deux progestatifs de synthèse ayant des propriétés anti-androgéniques tels que la finastéride et l'acétate de cyprotérone (cpa, pour cyproterone acétate) (Figure 24) a été étudié sur la fluidité de la membrane des DPPC dans la phase gel (32˚C) et liquide (50˚C) par la technique FTIR (Biruss, Dietl, & Valenta, 2007). Les formulations sont préparées à un ratio molaire de 100:0,5 (DPPC:PA).

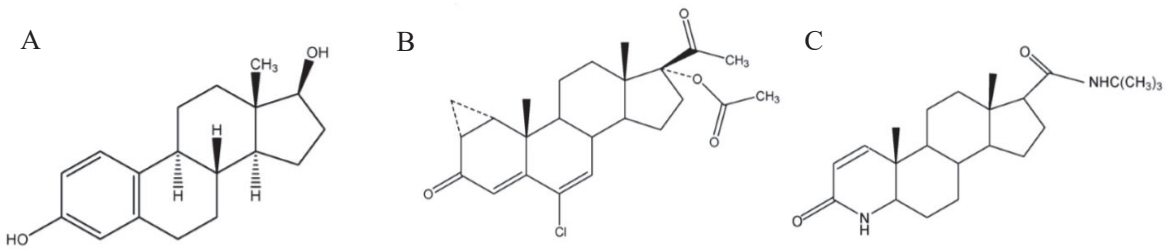



**Figure 24.** Structure des stéroïdes. (A) 17-β-estradiol, (B) acétate de cyprotérone, (C) finastéride (Biruss et al., 2007)

Les résultats montrent que la cpa stabilise la membrane de DPPC à l'état gel et liquide alors que la 17-β-estradiol augmente l'ordre des chaînes pour les deux états de la membrane. En revanche, la finastéride augmente la fluidité de la membrane à la phase liquide. En revanche, l'effet de la 17-β-estradiol sur les propriétés physiques de la membrane a été controversé où l'augmentation de la concentration à 20 mol%

dans une membrane de DPPC (100 mol%) engendre une augmentation de la fluidité de la membrane des liposomes (Boyar & Severcan, 1997).

On retrouve également que l'effet de la PG, la 17-β-estradiol et la MP sur la fluidité des membranes naturelles ont été étudié par la technique EPR. La PG ($10^{-9}$, $10^{-8}$, $10^{-7}$ et $10^{-6}$ M) (Kazushi Tsuda et al., 2002) et la 17-β-estradiol ($10^{-6}$, $10^{-7}$ M) (K Tsuda, Kinoshita, Kimura, Nishio, & Masuyama, 2001) induit une diminution importante du paramètre d'ordre (S) de la membrane érythrocytaire. Ceci implique que la PG et la 17-β-estradiol fluidifient la membrane des érythrocytes. En revanche, des études menées par Lamche et collaborateurs (1990) montrent que la MP (0,5;1 et 2 mg/ml) engendre une diminution du paramètre d'ordre S et par la suite une rigidification de la membrane des granulocytes (Lamche et al., 1990).

# Chapitre II

# Objectifs et stratégie de travail

## II. Objectifs et stratégie de travail

### II.1. Objectifs

Dans notre étude, deux classes de triterpènes (TTPs) ont été choisies pour étudier leurs effets sur les propriétés physiques des membranes lipidiques. Les TTPs tétracycliques sont les corticoïdes et les progestatifs et les TTPs pentacycliques sont l'acide oléanolique et l'érythrodiol. Le choix de ces molécules bioactives repose sur le fait qu'elles possèdent des propriétés biologiques diverses notamment anti-inflammatoires, anticancéreuses, antioxydantes, etc. (Martín, Hernández, Córdova, & Nieto, 2012; McDonough, Curtis, & Saag, 2008; Ozbakir, Crielaard, Metselaar, Storm, & Lammers, 2014). Les TTPs pentacycliques se trouvent dans les céréales, les fruits et légumes et l'huile d'olive, qui dans l'ensemble constitue la base du régime alimentaire méditerranéen. Leur consommation est étroitement liée à la réduction des maladies cardiovasculaires (Lopez et al., 2014).
Quant au cholestérol (CHOL), il représente l'unique stérol retrouvé dans la membrane des mammifères. Il a été largement décrit pour son rôle modulateur des propriétés physiques, structurales et dynamiques des membranes naturelles et synthétiques. Bien que les TTPs représentent des similarités structurales avec le CHOL, ils seront considérés comme de bons candidats à interagir avec la membrane et moduler ses propriétés. Cependant, les effets des TTPs sur les propriétés physiques des membranes ne sont pas tous traités dans la littérature et plus spécifiquement la perméabilité membranaire. De même et à notre connaissance, l'effet du CHOL à différents taux sur les propriétés physiques des membranes en présence des TTPs n'a jamais été recherché.

Le but de notre travail est de cibler l'impact de la composition de la membrane des liposomes de DPPC à différents taux en cholestérol sur la perméabilité et la fluidité membranaire en absence et en présence des TTPs tétra- et pentacycliques. Les liposomes sont caractérisés en termes de taille, d'homogénéité, de forme et de composition.
Nous sommes également intéressées à analyser les profils de libération d'une molécule hydrophile encapsulé dans les vésicules lipidiques par le modèle de Higuchi. En se basant sur les constantes de libération, l'effet des motifs structuraux des TTPs sur la fluidité et la perméabilité membranaire sera recherché.

## II.2. Stratégie de travail

Notre stratégie de travail consiste à préparer des liposomes, les caractériser, étudier les cinétiques de libération et chercher une relation entre les propriétés physicochimiques des TTPs et la perméabilité et la fluidité membranaire. L'effet du taux de CHOL encapsulé sera considéré.

### II.2.1. Préparation des liposomes

Les liposomes sont préparés par la technique d'évaporation inverse (REV). Les liposomes ont subi une extrusion dans le but d'obtenir des vésicules unilamellaires (LUVs) ayant une large cavité aqueuse. Aussi, les LUVs sont considérées comme le modèle le plus propice aux études de perméabilité où les lipides sont repartis de façon équilibrée entre le feuillet interne et externe de la membrane (Cullis, Fenske, & Hope, 1996). Nous avons adopté deux approches expérimentales pour l'exposition des liposomes aux TTPs. La première approche consiste à préparer des liposomes de DPPC:CHOL de ratio molaire de 100:100. Le TTP sera ajouté lors de la préparation des liposomes à un rapport molaire de DPPC:TTP de 100:2,5 et 100:10. La seconde approche consiste à exposer des liposomes préformés de DPPC préparés à différents taux en CHOL (0/2,5/5/10/20/25/30/50/100) aux TTPs. Le ratio molaire de DPPC:TTP est de 100:2,5.

### II.2.2. Etude de la perméabilité et la fluidité des membranes

Les études de perméabilité sont réalisées par la spectroscopie de fluorescence à travers le suivi de la cinétique de libération du fluorophore hydrophile, la sulforhodamine B (SRB), à 37˚C pendant 10 jours pour les liposomes chargés aux TTPs (DPPC:CHOL:TTP 100:100:2,5 et 100:100:10) dans du tampon tris-HCL contenant de la NaCl. De même, le suivi de la libération de la SRB à partir des liposomes préformés de DPPC (CHOL% 0-100) et exposés aux TTPs est effectué pendant 48 h.

Les études de fluidité sont réalisées par la résonance paramagnétique électronique (RPE) pour des liposomes préformés de DPPC CHOL% 0/10/20/30/100) exposés à la méthylprednisolone, l'acide oléanolique et l'érythrodiol. Les deux sondes 5- et 16-doxylstéariques (DSA) sont choisis pour étudier les changements de la dynamique des membranes près des têtes polaires des phospholipides et au cœur hydrophobe de la membrane à 30 et 40˚C, respectivement (Martínez Sarrasague, Cimato, Rubin de Celis, & Facorro, 2012). Ces changements seront quantifiés par l'écart hyperfin ($2A_{max}$) et le temps de corrélation ($\tau_c$) obtenus par les spectres 5- et 16-DSA, respectivement.

II.2.3. Analyse quantitative des profils de libération

Les cinétiques de libération de SRB obtenues à partir des différentes formulations liposomiales sont analysées par sept modèles mathématiques. Le modèle d'ordre zéro, premier ordre, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Hixson-Crowell, Weibull et Baker-Lonsdale sont présentés dans le premier article. La pertinence du choix du modèle mathématique se base sur le coefficient de corrélation le plus élevé (Boyapally, Nukala, Bhujbal, & Douroumis, 2010). Les résultats obtenus nous permettent de prédire le mécanisme de libération des molécules hydrophiles à partir des différentes formulations**.** Les profils de libération obtenus à partir des liposomes préformés (CHOL% 0-100) et exposés ou non aux TTPs sont analysés uniquement par le modèle de Higuchi. Ce modèle est le plus couramment utilisé dans les études des cinétiques de libération à travers les bicouches lipidiques (Barzegar-Jalali et al., 2008; Javadzadeh et al., 2010) et qui sont supposées suivre la loi de Fick (Refai, Hassan, & Abdelmonem, 2017). Les profils biphasiques des cinétiques de libération de la SRB nous mène à déterminer les constantes de libération ($K_1$ : 0-10 h et $K_2$ : 10-48 h).

II.2.4. Caractérisation des liposomes

II.2.4.1. Composition des liposomes

Les liposomes formés de DPPC:CHOL :TTP de ratio molaire de 100:100:2,5 sont caractérisés pour leur composition par des méthodes spectroscopiques et analytiques. Avant de procéder, les molécules incorporant les suspensions liposomiales (DPPC, CHOL et TTP) sont séparées des molécules libres par centrifugation.

- Dosage des phospholipides

  La concentration des DPPC dans la suspension liposomiale ($[DPPC]_{totale}$) ainsi que celle présente dans le surnageant ($[DPPC]_{libre}$) est déterminée par la technique de Bartlett et le protocole est détaillé dans la synthèse bibliographique. Ceci nous mène à déterminer le taux d'incorporation de la DPPC dans les vésicules lipidiques. Le rendement d'encapsulation (loading rate (LR)) de DPPC est aussi déterminé en se basant sur la masse de la DPPC initialement ajoutée à la suspension liposomiale.
- Dosage du cholestérol

  La concentration du cholestérol présente dans la suspension liposomiale ($[CHOL]_{totale}$) et celle présente dans le surnageant ($[CHOL]_{libre}$) est déterminée par une méthode colorimétrique

enzymatique. Ceci nous mène à déterminer le taux d'incorporation du CHOL et du rendement d'encapsulation du CHOL en se basant sur la masse du CHOL initialement ajoutée à la suspension liposomiale.

- Dosage des triterpènes

  La concentration des TTPs présente dans la suspension liposomiale ($[TTP]_{totale}$) et celle présente dans le surnageant ($[TTP]_{libre}$) est déterminée par HPLC. Ceci nous mène à déterminer l'efficacité d'encapsulation (EE) des TTPs ainsi que le rendement d'encapsulation des TTPs en se basant sur la masse des TTPs initialement ajoutée à la suspension liposomiale.

II.2.4.2. La taille et la morphologie des liposomes

La diffusion dynamique de la lumière (DLS) est la technique utilisée pour déterminer la distribution de taille des liposomes de DPPC (CHOL% 0-100) en absence des TTPs. L'homogénéité des suspensions liposomiales est déterminée par l'indice de polydispersité (PdI). Les valeurs de PdI peuvent varier entre 0 (monodisperse) et 1 (polydisperse). La granulométrie laser est également utilisée pour déterminer la distribution de taille des liposomes chargés de TTPs à 2,5 et 10 mol%. L'homogénéité des suspensions liposomiales est déterminée par le facteur « span ». Si les valeurs de span sont inférieures à 0,4, cela signifie que la population liposomiale est monodispersée (Zhou, Liu, Zhang, & Fan, 2012).
La morphologie des liposomes est déterminée par la microscopie électronique à transmission (TEM, pour transmission electron microscopy) par coloration négative pour visualiser la forme et la lamellarité des vésicules (Ruozi et al., 2009). Les liposomes de DPPC préparés à différents taux en CHOL et en absence des TTPs sont caractérisés par la TEM.

Un schéma récapitulatif de la stratégie expérimentale adoptée dans notre travail est présenté dans la figure 25 (A et B).

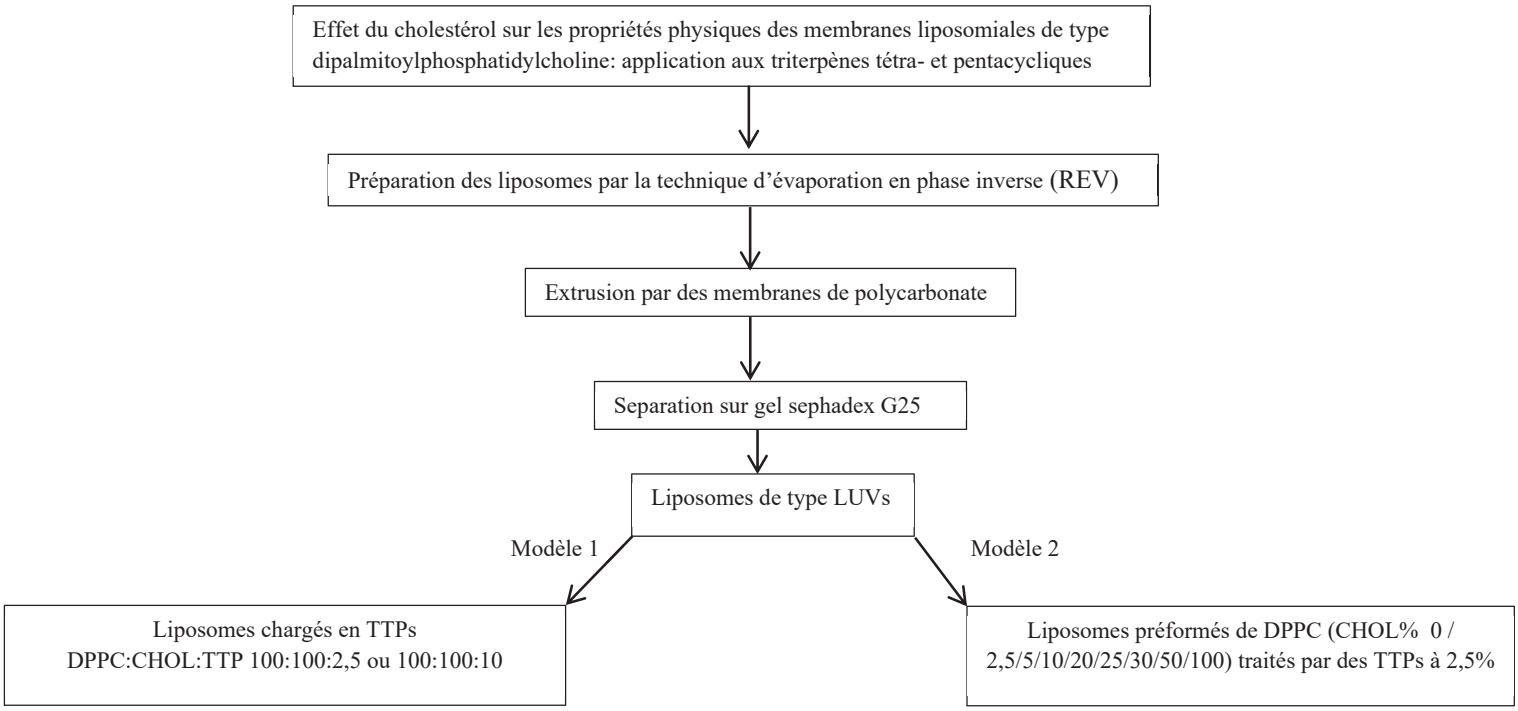



**Figure 25.A.** Préparation des liposomes chargés de triterpènes et des liposomes préformés et exposés aux triterpènes.

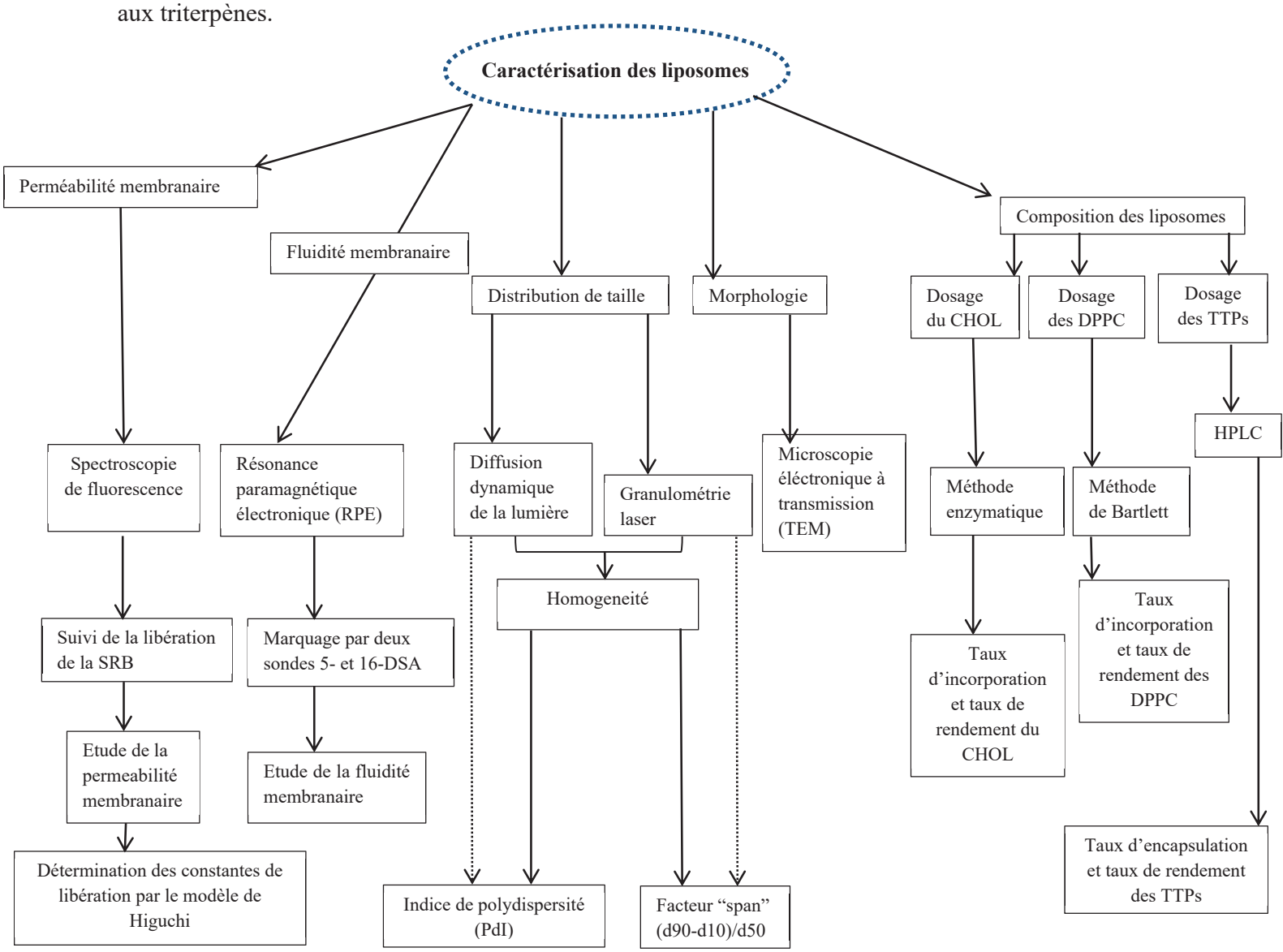


**Figure 25.B.** Caractérisation des liposomes en termes de taille, d'homogénéité et de composition par des méthodes analytiques, microscopiques et analytiques.

**Références**


Barzegar-Jalali, M., Adibkia, K., Valizadeh, H., Shadbad, M. R. S., Nokhodchi, A., Omidi, Y., … Shadbad, S. (2008). Kinetic analysis of drug release from nanoparticles. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences : A Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe Canadienne Des Sciences Pharmaceutiques*, *11*(1), 167–177.

Bartlett G, 1959. Phosphorus assay in column chromatography. Journal of Biological Chemistry 234, 466-468

Boyapally, H., Nukala, R. K., Bhujbal, P., & Douroumis, D. (2010). Controlled release from directly compressible theophylline buccal tablets. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *77*(2), 227–233. http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.01.031

Cullis, P. R., Fenske, D. B., & Hope, M. J. (1996). Physical properties and functional roles of lipids in membranes. In *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (pp. 1–33). http://doi.org/10.1016/S0167-7306(08)60508-6

Javadzadeh, Y., Ahadi, F., Davaran, S., Mohammadi, G., Sabzevari, A., & Adibkia, K. (2010). Preparation and physicochemical characterization of naproxen-PLGA nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *81*(2), 498–502. http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.07.047

Lopez, S., Bermudez, B., Montserrat-De La Paz, S., Jaramillo, S., Varela, L. M., Ortega-Gomez, A., … Muriana, F. J. G. (2014). Membrane composition and dynamics: A target of bioactive virgin olive oil constituents. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1838*(6), 1638–1656. http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.01.007

Martín, R., Hernández, M., Córdova, C., & Nieto, M. L. (2012). Natural triterpenes modulate immune-inflammatory markers of experimental autoimmune encephalomyelitis: therapeutic implications for multiple sclerosis. *British Journal of Pharmacology*, *166*(5), 1708–23. http://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01869.x

Martínez Sarrasague, M., Cimato, A., Rubin de Celis, E., & Facorro, G. (2012). Effect of serum proteins on an exogenous pulmonary surfactant: ESR analysis of structural changes and their relation with surfactant activity. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, *183*(1), 48–57. http://doi.org/10.1016/j.resp.2012.05.023

McDonough, A. K., Curtis, J. R., & Saag, K. G. (2008). The epidemiology of glucocorticoid-associated adverse events. *Current Opinion in Rheumatology*, *20*(2), 131–137. http://doi.org/10.1097/BOR.0b013e3282f51031

Ozbakir, B., Crielaard, B. J., Metselaar, J. M., Storm, G., & Lammers, T. (2014). Liposomal corticosteroids for the treatment of inflammatory disorders and cancer. *Journal of Controlled Release*, *190*, 624–636. http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.05.039

Refai, H., Hassan, D., & Abdelmonem, R. (2017). Development and characterization of polymer-coated liposomes for vaginal delivery of sildenafil citrate. *Drug Delivery*, *24*(1), 278–288. http://doi.org/10.1080/10717544.2016.1247925

Ruozi, B., Tosi, G., Tonelli, M., Bondioli, L., Mucci, A., Forni, F., & Vandelli, M. A. (2009). AFM phase imaging of soft-hydrated samples: A versatile tool to complete the chemical-physical study of liposomes. *Journal of Liposome Research*, *19*(1), 59–67. http://doi.org/10.1080/08982100802584071

Zhou, Q., Liu, L., Zhang, D., & Fan, X. (2012). Preparation and characterization of gemcitabine liposome injections. *Pharmazie*, *67*(10), 844–847. http://doi.org/10.1691/ph.2012.1157

# Chapitre III

# Discussion générale

## Introduction

Bien que les triterpènes (TTPs) présentent des propriétés biologiques diverses, ces derniers sont étroitement liées aux propriétés physiques des membranes biologiques. A notre connaissance, les travaux de la littérature ne couvrent pas l'effet des TTPs sur les propriétés physiques des membranes et plus spécifiquement la perméabilité et la fluidité membranaire. En outre, afin de se rapprocher du modèle de la membrane biologique, le cholestérol (CHOL) présent à différents taux est pris en considération dans la composition de la membrane. Des liposomes de type dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) sont choisis comme modèles membranaires. Nous avons préparé des liposomes formés d'un mélange binaire de DPPC:CHOL chargés d'une molécule hydrophile fluorescente, la sulforhodamine B (SRB) par la technique d'évaporation en phase inverse. Ces liposomes obtenus vont subir une extrusion dans le but d'obtenir des LUVs considérés comme un modèle propice pour les études de perméabilité. Ces formulations vont subir par la suite une étape de séparation sur gel sephadex G25 et les liposomes élués en premier contiennent tous les composants présents dans la suspension liposomiale y compris les DPPC, CHOL (0-100%) et SRB sont utilisés pour les études de perméabilité. Les formulations obtenus sont caractérisés en termes de taille, d'homogénéité et de morphologie L'effet du CHOL sur la perméabilité de la membrane des liposomes de DPPC est effectué par le suivi de la libération de la SRB à 37˚C pendant 48 h. Les différentes cinétiques de libération obtenues des différentes formulations sont analysées par des modèles mathématiques dans le but de prédire le mécanisme de libération à chaque taux en CHOL et de déterminer les constantes de libération en se basant sur le profil biphasique des cinétiques ($K_1$ : 0-10 h, $K_2$ : 10-48 h). La première phase de libération de la SRB semble relative aux molécules de SRB adsorbées à la surface des liposomes alors que la deuxième phase de libération correspond aux molécules de SRB qui diffusent de la cavité aqueuse liposomes vers le milieu externe. Par la suite, les études de fluidité sont réalisées pour certaines formulations de DPPC (CHOL% 0, 10, 20, 30 et 100) marquées par deux sondes 5- et 16-doxylstéariques (DSA). Les fluctuations de la dynamique de la membrane sont quantifiées près de l'interface et du cœur hydrophobe de la membrane par les paramètres de la résonance paramagnétique électronique (RPE) dont l'écart hyperfin et le temps de corrélation obtenus à partir des spectres de 5- et 16-DSA, respectivement. Les résultats de la TEM montrent une transition d'une forme irrégulière à une forme régulière et sphérique des liposomes au-delà de 5 mol% en CHOL. Les résultats de la DLS montrent une augmentation graduelle de la taille des liposomes (CHOL 0-30%) de 220 à 472 nm, cependant les liposomes (CHOL% 50 et 100) ont une taille proche de la taille des pores de la dernière membrane de polycarbonate de 400 nm. En outre, les différentes formulations de DPPC:CHOL sont considérées comme une population monodispersée où les valeurs de PdI sont inférieures à 0,4. Les

études de perméabilité montrent que les constantes de libération diminuent en fonction de l'augmentation du taux de CHOL. Cependant, les cinétiques de la libération de la SRB sont régies par un mécanisme de diffusion non-Fickienne dans la première phase de libération comprise entre 0 et 10 h alors qu'un mécanisme de diffusion Fickienne gouverne la deuxième phase de libération comprise entre 10 et 48 h. Les études de fluidité montrent que le CHOL affecte les régions polaires des phospholipides et le cœur hydrophobe de la membrane au-delà de 10% en CHOL. Ces observations montrent que la fluidité et la perméabilité des liposomes sont étroitement affectées par le cholestérol.

Ces résultats font le sujet du **l'article 1** publié en 2018 dans le journal « Food and Chemical Toxicology ».

Les triterpènes choisis dans notre étude sont les TTPs tétracycliques et les TTPs pentacycliques.

Parmi les TTPs tétracycliques, on retrouve les glucocorticoïdes (GRs) naturelles qui sont le cortisol (C) et la cortisone (Cn). Les corticoïdes synthétiques sont la fludrocortisone acétate (FA), la prednisone (P), la prednisolone (PL) et la méthylprednisolone (MP) qui sont les GRs de synthèse. Ces GRs et leurs effets sur la perméabilité et la fluidité de la membrane des liposomes font le sujet de **l'article 2**. Nous avons adoptés deux approches expérimentales pour la préparation des liposomes. La première approche consiste à préparer des liposomes préformés de DPPC à différents taux en CHOL (0/2,5/5/10/20/25/30/50/100) qui seront exposés aux TTPs à 2,5 mol%. La deuxième approche consiste à préparer des liposomes chargés de TTPs de ratio molaire DPPC:CHOL:TTP de 100:100:2,5 et 100:100:10. Les études de fluidité sont réalisées pour des liposomes préformés de DPPC (CHOL% 0/10/20/30/100) exposés ou non à la MP à 2,5 mol%. Les liposomes chargés de TTPs (DPPC:CHOL:TTP 100:100:2,5) sont caractérisés pour leur taille, homogénéité et composition par des méthodes spectroscopiques et analytiques. Des taux d'incorporation et de rendement d'encapsulation élevés de DPPC sont obtenus et supérieurs à 96 et 78%, respectivement. Des taux d'incorporation et rendement d'encapsulation (loading rate (LR)) élevés de CHOL sont obtenus et supérieurs à 98 et 95%, respectivement. L'efficacité d'encapsulation des GRs est supérieure à 94% et un rendement d'encapsulation des GRs supérieur à 77% est obtenu à l'exception de FA ayant des valeurs de LR de 51%. Les résultats de la granulométrie laser montre que les TTPs n'affectent pas la distribution de taille des liposomes et qui est comprise entre 0,32-0,46 μm, proche de la taille des pores de la dernière membrane impliquée dans l'extrusion (0,4 μm). La population des liposomes chargés de TTPs est considérée monodispersée et les valeurs de « Span » sont inférieures à 0,4. Le suivi de la libération de la SRB à des différentes formulations chargés de TTPs (DPPC:CHOL:TTP 100:100:2,5) montre que la MP ayant un groupement méthyle supplémentaire présente un effet perméabilisant comparant aux autres TTPs avec un pourcentage de libération de SRB de l'ordre de 39% après 220 h d'incubation. Il semble

que l'effet perméabilisant des TTPs est concentration-dépendante (10%). Les différentes cinétiques de libération de la SRB obtenues à partir des liposomes performées de DPPC (CHOL 0-100%) sont analysées par le modèle de Higuchi en se basant sur le profil biphasique des courbes de cinétiques ($K_1$ : 0-10 h, $K_2$ :10-48 h). les GRs tendent à diminuer la perméabilité de la membrane dans la première phase de libération (0-10) alors que l'effet inverse est observé dans la deuxième phase de libération. Les études de fluidité montrent que la MP tend à diminuer la fluidité de la membrane pour des concentrations intermédiaires en CHOL (10 et 20%). Ces observations montrent que le taux en CHOL, les substituants et la concentration des TTPs, la période d'incubation et l'approche expérimentale sont des facteurs qui modulent l'effet des TTPs sur la perméabilité et la fluidité de la membrane.

La seconde classe des TTPs tétracycliques porte sur les progestatifs. La progestérone (PG) et les 17- et 21-hydroxyprogestérone (17- et 21-OH PG) sont les progestatifs naturels. La medroxyprogestérone (MPG), la medroxyprogestérone acétate (MPGA) et la dydrogestérone (DYG) sont les progestatifs de synthèse. Les progestatifs et leurs effets sur la fluidité et la perméabilité des liposomes de DPPC font le sujet de **l'article 3**. Nous avons préparés des liposomes préformés de DPPC à différents taux en CHOL et exposés aux progestatifs à 2,5 mol%. En parallèle, nous avons préparés des liposomes de DPPC (CHOL% 100) chargés de progestatifs à 2,5 mol%. Le suivi de la libération de la SRB à partir des liposomes préformés exposés aux TTPs pendant 48 h et pendant 10 jours pour les liposomes chargés de TTPs. Les liposomes chargés de TTPs sont caractérisés en termes de taille, d'homogénéité et de composition. Les résultats de la granulométrie laser montrent que la distribution de taille des liposomes chargés de TTPs est de l'ordre de 0,4 μm à l'exception des formulations encapsulant la DYG où la taille des liposomes est de l'ordre de 0,27μm. La population des liposomes est considérée monodispersée où les valeurs de « Span » sont inférieures à 0,38. Les études de perméabilité réalisées sur les liposomes chargés de progestatifs montrent que la 21-OH PG et les progestatifs méthylés présentent l'effet perméabilisant le plus remarquable parmi les progestatifs. Ces observations sont également confirmées dans les études de cinétiques de libération de SRB à partir des liposomes préformés de DPPC (CHOL% 0-100). La présence d'un groupement hydroxyle libre en position C21 et un groupement méthyle supplémentaire constituent des éléments perturbateurs de la membrane. Ces observations montrent que la composition de la membrane, les substituants des TTPs et la période d'incubation sont les facteurs primordiaux dans la modulation de la perméabilité et la fluidité de la membrane.

Les TTPs pentacycliques sont l'acide oléanolique (OA, pour oleanolic acid) et l'erythrodiol (ER). L'effet des TTPs pentacycliques sur la perméabilité et la fluidité des liposomes de DPPC à différents taux en CHOL fait le sujet de **l'article 4.** Nous avons préparés des liposomes préformés de DPPC (CHOL% 0-100) exposés aux TTPs pentacycliques. En parallèle, nous avons préparés des liposomes chargés de TTPs pentacycliques de ratio molaire de DPPC:CHOL:TTP de 100:100:2,5 et de 100:100:10 en présence de l'OA uniquement. Les liposomes chargés de TTPs sont également caractérisés pour leur taille. Les études de perméabilité comportent le suivi de la libération de la SRB à partir des formulations chargés et exposés en fonction du temps. Les cinétiques de libération de la SRB obtenues à partir des liposomes préformés et exposés aux TTPs sont analysées par le modèle de Higuchi en tenant compte du profil biphasique de la cinétique de libération. Les études de fluidité sont réalisées à partir des liposomes préformés de DPPC (CHOL% 0, 10, 20, 30 et 100) et exposés aux TTPs pentacycliques à 2,5 mol%. Les résultats de la granulometrie laser montrent que les liposomes encapsulant les TTPs pentacycliques sont trois fois plus larges que les liposomes blancs (0,4 μm). Les études de perméabilité montrent un effet perméabilisant modéré des TTPs pentacycliques (39% vs 34% pour les liposomes blancs) après 10 jours d'incubation. L'analyse quantitative des cinétiques de libération de la SRB par le modèle de Higuchi montrent que les TTPs pentacycliques tendent à diminuer la perméabilité dans la première phase d'incubation pour les concentrations intermédiaires en CHOL (5-25%) alors que l'effet inverse est observé dans la deuxième phase de libération. Les études de fluidité montrent que les TTPs pentacycliques affectent les deux régions de la membrane y compris l'interface et la région hydrophobe sachant qu'à forte concentration en CHOL et à 40˚C, OA tend à diminuer la perméabilité dans le cœur hydrophobe de la membrane alors que l'ER augmente la perméabilité membranaire à l'interface. De nouveau, la composition de la membrane en CHOL, les substituants des TTPs et la période d'incubation sont des facteurs critiques modulant les effets des TTPs sur la perméabilité et la fluidité de la membrane.

# Article 1

**Cholesterol modulates the liposome membrane fluidity and permeability for a hydrophilic molecule**

Samar Kaddah[a,b], Nathalie Khreich[a], Fouad Kaddah[c], Catherine Charcosset[b], Hélène Greige-Gerges[a,*]

[a]Bioactive Molecules Research Laboratory, Faculty of Sciences, Lebanese University, Lebanon
[b]Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (LAGEP), Université Claude Bernard, Lyon 1, France
[c]École Supérieure d'ingénieurs de Beyrouth, Université Saint Joseph, Beyrouth, Mar Roukoz-Dekwaneh, Lebanon.

« Food and Chemical Toxicology »

DOI:10.1016/j.fct.2018.01.017

Food and Chemical Toxicology 113 (2018) 40–48

Contents lists available at ScienceDirect

Food and Chemical Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchemtox

# Cholesterol modulates the liposome membrane fluidity and permeability for a hydrophilic molecule

Samar Kaddah[a,b], Nathalie Khreich[a], Fouad Kaddah[c], Catherine Charcosset[b], Hélène Greige-Gerges[a,*]

[a] Bioactive Molecules Research Laboratory, Faculty of Sciences, Lebanese University, Lebanon
[b] Laboratoire D'Automatique et de Génie des Procédés (LAGEP), Université Claude Bernard, Lyon 1, France
[c] École Supérieure D'ingénieurs de Beyrouth, Université Saint Joseph, Beyrouth, Mar Roukoz-Dekwaneh, Lebanon

ARTICLE INFO

*Keywords:*
Cholesterol
Fluidity
Liposomes
Mathematical models
Permeability
Release

ABSTRACT

The effect of cholesterol (CHOL) content on the permeability and fluidity of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) liposome membrane was investigated. Liposomes encapsulating sulforhodamine B (SRB), a fluorescent dye, were prepared by reverse phase evaporation technique (REV) at various DPPC:CHOL molar ratios (from 100:0 to 100:100). The release kinetics of SRB was studied during 48 h in buffer (pH 7.4) containing NaCl at 37 °C. The DPPC:CHOL formulations were also characterized for their size, polydispersity index and morphology. Increasing CHOL concentration induced an increase in the mean liposomes size accompanying with a shape transition from irregular to nanosized, regular and spherical vesicles. The release kinetics of SRB showed a biphasic pattern; the release data was then analyzed using different mathematical models. On the overall, the SRB release was governed by a non-Fickian diffusion during the first period (0–10 h) while it followed a Fickian diffusion between 10 and 48 h. Changes in DPPC liposome membrane fluidity of various batches (CHOL% 0, 10, 20, 30 and 100) were monitored by using 5- and 16 doxyl stearic acids (DSA) as spin labels. CHOL induced a decrease in the bilayer fluidity. Concisely, CHOL represents a critical component in modulating the release of hydrophilic molecules from lipid vesicles.

## 1. Introduction

Efficient delivery of drugs to living cells is a major challenge (Yang et al., 2016). Liposomes, spherical capsules composed of one or more bilayers enclosing an aqueous core, are the most common and well-investigated nanocarriers (Patil and Jadhav, 2015). They have been exhaustively studied for targeted drug delivery (Sercombe et al., 2015) and controlled release of drugs (Akbarzadeh et al., 2013). They represent simplified models of biological membranes mainly consisting of binary or ternary mixtures of lipids (Bretscher, 1973; Eeman and Deleu, 2010). Several liposomal formulations such as Doxil®, Epaxal®, DepoDur™, Ambisome®, etc., were marketed for several years (Bulbake et al., 2017). Liposomes are mainly prepared from amphiphilic lipid molecules such as phospholipids and sterols (Wu et al., 2015).

Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) is a major phospholipid in mammalian membranes which shows a thermotropic transition of 41 °C near the physiological temperature (Gmajner and Ulrih, 2011). Cholesterol (CHOL) is also a key component of eukaryotic cell biological membranes (Magarkar et al., 2014). Its effect on the structural and dynamic properties of synthetic and natural membranes is well established. CHOL modulates the rigidity (Gracià et al., 2010; Najafinobar et al., 2016), thickness (Simons and Sampaio, 2011), stability (Miao et al., 2015) and fluidity of membranes (Peetla et al., 2013; Redondo-Morata et al., 2012; Takechi-Haraya et al., 2016). Moreover, CHOL content in membranes affects drug encapsulation efficiency (Haeri et al., 2014; Tabandeh and Mortazavi, 2013). It's worthwhile to note that the ratio between CHOL and phospholipid used in liposomes formulation to provide a controlled drug release is not well clarified (Briuglia et al., 2015; Miao et al., 2015). Therefore, it would be valuable to define the best combination of lipids and CHOL that allows a required controlled release of an encapsulated molecule (Fugit and Anderson, 2014).

To our knowledge, this study is the first to investigate the effect of cholesterol content on the permeability of DPPC bilayer for an encapsulated hydrophilic molecule, sulforhodamine B (SRB). Eleven batches of large unilamellar vesicles (LUVs) differing by DPPC:CHOL ratio (100:0, 100:2.5, 100:5, 100:10, 100:15, 100:20, 100:25, 100:30, 100:50, 100:75 and 100:100) are prepared by reverse phase

* Corresponding author.
*E-mail addresses:* hgreige@ul.edu.lb, greigegeorges@yahoo.com (H. Greige-Gerges).

https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.017
Received 3 November 2017; Received in revised form 9 January 2018; Accepted 11 January 2018
Available online 12 January 2018
0278-6915/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

evaporation technique (REV). The different liposomal suspensions encapsulating a fluorescent dye, sulforhodamine SRB, are compared for the leakage of the fluorophore through the lipid bilayer at 37 °C over 48 h. The effect of CHOL content on the apparent release constants was analyzed by comparison of the SRB release kinetics data to several mathematical models: zero-order, first-order, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Hixson-Crowell, Weibull and Baker-Lonsdale models. Changes in DPPC liposome membrane fluidity with the CHOL content (10, 20, 30 and 100%) were investigated by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy using 5- and 16-doxyl stearic acid (DSA) as spins labels. Moreover, the liposome preparations were analyzed for their size, polydispersity index (PdI) and morphology by dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM), respectively. The results of this study could be used as a tool for assessing drug permeability, understanding and predicting the in vitro release of hydrophilic solutes from different liposome formulations thus leading to a better design of appropriate nanocarriers.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) (purity ≥ 99%) is purchased from Lipoid Gmbh, Germany. CHOL (purity 99%), SRB (95% content dye), gel sephadex G25 are all purchased from Sigma-Aldrich, Germany. 5- and 16-DSA are purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Triton X-100 and Trizma Base are purchased from Sigma-Aldrich, Switzerland. The organic solvents chloroform and methanol are from Sigma-Aldrich, France and diethyl-ether is from VWR Chemicals Prolabo, France.

### 2.2. Preparation of large unilamellar vesicles containing SRB

Large unilamellar vesicles (LUVs) were prepared by reverse phase evaporation technique. of DPPC (25 μmol) was dissolved in 5 ml of a mixture of organic solvents: chloroform, diethyl-ether and methanol (6:6:1, v:v:v) (Khreich et al., 2008). The liposomal suspension was sonicated (Sonicator starsonic 35) for 1 min at 60 °C under nitrogen stream to avoid lipid oxidation. 0.75 ml of SRB solution (150 mM) prepared in 0.1 M tris-HCl buffer (pH 7.4) was added to the mixture followed by a sonication of the solution for 6 min at 60 °C under nitrogen stream. The organic solvents were removed at 45 °C using a rotary vacuum evaporator (Heidolph, Germany). A dark purple lipid film was obtained and SRB solution (1.5 ml) was added followed by a sonication for 5 min at 60 °C under a nitrogen stream. SRB was added to ensure its loading upon reconstitution of liposomes during evaporation and/or sonication steps. The liposomal suspension was stored at 4 °C for further manipulation.

The same protocol was used for the preparation of LUVs batches containing cholesterol. A stock solution of cholesterol was prepared in chloroform (25 mg/ml) and aliquots were added to the DPPC mixture before the first sonication at molar ratios DPPC: CHOL of 100:2.5, 100:5, 100:10, 100:15, 100:20, 100:25, 100:30, 100:50, 100:75 and 100:100. Three batches were prepared for each formulation.

### 2.3. Preparation of spin-labeled liposomes

Following the above-described protocol, the following formulations were prepared at various DPPC:CHOL ratios (100:0, 100:10, 100:20, 100:30, 100:100) with the exception that the spin label (5- or 16-DSA) was added to the liposomal suspensions at a DPPC:probe molar ratio of 100:1 before the first sonication. Three batches were prepared for each spin-labeled DPPC:CHOL formulation.

### 2.4. Extrusion and purification of liposomes

The liposome suspensions (SRB- and spin-labeled liposomes) were incubated in a 60 °C water bath for 35 min and then extruded using an "Avanti" mini-extruder (Avanti Polar Lipids, Switzerland) five times through a 1 μm polycarbonate membrane followed by five times through a 0.4 μm membrane. The extruded spin-labeled vesicles were ultracentrifuged (Optima™ Ultracentrifuge, Beckman Coulter, USA) at 40,000 g for 1 h at 4 °C and the resulting pellets were then kept in a desiccator overnight to remove the residual solvent before EPR analysis. The extruded SRB-loaded liposomes were centrifuged at 15000 rpm for 1 h at 4 °C to eliminate the excess buffer and the obtained pellet was suspended in tris-HCl (0.1 M; pH 7.4) buffer containing NaCl (150 mM). The buffer is added to maintain the osmolarity of the medium and to preserve the structure of the prepared liposomes. The resulting LUVs encapsulating SRB were separated from unloaded molecules by molecular sieve chromatography using sephadex G25 column. They were stored at 4 °C until use for fluorescence measurements.

### 2.5. Liposome characterization

#### 2.5.1. Morphological analysis

Liposomes were imaged by transmission electron microscopy (TEM) using a CM120 microscope (Philips, Eindhoven, Netherlands). 10 μl of the liposome suspension was placed on copper grids and negatively stained by a sodium silicotungstate solution (1%) for 30 s. The excess of solution was removed with a filter paper and the air-dried stained samples were used for imaging.

#### 2.5.2. Size analysis

The mean particle size of liposomes was determined by dynamic light scattering (DLS) technique using a Malvern Zetasizer Nano-series (Malvern Instruments Ltd, France). Dispersion Technology Software (DTS) v.5.10 was used to calculate the width of the fitted Gaussian size distribution which is displayed as the polydispersity index (PdI). The dispersity values reflect the nanoparticle size distribution (Masarudin et al., 2015) and ranged from 0 (monodispersed) to 1 (polydispersed) (Zaske et al., 2013). Before each DLS scan, the sample was stabilized for 5 min for the equilibration and the size measurements were performed in triplicate with at least 10 runs at 25 °C. Data were expressed as the mean ± standard deviation.

### 2.6. Fluorescence spectroscopy measurements

#### 2.6.1. Preparation of liposome suspensions for fluorescence measurements

To obtain absorbance values of 1, the suspensions of SRB-loaded liposomes were diluted in tris-HCl buffer (0.1 M; pH 7.4) containing NaCl (150 mM). Measurements were performed at 532 nm which was determined to be the maximal absorbance wavelength for loaded-SRB. The optical density measurements were determined using a spectrophotometer (Nicolet evolution 300 Thermoelectron, England). The diluted batches were used for fluorescence measurements.

#### 2.6.2. Permeability study

Permeability study was carried out at 37 °C by monitoring the release of SRB from liposomal suspensions over 48 h. The high concentration of encapsulated SRB in liposomes led to self-quenching followed by an increase in the fluorescence signal due to the release of SRB. Fluorescence measurements were performed using a spectrofluorometer (Thermo Spectronic, Aminco Bowman Series 2, USA). The excitation and the emission wavelength were 535 nm and 590 nm respectively. The release of SRB from LUVs is calculated according to the formula:

$$\text{Release SRB } (\%) = \frac{F_t - F_0}{F_{max}} \times 100 \quad (1)$$

where $F_t$ is the fluorescence of the suspension at time t, $F_0$ is the initial fluorescence measured at time $t_0$ and $F_{max}$ is the maximal fluorescence achieved by the addition of buffer containing Triton X-100 (1%) that leads to the total release of SRB from LUVs.

### 2.7. Kinetic modeling of SRB release profiles

The SRB release kinetics from the various DPPC:CHOL formulations were subjected to mathematical models including zero-order, first-order, Higuchi, Hixson-Crowell, Korsmeyer-Peppas, Weibull and Baker-Lonsdale models. The model with the highest correlation coefficient $R^2$ was considered to be the best fit for the kinetic release (Boyapally et al., 2010).

**Zero-order model**. The zero-order model describes the system where the drug release rate is independent of its concentration (Hadjiioannou et al., 1993; Kalam et al., 2007). It can be represented by the equation:

$$Q_t - Q_0 = K_0 t \quad (2)$$

Where $Q_t$ is the percentage of released SRB at time t (eq (1)), $Q_0$ is the percentage of released SRB at time $t_0$ and $K_0$ (slope of zero-order equation) is the zero-order release constant expressed in units of $time^{-1}$. Data obtained from in vitro SRB release was plotted versus time.

**First-order model**. According to the first-order model (Gibaldi and Feldman, 1967; Wagner, 1969), the release of the drug can be expressed by the equation:

$$\text{Log } C = \log C_0 - Kt/2.303 \quad (3)$$

Where $C_0$ is the initial concentration of drug, k is the first-order rate constant expressed in units of $time^{-1}$ and t is the time. In our work, C represents the percentage of remaining SRB in vesicles at time t and $C_0$ is the total SRB released in the medium containing Triton X-100 (1%). The data obtained were plotted as log percentage of SRB remaining versus time. This yielded a straight line with a slope of -K/2.303.

**Higuchi model**. The Higuchi model is the first example of a mathematical model aimed to describe drug release from a matrix system (Higuchi, 1961). The model describes the release of drugs from an insoluble matrix as a square root of a time-dependent process based on Fickian diffusion. In our work, we used the simplified Higuchi model expressed by the following equation:

$$Q = K_H \times t^{1/2} \text{ (Higuchi, 1963)} \quad (4)$$

Where $K_H$ (slope of Higuchi equation) is the Higuchi dissolution constant. The data obtained were plotted as percentage of released SRB versus square root of time.

**Hixson-Crowell model**. The Hixson-Crowell model describes the release from systems where there is a change in surface area and diameter of particles or tablets. The release is expressed by the equation:

$$Q_0^{1/3} - Q_t^{1/3} = \kappa_{hc} \times t \text{ (Hixson and Crowell, 1931)} \quad (5)$$

Where $Q_t$ is the remaining amount of the drug in particles at time t, $Q_0$ is the initial amount of the drug and $\kappa_{hc}$, the obtained slope from the Hixson-Crowell calibration curve, is the release constant. In our work, $Q_0^{1/3}$ is the cube root of 100% percentage of total SRB released in the medium containing Triton X-100 and $Q_t^{1/3}$ represents the cube root of percentage of SRB remaining in liposomes at time t. This model was applied to evaluate if the release rate of SRB could be controlled by erosion, dissolution and degradation mechanisms. The data obtained were plotted as $(Q_0^{1/3} - Q_t^{1/3})$ versus time.

**Baker-Lonsdale model**. The Baker-Lonsdale (Baker and Lonsdale, 1974) described the drug release from a spherical matrix and expressed by the following equation:

$$\frac{3}{2}\left[1 - \left(1 - \frac{M_t}{M_\infty}\right)^{2/3}\right] \frac{M_t}{M_\infty} = K_t \quad (6)$$

This equation is used to linearize the release data from several formulations of microcapsules (Shukla and Price, 1991). The Taylor development of Baker-Lonsdale equation is outlined in the Supporting Information. Here, $M_t/M_\infty$ is the percentage of released SRB at time t and K is the release rate constant obtained from the slope of Baker-Lonsdale equation $\sqrt{k}/2$. Data obtained from the in vitro SRB release from various batches of liposomes were plotted as $[d (M_t/M_\infty)]/dt$ with respect to the root of time inverse (Bhanja and Pal, 1989; Seki et al., 1990).

**Weibull model**. The Weibull model (Weibull, 1951) is used for drug dissolution or release from pharmaceutical dosage forms and expressed by the empirical equation: $m = 1 - e^{-(t - T/a)^b}$. In our work, m is the percentage of released SRB at time t, T accounts for the lag time before the onset of the dissolution or release process and in most cases will be zero, "a" denotes a scale parameter and is estimated from the calibration curve at time t = 1 (Kalam et al., 2007) while b is the shape parameter and obtained from the slope of the curve and characterizes the curve as exponential (b = 1), sigmoid (b > 1) or parabolic (b < 1). This empirical equation described above is rearranged as follows: $m = 1 - e^{-(t/a)^b}$ and its logarithmic form can be expressed by the equation:

$$\log [-\ln (1-m)] = b \log t - \log a \quad (7)$$

According to Weibull model, the dependency between the shape parameter b and the release mechanism has been established by several authors (Costa and Sousa Lobo, 2001). Fickian diffusion was estimated with $b \leq 0.75$, Fickian diffusion is combined with case II transport (matrix relaxation) with $0.75 < b < 1$ and a complex release mechanism of the drug is estimated with b = 1 (Papadopoulou et al., 2006). The data obtained were plotted as log [-ln (1-m)] versus the log time.

**Korsmeyer-Peppas model**. The applicability of this model is restricted to the first 60% of drug release and expressed by the following equation:

$$M_t/M_\infty = Kt^n \quad (8)$$

Its logarithmic form could be written as $\log (M_t/M_\infty) = \log K + n \log t$.

Here, $M_t/M_\infty$ corresponds to the first 60% of SRB released at time t, k is the release constant and n is release exponent. Data obtained were plotted as the log of 60% of released SRB with respect to the log time. The diffusional exponent n is obtained from the slope of Korsmeyer-Peppas equation and is indicative of the mechanism of release of SRB and is dependent on the geometry of the release device. The release exponent $n \leq 0.43$ indicates a diffusion-controlled drug release so-called Fickian diffusion; $0.43 < n < 1$ indicates a non-Fickian diffusion so-called anomalous transport in which the drug release is controlled by diffusion and erosion mechanisms; n = 1 indicates a zero-order release when the drug release is independent of time (Jafari and Kaffashi, 2016).

### 2.8. EPR spectroscopy measurements

#### 2.8.1. Fluidity study

EPR spectra were carried out at various temperatures (293, 303, 313 and 323 K) on a Bruker 500E spectrometer at the X-band (9.4 GHz), equipped with Bruker $N_2$-temperature controller. The sample was introduced into a standard quartz EPR tube of 21 cm in length with an inner diameter of 3 mm and placed in EPR cavity for 2 min before the data acquisition to ensure thermal equilibration. EPR spectra were recorded using the following parameters: microwave power, 0.6–6.4 mW; modulation amplitude, 1 G; scan time, ~5 min; spectral resolution,

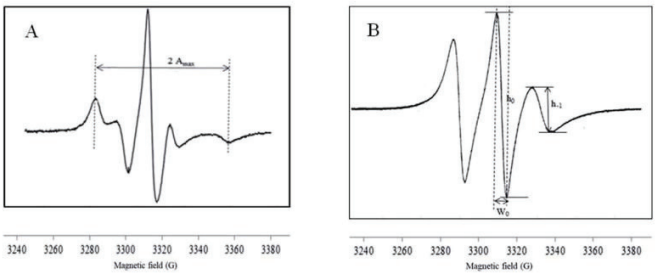



**Fig. 1.** EPR spectra of 5-DSA (A) and 16-DSA (B) labeled-DPPC liposomes.

2048 points; frequency modulation, 100 KHz.

The EPR spectrum of 5-DSA (Fig. 1A) exhibits anisotropic-low motion of the spin label. The fluidity of the membrane can be estimated from the outermost separation between the spectral extrema, the maximum hyperfine splitting ($2A_{max}$). The value of $2A_{max}$ reflects the motional profiles near the phospholipid polar head group of the lipid bilayer (Subongkot and Ngawhirunpat, 2015).

From 16-DSA spectrum (isotropic-fast motion) (Fig. 1B), the rotational correlation time ($\tau_c$) is the liposomal fluidity parameter used to determine the motional profiles at the phospholipid acyl chain near the lipophilic region of the phospholipid bilayer (Subongkot and Ngawhirunpat, 2015). $\tau_c$ is calculated according to the formula (Keith et al., 1970):

$$\tau_c = (6.5 \times 10^{-10}) W_0 [(h_0/h_{-1})^{0.5} - 1] \quad (9)$$

Where $W_0$ is the width of the central peak in Gauss (G), $h_0$ and $h_{-1}$ are the amplitude of the central and high field peaks respectively. The $2A_{max}$ and $\tau_c$ increased with a decrease in fluidity (Sarrasague et al., 2012). EPR measurements were performed in triplicate for each labeled-DPPC:CHOL formulation.

### 2.9. Statistics

To assess significant differences between values, statistical analysis was carried out using the Student's t-test and the one-way analysis of variance (ANOVA). A value of $P < .05$ was considered statistically significant.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Microscopy imaging of liposomes

TEM images showed a shape transition from irregular to nanosized unilamellar spherical vesicles following CHOL addition. Our findings are in agreement with a previous study proving that DPPC liposomes are subjected to shape fluctuation induced by CHOL addition (Brocca et al., 2004). The non-spherical shape was obtained for DPPC:CHOL formulations: 100:0 (Fig. 2A) and 100:2.5 (Fig. 2B). According to literature, the poor packing of lipid chains induces membrane defects (Raffy and Teissié, 1999) which in turn could be a reason for the irregular vesicle shape.

Beyond 2.5 mol% CHOL, liposomes were spherical, regular and homogenous in shape (Fig. 2C, D, E, F, G, H and I). According to literature, increasing CHOL content enhanced membrane stability (Nogueira et al., 2015) and this is associated with a decrease in membrane deformability due to an increase in lipid packing density (CHOL > 5%) (Choi et al., 2014).

### 3.2. Size and polydispersity index

The effect of CHOL addition on the mean size of DPPC liposomes and PdI values was investigated by DLS and results were outlined in Table 1.

Table 1 showed a gradual increase in the mean size of DPPC vesicles from 220 to 472 nm following CHOL addition (< 30 mol%). However, further CHOL addition (50 and 100%) had a limited effect on the mean vesicles size and the values were about 400 nm. Insertion of CHOL inside the membrane leads to the formation of CHOL-poor and CHOL-rich domains that could coalesce into larger vesicles (López-Pinto et al., 2005; Tseng et al., 2007). The formation of raft domains at high CHOL content (50 and 100% CHOL) (Javanainen et al., 2017; Waheed et al., 2012) may result in no additional increase of the vesicle size. This latter can be also due to the fact that all formulations underwent extrusion through polycarbonate membrane of 0.4 µm. The liposome preparations were also characterized for their homogeneity and the obtained PdI values were in the range 0.40–0.42 (Table 1) suggesting a monodispersed population of liposomes.

### 3.3. Release kinetics of SRB from liposomes

Most of the membrane permeability studies have been carried out using LUVs (Faure et al., 2006). They are prepared by reverse phase evaporation technique and their aqueous cavity allows a high encapsulation of hydrophilic fluorescent dyes (Ding et al., 2005; Khreich et al., 2008). SRB and calcein are mostly used as fluorescent probes to monitor liposomes permeability (Chen et al., 2012; Ding et al., 2005). In this work, permeability study of DPPC liposomes that differ by their cholesterol content was investigated by monitoring the release kinetics of SRB at 37 °C over 48 h.

Fig. 3 represents the release kinetics of SRB from various DPPC:CHOL batches. All the formulations containing CHOL% equal or below 30%, and DPPC:CHOL 100:75 showed a biphasic pattern, while a monophasic pattern was obtained for formulations loaded with DPPC:CHOL 100:50 and 100:100. The monophasic pattern was maintained during 28 days of incubation at 37 °C for the formulation DPPC:CHOL 100:100 (data not shown) allowing total release of SRB.

CHOL-free DPPC liposomes showed a release of SRB from the first hour of incubation and the percentage of released SRB was 6.84 ± 0.09%. Compared to this batch, liposomes incorporating 2.5% and 10% of CHOL showed also a release of SRB and the percentage of SRB release after 1 h was 7.9 ± 1.1% and 6.1 ± 0.65% respectively. After the same time, the percentage of released SRB did not exceed 5% for the other DPPC:CHOL formulations. After 4 h of incubation, the release of SRB was fast for the formulations 100:0 and 100:2.5 where the percentage of released SRB reached 26%. However, this percentage was 16.41 ± 1.01% for the batch prepared at a molar ratio DPPC:CHOL of 100:10 and lower than 10% for the other formulations.

After 10 h of incubation, the percentage of released SRB was above 45% for DPPC:CHOL formulations of 100:0, 100:2.5 and 100:10. However, it was of 17 and 14% for the batches 100:20 and 100:30 respectively and below 10% for the formulations 100:50 and 100:100. Chen et al. (2012) reported that about 43% of calcein release from

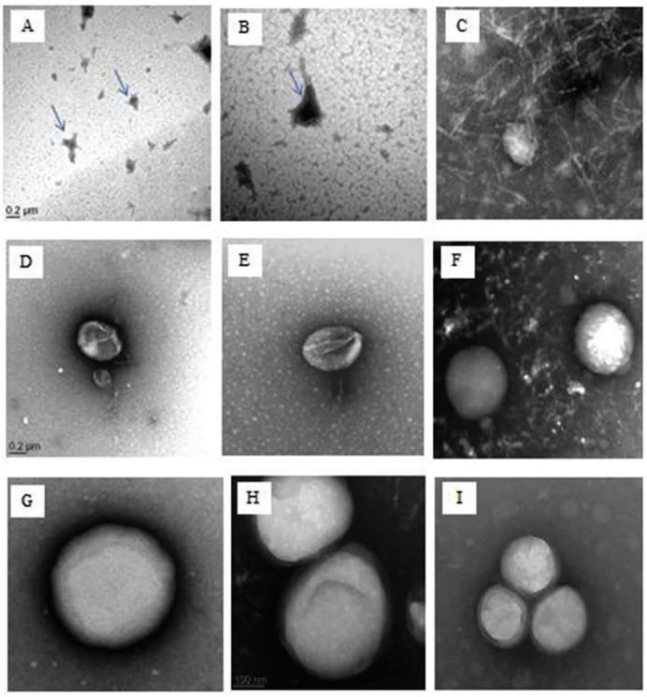



**Fig. 2.** TEM images of DPPC liposomes differing by their CHOL content: 0% (A), 2.5% (B), 5% (C), 10% (D), 20% (E), 25% (F), 30% (G), 50% (H) and 100% (I).

**Table 1**
Mean size values and polydispersity index for various DPPC:CHOL formulations.

| DPPC | CHOL | Size (nm) | PdI |
|---|---|---|---|
| 100 | 0 | 220 ± 3.72 | 0.42 ± 0.31 |
| 100 | 2.5 | 221 ± 3.25 | 0.41 ± 0.07 |
| 100 | 5 | 278 ± 3.56 | 0.42 ± 0.30 |
| 100 | 10 | 300 ± 2.39 | 0.40 ± 0.09 |
| 100 | 20 | 308 ± 1.80 | 0.40 ± 0.07 |
| 100 | 25 | 467 ± 1.56 | 0.40 ± 0.04 |
| 100 | 30 | 472 ± 0.54 | 0.41 ± 0.39 |
| 100 | 50 | 400 ± 0.59 | 0.40 ± 0.07 |
| 100 | 100 | 402 ± 0.26 | 0.40 ± 0.10 |

Values are expressed as the means of three repetitions ± SD.

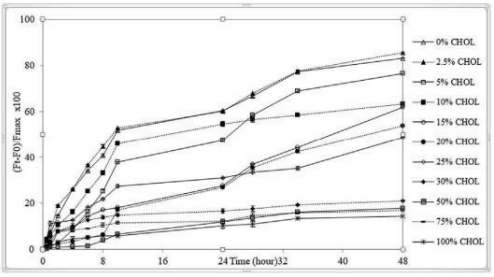



**Fig. 3.** The $(F_t\text{-}F_0)/F_{max} \times 100$ variation with time at 37 °C for DPPC:CHOL liposomes. Values are expressed as the mean of three independent release kinetics ± SD.

DPPC liposomes at 37 °C was obtained after 10 h of incubation (Chen et al., 2012). Similar results were obtained in our experiments since 45% of SRB were released after 10 h from CHOL-free DPPC liposomes.

After 48 h of incubation, the percentage of released SRB was higher than 80% for the formulations of 100:0 and 100:2.5, equals to 63, 53, 21%, for the formulations of 100:10, 100:20 and 100:30, and lower than 20% for the formulations of 100:50 and 100:100.

For formulations presenting a biphasic pattern of SRB release, the initial fast release could be due to SRB molecules adsorbed on the liposome surface, it is followed by a landing (between 10 and 24 h), then a re-increase of the SRB release. The second release phase may be attributed to the diffusion of SRB from the inner aqueous compartment to the extravesicular medium. It seems that a landing period is required to allow a hydrophilic compound to cross the membrane.

McConnell and Radhakrishnan proposed that when cholesterol is added to the phospholipid membrane, the complex cholesterol-phospholipid is formed and the area of the membrane decreases until an equivalence point of 33 mol% of cholesterol is reached (McConnell and Radhakrishnan, 2003). Beyond 33 mol% of cholesterol, a little additional change was reported. Our results proved that the release of SRB was drastically decreased with the increase of the cholesterol content in DPPC:CHOL formulations up to 30%. Several works reported that an increase in cholesterol content in DPPC:CHOL systems produced a decrease in cross-sectional area per molecule (Mills et al., 2008; Ohvo-Rekila, 2002; Saito and Shinoda, 2011). This is translated by the "condensing effect" or "ordering effect" of cholesterol leading to a more rigid structure of the membrane (Cournia et al., 2007; Decker et al., 2012; Simons and Vaz, 2004).

The mechanical rigidity of liposomes induced by the condensing effect of cholesterol and defined as the bending stiffness (Takechi-Haraya et al., 2016) has been demonstrated using several methods. It

was demonstrated that the bending stiffness increased as a function of cholesterol for saturated phosphatidylcholine chains (Arriaga et al., 2009; Decker et al., 2012). Consequently, the increase of membrane rigidity induced by cholesterol seems to be accompanied with the decrease of lipid bilayer permeability.

According to literature, the DPPC lipid bilayer exists in a solid-ordered form described as the gel phase $S_o$ at low temperature (below 30 °C). DPPC bilayers undergo a gel-liquid crystal transition at 41.2 °C (Tm) where the lipid chains melt into a disordered-liquid structure $L_d$ (Schubert et al., 2011; Tristram-Nagle and Nagle, 2004). Cholesterol affects the bilayer phase behavior (Feigenson, 2009; McMullen et al., 2004) and is considered as a key regulator of the membrane fluidity (Bagatolli and Sunil Kumar, 2009; Redondo-Morata et al., 2012; Xiang and Anderson, 1998). During the transition ($S_0$ to $L_d$ phase), CHOL addition (< 30 mol%) leads to a gradual decrease in fluidity (Franová, 2010; Zhang et al., 2015), and this is accompanied by a decrease of SRB release for formulations (5 < CHOL% < 30). Also, at low CHOL content (2.5%), the SRB release kinetics were similar as that of the control. At this fraction, CHOL didn't affect the bilayer permeability which is also accompanied with the lower effect of CHOL on the lipid transition temperature (Waheed et al., 2012).

Above 30 mol% of cholesterol and at temperature ranging between 283 and 323 K, the lipid chains are tightly packed (Ohvo-Rekila, 2002), the membrane lipids adopted a liquid-ordered $L_o$ phase (Aguilar et al., 2012; Saito and Shinoda, 2011) and cholesterol molecules arranged themselves in linear clusters (Zhang et al., 2015). Also, above CHOL 30%, minor changes of the liposome size, the bilayer thickness, and the average area per lipid molecule (Casciola et al., 2014; de Meyer and Smit, 2009) were observed and accompanied by a little variation of SRB release.

### 3.4. Mathematical modeling

To determine the effect of cholesterol on the constant release kinetics, quantitative analysis is done using the SRB release data. Several works applied mathematical models to evaluate the drug release mechanism from encapsulation systems (Shoaib et al., 2010). Mathematical modeling can serve to optimize the design of therapeutic device based on the drug release kinetics results (Aït-Oudhia et al., 2014; Briuglia et al., 2015; Fugit and Anderson, 2014). Zero-order, first-order, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Hixson-Crowell, Weibull and Baker-Lonsdale models are the commonly used models describing the mechanism of drug release (Barzegar-Jalali et al., 2008; Costa and Sousa Lobo, 2001; Javadzadeh et al., 2010). The model that best fitted the release data was evaluated by the highest correlation coefficient $R^2$ (Costa and Sousa Lobo, 2001; Kadivar et al., 2015). The SRB release data were analyzed by the various mathematical models; the release constants values ($K_1$ and $K_2$) were determined for two period ranges (from 0 to 10 h and from 10 to 48 h, respectively). $K_1$ and $K_2$ values were summarized in Tables 2 and 3 respectively. A representative graph of each CHOL molar ratio with Korsmeyer-Peppas model (first and second release phases) is presented in the Supporting Information (Fig. s1).

Whatever the mathematical model used, the SRB release constants showed a decrease with the increase of CHOL content in the liposomal membrane. $K_1$ values decreased from 5.05 to 0.60 (zero order model), from 0.070 to 0.006 (first order model), from 16.87 to 2.24 (Higuchi model), from 0.97 to 0.73 (Weibull model), 0.09 to 0.009 (Hixson-Crowell model) and from 0.04 to 0.03 (Baker-Lonsdale model). Also for $K_2$ values, the variation was from 0.88 to 0.22 (zero order model), from 0.029 to 0.002 (first order model), from 8.80 to 2.14 (Higuchi model), from 0.95 to 0.54 (Weibull model), from 0.03 to 0.003 (Hixson-Crowell model), and from 0.04 to 0.03 (Baker-Lonsdale model).

In the first phase (0–10 h), data kinetics were fitted into the Weibull model. Results suggest a non-Fickian diffusion for formulations (CHOL % 0, 2.5, 10, 15 and 50) as the "b" parameter values were between 0.75 and 1 (Table 2). Also, the "b" parameter of the formulations CHOL% of 30 and 100 were close to 0.75. This was in accordance with the results obtained by Korsmeyer-Peppas model as the "n" values were between 0.43 and 1 for the most formulations (Table 2).

For the second phase (from 10 to 48 h), the SRB release data suggested a Fickian diffusion mechanism for formulations (CHOL% 10, 30, 50, 75 and 100) as the "b" parameter values determined by Weibull model were below 0.75, which is concomitant with the obtained n values (< 0.43) from Korsmeyer-Peppas model (Table 3). Non-Fickian diffusion in the second phase was suggested for formulations CHOL% 0 and 2.5, and was confirmed by Korsmeyer-Peppas model while a zero order release mechanism seems to govern the SRB release from formulations CHOL% 5 and 15. Consequently, the period of incubation should be taken into consideration in release kinetics studies through lipid membranes.

### 3.5. Electron paramagnetic resonance study

EPR spectroscopy technique is used to monitor the molecular dynamics, mobility and conformational changes of the lipid bilayers (Sarrasague et al., 2012). In this work, changes in DPPC membrane fluidity following CHOL addition are monitored using 5- and 16-DSA as spin labels at the 5th and 16th carbon atom positions of the phospholipid acyl chain, respectively. The outer hyperfine splitting ($2A_{max}$) (Fig. 4A) and rotational correlation time ($\tau_c$) (Fig. 4B) were the EPR parameters obtained from 5-DSA and 16-DSA spectra, respectively at various temperatures (293, 303, 313 and 323 K).

Free-CHOL liposomes showed a decrease in the EPR parameters with temperature where the 2Amax values decreased from 63.19 ± 0.37 to 57.41 ± 0.47 G and $\tau_c$ values decreased from 2.27 ± 0.37 to 1.26 ± 0.13 ns when temperature varied from 293 to 323 K. It is well-documented that DPPC vesicles undergo a transition from gel to liquid-crystalline state at the main transition temperature (Tm ~ 314 K) (Altunayar et al., 2015; Redondo-Morata et al., 2012) and a fluid phase appears above $T_m$. Since the maximum hyperfine splitting and rotational correlation time are inversely related to the fluidity (Coderch et al., 2000), a decrease in the $2A_{max}$ and $\tau_c$ parameters are observed for all DPPC:CHOL formulations with the raise of temperature which is in agreement with other studies. Compared to CHOL-free DPPC liposomes, and based on 2Amax values, the membrane fluidity increased ($P < .05$) for formulations 10 and 30% CHOL at 293 K; 20% CHOL at 303 K; 10% CHOL at 313 K and 20% CHOL at 323 K while it decreased ($P < .05$) for formulations with 20% CHOL at 313 K, 30% CHOL at 313 and 323 k and 100% CHOL at all the studied temperatures. This means that cholesterol, at low or intermediate percentage, increased the fluidity of the upper region of the membrane while it decreased it at high cholesterol content.

Also, compared to CHOL-free DPPC liposomes, the lipid membrane fluidity estimated by $\tau_c$ parameter at the hydrophobic end showed a decrease for formulations of 20, 30 and 100% CHOL at 293 K; 30 and 100% CHOL at 303 k; 10, 20, 30 and 100% CHOL at 313 and 323 K. The fluidity of deeper region of the membrane seems to be more affected by the cholesterol presence whatever was the CHOL content mainly above 313 K. Compared to CHOL-free DPPC membrane, the molecular dynamics near the hydrophobic region were not affected in formulations with 10% CHOL at 293 and 303 K.

On the overall, the membrane fluidity was not affected by low CHOL content (10%) in the hydrophobic core (16-DSA spectrum) while it was decreased near phospholipid head groups and inside the deep hydrophobic region at intermediate (20 and 30%) and high (100%) CHOL content and this is in agreement with other studies (Nagimo et al., 1991; Zhao et al., 2007). CHOL is located inside the lipid bilayer and not only near the polar head groups of phospholipids above CHOL 10%.

**Table 2**
Release rate constants of SRB (in the first phase, K1) and correlation coefficient values obtained for different DPPC:CHOL formulations using various mathematical models.

| Liposome formulation DPPC:CHOL | Zero-order K ± SD $R^2$ ± SD | First-order K ± SD $R^2$ ± SD | Higuchi K ± SD $R^2$ ± SD | Korsmeyer-Peppas n ± SD $R^2$ ± SD | Weibull b ± SD $R^2$ ± SD | Hixson-Crowell K ± SD $R^2$ ± SD | Baker-Lonsdale K ± SD $R^2$ ± SD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 100:0 | 5.05 ± 0.00 | 0.070 ± 0.01 | 16.87 ± 0.00 | 0.87 ± 0.01 | 0.97 ± 0.00 | 0.97 ± 0.00 | 0.04 ± 0.00 |
| | 0.9874 ± 0.02 | 0.9937 ± 0.02 | 0.9632 ± 0.01 | 0.9944 ± 0.00 | 0.9940 ± 0.00 | 0.9972 ± 0.00 | 0.4069 ± 0.04 |
| 100:2.5 | 5.16 ± 0.00 | 0.072 ± 0.03 | 17.41 ± 0.00 | 0.81 ± 0.00 | 0.91 ± 0.00 | 0.10 ± 0.00 | 0.07 ± 0.01 |
| | 0.9779 ± 0.00 | 0.9941 ± 0.00 | 0.9726 ± 0.01 | 0.9847 ± 0.02 | 0.9728 ± 0.01 | 0.9910 ± 0.01 | 0.3467 ± 0.00 |
| 100:5 | 3.63 ± 0.01 | 0.043 ± 0.01 | 11.35 ± 0.00 | 1.23 ± 0.00 | 1.30 ± 0.00 | 0.06 ± 0.00 | 0.05 ± 0.00 |
| | 0.9603 ± 0.01 | 0.9340 ± 0.05 | 0.8147 ± 0.01 | 0.9768 ± 0.00 | 0.9728 ± 0.01 | 0.9437 ± 0.01 | 0.6102 ± 0.03 |
| 100:10 | 4.24 ± 0.01 | 0.053 ± 0.00 | 13.54 ± 0.01 | 0.78 ± 0.02 | 0.85 ± 0.00 | 0.07 ± 0.00 | 0.03 ± 0.00 |
| | 0.9893 ± 0.02 | 0.9710 ± 0.00 | 0.9148 ± 0.02 | 0.9821 ± 0.05 | 0.9723 ± 0.00 | 0.9791 ± 0.01 | 0.2254 ± 0.01 |
| 100:15 | 1.98 ± 0.02 | 0.021 ± 0.00 | 6.61 ± 0.0.03 | 1.19 ± 0.00 | 1.20 ± 0.04 | 0.032 ± 0.00 | 0.01 ± 0.00 |
| | 0.9428 ± 0.01 | 0.9517 ± 0.03 | 0.9451 ± 0.00 | 0.9201 ± 0.03 | 0.9247 ± 0.00 | 0.9489 ± 0.00 | 0.1635 ± 0.00 |
| 100:20 | 1.31 ± 0.00 | 0.014 ± 0.00 | 4.03 ± 0.00 | 0.76 ± 0.00 | 0.74 ± 0.00 | 0.021 ± 0.00 | 0.01 ± 0.00 |
| | 0.7979 ± 0.03 | 0.7786 ± 0.02 | 0.6623 ± 0.01 | 0.8756 ± 0.00 | 0.8673 ± 0.00 | 0.7851 ± 0.00 | 0.1004 ± 0.00 |
| 100:25 | 2.30 ± 0.00 | 0.025 ± 0.00 | 7.96 ± 0.00 | 0.56 ± 0.00 | 0.55 ± 0.00 | 0.037 ± 0.00 | 0.32 ± 0.00 |
| | 0.9101 ± 0.01 | 0.9255 ± 0.02 | 0.9434 ± 0.00 | 0.8693 ± 0.01 | 0.8772 ± 0.00 | 0.9207 ± 0.00 | 0.4636 ± 0.00 |
| 100:30 | 1.41 ± 0.03 | 0.013 ± 0.00 | 5.20 ± 0.00 | 0.77 ± 0.00 | 0.72 ± 0.03 | 0.024 ± 0.00 | 0.23 ± 0.01 |
| | 0.8835 ± 0.01 | 0.8949 ± 0.01 | 0.9659 ± 0.02 | 0.9306 ± 0.01 | 0.9346 ± 0.00 | 0.8913 ± 0.00 | 0.6832 ± 0.00 |
| 100:50 | 0.56 ± 0.00 | 0.005 ± 0.00 | 1.70 ± 0.00 | 0.96 ± 0.00 | 0.99 ± 0.00 | 0.008 ± 0.00 | 0.33 ± 0.00 |
| | 0.8680 ± 0.01 | 0.8631 ± 0.01 | 0.7195 ± 0.00 | 0.9066 ± 0.01 | 0.9053 ± 0.01 | 0.8649 ± 0.01 | 0.1005 ± 0.04 |
| 100:75 | 0.95 ± 0.00 | 0.010 ± 0.00 | 3.57 ± 0.00 | 0.44 ± 0.01 | 0.45 ± 0.03 | 0.015 ± 0.00 | 0.20 ± 0.01 |
| | 0.8103 ± 0.01 | 0.9371 ± 0.02 | 0.9547 ± 0.00 | 0.9347 ± 0.02 | 0.9364 ± 0.00 | 0.8186 ± 0.00 | 0.6228 ± 0.00 |
| 100:100 | 0.60 ± 0.01 | 0.006 ± 0.00 | 2.24 ± 0.00 | 0.79 ± 0.00 | 0.73 ± 0.00 | 0.009 ± 0.00 | 0.03 ± 0.00 |
| | 0.8566 ± 0.00 | 0.8604 ± 0.00 | 0.8624 ± 0.01 | 0.9244 ± 0.01 | 0.9253 ± 0.01 | 0.8592 ± 0.01 | 0.2536 ± 0.01 |

The emergence of the raft-like domains in membranes (Javanainen et al., 2017; Toppozini et al., 2014) at intermediate and high CHOL content may explain the decrease in membrane fluidity and consequently the permeability for SRB.

## 4. Conclusion

To sum up, in this work we focused on the understanding and modeling the bilayer permeability and fluidity of DPPC liposomes containing various CHOL percentages. Regular shapes of liposomes with a CHOL content higher than (2.5%) were obtained, and this was associated with a decrease in membrane deformability and a gradual decrease in the release of SRB. The SRB release data exhibited a biphasic pattern for all formulations except those of CHOL% 50 and 100. A non-Fickian diffusion mechanism governs the SRB release in the first release phase for all formulations, and in the second phase for formulations CHOL% 0 and 2.5. However, a Fickian diffusion mechanism controls the SRB release after 10 h of incubation for formulations containing a percentage of CHOL above 5. The results of this study could be considered in lipid membrane permeability studies as well as in the development of delivery systems based on liposomes.

## Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

**Table 3**
Release rate constants of SRB (in the second phase, K2) and correlation coefficient values obtained for different DPPC:CHOL formulations using various mathematical models.

| Liposome formulation DPPC:CHOL | Zero-order K ± SD $R^2$ ± SD | First-order K ± SD $R^2$ ± SD | Higuchi K ± SD $R^2$ ± SD | Korsmeyer-Peppas n ± SD $R^2$ ± SD | Weibull b ± SD $R^2$ ± SD | Hixson-Crowell K ± SD $R^2$ ± SD | Baker-Lonsdale K ± SD $R^2$ ± SD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 100:0 | 0.88 ± 0.01 | 0.029 ± 0.00 | 8.80 ± 0.00 | 0.31 ± 0.00 | 0.95 ± 0.00 | 0.031 ± 0.00 | 0.023 ± 0.00 |
| | 0.9430 ± 0.03 | 0.9358 ± 0.00 | 0.9293 ± 0.01 | 0.9136 ± 0.00 | 0.9496 ± 0.00 | 0.9411 ± 0.01 | 0.0105 ± 0.03 |
| 100:2.5 | 0.92 ± 0.01 | 0.032 ± 0.00 | 9.15 ± 0.00 | 0.31 ± 0.01 | 1.05 ± 0.01 | 0.033 ± 0.00 | 0.05 ± 0.00 |
| | 0.9478 ± 0.02 | 0.9342 ± 0.00 | 0.9224 ± 0.01 | 1.00 ± 0.00 | 0.9727 ± 0.04 | 0.9430 ± 0.00 | 0.036 ± 0.01 |
| 100:5 | 1.09 ± 0.01 | 0.027 ± 0.00 | 10.88 ± 0.03 | 0.26 ± 0.00 | 1.14 ± 0.00 | 0.031 ± 0.00 | 0.25 ± 0.00 |
| | 0.9355 ± 0.05 | 0.9388 ± 0.00 | 0.9248 ± 0.04 | 1.00 ± 0.00 | 0.9294 ± 0.00 | 0.9404 ± 0.01 | 0.3173 ± 0.01 |
| 100:10 | 0.45 ± 0.00 | 0.010 ± 0.00 | 4.62 ± 0.00 | 0.20 ± 0.00 | 0.34 ± 0.00 | 0.012 ± 0.00 | 0.23 ± 0.00 |
| | 0.9632 ± 0.02 | 0.9824 ± 0.01 | 0.9932 ± 0.03 | 0.9970 ± 0.01 | 0.9908 ± 0.01 | 0.9769 ± 0.00 | 0.5399 ± 0.01 |
| 100:15 | 1.18 ± 0.00 | 0.020 ± 0.00 | 11.62 ± 0.00 | 0.68 ± 0.02 | 1.52 ± 0.00 | 0.026 ± 0.00 | 0.22 ± 0.00 |
| | 0.9731 ± 0.01 | 0.9432 ± 0.00 | 0.9259 ± 0.00 | 0.9282 ± 0.01 | 0.9869 ± 0.01 | 0.9556 ± 0.00 | 0.4273 ± 0.01 |
| 100:20 | 1.00 ± 0.00 | 0.016 ± 0.00 | 9.96 ± 0.01 | 0.74 ± 0.01 | 1.25 ± 0.03 | 0.021 ± 0.00 | 0.28 ± 0.00 |
| | 0.9740 ± 0.04 | 0.9707 ± 0.05 | 0.9530 ± 0.00 | 0.9620 ± 0.03 | 0.9641 ± 0.05 | 0.9738 ± 0.00 | 0.4691 ± 0.03 |
| 100:25 | 0.52 ± 0.01 | 0.009 ± 0.02 | 5.26 ± 0.01 | 0.32 ± 0.00 | 0.80 ± 0.01 | 0.012 ± 0.00 | 0.30 ± 0.01 |
| | 0.8955 ± 0.01 | 0.8672 ± 0.02 | 0.8075 ± 0.02 | 0.7738 ± 0.01 | 0.9375 ± 0.00 | 0.8767 ± 0.01 | 0.4032 ± 0.00 |
| 100:30 | 0.17 ± 0.00 | 0.003 ± 0.00 | 1.65 ± 0.01 | 0.22 ± 0.01 | 0.40 ± 0.00 | 0.003 ± 0.00 | 0.32 ± 0.00 |
| | 0.9739 ± 0.02 | 0.9734 ± 0.00 | 0.9421 ± 0.03 | 0.9504 ± 0.00 | 0.9881 ± 0.01 | 0.9737 ± 0.01 | 0.3470 ± 0.01 |
| 100:50 | 0.30 ± 0.02 | 0.003 ± 0.00 | 1.70 ± 0.01 | 0.68 ± 0.01 | 0.50 ± 0.02 | 0.005 ± 0.00 | 0.40 ± 0.00 |
| | 0.8299 ± 0.01 | 0.8687 ± 0.03 | 0.8976 ± 0.02 | 0.9393 ± 0.00 | 0.6679 ± 0.03 | 0.8336 ± 0.01 | 0.1593 ± 0.02 |
| 100:75 | 0.15 ± 0.00 | 0.001 ± 0.00 | 1.52 ± 0.04 | 0.25 ± 0.00 | 0.45 ± 0.00 | 0.004 ± 0.00 | 0.21 ± 0.00 |
| | 0.8581 ± 0.05 | 0.8597 ± 0.06 | 0.8027 ± 0.01 | 0.8040 ± 0.00 | 0.8084 ± 0.01 | 0.8590 ± 0.01 | 0.1562 ± 0.01 |
| 100:100 | 0.22 ± 0.00 | 0.002 ± 0.03 | 2.14 ± 0.01 | 0.58 ± 0.02 | 0.54 ± 0.02 | 0.003 ± 0.01 | 0.03 ± 0.00 |
| | 0.9122 ± 0.04 | 0.9159 ± 0.13 | 0.9565 ± 0.02 | 0.9742 ± 0.00 | 0.8761 ± 0.00 | 0.9147 ± 0.00 | 0.1029 ± 0.01 |

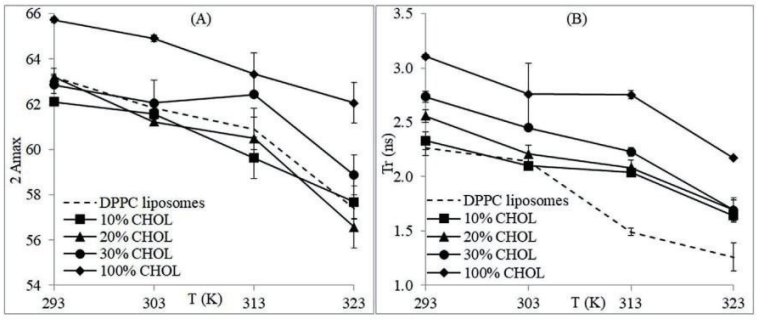



**Fig. 4.** Effect of temperature and CHOL content on EPR parameters: maximum hyperfine splitting (A) and rotational correlation time (B).


## Acknowledgments

Authors thank the Agence Universitaire de la Francophonie (PCSI 2015–2017).


## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.017.

## Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.017.

## References


Aguilar, L.F., Pino, J. a., Soto-Arriaza, M. a., Cuevas, F.J., Sánchez, S., Sotomayor, C.P., 2012. Differential dynamic and structural behavior of lipid-cholesterol domains in model membranes. PLoS One 7 (6). http://doi.org/10.1371/journal.pone.0040254.

Ait-Oudhia, S., Mager, D.E., Straubinger, R.M., 2014. Application of pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis to the development of liposomal formulations for oncology. Pharmaceutics 6 (1), 137–174. http://doi.org/10.3390/pharmaceutics6010137.

Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S.W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Nejati-Koshki, K., 2013. Liposome: classification, preparation, and applications. Nanoscale Research Letters 8 Nanoscale Research Letters. Retrieved from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23432972%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3599573.

Altunayar, C., Sahin, I., Kazanci, N., 2015. A comparative study of the effects of cholesterol and desmosterol on zwitterionic DPPC model membranes. Chem. Phys. Lipids 188, 37–45. http://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2015.03.006.

Arriaga, L.R., López-Montero, I., Monroy, F., Orts-Gil, G., Farago, B., Hellweg, T., 2009. Stiffening effect of cholesterol on disordered lipid phases: a combined neutron spin echo + dynamic light scattering analysis of the bending elasticity of large unilamellar vesicles. Biophys. J. 96 (9), 3629–3637. http://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.01.045.

Bagatolli, L., Sunil Kumar, P.B., 2009. Phase behavior of multicomponent membranes: experimental and computational techniques. Soft Matter 5 (17), 3234–3248. http://doi.org/10.1039/B901866B.

Baker, R.W., Lonsdale, H.S., 1974. Controlled Release of Biologically Active Agents.

Barzegar-Jalali, M., Adibkia, K., Valizadeh, H., Shadbad, M.R.S., Nokhodchi, A., Omidi, Y., Shadbad, S., 2008. Kinetic analysis of drug release from nanoparticles. J. Pharm. Pharmaceut. Sci.: A Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe Canadienne Des Sciences Pharmaceutiques 11 (1), 167–177.

Bhanja, R.S., Pal, T.K., 1989. In-vitro diffusion kinetics of salbutamol sulphate from microcapsules coated with Eudragit RS 100. Boll. Chim. Farm. 128 (9), 281–283. Retrieved from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2635613.

Boyapally, H., Nukala, R.K., Bhujbal, P., Douroumis, D., 2010. Controlled release from directly compressible theophylline buccal tablets. Coll. Surf. B Biointerf. 77 (2), 227–233. http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.01.031.

Bretscher, M., 1973. Membrane structure: some general principles. Science 181 (4100), 622–629. http://doi.org/10.1126/science.181.4100.622.

Briuglia, M.L., Rotella, C., McFarlane, A., Lamprou, D.A., 2015. Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. Drug Delivery and Translational Research 5 (3), 231–242. http://doi.org/10.1007/s13346-015-0220-8.

Brocca, P., Cantù, L., Corti, M., Del Favero, E., Motta, S., 2004. Shape fluctuations of large unilamellar lipid vesicles observed by laser light scattering: influence of the small-scale structure. Langmuir 20 (6), 2141–2148. http://doi.org/10.1021/la035374v.

Bulbake, U., Doppalapudi, S., Kommineni, N., Khan, W., 2017. Liposomal formulations in clinical use: an updated review. Pharmaceutics 9 (2), 12. http://doi.org/10.3390/pharmaceutics9020012.

Casciola, M., Bonhenry, D., Liberti, M., Apollonio, F., Tarek, M., 2014. A molecular dynamic study of cholesterol rich lipid membranes: comparison of electroporation protocols. Bioelectrochemistry 100, 11–17. http://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2014.03.009.

Chen, K.H., Mueannoom, W., Gaisford, S., Kett, V., 2012. Investigation into the effect of varying l-leucine concentration on the product characteristics of spray-dried liposome powders. J. Pharm. Pharmacol. 64 (10), 1412–1424. http://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2012.01521.x.

Choi, Y., Attwood, S.J., Hoopes, M.I., Drolle, E., Karttunen, M., Leonenko, Z., 2014. Melatonin directly interacts with cholesterol and alleviates cholesterol effects in dipalmitoylphosphatidylcholine monolayers. Soft Matter 10 (1), 206–213. http://doi.org/10.1039/C3SM52064A.

Coderch, L., Fonollosa, J., De Pera, M., Estelrich, J., De La Maza, A., Parra, J.L., 2000. Influence of cholesterol on liposome fluidity by EPR. Relationship with percutaneous absorption. J. Contr. Release 68 (1), 85–95. http://doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00240-6.

Costa, P., Sousa Lobo, J.M., 2001. Modeling and comparison of dissolution profiles. Eur. J. Pharmaceut. Sci. 13 (2), 123–133. http://doi.org/10.1016/S0928-0987(01)00095-1.

Cournia, Z., Ullmann, G.M., Smith, J.C., 2007. Differential effects of cholesterol, ergosterol and lanosterol on a dipalmitoyl phosphatidylcholine Membrane:? A molecular dynamics simulation study. J. Phys. Chem. B 111 (7), 1786–1801. http://doi.org/10.1021/jp065172i.

de Meyer, F., Smit, B., 2009. Effect of cholesterol on the structure of a phospholipid bilayer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106 (10), 3654–3658. http://doi.org/10.1073/pnas.0809959106.

Decker, C., Fahr, A., Kuntsche, J., May, S., 2012. Selective partitioning of cholesterol and a model drug into liposomes of varying size. Chem. Phys. Lipids 165 (5), 520–529. http://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2012.04.001.

Ding, W.X., Qi, X.R., Li, P., Maitani, Y., Nagai, T., 2005. Cholesteryl hemisuccinate as a membrane stabilizer in dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes containing saikosaponin-d. Int. J. Pharm. 300 (1–2), 38–47. http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.05.005.

Eeman, M., Deleu, M., 2010. From biological membranes to biomimetic model membranes. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 14 (4), 719–736. Retrieved from: http://popups.ulg.ac.be/Base/document.php?id=6568.

Faure, C., Nallet, F., Roux, D., Milner, S.T., Gauffre, F., Olea, D., Lambert, O., 2006. Modeling leakage kinetics from multilamellar vesicles for membrane permeability determination: application to glucose. Biophys. J. 91 (12), 4340–4349. http://doi.org/10.1529/biophysj.106.088401.

Franová, J., 2010. Effects of DPH on DPPC−Cholesterol membranes with varying concentrations of cholesterol: from local perturbations to limitations in fluorescence anisotropy experiments. J. Phys. Chem. B 114 (8), 2704–2711. http://doi.org/10.1021/jp908533x.

Feigenson, G.W., 2009. Phase diagrams and lipid domains in multicomponent lipid bilayer mixtures. Biochim. Biophys. Acta Biomembr. 1788 (1), 47–52. http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.08.014.

Fugit, K.D., Anderson, B.D., 2014. Dynamic, nonsink method for the simultaneous determination of drug permeability and binding coefficients in liposomes. Mol. Pharm. 11 (4), 1314–1325. http://doi.org/10.1021/mp400765n.

Gibaldi, M., Feldman, S., 1967. Establishment of sink conditions in dissolution rate determinations. Theoretical considerations and application to nondisintegrating dosage forms. J. Pharmaceut. Sci. 56 (10), 1238–1242. http://doi.org/10.1002/jps.2600561005.

Gmajner, D., Ulrih, N.P., 2011. Thermotropic phase behaviour of mixed liposomes of archaeal diether and conventional diester lipids. J. Therm. Anal. Calorim. 106 (1), 255–260. http://doi.org/10.1007/s10973-011-1596-4.

Gracià, R.S., Bezlyepkina, N., Knorr, R.L., Lipowsky, R., Dimova, R., 2010. Effect of cholesterol on the rigidity of saturated and unsaturated membranes: fluctuation and electrodeformation analysis of giant vesicles. Soft Matter 6 (7), 1472. http://doi.org/10.1039/b920629a.




®
®

Hadjiioannou, T.P., Christian, G.D., Koupparis, M.A., Macheras, P.E., 1993. Quantitative Calculations in Pharmaceutical Practice and Research.
Haeri, A., Alinaghian, B., Daeihamed, M., Dadashzadeh, S., 2014. Preparation and characterization of stable nanoliposomal formulation of fluoxetine as a potential adjuvant therapy for drug-resistant tumors. Iran. J. Pharm. Res. (IJPR) 13 (Suppl. L), 3–14.
Higuchi, T., 1961. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. J. Pharmaceut. Sci. 50, 874–875. Retrieved from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13907269.
Higuchi, T., 1963. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. J. Pharmaceut. Sci. 52 (12), 1145–1149. http://doi.org/10.1002/jps.2600521210.
Hixson, A.W., Crowell, J.H., 1931. Dependence of reaction velocity upon surface and agitation. Ind. Eng. Chem. 23 (8), 923–931. http://doi.org/10.1021/ie50260a018.
Jafari, M., Kaffashi, B., 2016. Mathematical kinetic modeling on isoniazid release from dex-HEMA-PNIPAAM nanogels. Nanomed Res J 1 (2), 90–96. http://doi.org/10.7508/nmrj.2016.02.005.
Javadzadeh, Y., Ahadi, F., Davaran, S., Mohammadi, G., Sabzevari, A., Adibkia, K., 2010. Preparation and physicochemical characterization of naproxen-PLGA nanoparticles. Colloids Surfaces B Biointerfaces 81 (2), 498–502. http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.07.047.
Javanainen, M., Martinez-Seara, H., Vattulainen, I., 2017. Nanoscale membrane domain formation driven by cholesterol. Sci. Rep. 7 (1), 1143. http://doi.org/10.1038/s41598-017-01247-9.
Kadivar, A., Kamalidehghan, B., Javar, H.A., Davoudi, E.T., Zaharuddin, N.D., Sabeti, B., Noordin, M.I., et al., 2015. Formulation and in vitro, in vivo evaluation of effervescent floating sustained-release imatinib mesylate tablet. PLoS One 10 (6), 1–23. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0126874.
Kalam, M., Humayun, M., Parvez, N., Yadav, S., 2007. Release kinetics of modified pharmaceutical dosage forms: a review. Cont. J. Pharmceutical Sci. 1 (January), 30–35. Retrieved from: http://www.wiloludjournal.com/pdf/pharmsci/2007/30-35.pdf.
Keith, A., Bulfield, G., Snipes, W., 1970. Spin-labeled neurospora mitochondria. Biophys. J. 10 (7), 618–629. http://doi.org/10.1016/S0006-3495(70)86324-X.
Khreich, N., Lamourette, P., Boutal, H., Devilliers, K., Créminon, C., Volland, H., 2008. Detection of Staphylococcus enterotoxin B using fluorescent immunoliposomes as label for immunochromatographic testing. Anal. Biochem. 377 (2), 182–188. http://doi.org/10.1016/j.ab.2008.02.032.
López-Pinto, J.M., González-Rodríguez, M.L., Rabasco, A.M., 2005. Effect of cholesterol and ethanol on dermal delivery from DPPC liposomes. Int. J. Pharm. 298 (1), 1–12. http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.02.021.
Magarkar, A., Dhawan, V., Kallinteri, P., Viitala, T., Elmowafy, M., Róg, T., Bunker, A., 2014. Cholesterol level affects surface charge of lipid membranes in saline solution. Sci. Rep. 4, 5005. http://doi.org/10.1038/srep05005.
Masarudin, M.J., Cutts, S.M., Evison, B.J., Phillips, D.R., Pigram, P.J., 2015. Factors determining the stability, size distribution, and cellular accumulation of small, monodisperse chitosan nanoparticles as candidate vectors for anticancer drug delivery: application to the passive encapsulation of [14C]-doxorubicin. Nanotechnol. Sci. Appl. 8, 67–80. http://doi.org/10.2147/NSA.S91785.
McConnell, H.M., Radhakrishnan, A., 2003. Condensed complexes of cholesterol and phospholipids. Biochim. Biophys. Acta Biomembr. 1610 (2), 159–173. http://doi.org/10.1016/S0005-2736(03)00015-4.
McMullen, T.P.W., Lewis, R.N.A.H., McElhaney, R.N., 2004. Cholesterol-phospholipid interactions, the liquid-ordered phase and lipid rafts in model and biological membranes. Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 8 (6), 459–468. http://doi.org/10.1016/j.cocis.2004.01.007.
Miao, Z.L., Deng, Y.J., Du, H.Y., Suo, Bin, X., Wang, X.Y., Wang, X., Duan, N., 2015. Preparation of a liposomal delivery system and its in vitro release of rapamycin. Experimental and Therapeutic Medicine 9 (3), 941–946. http://doi.org/10.3892/etm.2015.2201.
Mills, T.T., Toombes, G.E.S., Tristram-Nagle, S., Smilgies, D., Feigenson, G.W., Nagle, J.F., 2008. Order parameters and areas in fluid-phase oriented lipid membranes using wide angle x-ray scattering. Biophys. J. 95 (2), 669–681. http://doi.org/10.1529/biophysj.107.127845.
Nagimo, A., Sato, Y., Suzuki, Y., 1991. Electron spin resonance studies of phosphatidylcholine interacted with cholesterol and with a hopanoid in liposomal membrane. Chem. Pharmaceut. Bull. 39 (11), 3071–3074. http://doi.org/10.1248/cpb.39.3071.
Najafinobar, N., Mellander, L.J., Kurczy, M.E., Dunevall, J., Angerer, T.B., Fletcher, J.S., Cans, A.-S., 2016. Cholesterol alters the dynamics of release in protein independent cell models for exocytosis. Sci. Rep. 6 (1), 33702. http://doi.org/10.1038/srep33702.
Nogueira, E., Gomes, A.C., Preto, A., Cavaco-Paulo, A., 2015. Design of liposomal formulations for cell targeting. Colloids Surfaces B Biointerfaces 136, 514–526. http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.09.034.
Ohvo-Rekila, H., 2002. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. Prog. Lipid Res. 41 (1), 66–97. http://doi.org/10.1016/S0163-7827(01)00020-0.
Papadopoulou, V., Kosmidis, K., Vlachou, M., Macheras, P., 2006. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. Int. J. Pharm. 309 (1–2), 44–50. http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.10.044.
Patil, Y.P., Jadhav, S., 2015. Preparation of liposomes for drug delivery applications by extrusion of giant unilamellar vesicles. In: Nanoscale and Microscale Phenomena, pp. 17–29. http://doi.org/10.1007/978-81-322-2289-7_2.
Peetla, C., Vijayaraghavalu, S., Labhasetwar, V., 2013. Biophysics of cell membrane lipids in cancer drug resistance: implications for drug transport and drug delivery with nanoparticles. Adv. Drug Deliv. Rev. 65 (13–14), 1686–1698. http://doi.org/10.1016/j.addr.2013.09.004.
Raffy, S., Teissié, J., 1999. Control of lipid membrane stability by cholesterol content. Biophys. J. 76 (4), 2072–2080. http://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77363-7.
Redondo-Morata, L., Giannotti, M.I., Sanz, F., 2012. Influence of cholesterol on the phase transition of lipid bilayers: a temperature-controlled force spectroscopy study. Langmuir 28 (35), 12851–12860. http://doi.org/10.1021/la302620t.
Saito, H., Shinoda, W., 2011. Cholesterol effect on water permeability through DPPC and PSM lipid bilayers: a molecular dynamics study. J. Phys. Chem. B 115 (51), 15241–15250. http://doi.org/10.1021/jp201611p.
Sarrasague, M., Cimato, A., Rubin de Celis, E., Facorro, G., 2012. Effect of serum proteins on an exogenous pulmonary surfactant: ESR analysis of structural changes and their relation with surfactant activity. Respir. Physiol. Neurobiol. 183 (1), 48–57. http://doi.org/10.1016/j.resp.2012.05.023.
Schubert, T., Schneck, E., Tanaka, M., 2011. First order melting transitions of highly ordered dipalmitoyl phosphatidylcholine gel phase membranes in molecular dynamics simulations with atomistic detail. J. Chem. Phys. 135 (5), 1–11. http://doi.org/10.1063/1.3615937.
Seki, T., Kawaguchi, T., Endoh, H., Ishikawa, K., Juni, K., Nakano, M., 1990. Controlled release of 3′,5′-diester prodrugs of 5-Fluoro-2′-deoxyuridine from poly-l-lactic acid microspheres. J. Pharmaceut. Sci. 79 (11), 985–987. http://doi.org/10.1002/jps.2600791108.
Sercombe, L., Veerati, T., Moheimani, F., Wu, S.Y., Sood, A.K., Hua, S., 2015. Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. Front. Pharmacol. 6 (DEC), 1–13. http://doi.org/10.3389/fphar.2015.00286.
Shoaib, M.H., Al, S., Siddiqi, S., Yousuf, R.I., Zaheer, K., Hanif, M., Jabeen, S., 2010. Development and evaluation of hydrophilic colloid matrix of famotidine tablets. AAPS PharmSciTech 11 (2), 708–718. http://doi.org/10.1208/s12249-010-9427-7.
Shukla, A.J., Price, J.C., 1991. Effect of drug loading and molecular weight of cellulose acetate propionate on the release characteristics of theophylline microspheres. Pharmaceut. Res. 8 (11), 1396–1400. http://doi.org/10.1023/A:1015801207091.
Simons, K., Sampaio, J.L., 2011. Membrane organization and lipid rafts. Perspect Biol 3 (10), a004697. http://doi.org/10.1101/cshperspect.a004697.
Simons, K., Vaz, W.L.C., 2004. Model systems, lipid rafts, and cell membranes. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 33, 269–295. http://doi.org/10.1146/annurev.biophys.32.110601.141803.
Subongkot, T., Ngawhirunpat, T., 2015. Effect of liposomal fluidity on skin permeation of sodium fluorescein entrapped in liposomes. Int. J. Nanomed. 10, 4581–4592. http://doi.org/10.2147/IJN.S86624.
Tabandeh, H., Mortazavi, S.A., 2013. An investigation into some effective factors on encapsulation efficiency of alpha-tocopherol in MLVs and the release profile from the corresponding liposomal gel. Iran. J. Pharm. Res. (IJPR) 12 (Suppl. L), 19–28.
Takechi-Haraya, Y., Sakai-Kato, K., Abe, Y., Kawanishi, T., Okuda, H., Goda, Y., 2016. Atomic force microscopic analysis of the effect of lipid composition on liposome membrane rigidity. Langmuir 32 (24), 6074–6082. http://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b00741.
Toppozini, L., Meinhardt, S., Armstrong, C.L., Yamani, Z., Kucerka, N., Schmid, F., Rheinstadter, M.C., 2014. Structure of cholesterol in lipid rafts. Phys. Rev. Lett. 113 (22), 1–5. http://doi.org/10.1103/PhysRevLett.113.228101.
Tristram-Nagle, S., Nagle, J.F., 2004. Lipid bilayers: thermodynamics, structure, fluctuations, and interactions. Chem. Phys. Lipids 127 (1), 3–14. http://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2003.09.002.
Tseng, L.P., Liang, H.J., Chung, T.W., Huang, Y.Y., Liu, D.Z., 2007. Liposomes incorporated with cholesterol for drug release triggered by magnetic field. J. Med. Biol. Eng. 27 (1), 29–34.
Wagner, J.G., 1969. Interpretation of percent dissolved-time plots derived from in vitro testing of conventional tablets and capsules. J. Pharmaceut. Sci. 58 (10), 1253–1257. http://doi.org/10.1002/jps.2600581021.
Waheed, Q., Tjörnhammar, R., Edholm, O., 2012. Phase transitions in coarse-grained lipid bilayers containing cholesterol by molecular dynamics simulations. Biophys. J. 103 (10), 2125–2133. http://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.10.014.
Weibull, W., 1951. A statistical distribution function of wide applicability. J. Appl. Mech. 18, 293–297.
Wu, C.H., Bialecka-Fornal, M., Newman, D.K., 2015. Methylation at the C-2 position of hopanoids increases rigidity in native bacterial membranes. eLife 4 (4), 1–18. http://doi.org/10.7554/eLife.05663.
Xiang, T.X., Anderson, B.D., 1998. Influence of chain ordering on the selectivity of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes for permeant size and shape. Biophys. J. 75 (6), 2658–2671. http://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77711-2.
Yang, J., Bahreman, A., Daudey, G., Bussmann, J., Olsthoorn, R.C.L., Kros, A., 2016. Drug delivery via cell membrane fusion using lipopeptide modified liposomes. ACS Cent. Sci. 2 (9), 621–630. http://doi.org/10.1021/acscentsci.6b00172.
Zaske, A., Danila, D., Queen, M.C., Golunski, E., Conyers, J.L., 2013. Biological Atomic Force Microscopy for Imaging Gold-labeled Liposomes on Human Coronary Artery Endothelial Cells, 2013.
Zhang, Y., Lervik, A., Seddon, J., Bresme, F., 2015. A coarse-grained molecular dynamics investigation of the phase behavior of DPPC/cholesterol mixtures. Chem. Phys. Lipids 185, 88–98. http://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2014.07.011.
Zhao, L., Feng, S.S., Kocherginsky, N., Kostetski, I., 2007. DSC and EPR investigations on effects of cholesterol component on molecular interactions between paclitaxel and phospholipid within lipid bilayer membrane. Int. J. Pharm. 338 (1–2), 258–266. http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.01.045.

Supplementary data – Article 1

The Taylor development of Baker-Lonsdale equation (eq 6)

$$\frac{3}{2}\left[1-\left(1-\frac{Mt}{M\infty}\right)^{2/3}\right]\frac{Mt}{M\infty}=Kt$$

$$\frac{3}{2}\frac{d}{dt}\left(\frac{Mt}{M\infty}\right)-\frac{3}{2}\left(1-\frac{Mt}{M\infty}\right)^{2/3}\frac{d}{dt}\left(\frac{Mt}{M\infty}\right)+\left(1-\frac{Mt}{M\infty}\right)^{-1/3}\frac{Mt}{M\infty}\frac{d}{dt}\left(\frac{Mt}{M\infty}\right)$$

$$\frac{d}{dt}\left(\frac{Mt}{M\infty}\right)\left[\frac{3}{2}-\frac{3}{2}\left(1-\frac{Mt}{M\infty}\right)^{2/3}+\left(1-\frac{Mt}{M\infty}\right)^{-1/3}\frac{Mt}{M\infty}\right]=k$$

$$\frac{d}{dt}\left(\frac{Mt}{M\infty}\right)\left[\frac{3}{2}-\frac{3}{2}\left(1-\frac{2}{3}\frac{Mt}{M\infty}\right)+\left(1+\frac{Mt}{M\infty}\right)\frac{Mt}{M\infty}\right]=k$$

$$\frac{d}{dt}\left(\frac{Mt}{M\infty}\right)\left[\frac{Mt}{M\infty}+\frac{Mt}{M\infty}+\left(\frac{Mt}{M\infty}\right)^2\right]=k$$

$$\frac{3}{2}\left[1-\left(1-\frac{3}{2}\frac{Mt}{M\infty}\right)\right]\frac{Mt}{M\infty}=kt$$

$$\left(\frac{Mt}{M\infty}\right)^2=kt \longrightarrow \frac{Mt}{M\infty}=\sqrt{k}\sqrt{t}$$

$$\frac{d}{dt}\left(\frac{Mt}{M\infty}\right)\left(2\frac{Mt}{M\infty}\right)=\sqrt{k}\sqrt{t}$$

$$\frac{d}{dt}\left(\frac{Mt}{M\infty}\right)\left(2\sqrt{k}\sqrt{t}\right)=k$$

$$\frac{d}{dt}\left(\frac{Mt}{M\infty}\right)=\sqrt{k}/2.1/\sqrt{t}$$

# Article 2

**Corticoids modulate liposome membrane fluidity and permeability depending on membrane composition and experimental protocol design**

**Samar Kaddah[a,b], Nathalie Khreich[a], Fouad Kaddah[c], Lhoussain Khrouz[d], Catherine Charcosset[b], Hélène Greige-Gerges[a,*]**

[a]Bioactive Molecules Research Laboratory, Faculty of Sciences, Lebanese University, Lebanon

[b]Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (LAGEP), Université Claude Bernard, Lyon 1, France

[c]École Supérieure d'ingénieurs de Beyrouth, Université Saint Joseph, Beyrouth, Mar Roukoz-Dekwaneh, Lebanon

[d]Laboratoire de Chimie, École Normale Supérieure de Lyon, Université Claude Bernard, Lyon 1, France

*Corresponding author: greigegeorges@yahoo.com; hgreige@ul.edu.lb

**Soumis**

**ABSTRACT**

Given that literature data may give inconsistent results on the effect of a drug on lipid membrane properties, this work aims to investigate the impact of the liposome composition and experimental protocol design on glucocorticoids (GRs: cortisol, cortisone, fludrocortisone acetate, methylprednisolone, prednisolone and prednisone)-modulating membrane fluidity and permeability. GRs-loaded liposomes consisting of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and cholesterol (CHOL) were prepared by reverse phase evaporation technique (REV) at DPPC:CHOL:GR molar ratios of 100:100:2.5, and 100:100:10. The formulations were characterized for their size and homogeneity, encapsulation efficiency and loading rates of GRs, incorporation rates and loading rates of DPPC and CHOL. Changes in DPPC membrane fluidity (CHOL% 0, 10, 20, 30 and 100) after exposure to methylprednisolone were monitored by using 5- and 16-doxyl stearic acids (DSA) as spin probes. For permeability studies, the above-mentioned GRs-loaded liposomes and the preformed liposomes exposed to GRs (2.5 mol%) were compared for the leakage of an encapsulated fluorescent dye, sulforhodamine B (SRB), at 37˚C in buffer (pH 7.5) containing NaCl. The SRB release kinetics were analyzed by the Higuchi model for two release phases (from 0 to 10h, and from 10 to 48 h). All formulations exhibited a monodispersed size distribution of liposomes with a mean particle value close to 0.4 μm, also the DPPC and CHOL were highly incorporated (> 95%). High loading rate values of DPPC (> 78%) and CHOL (> 95%) were also obtained. Except for fludrocortisone acetate (51%) and prednisolone (77%), high loading rate values of GRs were obtained (> 81%). Fluidity and permeability studies showed that the GR concentration, CHOL content, experimental protocol design including the period of incubation represent critical parameters to be considered in analyzing the effect of drugs on the membrane properties.

**Keywords: cholesterol, corticoids, fluidity, Higuchi, liposome, permeability.**

## 1. Introduction

Glucocorticoids (GRs) are widely used to treat several diseases [1,2]. Beyond their well-known genomic action, corticoids may affect cell function via non-genomic mechanism [3–5].

The current literature on the non-genomic action of corticoids is focused on their ability to influence membrane properties. Previous studies have demonstrated that corticoids may alter the function of membrane-associated proteins [6], membrane fluidity [7,8] and $Ca^{2+}$-ATPase activity [9].

GRs present a tetracyclic skeleton with 21 carbon atoms. They are involved in carbohydrate, fat and protein metabolism [10], and widely used to treat several diseases associated with inflammation such as asthma, dermatologic, ophthalmologic and hematologic disorders, rheumatoid arthritis, and cancer [11,12]. Also, they are used as adjunctive therapy for autoimmune diseases [13,14].

Cortisol (Fig. 1A) is produced by the adrenal cortex where more than 90% circulates in the blood bound to cortisol-binding globulin and albumin. The unbound form is the physiologically active form [15]. Cortisone (Fig. 1B) and prednisone (Fig. 1C) are 11-keto compounds and lack GR activity until they are converted to 11-β-hydroxyl-compounds: cortisol and prednisolone (Fig. 1D) [16], respectively. The introduction of a double bond between C1 and C2 as in prednisolone and prednisone increased their anti-inflammatory potency of about 5-fold [17] with reduced salt retaining activity. Methylprednisolone (MP) (Fig. 1E), which is derived from cortisol with a methyl group at the C6 on the ring B, is 1.25 times more potent as an anti-inflammatory agent than prednisolone with a low tendency to induce sodium and water retention compared to cortisol [18].

Fludrocortisone administered as fludrocortisone acetate (FA) (Fig. 1F) is 12- and 10-fold more potent than cortisol for mineralocorticoid and glucocorticoid effects respectively. The fluorination of cortisol at C9 position enhances both glucocorticoid and mineralocorticoid activities [19].

However, few studies have explored the effect of GRs on the phospholipid membrane properties, especially on the liposome permeability.

The effect of cholesterol on the structural and dynamic properties of synthetic and natural membranes was widely discussed in literature. It is well-known as a modulator of rigidity [20,21], thickness [22], fluidity [23,24] and stability of membranes [25], and affects the encapsulation efficiency of drugs in liposomes [26,27]. GRs have structural similarities with cholesterol making them potential regulators of membrane physical properties [28].

Liposomes are spherical vesicles able to encapsulate hydrophilic drugs within their aqueous compartment and lipophilic drugs within the lipid bilayer [29]. Recently, we have studied GR effects on the CHOL-free DPPC membrane fluidity using liposomes as model membranes [8]. Here we are investigating the effect of corticoids on the lipid membrane permeability in parallel with the impact of CHOL content on corticoid-modulating membrane permeability. Calcein [30,31], SRB [32] and carboxyfluorescein [33,34] were the most fluorescent probes used for monitoring changes in membrane permeability. Corticoids were added to various SRB-loaded batches where CHOL to DPPC percentage was of 0, 2.5, 5, 10, 20, 25, 30, 50 and 100%. Corticoid to DPPC molar ratio was of 2.5%. The liposome suspensions were compared for the leakage of SRB during 48 h at 37˚C. The apparent release constants were then analyzed using Higuchi model. In parallel, DPPC membrane fluidity of various batches

(CHOL% 0, 10, 20, 30 and 100) were investigated in the absence and presence of MP by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy using 5- and 16-DSA as spin labels.

GRs were added during liposome preparation at 2.5 and 10%. This addition was considered as a modification in the experimental protocol design. The release kinetics of SRB were studied during 10 days at 37˚C. The liposome preparations were characterized for their size and homogeneity by laser granulometry. The loading rate and encapsulation efficiency values of corticoids were determined upon HPLC analysis and the cholesterol and phospholipids incorporation rates and loading rates values were determined by spectrophotometric methods.

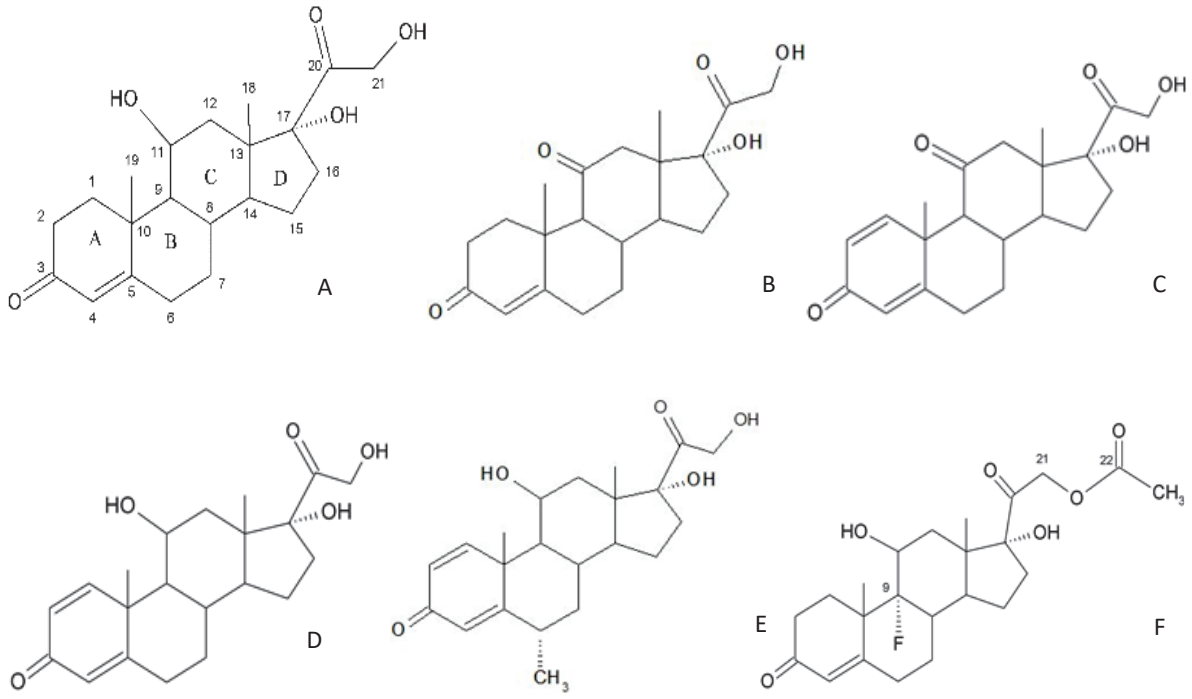



**Fig.1.** Structure of cortisol (A), cortisone (B), prednisone (C), prednisolone (D), methylprednisolone (E) and fludrocortisone acetate (F).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) (purity ≥ 99%) was purchased from Lipoid Gmbh, Germany. Cortisol, prednisone, 5- and 16-DSA were all purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Cortisone, prednisolone and methylprednisolone were purchased from Sigma-Aldrich, China.

Fludrocortisone acetate was furnished from Sigma-Aldrich, Italy. 4-Amino-3-hydroxy-1-naphtalenesulfonic acid was purchased from Fluka Analytical, India. CHOL (purity 99%), ammonium molybdate, sodium sulfite, sodium bisulfite solution, potassium phosphate monobasic, potassium dihydrogenophosphate, hydrogen peroxide solution 30%, SRB (95% content dye), gel sephadex G25 and methanol-HPLC grade were purchased from Sigma-Aldrich, Germany. Triton X-100 and Trizma Base were purchased from Sigma-Aldrich, Switzerland. The organic solvents, chloroform and methanol were from Sigma-Aldrich, France, diethyl-ether was from VWR Chemicals Prolabo, France, while dimethylsulfoxide (DMSO) (purity ≥ 99%) was purchased from Sigma-Aldrich, Japan. Cholesterol FS Kit was purchased from DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Germany.

## 2.2. Preparation of liposomes

Two approaches were used to study the effect of GRs on liposome membrane. The first approach consisted of exposing the preformed DPPC liposomes to GRs, while in the second approach GRs were added during the liposome preparation.

### 2.2.1. Preparation of liposomes containing SRB followed by exposure to GRs

Liposomes were prepared by reverse phase evaporation technique. 25 μmol of DPPC was dissolved in 5 ml of a mixture of organic solvents: chloroform, diethyl-ether and methanol (6:6:1, v:v:v) [35]. The liposomal suspension was sonicated (Sonicator starsonic 35) for 1 min at 60˚C under nitrogen stream to avoid lipid oxidation. 0.75 ml of SRB solution (150 mM) prepared in 0.1 M tris-HCl buffer (pH 7.4) was added to the mixture followed by a sonication of the solution for 6 min at 60˚C under nitrogen stream. The organic solvents were removed at 45˚C using a rotary vacuum evaporator (Heidolph, Germany). A dark purple lipid film was obtained, and 1.5 ml of SRB solution was added followed by a sonication for 5 min at 60˚C under a nitrogen stream. SRB was added to ensure its loading upon reconstitution of liposomes during evaporation and/or sonication steps. The liposomal suspension was stored at 4˚C until use.

The same protocol was used for the preparation of DPPC vesicles containing cholesterol. A stock solution of cholesterol was prepared in chloroform (25 mg/ml) and aliquots were added to DPPC before the first sonication at CHOL to DPPC molar percentage of 2.5, 5, 10, 20, 25, 30, 50 and 100%. Three batches were prepared for each formulation.

The SRB-loaded liposomes were then exposed to GRs. Corticoids stock solutions were prepared in methanol (2.5 mg/ml), and aliquots were added to the above-mentioned SRB-loaded liposomes suspensions to obtain corticoid to DPPC percentage of 2.5. The percentage of methanol was lower than 4%. The same percentage was added for blank liposomes. For each corticoid, three batches were used for monitoring the released SRB during 48 h.

2.2.2. Preparation of corticoids-loaded liposomes with and without SRB

Following the above-described protocol, liposomes were prepared with the exception that the SRB solution was replaced by tris-HCl buffer. Equimolar mixture of DPPC (25 µmol) and CHOL (25 µmol) was used (CHOL 100%). Aliquots from corticoid stock solution were added before the first sonication. The corticoid percentage was of 2.5% or 10%. Three batches were prepared for each formulation and analyzed for liposome content (encapsulation efficiency and loading rate of corticoids, DPPC and CHOL incorporation rates and loading rates) as detailed below.

2.3. Preparation of spin-labeled liposomes exposed to methylprednisolone

The same protocol described above (paragraph 2.2.1) was applied to prepare liposomes batches (CHOL% of 0, 10, 20, 30 and 100) in the presence of the spin probe (5- or 16-DSA) that was added during liposome preparation before the first sonication at a probe molar percentage of 1 mol%. Three batches were prepared for each spin-labeled formulation.

2.4. Extrusion of liposomes

All liposomes suspensions containing or not SRB, as well as the spin-labeled vesicles, were incubated in a 60˚C water bath for 35 min and then extruded using an “Avanti” mini-extruder (Avanti Polar Lipids, Switzerland) five times through a 1 µm polycarbonate membrane, followed by five times through a 0.4 µm membrane.

After extrusion, the liposomes suspensions prepared in the absence of SRB were diluted with tris-HCl buffer (0.1 M; pH 7.4) and used for liposome characterization (loading rate and encapsulation efficiency of corticoids, DPPC and CHOL incorporation rates and loading rates).

The SRB-loaded liposomes were centrifuged at 21,400 g for 1 h at 4˚C to eliminate the excess buffer. The pellets were suspended with a small volume of tris-HCl buffer containing NaCl (150 mM) then

purified from unloaded molecules by molecular sieve chromatography using sephadex G25 column. They were stored at 4˚C until use for membrane permeability study.

## 2.5. Characterization of blank and corticoids-loaded liposomes

### 2.5.1. Vesicle size analysis

The liposomes particle size was analyzed by laser granulometry (Partica-LA-950V2 Laser Diffraction Particle Size Distribution Analyzer, Horiba, Japan) that allowed the detection of particles from 0.01 µm to 3000 µm.

In addition, the polydispersity was assessed by the mean of span factor. This parameter is a good indicator of the width of liposome size distribution and can be expressed as follows [36]:

$$\text{Span} = \frac{d90 - d10}{d50} \quad \text{Equation (1)}$$

where $d_{10}$, $d_{50}$ and $d_{90}$ were the diameters at 10%, 50% and 90% of the cumulative intensity respectively. If the span factor < 0.4, the size distribution was considered to be monodispersed [37].

The size particle and span values were expressed as the means of results obtained for three independent samples ± standard deviation.

### 2.5.2. Separation of free and incorporated compounds (corticoid, cholesterol and phospholipid)

An aliquot from the liposomal suspension was diluted 5 times in tris-HCl buffer (0.1 M, pH 7.4) and was placed in a filtrate tube (vivaspin 500 centrifugal concentrators (Sartorius Stedium Biotech, Germany, MW cut-off = 1000 Da). It underwent centrifugation at 21,400 g for 1 h at 4˚C. The filtrate was used to determine the concentration of unloaded phospholipids, cholesterol and corticoid.

Also, aliquots from liposomes suspensions were sonicated for 10 min at 25˚C to ensure the liposome membrane rupture and the release of encapsulated compounds. This allowed the determination of total concentration of each molecule (DPPC, CHOL and corticoid) in the liposome suspension.

2.5.3. Determination of encapsulation efficiency of corticoids by HPLC

Stock standard solutions of corticoids (1 mg/ml) and of the internal standard, 17-OH PG (1 mg/ml) were prepared in DMSO. Diluted solutions were then prepared in ultrapure water (0.15 to 100 µg/ml). Diluted solution of 17-OH PG (100 µg/ml) was prepared in water.
100 µl of corticoid standard solution, liposomal suspension or liposomal filtrate (100 µl) were added to 17-OH PG (100 µl) and methanol (200 µl). The samples were analyzed by HPLC using an analytical column C18 (15 cm x 4.6 mm, 5 µm (Supelco, USA)). The mobile phase was a mixture of methanol and water (70/30). The flow rate was set at 1 ml/min, and the detection was measured at 254 nm.

The encapsulation efficiency of corticoid was calculated as follows:

$$EE\ (\%) = \frac{[Corticoid]Total - [Corticoid]Free}{[Corticoid]Total} \times 100 \quad \text{Equation (2)}$$

The encapsulation efficiency was determined in triplicate for each preparation.

2.5.4. Determination of the loading rate of corticoids

The loading rate (LR) was calculated according to the following formula:

$$\text{Loading rate}\ (\%) = \frac{Incorporated\ mass\ of\ corticoid\ into\ liposomes}{Initial\ mass\ of\ corticoid} \times 100 \quad \text{Equation (3)}$$

The incorporated mass of corticoid was obtained by subtracting the mass of free corticoid (determined in the liposomal filtrate) from that initially added to the organic phase during liposome preparation.

2.5.5. Determination of cholesterol incorporation rate and loading rate

An enzymatic colorimetric assay based on the formation of the colorimetric indicator quinoneimine in the presence of phenol and peroxidase was applied using cholesterol FS kit. 1000 µl of the standard kit were added to the filtrate or the sonicated samples (10 µl). The incubation was carried out for 20 min at room temperature. Then, the absorbance was read at a wavelength of 500 nm. Based on a calibrator concentration of 1 mg/ml and an absorbance value of 0.121, the concentration of cholesterol was determined as follows:

$$[\text{Cholesterol}] = \frac{Absorbance\ of\ sample}{Absorbance\ of\ calibrator} \times [calibrator]$$

The cholesterol incorporation rate was then calculated by the following equation:

CHOL incorporation rate (%) = $\frac{[Cholesterol]Total - [Cholesterol]Free}{[Cholesterol]Total}$ x 100 Equation (4).

The loading rate of CHOL was also calculated as follows:

Loading rate (%) = $\frac{Incorporated\ mass\ of\ CHOL\ into\ liposomes}{Initial\ mass\ of\ CHOL}$ x 100 Equation (5)

2.5.6. Determination of phospholipid incorporation rate and loading rate

Free and total amount of phospholipids were determined by Bartlett's method [11], according to the procedure described previously [38]. The incorporation rate of DPPC was calculated according to the following formula:

DPPC incorporation rate (%) = $\frac{[DPPC]Total - [DPPC]Free}{[DPPC]Total}$ x 100 Equation (6)

As for CHOL, the loading rate of DPPC was determined by the following equation:

Loading rate (%) = $\frac{Incorporated\ mass\ of\ DPPC\ into\ liposomes}{Initial\ mass\ of\ DPPC}$ x 100 Equation (7)

The results are expressed as the means of three independent experiments ± SD.

2.6. Electron paramagnetic resonance spectroscopy measurements

EPR measurements were performed on a Bruker 500E spectrometer at the X-band (9.4 GHz) coupled with a variable temperature controller accessory following the instrumental parameters: center field, 3360 G; modulation amplitude, 1.0 G; microwave power, 0.6-6.4 mW; frequency modulation, 100 KHz. 5- and 16-DSA were used as spin labels. Prior to EPR analysis, the spin-labeled liposomes were ultracentrifuged (Optima$^{TM}$ Ultracentrifuge, Beckman Coulter, USA) at 40,000 g for 1 h at 4˚C, and the resulting pellets were then kept in a desiccator overnight to remove any residual solvent. The sample was then introduced into a standard quartz EPR tube of 25 cm in length with an inner diameter of 3 mm, and the EPR spectra were recorded at 30 and 40˚C. Changes in DPPC membrane fluidity for liposomes (CHOL% 0, 10, 20, 30 and 100) exposed to MP were investigated based on the spectral parameters; (1) the maximum hyperfine splitting ($2A_{max}$), and (2) the rotational correlation time ($\tau_c$), defined successively as:

(1) the outermost separation between the spectral extrema

(2) $\tau_c = (6.5x10^{-10})$ x $W_0$ x $[(h_0/h_{-1})^{0.5} -1]$, where $W_0$ was the width of the central line at half-height, and $h_0$ and $h_{-1}$ were the amplitude of the center- and high-field lines [39].

## 2.7. Permeability study

### 2.7.1. Preparation of liposomes suspensions for fluorescence measurements

The suspensions of SRB-loaded liposomes were diluted in tris-HCl buffer (0.1 M; pH 7.4) containing NaCl (150 mM) to obtain absorbance values of 1.0. They were then used for SRB release kinetics. It was demonstrated that SRB formed dimers when encapsulated at high concentration, and exhibited an absorption spectrum with two peaks at 532 and 568 nm for loaded- and free-SRB, respectively [40]. The optical density measurements were determined using a spectrophotometer (Nicolet evolution 300 Thermoelectron, England). The diluted batches were used for fluorescence measurements.

### 2.7.2. SRB release kinetics

Permeability study was carried out at 37˚C by monitoring the release of SRB from blank and GRs-loaded liposomes over time as well as from preformed liposomes exposed or not to GRs (2.5 mol%). A high concentration of encapsulated SRB in liposomes led to self-quenching. The release of SRB from vesicles led to an increase in the fluorescence signal. Fluorescence measurements were performed using a spectrofluorometer (Thermo Spectronic, Aminco Bowman Series 2, USA). The fluorescence signal was measured at an excitation wavelength of 535 nm. The emission spectra were recorded in the range of 540-700 nm. The release of SRB from vesicles was calculated according to the formula:

Release SRB (%)= $\frac{Ft - F0}{Fmax}$ x 100 Equation (8)

where $F_t$ was the fluorescence of the suspension at time t, $F_0$ was the initial fluorescence measured at time $t_0$ and $F_{max}$ was the maximal fluorescence achieved by the addition of buffer containing Triton X-100 (1%) that led to the total release of SRB from vesicles.

#### 2.7.2.1. Kinetic modeling of SRB release profiles

The apparent release constants were determined by fitting the SRB release kinetics data into the Higuchi model expressed by the simplified equation [41]:

$Q = K_H \times t^{1/2}$ Equation (9)

where $Q$ corresponded to the percentage of released SRB in the medium at time t and $K_H$ was the Higuchi release constant.

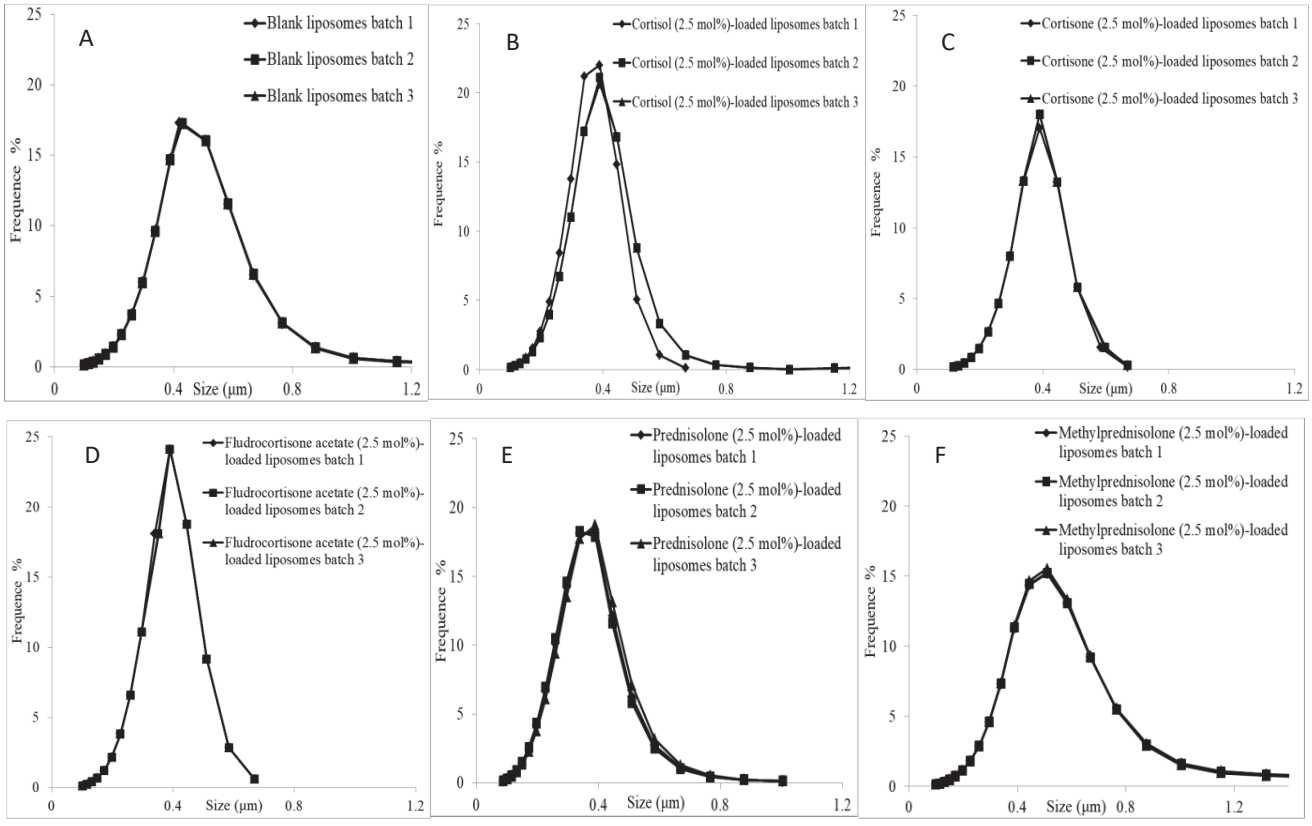
2.8. Statistics

To assess significant differences between values, statistical analysis was carried out using the Student's t-test. A P value < 0.05 was considered statistically significant.

## 3. Results and discussion

3.1. Liposome size and span analysis

The mean size distribution of blank and corticoids-loaded liposomes was determined by laser granulometry after extrusion and separation on sephadex G25 column respectively. The liposome size distribution for the corticoids-loaded liposomes was shown in Fig.2.



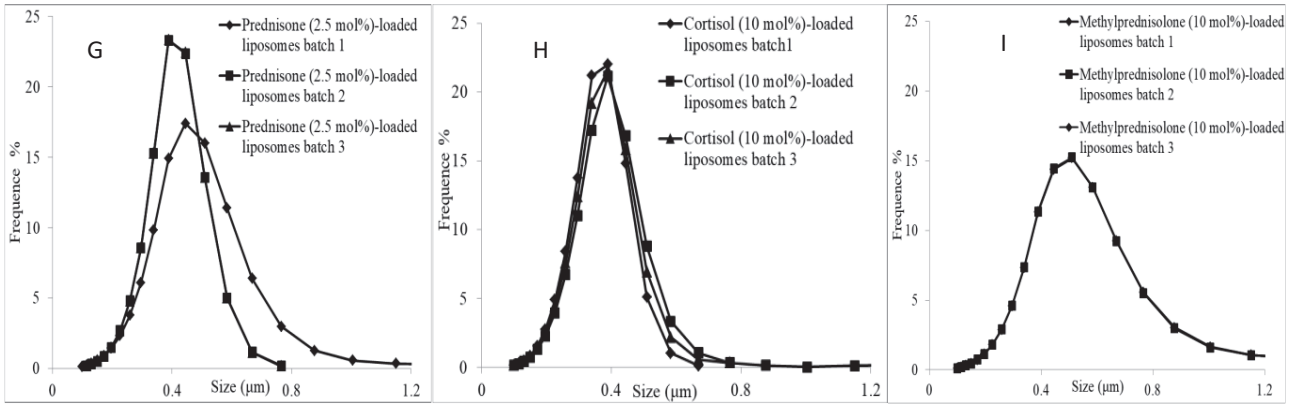



**Fig.2.** Liposome size distribution determined by laser granulometry of blank and corticoids-loaded liposomes. (A) blank liposomes; GRs (2.5%)-loaded liposomes: (B) cortisol, (C) cortisone, (D) fludrocortisone acetate, (E) prednisolone, (F) methylprednisolone, (G) prednisone; GRs (10%)-loaded liposomes: (H) cortisol, (I) methylprednisolone. Measurements were performed on three different batches.

Blank liposomes have a mean diameter of 0.42 ± 0.00 µm. With respect to blank liposomes (Fig. 2A), all batches showed a monomodal-Gaussian size distribution with a mean particle size varying between 0.32-0.46 µm which was close to the pore size of the last membrane they were extruded through (0.4 µm) (Fig. 2B, C, D, E, F, G, H and I). The liposome mean size values were listed in Table 1. This little variation in the liposome size distribution could be due to the processing parameters as sonication and extrusion [42,43]. Also, the size distribution of liposomes did not change with increasing the corticoid content to 10 mol% as in cortisol- and MP-loaded liposomes (Fig. 2H and I).

**Table 1**

Mean size distribution value and span value of corticoids-loaded liposomes determined by laser granulometry

| SRB-loaded liposomes | [a]Size (µm) | [a]Span value | [b]Size (µm) | [b]Span value |
|---|---|---|---|---|
| Blank | 0.42 ± 0.00 | 0.40 ± 0.00 | | |
| Cortisol | 0.35 ± 0.01 | 0.32 ± 0.01 | 0.35 ± 0.01 | 0.32 ± 0.23 |
| Cortisone | 0.39 ± 0.01 | 0.37 ± 0.03 | | |
| Fludrocortisone acetate | 0.36 ± 0.02 | 0.40 ± 0.01 | | |
| Methylprednisolone | 0.46 ± 0.01 | 0.40 ± 0.11 | 0.45 ± 0.01 | 0.40 ± 0.22 |
| Prednisolone | 0.32 ± 0.01 | 0.34 ± 0.14 | | |
| Prednisone | 0.40 ± 0.02 | 0.40 ± 0.22 | | |

Values are expressed as the means of three different batches ± SD
[a] Batches prepared at a molar ratio DPPC:CHOL:corticoid of 100:100:2.5
[b] Batches prepared at a molar ratio DPPC:CHOL:corticoid of 100:100:10

In parallel, the width of liposome size distribution expressed by the "span factor" was calculated according to Equation (1), and the span values were outlined in Table 1. Span value was used to represent size uniformity and dispersity of the microspheres [44]. Blank liposomes have a span value of 0.40 ± 0.00. With respect to blank liposomes, there is no significant effect ($P > 0.05$) of corticoids (2.5 and 10 mol%) on the width of the size distribution, and the span values varied between 0.32-0.40 (Table 1). According to literature, the size distribution is considered as narrow or monodispersed for span values < 0.4 [42,43]. This means that the drug loading did not alter the homogeneity of the liposomes suspensions [47], and generated vesicles of uniform size distribution.

### 3.2. Liposome composition analysis

#### 3.2.1. Incorporation rate and loading rate of phospholipids

The concentration of free and total phospholipid in the liposome suspension was determined according to a calibration curve ($y = 2.114x - 0.0604$), with a correlation coefficient of 0.999. The incorporation rate of DPPC in liposomes was calculated according to Equation (6). The obtained values revealed that the incorporation rate of phospholipids in blank liposomes, as well as in the corticoids-loaded liposomes was almost complete (Table 2) as the concentration of phospholipids found in the filtrate represents less than 5% of the total phospholipid concentration.

The loading rate of DPPC was also determined. LR values for blank liposomes were 76.63 ± 0.15%. Compared to blank liposomes, DPPC was efficiently loaded in the presence of GRs, and values varied from 78 to 100%. It seems that GRs promote the incorporation of DPPC into the liposome suspensions.

**Table 2**

Incorporation rate and loading rate values of DPPC and cholesterol, encapsulation efficiency and loading rate values of corticoids for formulations (DPPC:CHOL:GR 100:100:2.5).

| Corticoids-loaded liposomes | Incorporation rate of DPPC | Loading rate of DPPC | Incorporation rate of CHOL | Loading rate of CHOL | EE (%) of GRs | LR (%) of GRs |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Blank | 95.95 ± 0.48 | 76.63 ± 0.15 | 98.82 ± 0.95 | 99.36 ± 0.45 | | |
| Cortisol | 96.07 ± 0.59 | 90.10 ± 0.70 | 98.45 ± 0.14 | 95.54 ± 0.75 | 97.78 ± 0.03 | 97.68 ± 0.86 |
| Cortisone | 96.07 ± 0.00 | 84.47 ± 0.05 | 99.29 ± 0.15 | 95.85 ± 0.22 | 98.47 ± 0.09 | 95.46 ± 0.54 |
| Fludrocortisone acetate | 96.14 ± 0.00 | 93.73 ± 0.72 | 98.23 ± 0.00 | 96.87 ± 0.33 | 97.87 ± 0.05 | 51.84 ± 0.19 |
| Methylprednisolone | 97.32 ± 0.06 | 78.29 ± 0.07 | 98.51 ± 0.15 | 99.83 ± 0.17 | 97.36 ± 0.12 | 81.03 ± 0.00 |
| Prednisolone | 99.55 ± 0.15 | 87.95 ± 0.27 | 98.90 ± 0.31 | 98.16 ± 0.03 | 97.25 ± 0.15 | 77.58 ± 0.43 |
| Prednisone | 99.71 ± 0.01 | 100.00 ± 0.00 | 98.78 ± 0.28 | 95.33 ± 0.25 | 94.46 ± 0.08 | 88.47 ± 1.94 |

Values are expressed as the mean of three different preparations ± SD.

3.2.2. Cholesterol incorporation rate and loading rate into liposomes

As for phospholipids, the incorporation rate of CHOL was calculated according to Equation (4) using an enzymatic kit. The incorporation of CHOL was almost complete as for the loading rate of CHOL (> 95%), and all corticoids at 2.5 mol% did not alter CHOL incorporation into liposomes (Table 2).

3.2.3. Corticoids incorporation

The corticoid concentration in the liposome suspension ($[corticoid]_{Total}$), as well as in the filtrate ($[corticoid]_{Free}$) was determined by HPLC. The retention time values of GRs were presented in Table 3, and that of 17-OH PG, used as the internal standard was 7.00 ± 0.01 min.
The calibration curves were constructed by plotting the corticoid/17-OH PG area ratio against the concentration of corticoid in (µg/ml). The linear relationships were evaluated by regression analysis with the least-squares methods. Table 3 presents the calibration curve equations and their correlation coefficients. The equations were used to determine the corticoid concentration, and thus the encapsulation efficiency and loading rate values of corticoids into liposomes.

**Table 3**
Retention times and calibration curves of corticoids with their correlation coefficients determined by HPLC

| Corticoids | Retention time (min) | Calibration curve | Correlation coefficient |
|---|---|---|---|
| Cortisol | 3.53 ± 0.01 | 0.0093x – 0.0065 | 0.999 |
| Cortisone | 3.17 ± 0.31 | 0.0136x + 0.0026 | 0.998 |
| Fludrocortisone acetate | 4.11 ± 0.02 | 0.0064x – 0.0037 | 0.999 |
| Methylprednisolone | 4.26 ± 0.01 | 0.0135x – 0.0066 | 0.999 |
| Prednisolone | 3.51 ± 0.01 | 0.0112x – 0.0024 | 0.999 |
| Prednisone | 3.00 ± 0.02 | 0.0094x – 0.0052 | 0.999 |

Table 2 showed that the GRs were highly encapsulated into liposomes. The EE (%) values for the various corticoids were above 94%. Results showed that the high CHOL content (100%) did not affect the EE% of GRs. Recently, it has been proven by biophysical techniques that corticoids interact with polar head groups and alkyl chains of phospholipids [8]. This was translated by the high EE% of GRs into liposomes. In fact, the high CHOL content leads to an ordering and condensing effect of the bilayer [45-47].

Our findings were in agreement with a recent study conducted by Subramanian et al. (2016) who demonstrated a high retention of beclomethasone dipropionate (BDP) in formulation made of soya phosphatidylcholine:CHOL system (1:1 molar ratio) [48]. Authors reported that when cholesterol was included in the formulation prior to extrusion, liposomes tend to provide high BDP retention compared to free-CHOL liposomes.

Corticoids-loaded liposomes exhibited also high LR values (> 81%) except for FA and prednisolone. The structure of the encapsulated drug may be a critical feature. According to literature, NMR experiments suggested that the steroid backbone precisely the second ring bearing fluorine atom is not totally included in the lipophilic moiety of phospholipids [49]. The presence of an acetate function may produce a steric effect or a modulation in the backbone orientation prohibiting the liposomal entrapment of drugs of FA. This could be a reason for the obtained low LR value.

The composition of the obtained vesicles was as follows: DPPC:CHOL:GR 100:134:0 for blank liposomes, 100:106:2.7 for cortisol-loaded liposomes, 100:113:2.82 for cortisone-loaded liposomes, 100:103:1.5 for FA-loaded liposomes, 100:98:2.0 for prednisone-loaded liposomes, 100:114:2.2 for prednisolone-loaded liposomes and 100:127:2.9 for MP-loaded liposomes.

### 3.3. Electron paramagnetic resonance study

EPR spectroscopy technique is one of the well-established methods for in-depth investigation of the molecular dynamic changes of lipid membranes [50,51]. In this study, changes in the lipid membrane fluidity of liposomes (CHOL% 0, 10, 20, 30 and 100) treated or not with MP (2.5 mol%) were carried out at 30 and 40˚C by using 5- and 16-DSA as spin probes. The nitroxide radical moieties of these probes are attached at the $5^{th}$ (near polar headgroup region) and $16^{th}$ (hydrophobic end) position of the hydrocarbon chain respectively [52]. Hence, the fluidity of the membrane can be estimated from the maximum hyperfine splitting (*2Amax*) (Fig. 3A and B) and the rotational correlation time ($\tau_c$) (Fig. 3C and D) obtained from 5- and 16-DSA spectrum respectively.

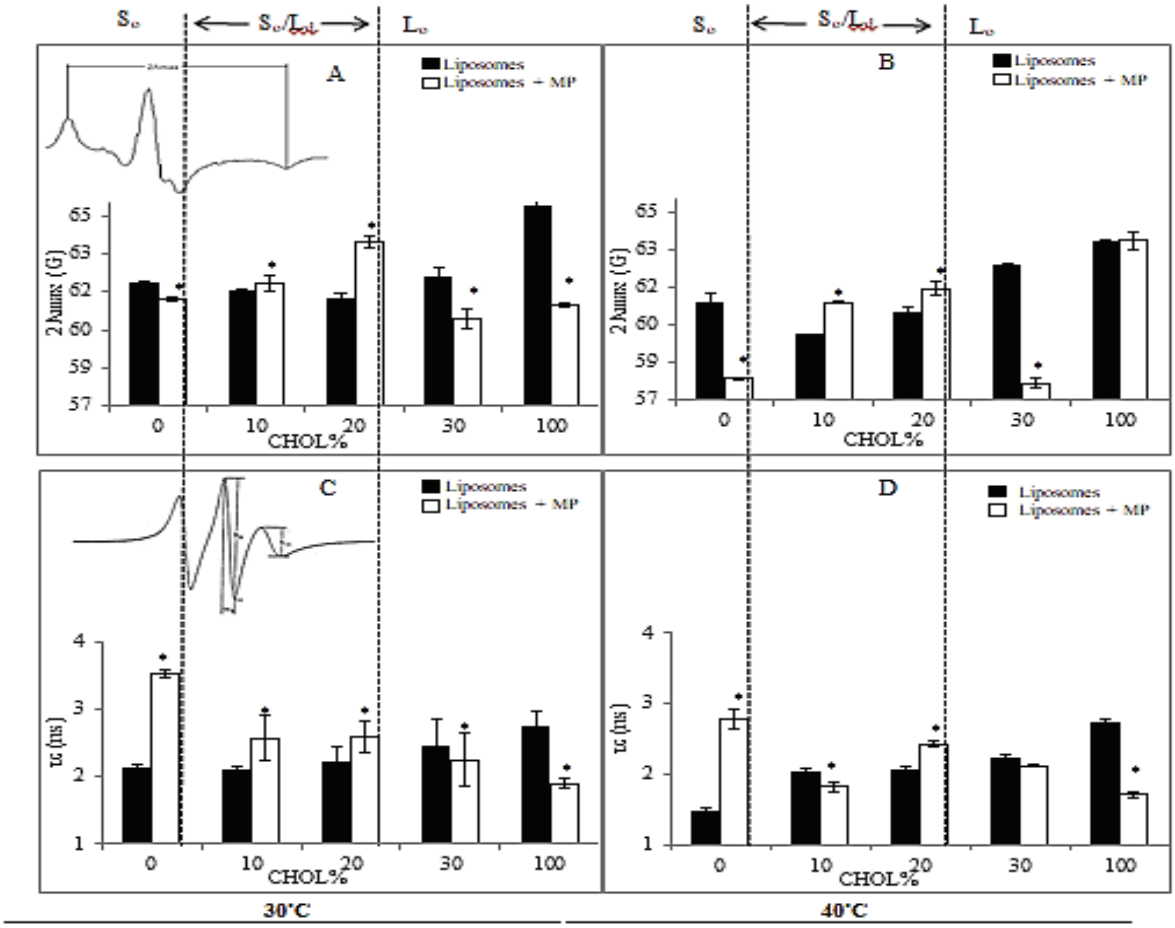



**Fig.3.** Effect of temperature and CHOL content on the maximum hyperfine splitting (*2Amax*) and the rotational correlation time ($\tau_c$) for spin-labeled blank liposomes (CHOL% 0, 10, 20, 30 and 100) exposed or not to MP. (A) $2A_{max}$ at 30˚C, (B) $2A_{max}$ at 40˚C, (C) $\tau_c$ at 30˚C, (D) $\tau_c$ at 40˚C.
$S_o$: solid-ordered phase, $S_o/L_d$: solid-ordered/liquid-disordered phase, $L_o$: liquid-ordered phase
Values are expressed as the mean of three independent measurements ± SD.
*P < 0.05 compared with the control value

At CHOL 0%, DPPC membrane exists in a gel or solid-ordered ($S_o$) state (~30˚C). The gel phase melts into a liquid crystalline phase at the main phase transition temperature (41˚C) [23] and this is close to the studied temperature of 40˚C. The phase transition is accompanied with an increase in membrane fluidity [53] and this is consistent with the decrease in the $2A_{max}$ and $\tau_c$ values (inversely related to the fluidity) with the raise of temperature. These findings are in agreement with previous data [54,55]. Compared to the control (CHOL 0%) at 30 and 40˚C, MP increased the membrane fluidity near the phospholipid headgroups region while MP decreased the membrane fluidity at the hydrophobic end. MP affects the membrane fluidity of the upper region of the membrane differently than the deeper region, and this could be related to its orientation within the two regions of the membrane.

At intermediate CHOL concentration (CHOL% 10 and 20), a $S_0/L_d$ phase transition occurs [56] and this is generally accompanied with the ordering and condensing effect of CHOL [57–59]. Compared to CHOL 0%, the EPR parameters (*2Amax* and $\tau_c$) of blank liposomes (CHOL% 10 and 20) showed slight decrease (except for Fig. 3D) which is not in accordance with CHOL lipid packing effect. This could be related to the heterogeneous distribution of CHOL within the lipid membrane into CHOL-poor and CHOL-rich domains [60]. Compared to the controls (CHOL% 10 and 20), MP decreased the membrane fluidity of the upper and the deeper regions except for CHOL 10 mol% at the deeper region of the membrane at 40˚C. It can be concluded that MP promotes the condensing and ordering effect better than CHOL.

Above CHOL 30%, the onset of the $L_o$ phase occurs [61] with the emergence of raft domains defined as nanostructures enriched in CHOL. Compared to CHOL 0%, blank liposomes (CHOL% 30 and 100) showed an increase of the EPR parameters meaning a decrease in the membrane fluidity. The lipid chains are tightly packed and this is in agreement with previous data [62].Compared to controls (CHOL% 30 and 100), MP increased significantly or did not slightly modify the membrane fluidity at the upper and deeper regions of the membrane (CHOL 100% at 40˚C at the upper region).

On the overall, MP affects the membrane fluidity in both upper and deeper regions of the membrane whatever was the CHOL content. MP tends to decrease the membrane fluidity at intermediate CHOL content (10-20 mol%) while a destabilizing effect of MP is promoted at high CHOL content.

### 3.4. Release kinetics of SRB from liposomes

For permeability studies, vesicles are prepared by reverse phase evaporation (REV) technique, as their aqueous cavity allows a high encapsulation of hydrophilic molecules [35,63]. In the present work, the SRB release from corticoid-loaded liposomes prepared at DPPC:CHOL:corticoid molar ratios of 100:100:2.5 and 100:100:10 was followed. Also, nine formulations of DPPC liposomes differing by their CHOL content (CHOL% to DPPC from 0 to 100%) were prepared, and the corticoid effect at 2.5% was studied.

#### 3.4.1 Release kinetics of SRB from corticoids-loaded liposomes

The phospholipid:cholesterol stoichiometry has been a matter of debate in the literature [64]. The most frequently used proportion in DPPC:CHOL binary mixture is 2:1 or 1:1, however the reason of this particular ratio is unknown [65]. In general, the 1:1 molar ratio is chosen for simplicity [66] but it is worth to mention that this stoichiometry could reflect the appropriate geometrical arrangement for an optimum packing of the lipid compounds in the mixed bilayer [67]. Thereby, the DPPC:CHOL binary mixture at a molar ratio of 1:1 is used firstly and the permeability study of liposomes encapsulating 2.5 and 10 mol% of corticoids was investigated at 37˚C over 10 days. Fig.4 represents the release kinetics of SRB from blank and corticoids-loaded batches.

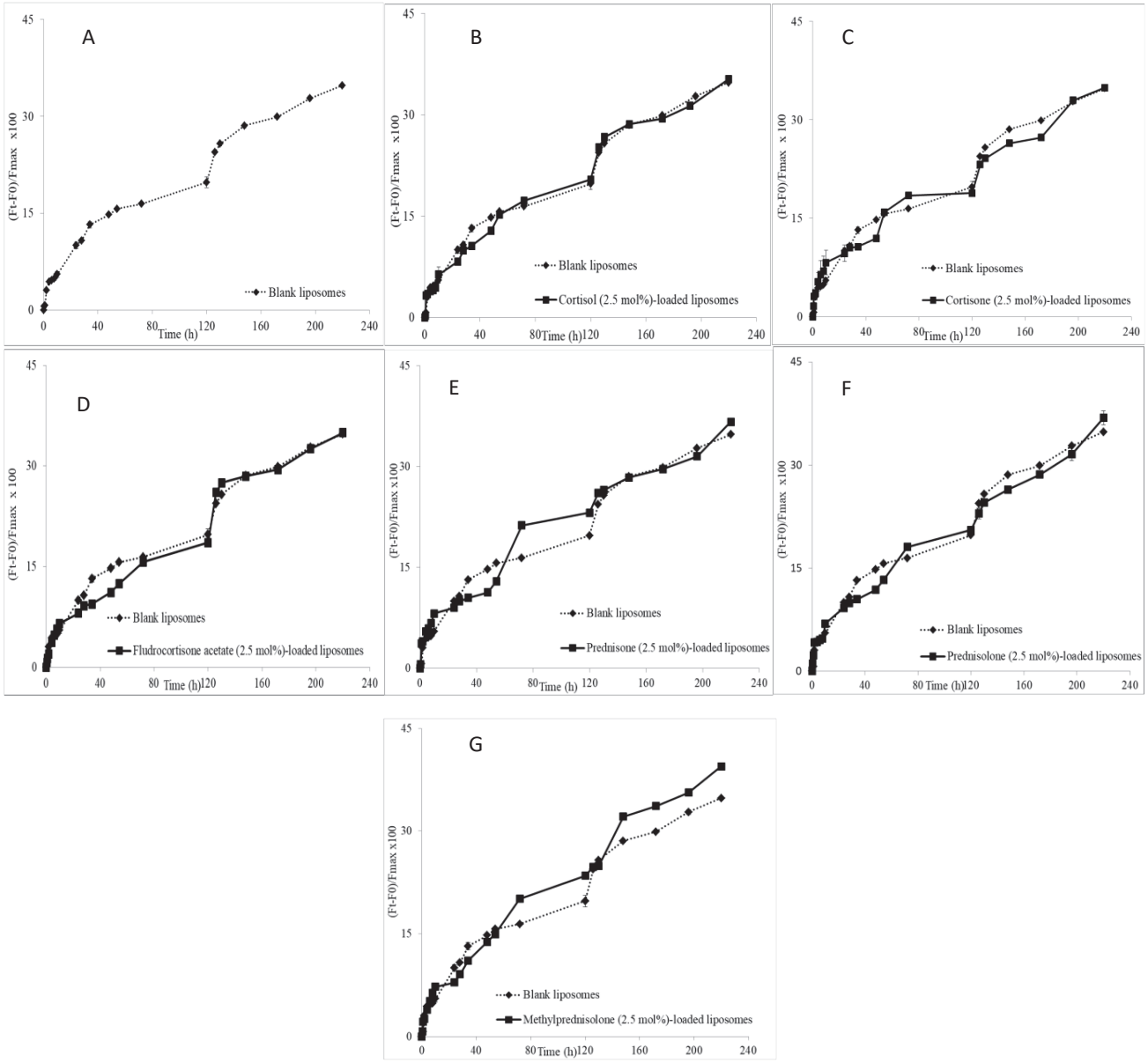



**Fig.4.** The $(F_t\text{-}F_0)/F_{max}$ x 100 variation with time at 37˚C for corticoids-loaded liposomes, CHOL% was of 100 mol%. (A) blank, (B) cortisol-, (C) cortisone-, (D) fludrocortisone acetate-, (E) prednisone-, (F) prednisolone-, (G) methylprednisolone-loaded liposomes. Values are expressed as the mean of three independent release kinetics ± SD.

The percentage of released SRB from blank liposomes (Fig. 4A) was 14 and 34% at 48 and 220 h respectively. Similar SRB release kinetics were obtained for cortisol- (Fig. 4B), cortisone- (Fig. 4C), FA- (Fig. 4D), prednisone- (Fig. 4E) and prednisolone-(Fig. 4F) loaded liposomes. Among the various GRs, the presence of MP (Fig. 4G) produced a weak difference in the SRB release kinetics, where the $(F_t\text{-}F_0/F_{max})$ x100 was equal to 14 and 39% at 48 and 220 h, respectively. The large amount of CHOL in the membrane produced a condensing effect [61,68] and a tightening of lipid acyl chains [23,58], associated with the formation of raft domains [69]. This was translated by the limited SRB released, thus a minor effect of corticoids on the bilayer permeability. Hence, the effect of MP on the bilayer permeability was studied at 10 mol%. In addition, cortisol was selected as

a model for other steroids, and studied at the same molar percentage. The SRB release kinetics were presented in Fig.5. The SRB release kinetics from liposomes encapsulating 2.5 mol% of corticoids were added to the release curves for comparison.

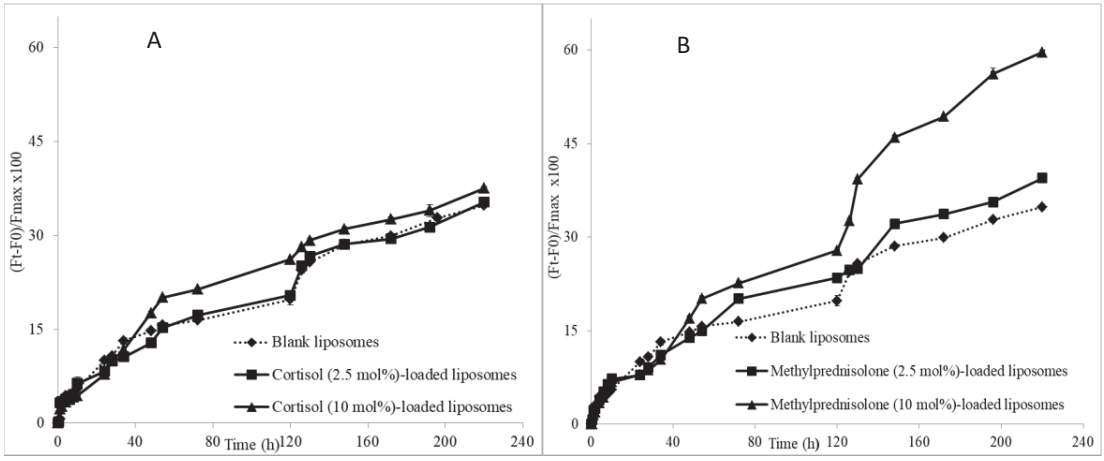



**Fig.5.** ($F_t$-$F_0$)/$F_{max}$ x100 variation with time at 37˚C for cortisol- and MP-loaded liposomes prepared at a molar ratio DPPC:CHOL:GR of 100:100:10. (A) cortisol-loaded liposomes, (B) MP-loaded liposomes. Values are expressed as the mean of three independent release kinetics ± SD.

Compared to blank liposomes, both corticoids were able to permeabilize the liposome membrane at 10 mol%. The percentage of released SRB was 17 and 37% for cortisol-loaded liposomes (Fig. 5A) and 17 and 59% for MP-loaded liposomes at 48 and 220 h, respectively (Fig. 5B).
We assume that GR at high concentration could disturb the tightly packed structure, leading to an increase of the membrane permeability.

Alsop et al. (2016) demonstrated that cortisone at high concentration (> 20%) spans the entire POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) membrane leading to a perturbation in the lipid tails region [70].This could explain the increase in the membrane permeability following increased GR content (10 mol%).

3.4.2. Release kinetics of SRB from DPPC liposomes differing by CHOL content and exposed to corticoids

Permeability study was carried out by monitoring the release of SRB from the various DPPC formulations (CHOL% 0, 2.5, 5, 10, 20, 25, 30, 50 and 100) treated by GRs at 2.5 mol% over 48 h at 37˚C. The kinetic release curves are presented in Fig. S1. Blank liposomes differing by their CHOL content were compared for the leakage of SRB and results were in concordance with previous SRB release kinetics exhibiting a biphasic pattern except for formulations containing CHOL% 50 and 100 [71].

Although various mathematical models were previously used to determine the release constant values ($K_1$ and $K_2$), and to explore the SRB release mechanisms from the different formulations [71], we select the Higuchi model to treat the SRB release data for the formulations exposed to GRs for the following reason:

Higuchi model supposes that the drug release is a diffusion process based on the Fick's law [72]; and is among the most common models used to study the release of drugs through the lipid bilayers [73,74]. Fig. 6 (A and B) represents the Higuchi release constants $K_1$ and $K_2$, respectively, for blank liposomes (CHOL% 0-100) exposed or not to GRs (2.5 mol%).

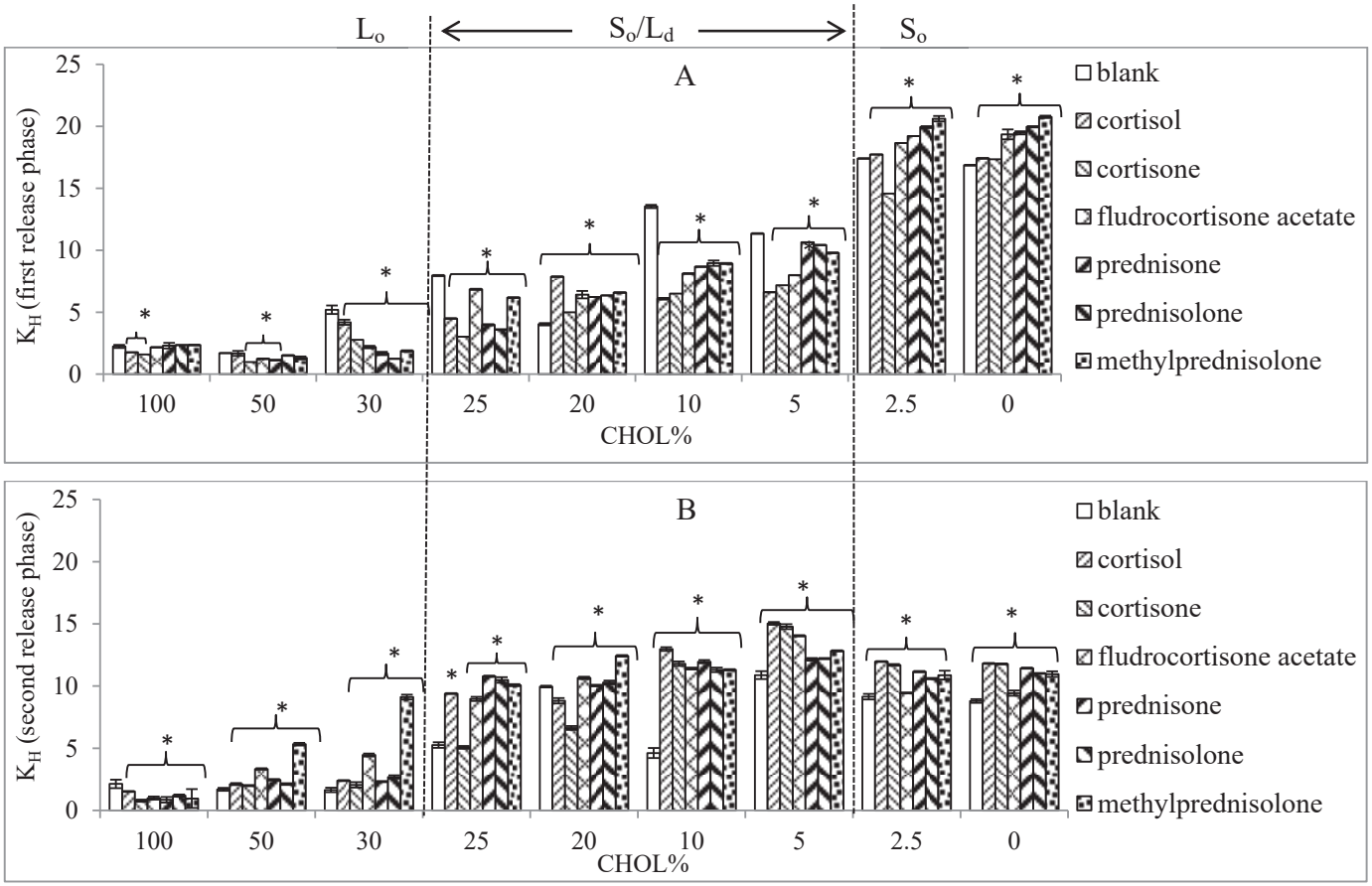



**Fig.6.** Higuchi SRB release constants determined for the two release phases: (first phase, from 0 to 10 h (A), second phase, from 10 to 48 h (B)) for blank liposomes exposed or not to GRs (2.5 mol%).
*P < 0.05 compared with the control value

For blank liposomes, the CHOL presence produced a decrease in the membrane permeability for SRB [71]. Compared to controls (CHOL% 0, 2.5), GRs increased the membrane permeability for formulations (CHOL% 0 and 2.5) in the first and second release phases (except for CHOL% 2.5 exposed to cortisone where a decrease was obtained). This observation confirmed also the fluidizing effect of MP demonstrated by EPR measurements. Our previous data showed that cortisol, FA and prednisolone loaded-DPPC liposomes at 2.5 mol% produced an

increase in the membrane fluidity [8]. Below CHOL 2.5 mol%, the fluidizing effect of GRs is accompanied by an increase in membrane permeability.

At intermediate CHOL content ($S_o/L_d$ phase transition), the release constants for blank liposomes showed unstable variations in the first and second release phases. This observation is also consistent with the EPR parameters meaning that the condensing effect of CHOL is not concomitant with the variation in membrane permeability or fluidity (5 < CHOL% < 25). Compared to controls (CHOL% 5, 10 and 25), GRs decreased the membrane permeability in the first release phase while the contrary effect was obtained at CHOL 20%. For the second release phase, GRs increased the membrane permeability for CHOL 5, 10, 20 and 25% except cortisol and cortisone that decreased the membrane permeability at CHOL 20% while cortisone had no effect on SRB release at CHOL 25%.

Above CHOL 30% ($L_o$ state) and compared to controls (CHOL% 30, 50 and 100), GRs decreased or did not change the membrane permeability in the first and second release phases at CHOL 100% while the contrary effect was obtained at CHOL% 30 and 50 in the second release phase.

On the overall, above CHOL% 5 (physiological concentration), GRs tend to decrease the membrane permeability in the first release phase and this effect was noticeable for cortisone while the contrary effect was obtained in the second release phase. These findings confirm also that the structure of the drug is not the main factor controlling its effect on the membrane permeability; while CHOL content and incubation time seem to be critical parameters.

3.4.3. Kinetic modeling of SRB release data from GRs-loaded liposomes versus liposomes exposed to GRs

The Higuchi release constants of SRB for GRs-loaded liposomes and those obtained from liposomes exposed to GRs were presented in Table 4.

**Table 4**

Higuchi release constants for GRs-loaded liposomes versus liposomes exposed to GRs

| **Release phase (h)** | **First phase (0-10)** | | **Second phase (10-48)** | |
|---|---|---|---|---|
| Higuchi release constant | $K_H$ [a] | $K_H$ [b] | $K_H$ [a] | $K_H$ [b] |
| Cortisol | 1.87 ± 0.00 | 1.76 ± 0.03 | 2.00 ± 0.01 | 1.73 ± 0.07 |
| Cortisone | 1.48 ± 0.01 | 1.59 ± 0.02 | 0.79 ± 0.03 | 0.89 ± 0.02 |
| Fludrocortisone acetate | 2.00 ± 0.03 | 2.17 ± 0.01 | 2.18 ± 0.01 | 1.21 ± 0.04 |
| Methylprednisolone | 2.30 ± 0.04 | 2.35 ± 0.03 | 2.67 ± 0.02 | 0.96 ± 0.04 |
| Prednisolone | 2.20 ± 0.01 | 2.35 ± 0.02 | 2.18 ± 0.05 | 1.31 ± 0.21 |
| Prednisone | 2.12 ± 0.01 | 2.13 ± 0.20 | 2.16 ± 0.11 | 0.86 ± 0.04 |

[a]GRs-loaded liposomes (DPPC:CHOL:GR molar ratio of 100:100:2.5)

[b]Liposomes exposed to 2.5 mol% GRs (DPPC:CHOL molar ratio of 100:100)

Compared to liposomes exposed to GRs, similar $K_H$ values were obtained for GRs-loaded liposomes in the first release phase. Surprisingly, GRs tend to decrease the membrane permeability of the preformed liposomes in the second release phase while no major changes of release constant values were obtained for GRs-loaded liposomes. These results were challenging since the same GR could affect differently the membrane permeability depending on experimental protocol design.

## 4. Conclusion

In this work, we studied the parameters that control the effect of a series of corticoids on the bilayer permeability and fluidity of DPPC liposomes differing by their CHOL content. Two approaches were adopted in the experimental protocol design (loading liposomes with GRs or treating liposomes by GRs). The GRs-loaded liposomes exhibited a monodispersed size distribution, and this was accompanied with a high encapsulation efficiency of GRs, and a high incorporation rate of DPPC and CHOL. Fluidity and permeability studies showed that the CHOL content, GR concentration, period of incubation and the experimental protocol design are factors determining the outcomes of the research. The results would serve as a tool for the design of experimental protocol dealing with the effect of drugs on liposome membrane properties as well as for the development of liposome-based drug delivery systems.

## ASSOCIATED CONTENT

### Supporting information

**Fig. S1.** SRB release curves of DPPC liposomes exposed to GRs at 2.5 mol% over 48 h at 37˚C and containing various CHOL%: (A) 0%, (B) 2.5%, (C) 5%, (D) 10%, (E) 20%, (F) 25%, (G) 30%, (H) 50% and (I) 100%.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

### Acknowledgments

Authors thank the Agence Universitaire de la Francophonie (PCSI 2015-2017).

### References

[1] C. Li, P. Yang, Y. Zhang, Y. Sun, W. Wang, Z. Zou, L. Xing, Z. Chen, C. Tang, F. Guo, J. Deng, Y. Zhao, Y. Yan, J. Tang, X. Wang, C. Jiang, Corticosteroid Treatment Ameliorates Acute Lung Injury Induced by 2009 Swine Origin Influenza A (H1N1) Virus in Mice, PLoS One. 7 (2012) 1–7. doi:10.1371/journal.pone.0044110.

[2] A.K. Waljee, M.A.M. Rogers, B.K. Nallamothu, Authors' reply to Hamilton, BMJ. (2017) j2538.

doi:10.1136/bmj.j2538.

[3] J.G. Tasker, S. Di, R. Malcher-Lopes, Minireview: Rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors, Endocrinology. 147 (2006) 5549–5556. doi:10.1210/en.2006-0981.

[4] A. Alangari, Genomic and non-genomic actions of glucocorticoids in asthma, Ann. Thorac. Med. 5 (2010) 133. doi:10.4103/1817-1737.65040.

[5] F.L. Groeneweg, H. Karst, E.R. de Kloet, M. Joëls, Rapid non-genomic effects of corticosteroids and their role in the central stress response, J. Endocrinol. 209 (2011) 153–167. doi:10.1530/JOE-10-0472.

[6] J. Prades, O. Vögler, R. Alemany, M. Gomez-Florit, S.S. Funari, V. Ruiz-Gutiérrez, F. Barceló, Plant pentacyclic triterpenic acids as modulators of lipid membrane physical properties, Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. 1808 (2011) 752–760. doi:10.1016/j.bbamem.2010.12.007.

[7] L. Vigh, Z. Török, T. Crul, B. Maresca, G.J. Schütz, F. Viana, L. Dindia, S. Piotto, M. Brameshuber, G. Balogh, M. Péter, A. Porta, A. Trapani, I. Gombos, A. Glatz, B. Gungor, B. Peksel, L. Vigh, B. Csoboz, I. Horváth, M.M. Vijayan, P.L. Hooper, J.L. Harwood, Plasma membranes as heat stress sensors: From lipid-controlled molecular switches to therapeutic applications, Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. 1838 (2014) 1594–1618. doi:10.1016/j.bbamem.2013.12.015.

[8] R. Abboud, C. Charcosset, H. Greige-Gerges, Tetra- and Penta-Cyclic Triterpenes Interaction with Lipid Bilayer Membrane: A Structural Comparative Study, J. Membr. Biol. 249 (2016) 327–338. doi:10.1007/s00232-016-9871-8.

[9] B. Shin, W. Park, Synergistic effect of oleanolic acid on aminoglycoside antibiotics against acinetobacter baumannii, PLoS One. 10 (2015) 1–17. doi:10.1371/journal.pone.0137751.

[10] S. Shaikh, H. Verma, N. Yadav, M. Jauhari, J. Bullangowda, Applications of Steroid in Clinical Practice: A Review, ISRN Anesthesiol. 2012 (2012) 1–11. doi:10.5402/2012/985495.

[11] B. Ozbakir, B.J. Crielaard, J.M. Metselaar, G. Storm, T. Lammers, Liposomal corticosteroids for the treatment of inflammatory disorders and cancer, J. Control. Release. 190 (2014) 624–636. doi:10.1016/j.jconrel.2014.05.039.

[12] A.K. McDonough, J.R. Curtis, K.G. Saag, The epidemiology of glucocorticoid-associated adverse events, Curr. Opin. Rheumatol. 20 (2008) 131–137. doi:10.1097/BOR.0b013e3282f51031.

[13] B.N. Lenta, J.R. Chouna, P.A. Nkeng-Efouet, N. Sewald, Endiandric acid derivatives and other constituents of plants from the genera Beilschmiedia and Endiandra (Lauraceae), Biomolecules. 5 (2015) 910–942. doi:10.3390/biom5020910.

[14] D. Liu, A. Ahmet, L. Ward, P. Krishnamoorthy, E.D. Mandelcorn, R. Leigh, J.P. Brown, A. Cohen, H. Kim, A practical guide to the monitoring and management of the complications of systemic corticosteroid therapy, Allergy, Asthma Clin. Immunol. 9 (2013) 30. doi:10.1186/1710-1492-9-30.

[15] I. Perogamvros, D.W. Ray, P.J. Trainer, Regulation of cortisol bioavailability—effects on hormone measurement and action, Nat. Rev. Endocrinol. 8 (2012) 717–727. doi:10.1038/nrendo.2012.134.

[16] P. Gupta, V. Bhatia, Corticosteroid physiology and principles of therapy, Indian J. Pediatr. 75 (2008) 1039–1044. doi:10.1007/s12098-008-0208-1.

[17] Y. He, W. Yi, K. Suino-Powell, X.E. Zhou, W.D. Tolbert, X. Tang, J. Yang, H. Yang, J. Shi, L. Hou, H. Jiang, K. Melcher, H.E. Xu, Structures and mechanism for the design of highly potent glucocorticoids, Cell Res. 24 (2014) 713–726. doi:10.1038/cr.2014.52.

[18] A. Bagga, A. Sinha, Symposium on Steroid Therapy Pulse Steroid Therapy, Indian J. Pediatr. J Pediatr. 75 (2008) 10571066. doi:10.1007/s12098-008-0210-7.

[19] M. Katz, E.H. Gans, Topical corticosteroids, structure-activity and the glucocorticoid receptor: Discovery and development - A process of planned serendipity, J. Pharm. Sci. 97 (2008) 2936–2947. doi:10.1002/jps.21222.

[20] R.S. Gracià, N. Bezlyepkina, R.L. Knorr, R. Lipowsky, R. Dimova, Effect of cholesterol on the rigidity of saturated and unsaturated membranes: fluctuation and electrodeformation analysis of giant vesicles, Soft Matter. 6 (2010) 1472. doi:10.1039/b920629a.

[21] N. Najafinobar, L.J. Mellander, M.E. Kurczy, J. Dunevall, T.B. Angerer, J.S. Fletcher, A.-S. Cans, Cholesterol Alters the Dynamics of Release in Protein Independent Cell Models for Exocytosis, Sci. Rep. 6 (2016) 33702. doi:10.1038/srep33702.

[22] K. Simons, J.L. Sampaio, Membrane organization and lipid rafts, Perspect Biol. 3 (2011) a004697. doi:10.1101/cshperspect.a004697.

[23] L. Redondo-Morata, M.I. Giannotti, F. Sanz, Influence of cholesterol on the phase transition of lipid bilayers: A temperature-controlled force spectroscopy study, Langmuir. 28 (2012) 12851–12860. doi:10.1021/la302620t.

[24] Y. Takechi-Haraya, K. Sakai-Kato, Y. Abe, T. Kawanishi, H. Okuda, Y. Goda, Atomic Force Microscopic Analysis of the Effect of Lipid Composition on Liposome Membrane Rigidity, Langmuir. 32 (2016) 6074–6082. doi:10.1021/acs.langmuir.6b00741.

[25] Z.L. Miao, Y.J. Deng, H.Y. Du, X. Bin Suo, X.Y. Wang, X. Wang, L. Wang, L.J. Cui, N. Duan, Preparation of a liposomal delivery system and its in vitro release of rapamycin, Exp. Ther. Med. 9 (2015) 941–946. doi:10.3892/etm.2015.2201.

[26] A. Haeri, B. Alinaghian, M. Daeihamed, S. Dadashzadeh, Preparation and characterization of stable nanoliposomal formulation of fluoxetine as a potential adjuvant therapy for drug-resistant tumors, Iran. J. Pharm. Res. 13 (2014) 3–14.

[27] A. Deniz, A. Sade, F. Severcan, D. Keskin, A. Tezcaner, S. Banerjee, Celecoxib-loaded liposomes: effect of cholesterol on encapsulation and in vitro release characteristics, Biosci. Rep. 30 (2010) 365–373. doi:10.1042/BSR20090104.

[28] J.J. Wenz, F.J. Barrantes, Steroid Structural Requirements for Stabilizing or Disrupting Lipid Domains, Biochemistry. 42 (2003) 14267–14276. doi:10.1021/bi035759c.

[29] R. Gharib, H. Greige-Gerges, A. Jraij, L. Auezova, C. Charcosset, Preparation of drug-in-cyclodextrin-in-liposomes at a large scale using a membrane contactor: Application to trans-anethole, Carbohydr. Polym. 154 (2016) 276–286. doi:10.1016/j.carbpol.2016.06.074.

[30] A. Berquand, N. Fa, Y.F. Dufrêne, M.P. Mingeot-Leclercq, Interaction of the macrolide antibiotic

azithromycin with lipid bilayers: Effect on membrane organization, fluidity, and permeability, Pharm. Res. 22 (2005) 465–475. doi:10.1007/s11095-004-1885-8.

[31] M. Ahumada, C. Calderon, E.A. Lissi, TEMPERATURE DEPENDENCE OF BILAYER PROPERTIES IN LIPOSOMES AND THE USE OF FLUORESCENT PROBES AS A TOOL TO ELUCIDATE THE PERMEATION MECHANISM OF HYDROPHILIC SOLUTES, 3 (2016) 60–62.

[32] J.C. Bischof, J. Padanilam, W.H. Holmes, R.M. Ezzell, R.C. Lee, R.G. Tompkins, M.L. Yarmush, M. Toner, Dynamics of Cell-Membrane Permeability Changes at Supraphysiological Temperatures, Biophys J. 68 (1995) 2608–2614. doi:10.1016/S0006-3495(95)80445-5.

[33] R.J. Lee, S. Wang, M.J. Turk, P.S. Low, The effects of pH and intraliposomal buffer strength on the rate of liposome content release and intracellular drug delivery, Biosci. Rep. 18 (1998) 69–78. doi:10.1023/A:1020132226113.

[34] N. Düzgüneş, H. Faneca, M.C. Lima, Methods to monitor liposome fusion, permeability, and interaction with cells., Methods Mol Biol. 606 (2010) 209–32. doi:10.1007/978-1-60761-447-0_16.

[35] N. Khreich, P. Lamourette, H. Boutal, K. Devilliers, C. Créminon, H. Volland, Detection of Staphylococcus enterotoxin B using fluorescent immunoliposomes as label for immunochromatographic testing, Anal. Biochem. 377 (2008) 182–188. doi:10.1016/j.ab.2008.02.032.

[36] H. Hamishehkar, S. Ghanbarzadeh, S. Sepehran, Y. Javadzadeh, Z.M. Adib, M. Kouhsoltani, Histological assessment of follicular delivery of flutamide by solid lipid nanoparticles: potential tool for the treatment of androgenic alopecia, Drug Dev. Ind. Pharm. (2015) 1–8. doi:10.3109/03639045.2015.1062896.

[37] C. Cheng, L. Chu, R. Xie, Preparation of highly monodisperse W / O emulsions with hydrophobically modified SPG membranes, 300 (2006) 375–382. doi:10.1016/j.jcis.2006.03.056.

[38] L. Habib, N. Khreich, A. Jraij, S. Abbas, J. Magdalou, C. Charcosset, H. Greige-Gerges, Preparation and characterization of liposomes incorporating cucurbitacin E, a natural cytotoxic triterpene, Int. J. Pharm. 448 (2013) 313–319. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.03.027.

[39] A. Keith, G. Bulfield, W. Snipes, Spin-Labeled Neurospora Mitochondria, Biophys. J. 10 (1970) 618–629. doi:10.1016/S0006-3495(70)86324-X.

[40] R.F. Chen, J.R. Knutson, Mechanism of fluorescence concentration quenching of carboxyfluorescein in liposomes: Energy transfer to nonfluorescent dimers, Anal. Biochem. 172 (1988) 61–77. doi:10.1016/0003-2697(88)90412-5.

[41] T. Higuchi, Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices, J. Pharm. Sci. 52 (1963) 1145–1149. doi:10.1002/jps.2600521210.

[42] S. Ong, M. Chitneni, K. Lee, L. Ming, K. Yuen, Evaluation of Extrusion Technique for Nanosizing Liposomes, Pharmaceutics. 8 (2016) 36. doi:10.3390/pharmaceutics8040036.

[43] D.G. Hunter, B.J. Frisken, Effect of extrusion pressure and lipid properties on the size and polydispersity of lipid vesicles, Biophys. J. 74 (1998) 2996–3002. doi:10.1016/S0006-3495(98)78006-3.

[44] K.A. Khaled, H.A. Sarhan, M.A. Ibrahim, A.H. Ali, Y.W. Naguib, Prednisolone-Loaded PLGA Microspheres. In Vitro Characterization and In Vivo Application in Adjuvant-Induced Arthritis in Mice,

AAPS PharmSciTech. 11 (2010) 859–869. doi:10.1208/s12249-010-9445-5.

[45] Q. Zhou, L. Liu, D. Zhang, X. Fan, Preparation and characterization of gemcitabine liposome injections, Pharmazie. 67 (2012) 844–847. doi:10.1691/ph.2012.1157.

[46] W. Guo, P. Quan, L. Fang, D. Cun, M. Yang, Sustained release donepezil loaded PLGA microspheres for injection: Preparation, in vitro and in vivo study, Asian J. Pharm. Sci. 10 (2015) 405–414. doi:10.1016/j.ajps.2015.06.001.

[47] Z. Gurturk, A. Tezcaner, A.D. Dalgic, S. Korkmaz, D. Keskin, Maltodextrin modified liposomes for drug delivery through the blood–brain barrier, Med. Chem. Commun. 8 (2017) 1337–1345. doi:10.1039/C7MD00045F.

[48] S. Subramanian, I. Khan, O. Korale, M.A. Alhnan, W. Ahmed, M. Najlah, K.M.G. Taylor, A. Elhissi, A simple approach to predict the stability of phospholipid vesicles to nebulization without performing aerosolization studies, Int. J. Pharm. 502 (2016) 18–27. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.01.070.

[49] J. -M Devoisselle, J. Vion-Dury, S. Confort-Gouny, D. Coustaut, P.J. Cozzone, Liposomes containing fluorinated steroids: an analysis based on photon correlation and fluorine-19 nuclear magnetic resonance spectroscopy., J. Pharm. Sci. 81 (1992) 249–54. doi:10.1002/jps.2600810313.

[50] P. Stepien, A. Polit, A. Wisniewska-Becker, Comparative EPR studies on lipid bilayer properties in nanodiscs and liposomes, Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. 1848 (2015) 60–66. doi:10.1016/j.bbamem.2014.10.004.

[51] M. Martínez Sarrasague, A. Cimato, E. Rubin de Celis, G. Facorro, Effect of serum proteins on an exogenous pulmonary surfactant: ESR analysis of structural changes and their relation with surfactant activity, Respir. Physiol. Neurobiol. 183 (2012) 48–57. doi:10.1016/j.resp.2012.05.023.

[52] T. Subongkot, T. Ngawhirunpat, Effect of liposomal fluidity on skin permeation of sodium fluorescein entrapped in liposomes, Int. J. Nanomedicine. 10 (2015) 4581–4592. doi:10.2147/IJN.S86624.

[53] N.C. Clark, A.M. Friel, C.A. Pru, L. Zhang, T. Shioda, B.R. Rueda, J.J. Peluso, J.K. Pru, Progesterone receptor membrane component 1 promotes survival of human breast cancer cells and the growth of xenograft tumors, Cancer Biol. Ther. 17 (2016) 262–271. doi:10.1080/15384047.2016.1139240.

[54] L. Coderch, J. Fonollosa, M. De Pera, J. Estelrich, A. De La Maza, J.L. Parra, Influence of cholesterol on liposome fluidity by EPR. Relationship with percutaneous absorption, J. Control. Release. 68 (2000) 85–95. doi:10.1016/S0168-3659(00)00240-6.

[55] L. Zhao, S.-S. Feng, N. Kocherginsky, I. Kostetski, DSC and EPR investigations on effects of cholesterol component on molecular interactions between paclitaxel and phospholipid within lipid bilayer membrane, Int. J. Pharm. 338 (2007) 258–266. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.01.045.

[56] L.F. Aguilar, J. a. Pino, M. a. Soto-Arriaza, F.J. Cuevas, S. Sánchez, C.P. Sotomayor, Differential dynamic and structural behavior of lipid-cholesterol domains in model membranes, PLoS One. 7 (2012). doi:10.1371/journal.pone.0040254.

[57] H. Saito, W. Shinoda, Cholesterol effect on water permeability through DPPC and PSM lipid bilayers: A molecular dynamics study, J. Phys. Chem. B. 115 (2011) 15241–15250. doi:10.1021/jp201611p.

[58] C. Decker, A. Fahr, J. Kuntsche, S. May, Selective partitioning of cholesterol and a model drug into liposomes of varying size, Chem. Phys. Lipids. 165 (2012) 520–529. doi:10.1016/j.chemphyslip.2012.04.001.

[59] T.T. Mills, G.E.S. Toombes, S. Tristram-Nagle, D. Smilgies, G.W. Feigenson, J.F. Nagle, Order Parameters and Areas in Fluid-Phase Oriented Lipid Membranes Using Wide Angle X-Ray Scattering, Biophys. J. 95 (2008) 669–681. doi:10.1529/biophysj.107.127845.

[60] M. Javanainen, H. Martinez-Seara, I. Vattulainen, Nanoscale Membrane Domain Formation Driven by Cholesterol, Sci. Rep. 7 (2017) 1143. doi:10.1038/s41598-017-01247-9.

[61] L. Toppozini, S. Meinhardt, C.L. Armstrong, Z. Yamani, N. Kucerka, F. Schmid, M.C. Rheinstadter, Structure of cholesterol in lipid rafts, Phys. Rev. Lett. 113 (2014) 1–5. doi:10.1103/PhysRevLett.113.228101.

[62] K.J. Tierney, D.E. Block, M.L. Longo, Elasticity and phase behavior of DPPC membrane modulated by cholesterol, ergosterol, and ethanol, Biophys. J. 89 (2005) 2481–2493. doi:10.1529/biophysj.104.057943.

[63] W.X. Ding, X.R. Qi, P. Li, Y. Maitani, T. Nagai, Cholesteryl hemisuccinate as a membrane stabilizer in dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes containing saikosaponin-d, Int. J. Pharm. 300 (2005) 38–47. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.05.005.

[64] M.A.R.B. Castanho, M. Prieto, D.M. Jameson, The pentaene macrolide antibiotic filipin prefers more rigid DPPC bilayers: A fluorescence pressure dependence study, Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. 1419 (1999) 1–14. doi:10.1016/S0005-2736(99)00049-8.

[65] M.L. Briuglia, C. Rotella, A. McFarlane, D.A. Lamprou, Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release, Drug Deliv. Transl. Res. 5 (2015) 231–242. doi:10.1007/s13346-015-0220-8.

[66] H.M. McConnell, A. Radhakrishnan, Condensed complexes of cholesterol and phospholipids, Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. 1610 (2003) 159–173. doi:10.1016/S0005-2736(03)00015-4.

[67] M.C. Phillips, E.G. Finer, The stoichiometry and dynamics of lecithin-cholesterol clusters in bilayer membranes, BBA - Biomembr. 356 (1974) 199–206. doi:10.1016/0005-2736(74)90283-1.

[68] K. Simons, W.L.C. Vaz, Model systems, lipid rafts, and cell membranes., Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 33 (2004) 269–295. doi:10.1146/annurev.biophys.32.110601.141803.

[69] Q. Waheed, R. Tjörnhammar, O. Edholm, Phase Transitions in Coarse-Grained Lipid Bilayers Containing Cholesterol by Molecular Dynamics Simulations, Biophys. J. 103 (2012) 2125–2133. doi:10.1016/j.bpj.2012.10.014.

[70] R.J. Alsop, A. Khondker, J.S. Hub, M.C. Rheinstädter, The Lipid Bilayer Provides a Site for Cortisone Crystallization at High Cortisone Concentrations., Sci. Rep. 6 (2016) 22425. doi:10.1038/srep22425.

[71] S. Kaddah, N. Khreich, F. Kaddah, C. Charcosset, H. Greige-Gerges, Cholesterol modulates the liposome membrane fluidity and permeability for a hydrophilic molecule, Food Chem. Toxicol. (2018). doi:10.1016/j.fct.2018.01.017.

[72] H. Refai, D. Hassan, R. Abdelmonem, Development and characterization of polymer-coated liposomes for vaginal delivery of sildenafil citrate, Drug Deliv. 24 (2017) 278–288.

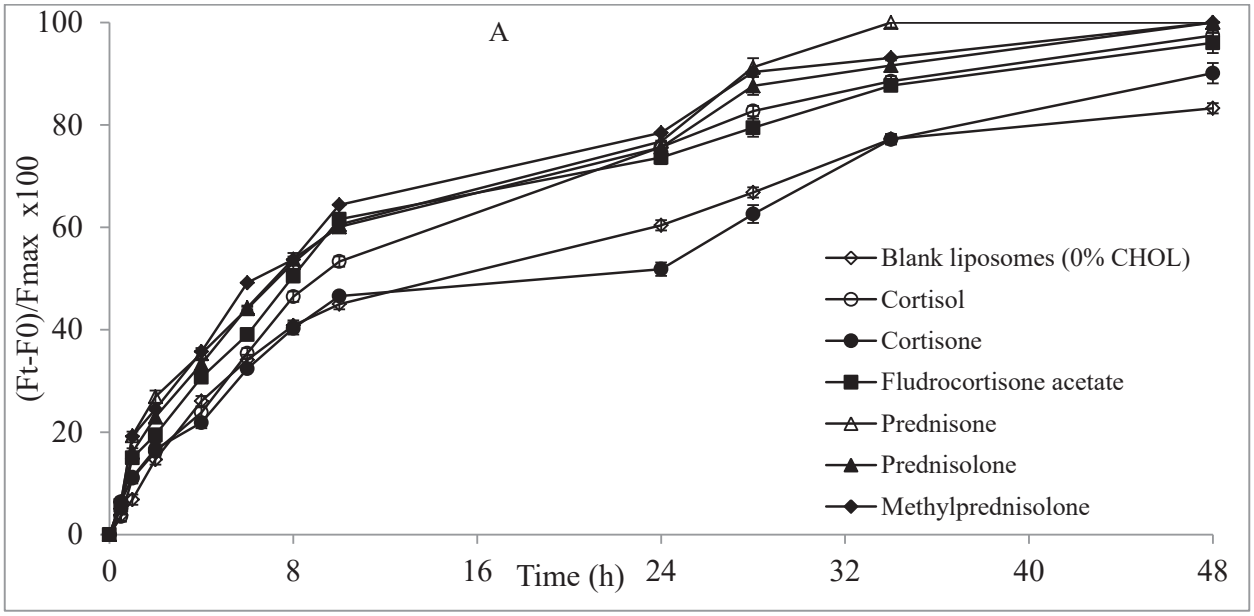
doi:10.1080/10717544.2016.1247925.

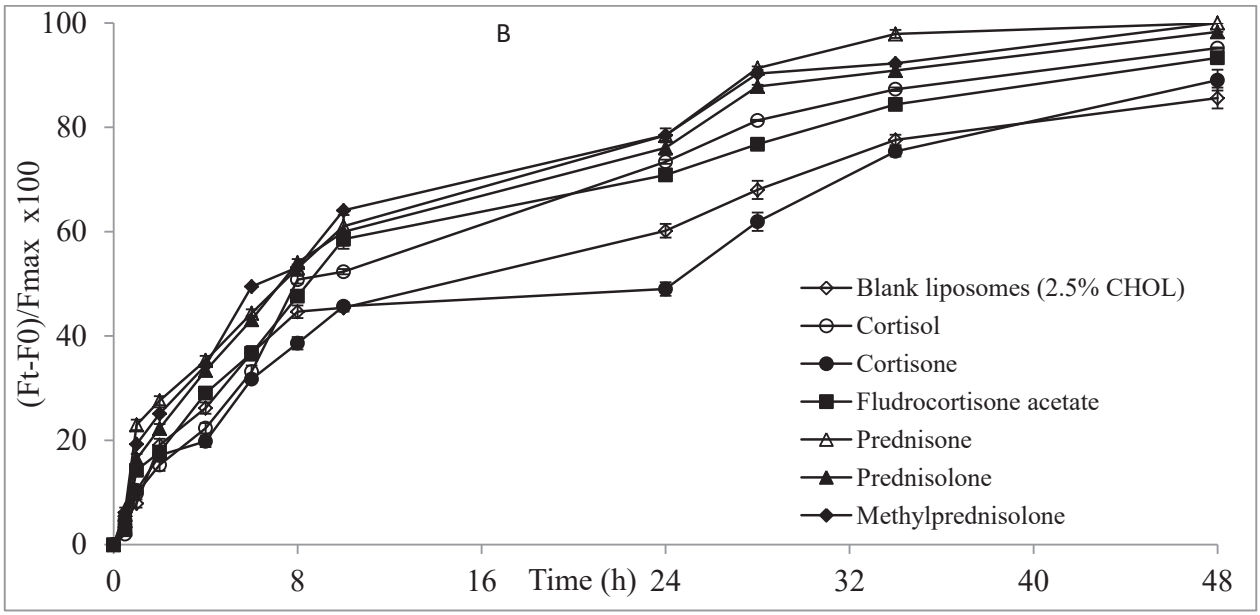
[73] M. Barzegar-Jalali, K. Adibkia, H. Valizadeh, M.R.S. Shadbad, A. Nokhodchi, Y. Omidi, G. Mohammadi, S.H. Nezhadi, M. Hasan, M. Reza, S. Shadbad, Kinetic analysis of drug release from nanoparticles., J. Pharm. Pharm. Sci. 11 (2008) 167–177.

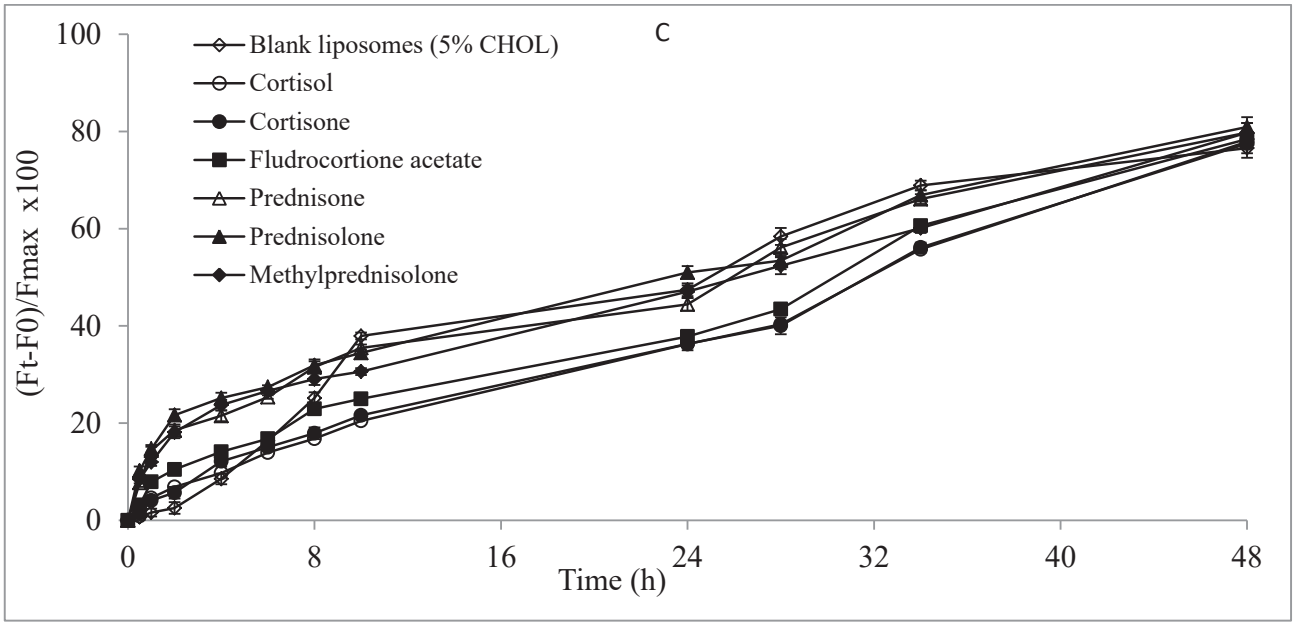
[74] Y. Javadzadeh, F. Ahadi, S. Davaran, G. Mohammadi, A. Sabzevari, K. Adibkia, Preparation and physicochemical characterization of naproxen-PLGA nanoparticles, Colloids Surfaces B Biointerfaces. 81 (2010) 498–502. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.07.047.

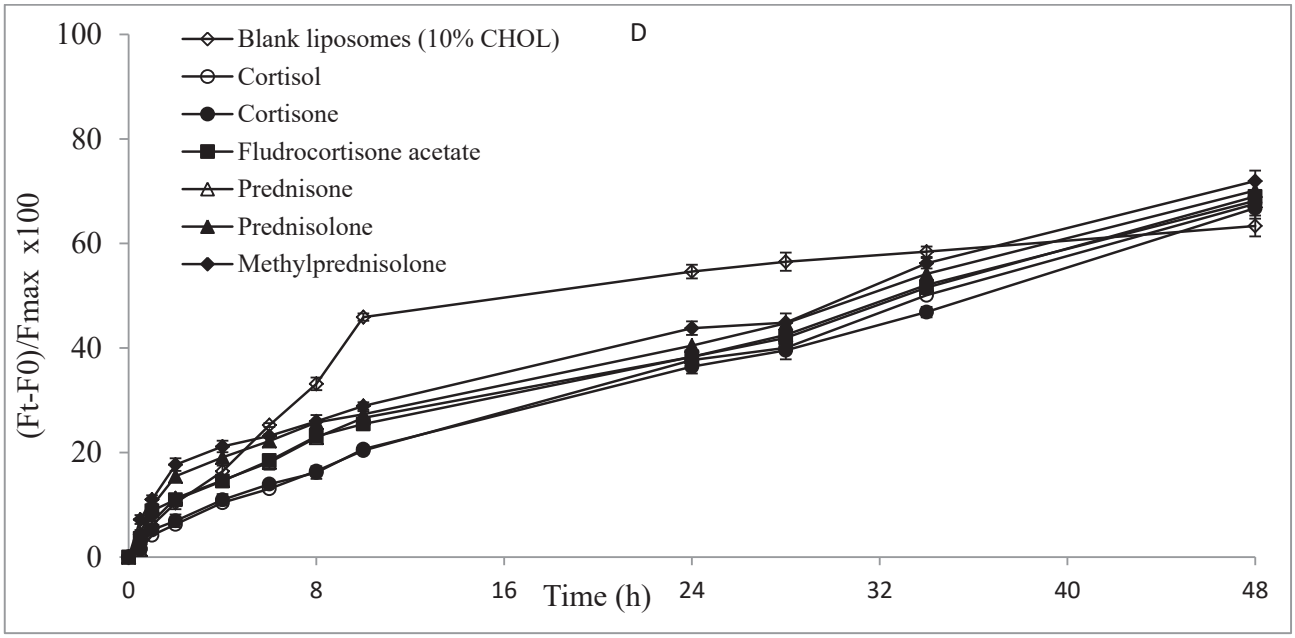
## Supporting information – Article 2

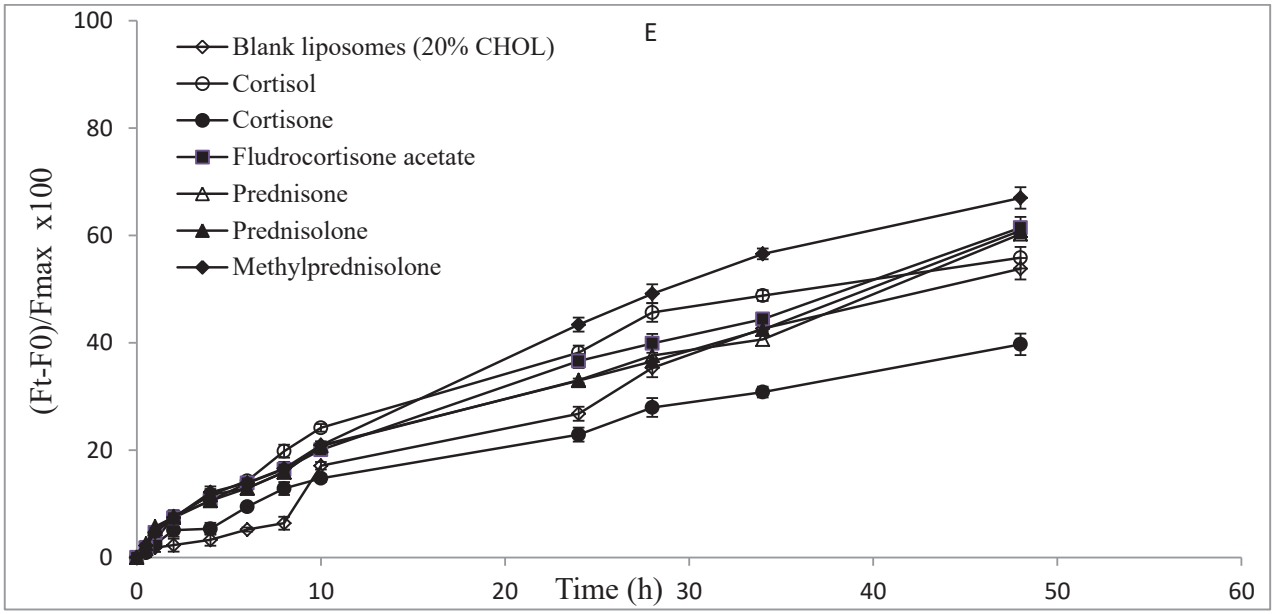
## Supporting information

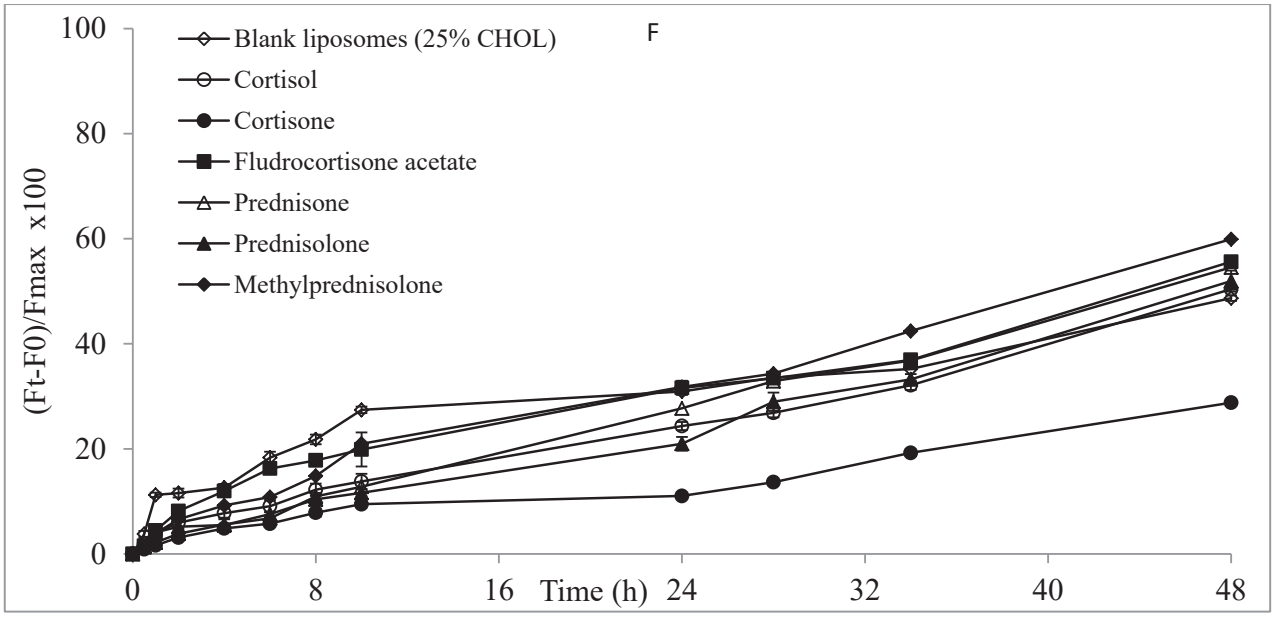


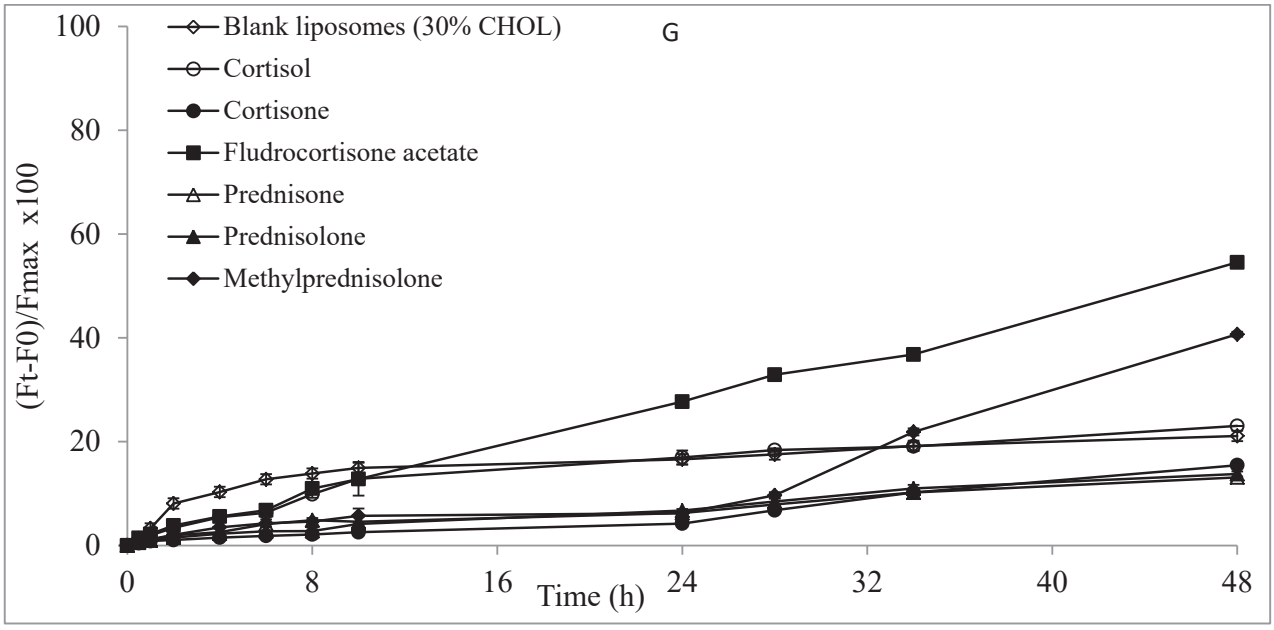



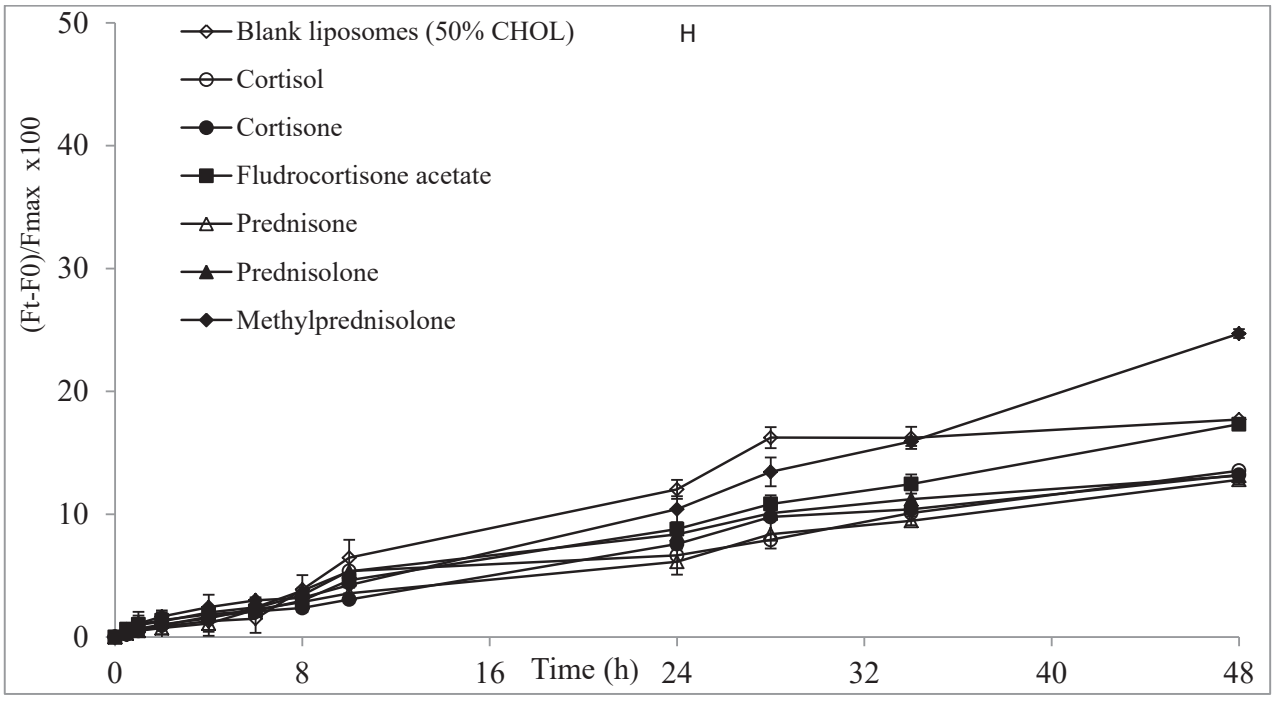

C
Blank liposomes (5% CHOL)
Cortisol
Cortisone
Fludrocortione acetate
Prednisone
Prednisolone
Methylprednisolone
(Ft-F0)/Fmax x100
Time (h)
0
20
40
60
80
100
0
8
16
24
32
40
48


D
Blank liposomes (10% CHOL)
Cortisol
Cortisone
Fludrocortisone acetate
Prednisone
Prednisolone
Methylprednisolone
(Ft-F0)/Fmax x100
Time (h)
0
20
40
60
80
100
0
8
16
24
32
40
48


E
Blank liposomes (20% CHOL)
Cortisol
Cortisone
Fludrocortisone acetate
Prednisone
Prednisolone
Methylprednisolone
(Ft-F0)/Fmax x100
Time (h)
0
20
40
60
80
100
0
10
20
30
40
50
60


F
Blank liposomes (25% CHOL)
Cortisol
Cortisone
Fludrocortisone acetate
Prednisone
Prednisolone
Methylprednisolone
(Ft-F0)/Fmax x100
Time (h)
0
20
40
60
80
100
0
8
16
24
32
40
48


G
Blank liposomes (30% CHOL)
Cortisol
Cortisone
Fludrocortisone acetate
Prednisone
Prednisolone
Methylprednisolone
(Ft-F0)/Fmax x100
Time (h)
0
20
40
60
80
100
0
8
16
24
32
40
48


H
Blank liposomes (50% CHOL)
Cortisol
Cortisone
Fludrocortisone acetate
Prednisone
Prednisolone
Methylprednisolone
(Ft-F0)/Fmax x100
Time (h)
0
10
20
30
40
50
0
8
16
24
32
40
48

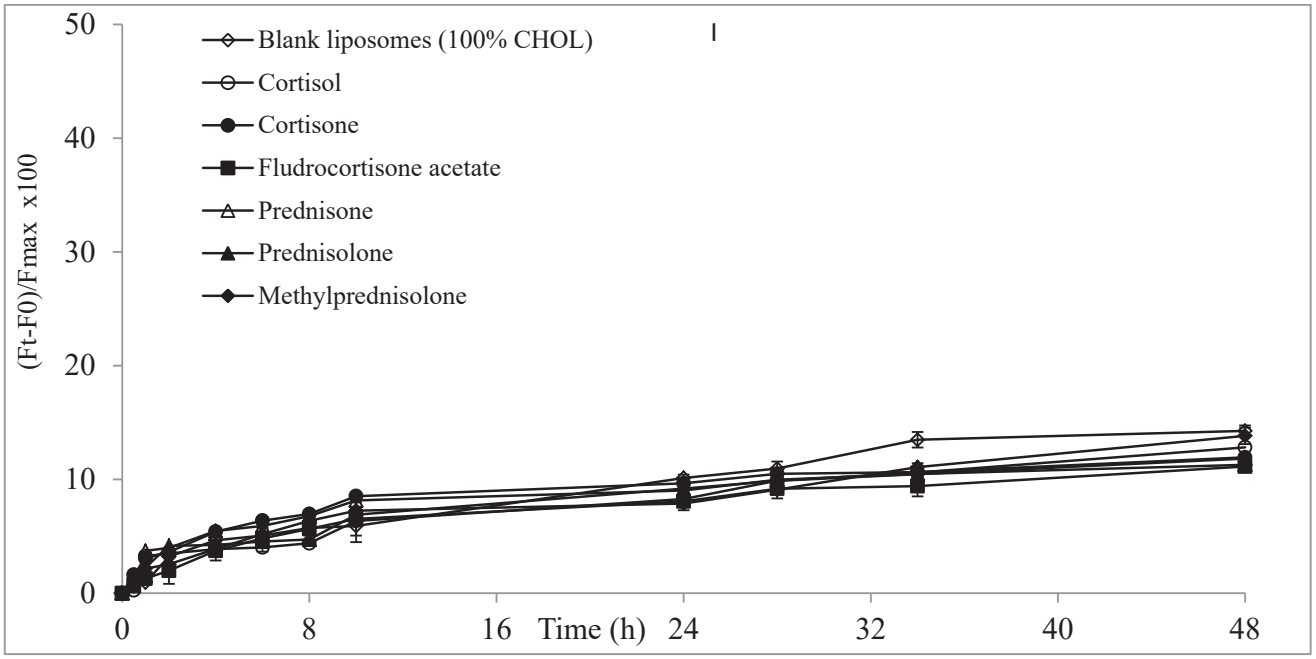



**Fig. S1.** SRB release curves of DPPC liposomes exposed to GRs at 2.5 mol% over 48 h at 37˚C and containing various CHOL%: (A) 0%, (B) 2.5%, (C) 5%, (D) 10%, (E) 20%, (F) 25%, (G) 30%, (H) 50% and (I) 100%.

# Article 3

**Progestogens affect the liposome membrane permeability: an insight into the effect cholesterol content and the period of incubation**

**Samar Kaddah[1,2], Nathalie Khreich[1], Fouad Kaddah[3], Catherine Charcosset[2], Hélène Greige-Gerges[1,*]**

[1] Bioactive Molecules Research Laboratory, Faculty of Sciences, Lebanese University, Lebanon
[2] Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (LAGEP), Université Claude Bernard, Lyon 1, France
[3]École Supérieure d'ingénieurs de Beyrouth, Université Saint Joseph, Beyrouth, Mar Roukoz-Dekwaneh, Lebanon
*Corresponding author: greigegeorges@yahoo.com; hgreige@ul.edu.lb

**<u>En préparation</u>**

**ABSTRACT**

Despite the extensive data on the biological properties of progestogens, few studies are focused on their effect on the physical membrane dynamics. This work aims to investigate the impact of the liposome composition and experimental protocol design on progestogens-modulating membrane permeability. Progesterone (PG), 17- and 21-hydroxyprogesterone (17- and 21-OH PG), medroxyprogesterone (MP), medroxyprogesterone acetate (MPA) and dydrogesterone (DYG) were used in our study at 2.5 mol%. Liposomes composed of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and cholesterol (CHOL) were prepared by reverse phase evaporation technique (REV). The liposomes obtained were compared for the leakage of an encapsulated fluorophore, sulforhodamine B (SRB), in Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing NaCl, from progestogens-loaded liposomes (DPPC:CHOL, 100:100) and from preformed DPPC liposomes (CHOL% 0-100) exposed to progestogens. The SRB biphasic pattern was subjected to Higuchi model. Progestogens-loaded liposomes were characterized for their size and homogeneity, encapsulation efficiency and loading of progestogens, DPPC and CHOL incorporation rates and loading rates. A monodispersed unimodal-Gaussain size distribution was obtained for all formulations with a mean size of 0.4 μm except for those loaded with DYG (0.27 μm). High loading rate and incorporation rate values were obtained for DPPC, CHOL and progestogens (> 78%) while low loading rate values were obtained for PG, 17-OH PG and MPA (< 14%). Permeability studies showed that the CHOL content, structural feature of the drug, the period of incubation and the SRB release curve shape were the critical parameters in analyzing the modulatory effect of drugs on the membrane permeability.

**Keywords: cholesterol, DPPC, Higuchi, permeability, progestogens.**

## Introduction

Progestogens are widely used as contraceptive agents (Micks, Raglan, & Schulkin, 2015), and in hormone replacement therapy (Jiang, Yang, Du, Zhang, & Zhang, 2016) for over two decades. In addition to their well-known genomic action (Mueck, Ruan, Seeger, Fehm, & Neubauer, 2014; Singh, Su, & Ng, 2013), significant extra-reproductive functions are mediated via non-genomic signaling pathways (Kasubuchi et al., 2017; Moussatche & Lyons, 2012). Particular attention is directed towards the ability of progestogens to alter membrane properties. Several works demonstrated that progestogens can modulate the membrane fluidity of natural (Tsuda, Kinoshita, & Nishio, 2002) and synthetic membranes (Korkmaz, Kirbiyik, & Severcan, 2005; Tsuda et al., 2002), the protein secondary structure

of the human serum albumin (Teir, Ghithan, & Darwish, 2011), and the $Ca^{2+}$ levels and ions fluxes (Shchelkunova & Morozov, 2015). Progestogens present a tetracyclic skeleton with 21 carbon atoms. Beyond their paradigmatic role on the reproductive tract, progestogens exhibit immunomodulatory (Hall et al., 2016), neuroprotective (Lei et al., 2014), cardioprotective (Dharwadkar, Chitterusu, Dharwadkar, Chenmarathy, & Dharwadkar, 2017), anti-osteoporosis (Seifert-Klauss & Prior, 2010), and anti-tumorigenic properties (Goncharov et al., 2017; Han, Kim, Kim, Chung, & Song, 2013).

Progesterone (PG) (Fig. 1a) is mainly synthesized in the ovaries, placenta and adrenal glands (Sinreih et al., 2015). Its hydroxylation at C17 position leads to the formation of 17-hydroxyprogesterone (17-OH PG) (Fig. 2b). In early pregnancy, the increase of the maternal levels of 17-OH PG marked the activity of the corpus luteum (Magon & Kumar, 2012). 17-OH PG is considered also as a sensitive predictive marker for diagnosing congenital adrenal hyperplasia (Bello et al., 2017).

21-hydroxyprogesterone (21-OH PG) (Fig. 1c) is known as deoxycorticosterone which differs from PG by a hydroxyl group at C21 position. It's a precursor of aldosterone and possesses mineralocorticoid activity (Hosseinabadi, Vahidi, Nickavar, & Kobarfard, 2015).

In an attempt to avoid the limited progestogenic potency owing to the hepatic first-pass metabolism (Stanczyk et al., 2013), synthetic progestogens are used (Regidor, 2014).

Medroxyprogesterone (MP) (Fig. 1d) is a synthetic progestogen which differs from PG by a methyl group and a hydroxyl group at C6 and C17 positions, respectively. MP is considered as a standard treatment for hot flushes caused by the androgen-suppression therapy for prostate cancer (Irani, Salomon, Oba, Bouchard, & Mottet, 2010).

Medroxyprogesterone acetate (MPA) (Fig. 1e) is a 17-OH PG derivative which differs from PG by a methyl and an acetate group at C6 and C17 positions, respectively. MPA possesses a high progestational activity and bioavailability near to 100% compared to PG, when administered. The depot MPA (DMPA) is the progestin-only injectable used in regions with high HIV-1 prevalence (Huijbregts et al., 2013).

Dydrogesterone (DYG) (Fig. 1f) is an active retroprogesterone which lacks androgenic, estrogenic, anabolic and corticoid properties (Pandya et al., 2016). It differs from PG by a methyl group at C10 in the position α and a C6-C7 double bond. These two structural features improve better bioavailability and higher progestational activity of the main metabolites (20-, 21- and 16-hydroxyderivatives) with lower dose of DYG (10-20 times) as compared to micronized PG (Pandya et al., 2016).

Despite the extensive data on the biological properties of progestogens, limited information was gained on their effects on the physical membrane properties, specifically on the membrane permeability.

On the other hand, the modulatory effect of CHOL on the structural and dynamic properties of synthetic and natural membrane was widely discussed in terms of thickness (Simons & Sampaio, 2011), rigidity

(Najafinobar et al., 2016), stability (Miao et al., 2015), fluidity (Redondo-Morata, Giannotti, & Sanz, 2012), permeability of membranes (Kaddah, Khreich, Kaddah, Charcosset, & Greige-Gerges, 2018), and drug-loading into liposomes (Haeri, Alinaghian, Daeihamed, & Dadashzadeh, 2014). Since steroid hormones are derived from CHOL and possess an identical backbone, they may regulate the membrane properties in a similar way (Oren, Fleishman, Kessel, & Ben-Tal, 2004).

Liposomes, defined as spherical vesicles entrapping both hydrophobic and hydrophilic compounds (Agarwal et al., 2016), are used as biomimetic model membrane systems (Meister et al., 2014).

Recently, our team has studied the interaction of progestogens with CHOL-free DPPC liposomes as a function of drug concentration (Abboud, Charcosset, & Greige-Gerges, 2016). The effect of corticoids on the permeability of DPPC:CHOL liposomes membranes were also investigated (unpublished data).

Carboxyfluorescein, calcein and SRB were the most fluorophores used for monitoring membrane permeability changes (Miranda & Lovell, 2016). In the current study, two approaches were adopted in investigating the effect of CHOL content on the progestogens-modulating membrane permeability.

First, progestogens were added to DPPC:CHOL liposomes containing SRB (CHOL% 0, 2.5, 5, 10, 20, 25, 30, 50 and 100). The progestogen to DPPC molar ratio was of 2.5 mol% (physiological condition). The release kinetics of SRB were studied during 48 h at 37˚C. The SRB release constants were then determined using Higuchi model.

In a second step, progestogens (2.5 mol%) were added during liposome preparations at DPPC:CHOL molar ratios of 100:100, and the SRB release kinetics were carried out during 10 days at 37˚C. These liposomes preparations were characterized for their size and homogeneity by laser granulometry. The loading rate and encapsulation efficiency values of progestogens were determined by HPLC analysis. The CHOL and DPPC incorporation rate and loading rate values were achieved by spectrophotometric methods.

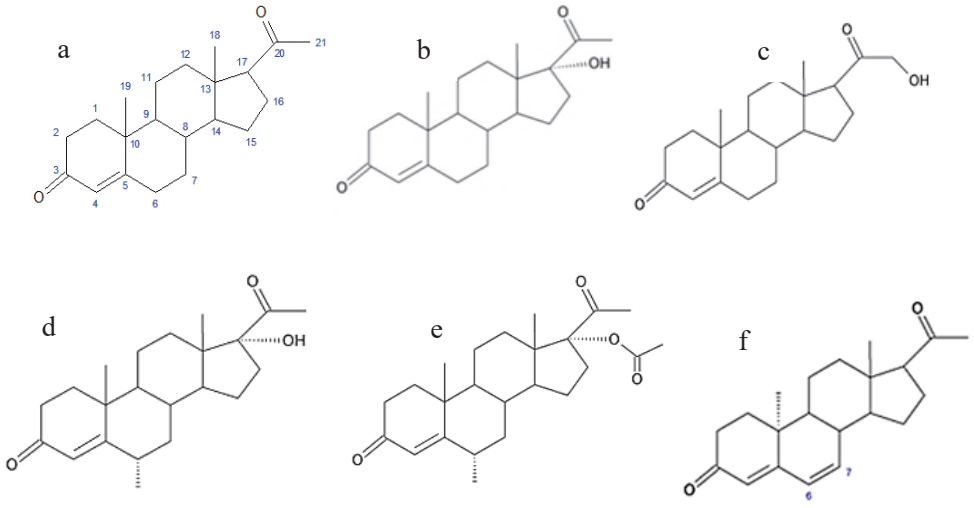


**Fig.1** Structure of progestogens: (a) Progesterone, (b) 17-hydroxyprogesterone, (c) 21-hydroxyprogesterone, (d) medroxyprogesterone, (e) medroxyprogesterone acetate, (f) Dydrogesterone.

## Materials and Methods

### Chemicals

Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) (purity ≥ 99%) was purchased from Lipoid Gmbh, Germany. PG, 17-OH PG, MP and MPA were all purchased from Sigma-Aldrich, China. 21-OH PG was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) while DYG was purchased from European pharmacopoeia Reference Standard, Strasbourg, France. 4-Amino-3-hydroxy-1-naphtalenesulfonic acid was purchased from Fluka Analytical, India. CHOL (purity 99%), ammonium molybdate, sodium sulfite, sodium bisulfite solution, potassium phosphate monobasic, potassium dihydrogenophosphate, hydrogen peroxide solution 30%, SRB (95% content dye), gel sephadex G25 and methanol-HPLC grade were purchased from Sigma-Aldrich, Germany. Triton X-100 and Trizma Base were purchased from Sigma-Aldrich, Switzerland. The organic solvents, chloroform and methanol were from Sigma-Aldrich, France, diethyl-ether was from VWR Chemicals Prolabo, France, while dimethylsulfoxide (DMSO) (purity ≥ 99%) was purchased from Sigma-Aldrich, Japan. Cholesterol FS Kit was purchased from DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Germany.

### Preparation of liposomes

Two protocols were used for the preparation of liposomes. The first experimental protocol design consisted of exposing the preformed DPPC liposome membrane to a series of progestogens with varying the CHOL content from 0 to 100%. The second protocol consisted of adding the progestogens during the liposome preparation (DPPC:CHOL molar ratio of 100:100). Progestogen to DPPC molar ratio was of 2.5%.

### Preparation of SRB-loaded liposomes and exposed to progestogens

Liposomes were prepared by reverse phase evaporation technique. 25 μmol of DPPC was dissolved in 5 ml of a mixture of organic solvents: chloroform, diethyl-ether and methanol (6:6:1, v:v:v) (Khreich et al., 2008). The liposomal suspension was sonicated (Sonicator starsonic 35) for 1 min at 60˚C under

nitrogen stream to avoid lipid oxidation. 0.75 ml of SRB solution (150 mM) prepared in 0.1 M tris-HCl buffer (pH 7.4) was added to the mixture followed by a sonication of the solution for 6 min at 60˚C under nitrogen stream. The organic solvents were removed at 45˚C using a rotary vacuum evaporator (Heidolph, Germany). A dark purple lipid film was obtained, and 1.5 ml of SRB solution was added followed by a sonication for 5 min at 60˚C under a nitrogen stream. SRB was added to ensure its loading upon reconstitution of liposomes during evaporation and/or sonication steps. The liposomal suspension was stored at 4˚C until use.

The same protocol was used for the preparation of DPPC liposomes at various CHOL content. A stock solution of CHOL was prepared in chloroform (25 mg/ml) and aliquots were added to DPPC vesicles before the first sonication at CHOL to DPPC molar percentage of 2.5, 5, 10, 20, 25, 30, 50 and 100%. Three batches were prepared for each formulation.

The SRB-loaded liposomes were then exposed to progestogens. Stock solutions of progestogens were prepared in methanol (2.5 mg/ml), and aliquots were added to the above-mentioned SRB-loaded liposomes to obtain progestogen to DPPC percentage of 2.5. The percentage of methanol was lower than 4%. The same percentage was added for blank liposomes. The obtained liposomes suspensions were compared for the leakage of SRB during 48 h.

**Preparation of progestogens-loaded liposomes with and without SRB**

Following the above-described protocol, liposomes were prepared with the exception that the SRB solution was replaced by tris-HCl buffer. Equimolar mixture of DPPC (25 µmol) and CHOL (25 µmol) was used (CHOL 100%). Aliquots from progestogen stock solution were added before the first sonication and the progestogen percentage was of 2.5%. Three batches were prepared for each formulation and analyzed for liposome content (encapsulation efficiency and loading rate of progestogens, DPPC and CHOL incorporation rates and loading rates) as detailed below.

**Extrusion of liposomes**

All liposomes suspensions containing or not SRB, were incubated in a 60˚C water bath for 35 min and then extruded using an “Avanti” mini-extruder (Avanti Polar Lipids, Switzerland) five times through a 1 µm polycarbonate membrane, followed by five times through a 0.4 µm membrane.

After extrusion, the liposomes suspensions prepared in the absence of SRB were diluted with tris-HCl buffer (0.1 M; pH 7.4) and used for liposome characterization (loading rate and encapsulation efficiency of progestogens, DPPC and CHOL incorporation rates and loading rates).

The SRB-loaded liposomes were centrifuged at 21,400 g for 1 h at 4˚C to eliminate the excess buffer. The pellets were suspended with a small volume of tris-HCl buffer containing NaCl (150 mM) then purified from unloaded molecules by molecular sieve chromatography using sephadex G25 column. They were stored at 4˚C until use for membrane permeability study.

**Characterization of blank and progestogens-loaded liposomes**

**Vesicle size analysis**

The liposomes particle size was analyzed by laser granulometry (Partica-LA-950V2 Laser Diffraction Particle Size Distribution Analyzer, Horiba, Japan) that allowed the detection of particles from 0.01 µm to 3000 µm. The span factor, which is the width of the liposome size distribution, was determined as a measure of homogeneity (Essa, 2010). This parameter was calculated by the following equation (Nasr, Taha, & Hathout, 2013):

Span = $\frac{d90 - d10}{d50}$ Equation (1)

where $d_{10}$, $d_{50}$ and $d_{90}$ were the diameters at 10%, 50% and 90% of the cumulative intensity, respectively. If the span factor < 0.4, the size distribution was considered to be monodispersed (Hamishehkar et al., 2015).

The size particle and span values were expressed as the means of three different measurements ± standard deviation.

**Separation of free and incorporated compounds (progestogen, cholesterol and phospholipid)**

An aliquot from the liposomal suspension was diluted 5 times in tris-HCl buffer (0.1 M, pH 7.4) and was placed in a filtrate tube (vivaspin 500 centrifugal concentrators (Sartorius Stedium Biotech, Germany, MW cut-off = 1000 Da)). It underwent centrifugation at 21,400 g for 1 h at 4˚C. The filtrate was used to determine the concentration of unloaded phospholipids, cholesterol and progestogen.

Also, aliquots from liposomes suspensions were sonicated for 10 min at 25˚C to ensure the liposome membrane lysis and the release of encapsulated compounds. This allowed the determination of total concentration of each molecule (DPPC, CHOL and progestogen) in the liposome suspension.

**Determination of encapsulation efficiency of progestogens by HPLC**

Stock standard solutions of progestogens (1 mg/ml) and of the internal standard, 17-OH PG (1 mg/ml) were prepared in DMSO. Diluted solutions were then prepared in ultrapure water (0.15 to 100 µg/ml). Diluted solution of 17-OH PG (100 µg/ml) was prepared in water.
100 µl of progestogen standard solution, liposomal suspension or liposomal filtrate (100 µl) were added to 17-OH PG (100 µl) and methanol (200 µl). The samples were analyzed by HPLC using an analytical column C18 (15 cm x 4.6 mm, 5 µm (Supelco, USA)). The mobile phase was a mixture of methanol and water (70/30). The flow rate was set at 1 ml/min, and the detection was measured at 254 nm.

The encapsulation efficiency of progestogen was calculated as follows:

$$EE\ (\%) = \frac{[Progestogen]Total - [Progestogen]Free}{[Progestogen]Total} \times 100 \quad \text{Equation (2)}$$

The encapsulation efficiency was determined in triplicate for each preparation.

**Determination of the loading rate of progestogens**

The loading rate (LR) was calculated according to the following formula:

$$\text{Loading rate}\ (\%) = \frac{Incorporated\ mass\ of\ progestogen\ into\ liposomes}{Initial\ mass\ of\ progestogen} \times 100 \quad \text{Equation (3)}$$

The incorporated mass of progestogen was obtained by subtracting the mass of free progestogen (determined in the liposomal filtrate) from that initially added to the organic phase during liposome preparation.

**Determination of cholesterol incorporation rate and loading rate**

An enzymatic colorimetric assay based on the formation of the colorimetric indicator quinoneimine in the presence of phenol and peroxidase was applied using cholesterol FS kit. 1000 µl of the standard kit were added to the filtrate or the sonicated samples (10 µl). The incubation was carried out for 20 min at room temperature. Then, the absorbance was read at a wavelength of 500 nm. Based on a calibrator

concentration of 1 mg/ml and an absorbance of 0.121, the concentration of cholesterol was determined as follows:

$$[\text{Cholesterol}] = \frac{Absorbance\ of\ sample}{Absorbance\ of\ calibrator} \text{ x } [calibrator]$$

The cholesterol incorporation rate was then calculated by the following equation:

$$\text{CHOL incorporation rate (\%)} = \frac{[Cholesterol]Total - [Cholesterol]Free}{[Cholesterol]Total} \text{ x 100 Equation (4)}$$

The loading rate of CHOL was determined as follows:

$$\text{Loading rate (\%)} = \frac{Incorporated\ mass\ of\ CHOL\ into\ liposomes}{Initial\ mass\ of\ CHOL} \text{ x 100 Equation (5)}$$

**Determination of phospholipid incorporation rate and loading rate**

Free and total amount of phospholipids were determined by Bartlett's method (Bartlett 1959), according to the procedure described previously (Habib et al., 2013). The incorporation rate of DPPC was calculated according to the following formula:

$$\text{DPPC incorporation rate (\%)} = \frac{[DPPC]Total - [DPPC]Free}{[DPPC]Total} \text{ x 100 Equation (6)}$$

The loading rate of DPPC was also determined as follows:

$$\text{Loading rate (\%)} = \frac{Incorporated\ mass\ of\ DPPC\ into\ liposomes}{Initial\ mass\ of\ DPPC} \text{ x 100 Equation (7)}$$

The measurements were performed in triplicate.

**Permeability study**

**Preparation of liposomes suspensions for fluorescence measurements**

The suspensions of SRB-loaded liposomes were diluted in tris-HCl buffer (0.1 M; pH 7.4) containing NaCl (150 mM) to obtain absorbance values of 1.0. They were then used for SRB release kinetics. Chen et al. (1988) reported that SRB when encapsulated at high efficiency forms dimers, and exhibited an absorption spectrum with two peaks at 532 and 568 nm (70% of the height of the 532 nm peak) for loaded- and free-SRB, respectively. The optical density measurements were determined using a

spectrophotometer (Nicolet evolution 300 Thermoelectron, England). The diluted batches were used for fluorescence measurements.

**SRB release kinetics**

Permeability study was carried out at 37˚C by monitoring the release of SRB from blank and progestogens-loaded liposomes over time as well as from preformed liposomes exposed or not to progestogens (2.5 mol%). A high concentration of encapsulated SRB in liposomes led to self-quenching. The release of SRB from vesicles led to an increase in the fluorescence signal. Fluorescence measurements were performed using a spectrofluorometer (Thermo Spectronic, Aminco Bowman Series 2, USA). The fluorescence signal was measured at an excitation wavelength of 535 nm. The emission spectra were recorded in the range of 540-700 nm. The release of SRB from vesicles is calculated according to the formula:

Release SRB (%)= $\frac{Ft - F0}{Fmax}$ x 100 Equation (8)

where $F_t$ was the fluorescence of the suspension at time t, $F_0$ was the initial fluorescence measured at time $t_0$ and $F_{max}$ was the maximal fluorescence achieved by the addition of buffer containing Triton X-100 (1%) that ensured the total release of SRB from vesicles.

**Kinetic modeling of SRB release profiles**

The apparent release constants were determined by fitting the SRB release kinetics data into the Higuchi diffusion-controlled model expressed by the following equation (Higuchi, 1963):

$Q = K_H \text{ x } t^{1/2}$ Equation (9)

where $Q$ corresponded to the percentage of released SRB in the medium at time t and $K_H$ was the Higuchi release constant.

**Statistics**

To assess significant differences between values, statistical analysis was carried out using the Student's t-test. A P value < 0.05 was considered statistically significant.

## Results and discussion

### Liposome size and span analysis

The mean size distribution of blank and progestogens-loaded liposomes was determined by laser granulometry after extrusion and separation on sephadex G25 column respectively. The liposome size distribution for the progestogens-loaded liposomes was presented in Fig.2.

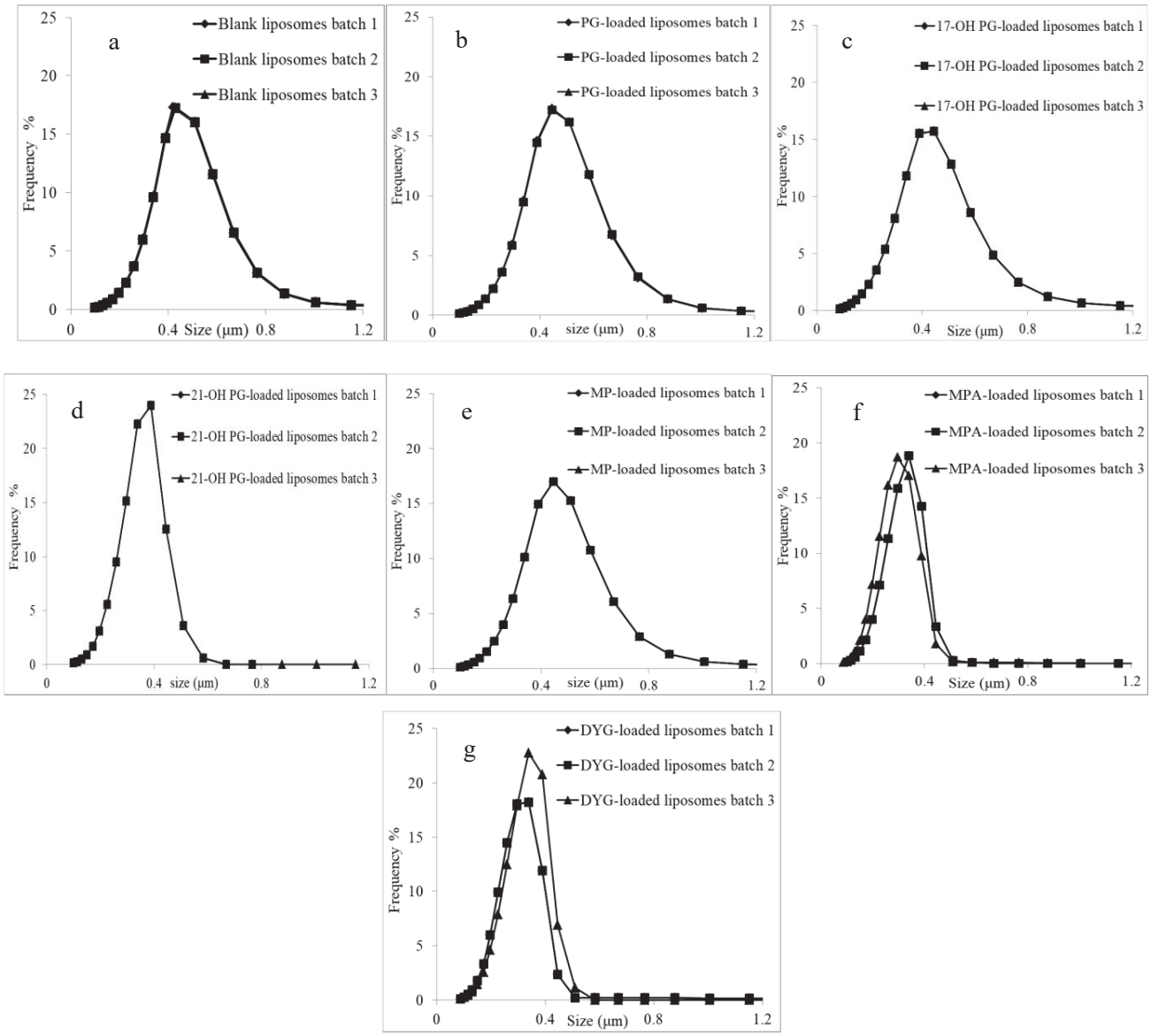



**Fig.2** Liposome size distribution determined by laser granulometry of blank and progestogens-loaded liposomes at 2.5 mol%. (a) blank liposomes, (b) PG-, (c) 17-OH PG-, (d) 21-OH PG-, (e) MP-, (f) MPA-, (g) DYG-loaded liposomes. Measurements were performed on three different batches.

Blank liposomes (Fig. 2a) have a mean diameter equal to 0.42 ± 0.00 µm. Compared to blank liposomes, progestogens-loaded liposomes showed a unimodal-Gaussian size distribution with a mean particle size varying between 0.27-0.41 µm which was closed to the pore size of the last membrane they were extruded through (0.4 µm) (Fig.2 b, c, d, e and f), except for DYG-loaded liposomes (Fig. 2g) exhibiting a slight reduction in the liposome size distribution (0.27 µm). The liposome mean size values were outlined in Table 1. The slight variation in the liposome size distribution could be due to the processing parameters as the sonication and extrusion (Ong, Chitneni, Lee, Ming, & Yuen, 2016; Soema, Willems, Jiskoot, Amorij, & Kersten, 2015). Among the various progestogens, the variation in the liposome size distribution was noticeable with DYG ($P < 0.05$). Its bent shape owing to the inverted configuration at C9 and C10 and the additional double bond (C6-C7) constricted the molecule into a rigid conformation (Colombo, Ferraboschi, Prestileo, & Toma, 2006). These structural features could promote a rearrangement of the lipid membrane leading to a decrease in the liposome size distribution.

**Table 1**

Mean size distribution and span values of progestogens-loaded liposomes prepared at a molar ratio of DPPC:CHOL:progestogen of 100:100:2.5 and determined by laser granulometry

| Progestogens-loaded liposomes | Size (µm) | Span value |
|---|---|---|
| Blank | 0.42 ± 0.00 | 0.40 ± 0.00 |
| Dydrogesterone | 0.27 ± 0.03* | 0.34 ± 0.17 |
| 17-hydroxyprogesterone | 0.39 ± 0.00 | 0.35 ± 0.00 |
| 21-hydroxyprogesterone | 0.33 ± 0.00 | 0.35 ± 0.00 |
| Medroxyprogesterone | 0.41 ± 0.01 | 0.32 ± 0.00 |
| Medroxyprogesterone acetate | 0.32 ± 0.00 | 0.36 ± 0.12 |
| Progesterone | 0.41 ± 0.06 | 0.38 ± 0.00 |

Values are expressed as the mean of three different measurements ± SD
*$P < 0.05$ compared with the blank liposomes value

In addition, the width of liposome size distribution expressed by the "span factor" was calculated according to Equation (1), and the span values were listed in Table 1. Span factor is a good indicator of the uniformity of the liposome preparation (Mehanna, El-Kader, & Samaha, 2017). Blank liposomes have a span value of 0.40 ± 0.00. Compared to blank liposomes, there was no significant effect ($P > 0.05$) of progestogens (2.5 mol%) on the width of the liposome size distribution, and the span values varied between 0.32-0.38 . According to literature, the size distribution was considered as narrow or monodispersed for span values < 0.4 (Guo, Quan, Fang, Cun, & Yang, 2015; Zhou, Liu, Zhang, & Fan, 2012). This indicated that progestogens loaded at 2.5 mol% did not alter the homogeneity of the liposomes suspensions.

**Determination of liposome composition**

**Phospholipids incorporation rate and loading rate**

By using Bartlett's method, the concentration of free and total phospholipid in the liposome suspension was determined according to a calibration curve (y = 2.114x – 0.0604) with a correlation coefficient of 0.999. The incorporation rate of DPPC was calculated according to Equation (6). Our results exhibited a high incorporation rate of phospholipids (> 95%) (Table 2) in blank liposomes as well as in the progestogens-loaded liposomes, as the concentration of DPPC found in the filtrate represents less than 5% except for 21-OH PG-loaded liposomes where the incorporation rate of DPPC was about 89%. The incorporation of DPPC into liposomes was not altered by the progestogens loaded at 2.5 mol%.

The loading rate of DPPC was also determined according to Equation (7). LR values for blank liposomes were 76.63 ± 0.15% which were similar to our previous data (unpublished data). Compared to blank liposomes, DPPC was incorporated at high efficiency in the presence of progestogens, and values varied between 80 and 97% (Table 2). We assume that the incorporation of DPPC into liposomes was promoted by the progestogens.

**Table 2**

Liposomes composition (DPPC:CHOL:progestogen 100:100:2.5): incorporation rates and loading rate values of DPPC and cholesterol, encapsulation efficiency and loading rate values of progestogens.

| Progestogens-loaded liposomes | Incorporation rate of DPPC | Loading rate of DPPC | Incorporation rate of CHOL | Loading rate of CHOL | EE (%) of progestogens | LR (%) of progestogens |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Blank | 95.95 ± 0.48 | 76.63 ± 0.15 | 98.82 ± 0.95 | 99.36 ± 0.45 | | |
| Dydrogesterone | 98.10 ± 0.10 | 91.67 ± 0.17 | 93.85 ± 0.05 | 92.65 ± 0.34 | 94.22 ± 0.27 | 69.25 ± 3.80 |
| 17-hydroxyprogesterone | 98.67 ± 0.52 | 85.00 ± 0.04 | 96.00 ± 0.00 | 90.67 ± 0.05 | 85.44 ± 6.00 | 14.80 ± 3.21 |
| 21-hydroxyprogesterone | 89.61 ± 0.37 | 80.00 ± 0.27 | 96.00 ± 0.00 | 93.26 ± 0.00 | 99.70 ± 0.23 | 60.09 ± 5.58 |
| Medroxyprogesterone | 98.97 ± 0.67 | 80.32 ± 0.40 | 96.00 ± 0.00 | 100.00 ± 0.00 | 100.00 ± 0.00 | 48.00 ± 0.00 |
| Medroxyprogesterone acetate | 98.36 ± 0.12 | 97.27 ± 0.05 | 96.00 ± 0.00 | 100.00 ± 0.00 | 78.18 ± 0.88 | 4.60 ± 0.00 |
| Progesterone | 99.80 ± 0.20 | 90.84 ± 0.11 | 95.00 ± 0.52 | 92.65 ± 0.00 | 98.24 ± 0.80 | 11.33 ± 0.85 |

Values are expressed as the mean of three different preparations ± SD.

**Cholesterol incorporation rate and loading rate**

As for phospholipids, the incorporation rate of CHOL was calculated according to Equation (4). The enzymatic colorimetric assay revealed a high incorporation rate of CHOL into liposomes (> 93%). Similarly, a high loading rate of CHOL (> 90%) was obtained (Table 2), and the incorporation of CHOL into liposomes was not altered by the loaded progestogens at 2.5 mol%.

Our results were in agreement with our previous data exhibiting a high incorporation rate of DPPC and CHOL into corticoids-loaded liposomes where these latters also enhanced DPPC and CHOL incorporation (unpublished data).

**Progestogens incorporation**

The progestogen concentration in the liposomal suspension ($[Progestogen]_{Total}$) as well as in the filtrate ($[Progestogen]_{Free}$) was determined by HPLC analysis. The retention time values of 17-OH PG used as an internal standard, and those of the other progestogens were listed in Table 3. The calibration curves were then constructed by plotting the progestogen/17-OH PG area ratio against the concentration of progestogen in (µg/ml). The linear relationships were evaluated by regression analysis with the least-squares methods and the correlation coefficient values were ranged between 0.997-0.999. The equations were used to calculate the progestogen concentration in order to determine the encapsulation efficiency and loading rate values of progestogens into liposomes.

**Table 3**

Retention times and calibration curves of progestogens with their correlation coefficients determined by HPLC

| Progestogens | Retention time (min) | Calibration curve | Correlation coefficient |
|---|---|---|---|
| Dydrogesterone | 8.64 ± 0.00 | 0.005x - 0.044 | 0.999 |
| 17-hydroxyprogesterone | 7.00 ± 0.01 | 0.025x - 0.002 | 0.998 |
| 21-hydroxyprogesterone | 5.14 ± 0.01 | 0.013x + 0.001 | 0.998 |
| Medroxyprogesterone | 8.75 ± 0.00 | 0.001x - 0.006 | 0.998 |
| Medroxyprogesterone acetate | 9.68 ± 0.00 | 0.011x - 0.006 | 0.998 |
| Progesterone | 10.88 ± 0.01 | 0.023x + 0.020 | 0.997 |

Table 2 showed that the progestogens were highly encapsulated into liposomes and the EE% values were above 85% except for formulations loaded with MPA where EE values were 78%. Our results were in accordance with our previous data on the high entrapment of corticoids into DPPC liposomes

(CHOL% 100) (unpublished data). The large amount of CHOL did not affect the encapsulation efficiency of progestogens except for MPA. By using the differential scanning calorimetry technique, it has been demonstrated that the addition of PG and PG derivatives to DPPC liposomes at 2.5 mol% abolished the pre-transition peak meaning that progestogens interact with the polar head groups of phospholipids (Abboud, Greige-Gerges, & Charcosset, 2015). This may explain the high encapsulation efficiency of progestogens into liposomes. The effect of the chemical structure on the encapsulation efficiency of progestogens cannot be excluded. From our findings, MPA showed the lowest encapsulation efficiency and loading rate values among the studied progestogens (Table 2). It seems that the acetate function in MPA produced a steric effect prohibiting its entrapment into liposomes.

Another study conducted by Subramanian et al. (2016) demonstrated a high encapsulation efficiency of beclomethasone dipropionate (BDP) (a GR that differs from PG by a double bond at C1-C2, a chlorine group at C9, a hydroxyl group at C11 and propionyl groups at C17 and C21) into soya phosphatidylcholine:CHOL system at a molar ratio of 1:1 (Subramanian et al., 2016). 81% of BDP was encapsulated into liposomes when CHOL was incorporated in the formulation prior to extrusion compared to CHOL-free batches (31%). This is in agreement with our results showing a high encapsulation efficiency of progestogens into DPPC:CHOL liposomes (1:1).

The loading rate of progestogens into liposomes was also determined according to Equation (3), and it was found that MP, 21-OH PG and DYG were highly loaded with LR values of 48, 60 and 69%, respectively. Low LR values were found for MPA, PG and 17-OH PG and values were of 4, 11 and 14%, respectively. The low LR value of 14% obtained for 17-OH PG might be explained by the possible intramolecular hydrogen bond between the hydroxyl group at C17 and the carbonyl function at C20, depleting its loading into liposomes. In addition, MPA showed the lowest LR among the studied progestogens, suggesting again the role of the acetate group in preventing an efficient loading into liposomes. The localization and/or the orientation of the drug within the lipid bilayer cannot be excluded in affecting its loading also.

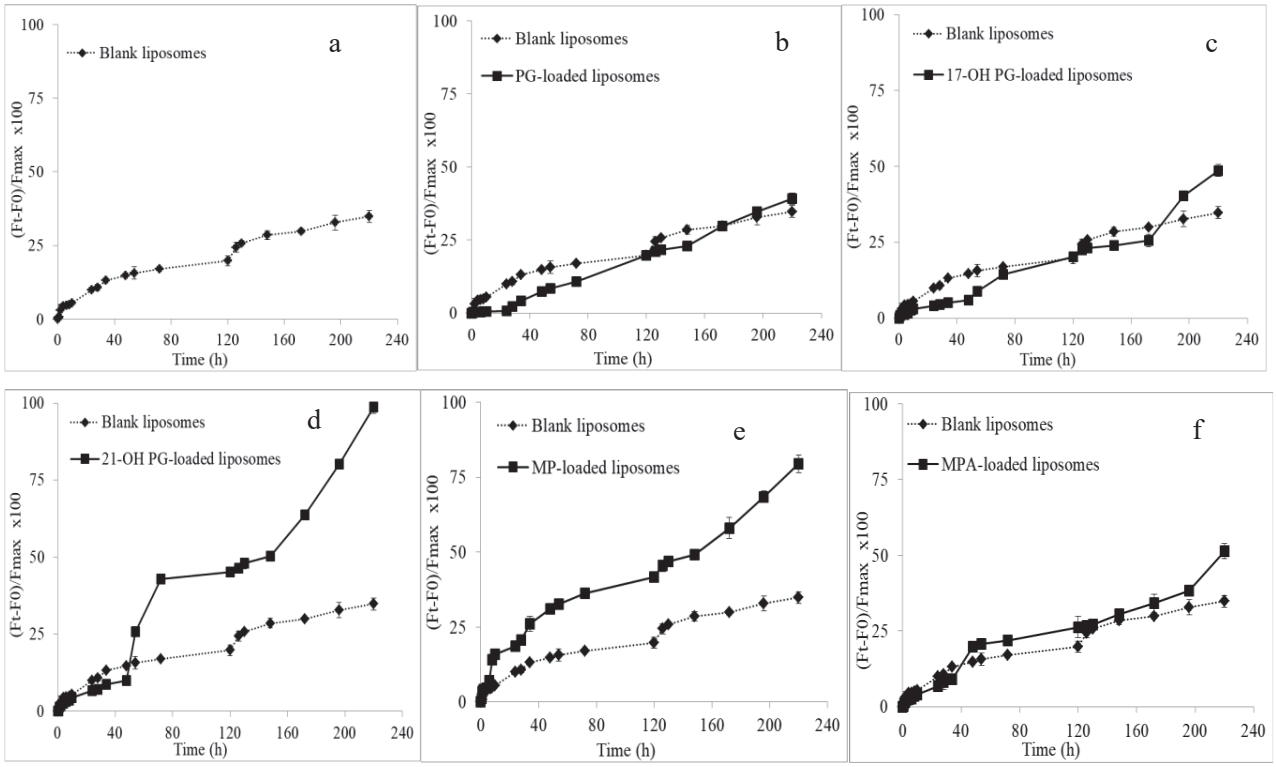
**Permeability study**

Liposomes were prepared by reverse phase evaporation (REV) technique in order to obtain large unilamellar vesicles. LUVs are the most suitable models for permeability studies where the distribution of lipids between the outer and inner leaflets is close to 1:1 (Cullis, Fenske, & Hope, 1996), and their large aqueous core are suitable for the high loading of hydrophilic molecules (Khreich et al., 2008). In

our work, the SRB release kinetics were studied over 10 days for progestogens-loaded liposomes prepared at a DPPC:CHOL molar ratio of 100:100. Also, the SRB release from preformed liposomes at various CHOL content (from 0 to 100%) and exposed to progestogens was followed over 48 h. In all experiments, the progestogen to DPPC molar ratio was of 2.5.

**Release kinetics of SRB from progestogens-loaded liposomes**

Although the stoichiometry of the phospholipid:cholesterol system is still a matter of debate, 1:1 or 2:1 are considered to be the most widely used DPPC:CHOL molar ratios (Briuglia, Rotella, McFarlane, & Lamprou, 2015). As the DPPC:CHOL molar ratio of 1:1 is known to be stable in water (Collins & Phillips, 1982) and considered as a "long-lived" complex (Phillips & Finer, 1974), it was used for our set of experiments. The permeability study of progestogens-loaded liposomes was carried out at 37˚C over 10 days. The fluorescence values were determined by using the equation (8). The SRB release kinetics of blank and progestogens-loaded liposomes were presented in Fig.3.



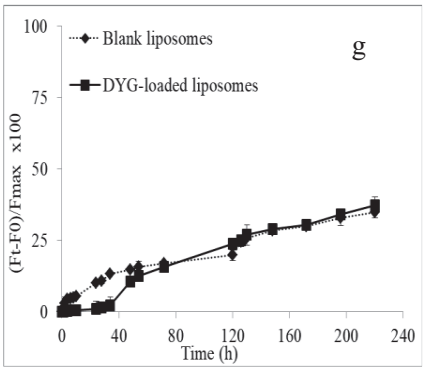



**Fig.3** The $(F_t\text{-}F_0)/F_{max}$ x100 variation over 10 days at 37˚C for progestogens-loaded liposomes prepared at DPPC:CHOL:progestogen molar ratio of 100:100:2.5. (a) blank, (b) PG-, (c) 17-OH PG-, (d) 21-OH PG-, (e) MP-, (f) MPA-, (g) DYG-loaded liposomes. $F_t$ is the intrinsic fluorescence at time t, $F_0$ is the initial fluorescence at time $t_0$, and $F_{max}$ is the maximal fluorescence after the solubilisation of liposomes by Triton X-100 (1%). Values are expressed as the mean of three independent release kinetics ± SD.

Among the various progestogens, DYG (Fig. 3g) seems to have the most decreasing effect on the membrane permeability comparing to blank liposomes. This decreasing effect was noticeable for the first hours of incubation (up to 48 h). At 48 h, a slight increase in SRB release occurred but was always lower than that of blank liposomes (17%).

The others progestogens (Fig. 3b, c, d, g) showed all a decreasing effect on the membrane permeability in the first 48 h with SRB release lower than 10%, while MPA (Fig. 3f) showed a slight increase in fluorescence after 48 h (21%), reflecting a weak permeability effect even after 220 h with SRB release of 51%.

On the other hand, MP (Fig. 3e) induced a strong increase in the SRB release kinetics which is in contrast with all others progestogens. From the very first hours of incubation, it showed a high SRB release of 31% and 36% at 48 and 72 h, respectively, and this increase was sustained throughout all the incubation time leading to 79% of SRB release after 220 h.

Interestingly, 21-OH PG (Fig. 3d) produced a prompt increase in the release of SRB after 48 h reaching 42% at 72 h. The SRB release from 21-OH PG-loaded liposomes was fast, showing a strong permeability effect on the membrane with a total release of SRB after 220 h. At this time, all progestogens were able to permeabilize the bilayer permeability in the following order: 21-OH PG > MP > MPA >17-OH PG > PG > DYG, and the percentage of released SRB was 98, 79, 51, 48, 39 and 37%, respectively.

From these results, we assume that the presence of all progestogens, with the exception of MP, had different effect on the membrane permeability depending on the incubation time.

In fact, they share all a more accentuated decreasing effect on membrane permeability in the first hours of incubation. This effect was sustained for DYG, PG and 17-OH PG, and was reversed for MPA and 21-OH PG.

It is well established that when CHOL is incorporated at high content, it induces a condensing and ordering effect due to a reducing in the cross-sectional area per molecule (McConnell & Radhakrishnan, 2003; Ohvo-Rekila, 2002; Saito & Shinoda, 2011). This is also accompanied with the emergence of nanodomains enriched in CHOL, known as raft domains (Javanainen, Martinez-Seara, & Vattulainen, 2017; Saito & Shinoda, 2011; Waheed, Tjörnhammar, & Edholm, 2012), leading to a packed and rigid bilayer structure. At short time of incubation, it seems that progestogens promote the condensing effect of CHOL, and this translated by a decrease in the membrane permeability compared to blank liposomes.

In contrast, the presence of MP could disrupt the lipid packing from the early hours leading to an increase in the lipid membrane permeability. According to literature, raft domains are transient entities with a short life time destabilizing the lipid structure organization. We assume that the drug-modulating bilayer properties is strongly related, from one hand to the bilayer organization at a specific incubation time, and from the other hand to the structural feature of the drug. This latter criterion could be a main factor in modulating the membrane physical properties.

For hydroxylated progestogens, it seems that the position of the hydroxyl group plays an important role in affecting membrane properties. We propose that in 21-OH PG, the permeabilizing effect could be due to the less favored intramolecular hydrogen bonds between the hydroxyl and carbonyl groups as proposed by Abboud et al. (2015) (Abboud et al., 2015). This was in contrast with the limited effect of 17-OH PG on the bilayer permeability which was promoted by the intramolecular hydrogen bonds. Also, it was found that these two molecules showed a different effect on membrane fluidity effect of the two molecules where 21-OH PG exhibited a higher fluidifying effect (Abboud et al., 2015).

For methylated progestogens, the increase in the bilayer permeability could be related to the extra methyl group at C6 position. It was reported by solid-state NMR investigation that the extra methyl group in MP induced a perturbation of the steroidal rings conformation (Carillo, Arco, Wang, & Tzou, 2015). Interestingly, the effect of the acetylated MP was time dependent and less noticeable. The presence of the acetate group could produce a steric effect (Abboud et al., 2015)that prohibits its incorporation into the lipid bilayer. This could explain its LR into DPPC:CHOL liposomes as well as its weak permeabilizing effect compared to MP.

Also, it was reported that the position of the double bond in ring B in DYG can alter the distribution of the atomic charges in the polycyclic system (Novak & Kovač, 1999). In addition, DYG has a bent shape

which constricts the molecule into a rigid conformation. These structural features may constraint the possible destabilizing effect on this molecule on the bilayer permeability.

In addition, it is worth to mention that the effect of progestogens on the membrane permeability seems to be independent on its LR. Otherwise, DYG showed the lowest effect on the membrane permeability (37%) with a LR of 4.6%.

All these observations allow us to conclude that the effect of progestogens on the membrane depends on the structures of the molecule and the organization of the membrane.

**Release kinetics of SRB from preformed DPPC liposomes differing by their CHOL content and exposed to progestogens**

In a different protocol design, the preformed liposomes exposed to progestogens, and differing by their CHOL content (from 0 to 100%) were monitored for their SRB release over 48 h. This incubation time was chosen based on our previous kinetic study showing that the all progestogens except MP decrease the liposome permeability of SRB up to 48 h.

The release of SRB was monitored from the various DPPC formulations (CHOL% 0, 2.5, 5, 10, 20, 25, 30, 50 and 100) exposed or not to progestogens at 2.5 mol% (DYG was excluded from this section) over 48 h at 37˚C. The kinetic release curves of liposomes (CHOL% 2.5) exposed or not to 2.5% of progestogens were presented in (Fig. 4). The other kinetic release curves were presented in Fig.S1.

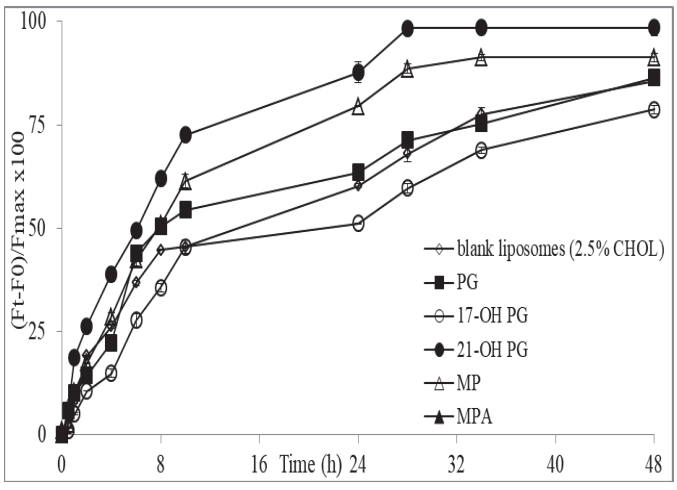



**Fig. 4** The SRB release kinetics obtained from preformed DPPC liposomes (CHOL% 2.5) exposed or not to 2.5% of progestogens over 48 h. Values are expressed as the mean of three different measurements ± SD.

The SRB release kinetics of all formulations showed a biphasic pattern (Fig.4 and Fig. S1) except for formulations loaded with high CHOL content (50 and 100%), as recently demonstrated (Kaddah et al., 2018). The release constants values ($K_1$ and $K_2$) were determined in order to explore the SRB release mechanisms from the different formulations (Singhvi & Singh, 2011). The Higuchi model based on diffusion-controlled process (Romero et al., 2018) was selected, and the Higuchi release constants values $K_1$ (Fig. 5a) and $K_2$ (Fig. 5b) for the first (from 0 to 10 h) and second (from 10 to 48 h) release phases were determined for blank liposomes (CHOL% 0-100) exposed or not to progestogens.

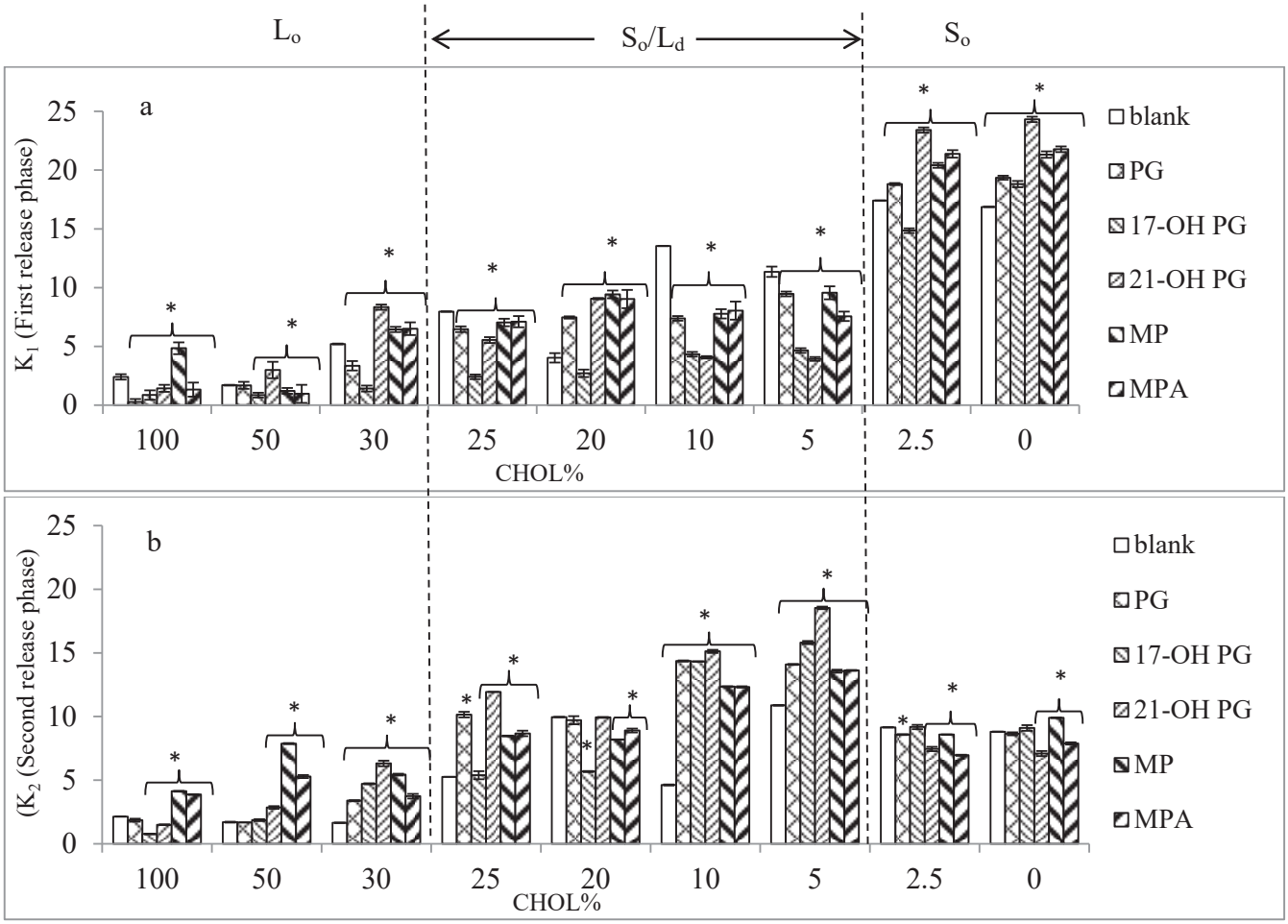



**Fig.5** Higuchi SRB release constants determined for the two release phases for blank liposomes (CHOL% 0-100) exposed or not to progestogens at 2.5 mol%. (A) $K_1$ values: first phase, from 0 to 10 h; (B) $K_2$ values: second phase, from 10 to 48 h. Values are expressed as the mean of three different measurements ± SD.
$S_o$: solid-ordered phase, $S_o/L_d$ : solid-ordered/liquid-disordered phase, $L_o$: liquid-ordered phase.
*P < 0.05 compared with the control value

As expected, blank liposomes exhibited a decrease in the membrane permeability for SRB following CHOL increase (from 0 to 100% CHOL) (Kaddah et al., 2018).

At CHOL 0%, DPPC membrane exists in a gel or solid-ordered ($S_o$) state (~30˚C) (Attwood, Choi, & Leonenko, 2013). It undergoes a gel to liquid crystalline phase transition at the main phase transition temperature of 41˚C (Schubert, Schneck, & Tanaka, 2011), and this is accompanied with an increase in membrane fluidity (Heerklotz, 2004). In this gel phase, the addition of CHOL up to 2.5% showed a slight increase in the Higuchi release constants, reflecting the fluidizing effect in both release phases at low CHOL content (Smith, Wang, & Dea, 2012). In $S_o$ phase (CHOL% 0 and 2.5%), all progestogens increased the membrane permeability in the first release phase except for 17-OH PG for formulations at CHOL% 2.5. In the second release phase, MPA and 21-OH PG showed a decrease in Higuchi release constants for both formulations at CHOL% 0 and 2.5, PG and 17-OH PG had no effect on membrane permeability compared to controls while MP showed an increasing in Higuchi release constants at CHOL% 0 and a reverse effect at CHOL% 2.5.

At intermediate CHOL concentration (5, 10, 20 and 25%), a $S_o/L_d$ phase transition occurs (Redondo-Morata et al., 2012). This is accompanied with the condensing and ordering effect of CHOL (Magarkar et al., 2014) leading to membrane thickness increase (Rheinstädter & Mouritsen, 2013)and membrane fluidity decrease (Mills et al., 2008). Our results showed that blank liposomes (CHOL% 5-25) exhibited unstable SRB release constants variations following CHOL% increase which is not in accordance with the CHOL lipid packing properties. Compared to controls, all formulations exposed to all progestogens except that of CHOL% 20 showed a decrease in the membrane permeability in the first release phase. It is worth to mention that liposomes (CHOL% 20) exposed to 17-OH PG showed a decrease in the SRB release constants.

The effect of progestogens on the membrane permeability for all formulations was reversed in the second phase. At this phase, liposomes loaded with 5, 10 and 25% CHOL and exposed to progestogens showed an increase in SRB release constants comparing to the corresponding controls, and a high SRB release values was observed comparing to the first phase. As for liposomes (CHOL% 20), the contrary effect was observed in the second phase for MP and MPA, while 17-OH PG still decrease the membrane permeability at this phase; it seems that PG and 21-OH PG has no effect on the membrane permeability comparing to controls. It was reported by molecular dynamic (MD) simulations that the presence of CHOL-rich and CHOL-poor domains assigned to the $S_o/L_d$ phase transition promotes the heterogeneous distribution of CHOL within the lipid membrane (Javanainen et al., 2017). Similar SRB release profiles were reported for liposomes exposed to corticoids at the intermediate CHOL concentration (Submitted). We assume that the heterogeneous distribution of CHOL domains modulate the effect of progestogens on the membrane permeability beside the structural feature of the drug.

All progestogens showed a decreasing effect on the membrane permeability in the first release phase followed by an increasing in the second phase except for that of CHOL% 20 where the contrary effect was observed. As discussed earlier, this inconsistent effect of CHOL on the membrane permeability could be explained by the heterogeneity of the membrane structure (CHOL-poor and CHOL-rich domains) that could occurs at these CHOL content.

In the liquid-ordered phase ($L_o$) (CHOL% 30-100) (Redondo-Morata et al., 2012), it seems that the increase in CHOL content rigidifies the membrane (Kaddah et al., 2018).
Above CHOL% 30, this phase is accompanied with the formation of raft structures. Compared to the control (CHOL% 30), progestogens increased the membrane permeability in the first and second release phases, except for the formulations exposed to PG and 17-OH PG where a decrease in the membrane permeability was observed in the first release phase. According to literature, PG increased the erythrocyte membrane fluidity (~30% CHOL,(Nelson, 1967)) which is not conconmittant with the effect of PG on the membrane permeability in the first release phase. Thus, this could emphasize our suggestion on the role the period of incubation in modulating the effect of drugs on membrane properties.
Compared to the control (CHOL% 50), MP and MPA decreased the membrane permeability in the first release phase while the contrary effect was observed in the second phase. 21-OH PG increased the membrane permeability in the first and second release phases. However, no effect on the membrane permeability was observed for formulations exposed to PG in the first and second release phases. Also, the presence of 17-OH PG didn't affect the membrane permeability in the second release phase while it decreased the membrane permeability in the first release phase.
Compared to the control (CHOL% 100), only MP seems to increase the membrane permeability in the first release. In the second release phase, both MP and MPA showed an increase in SRB release constants while 17- and 21-OH PG continued to decrease the membrane permeability. PG showed a comparable SRB release constants as the control. According to literature, raft domains lead to density and compositional fluctuations in space and time (Toppozini et al., 2014), explaining that the same drug could affect differently the membrane permeability depending on membrane composition

From our findings, we assume that the variations obtained on the effect of progestogens on the membrane permeability are strongly related to the CHOL, the period of incubation and to the structural features of the drug. Among the various progestogens, 17-OH PG promotes a condensing effect and this was translated by the decrease in the membrane permeability. In contrast, MP disrupts the lipid packing in the second release phase and this was translated by an increase in the membrane permeability.

In parallel, the Higuchi release constants were determined for PG-loaded liposomes and results showed similar values with those obtained from liposomes exposed to progestogens in the first and second release phases. This means that the SRB release curve shape (biphasic pattern) is a main factor that should be taken into consideration in order to compare the SRB release kinetics obtained from two different approaches adopted in preparing liposomes.

However, PG-loaded liposomes showed a decrease in the membrane permeability while the formulations exposed to PG didn't show any effect on the membrane permeability in the second release phase. In addition, MPA-loaded liposomes showed an increase in the membrane permeability while the contrary effect was observed for the formulations treated with MPA in the first release phase.
The biphasic pattern (SRB release curve shape) was considered as a critical parameter rather than the applied modification in the experimental protocol design for determining the effect of progetogens on membrane properties.

## 4. Conclusion

To sum up, we studied the parameters that control the effect of progestogens on the lipid bilayer permeability of DPPC liposomes at various cholesterol content. Two approaches were adopted in the experimental protocol design (loading liposomes by progestogens or exposing liposomes by progestogens). The progestogens-loaded liposomes showed a monodispersed liposome size distribution. Therefore, achieving a high incorporation and loading rates of DPPC and CHOL and a high encapsulation efficiency of progestogens, low loading rates of drugs were obtained for formulations loaded with 17-OH PG, PG and MPA. Kinetic studies showed that the CHOL content, the period of incubation, the SRB release curve shape beside the structural features of the drug are the main factors determining the progestogens effect on the membrane permeability rather than the experimental protocol design. These results could serve as a suitable tool for developing delivery systems based on liposomes in order to understand the effect of drugs on liposomes membrane properties.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

**References**

Abboud, R., Charcosset, C., & Greige-Gerges, H. (2016). Tetra- and Penta-Cyclic Triterpenes Interaction with Lipid Bilayer Membrane: A Structural Comparative Study. *The Journal of Membrane Biology*, *249*(3), 327–338. http://doi.org/10.1007/s00232-016-9871-8

Abboud, R., Greige-Gerges, H., & Charcosset, C. (2015). Effect of Progesterone, Its Hydroxylated and Methylated Derivatives, and Dydrogesterone on Lipid Bilayer Membranes. *The Journal of Membrane Biology*, *248*(4), 811–824. http://doi.org/10.1007/s00232-015-9803-z

Attwood, S., Choi, Y., & Leonenko, Z. (2013). Preparation of DOPC and DPPC Supported Planar Lipid Bilayers for Atomic Force Microscopy and Atomic Force Spectroscopy. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(2), 3514–3539. http://doi.org/10.3390/ijms14023514

Bello, R., Lebenthal, Y., Lazar, L., Shalitin, S., Tenenbaum, A., Phillip, M., & de Vries, L. (2017). Basal 17-hydroxyprogesterone cannot accurately predict nonclassical congenital adrenal hyperplasia in children and adolescents. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics*, *106*(1), 155–160. http://doi.org/10.1111/apa.13630

Briuglia, M. L., Rotella, C., McFarlane, A., & Lamprou, D. A. (2015). Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. *Drug Delivery and Translational Research*, *5*(3), 231–242. http://doi.org/10.1007/s13346-015-0220-8

Carillo, K. D., Arco, S., Wang, C., & Tzou, D. M. (2015). Solid-state NMR investigation of effect of fluorination and methylation on prednisolone conformation. *Steroids*, *104*, 263–269. http://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.10.012

Collins, J. J., & Phillips, M. C. (1982). The stability and structure of cholesterol-rich codispersions of cholesterol and phosphatidylcholine. *Journal of Lipid Research*, *23*(2), 291–8. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7077143

Colombo, D., Ferraboschi, P., Prestileo, P., & Toma, L. (2006). A comparative molecular modeling study of dydrogesterone with other progestational agents through theoretical calculations and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *98*(1), 56–62. http://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2005.07.009

Cullis, P. R., Fenske, D. B., & Hope, M. J. (1996). Physical properties and functional roles of lipids in membranes. In *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (pp. 1–33). http://doi.org/10.1016/S0167-7306(08)60508-6

Dharwadkar, A., Chitterusu, R., Dharwadkar, A., Chenmarathy, B., & Dharwadkar, K. (2017). Cardioprotective function of progesterone: A new perspective. *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology*, *7*(2), 1. http://doi.org/10.5455/njppp.2017.7.0927404102016

Essa, E. (2010). Effect of formulation and processing variables on the particle size of sorbitan

monopalmitate niosomes. *Asian Journal of Pharmaceutics*, *4*(4), 227. http://doi.org/10.4103/0973-8398.76752

Goncharov, A. I., Maslakova, A. A., Polikarpova, A. V., Bulanova, E. A., Guseva, A. A., Morozov, I. A., Shchelkunova, T. A. (2017). Progesterone inhibits proliferation and modulates expression of proliferation—Related genes in classical progesterone receptor-negative human BxPC3 pancreatic adenocarcinoma cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *165*, 293–304. http://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.07.007

Guo, W., Quan, P., Fang, L., Cun, D., & Yang, M. (2015). Sustained release donepezil loaded PLGA microspheres for injection: Preparation, in vitro and in vivo study. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *10*(5), 405–414. http://doi.org/10.1016/j.ajps.2015.06.001

Haeri, A., Alinaghian, B., Daeihamed, M., & Dadashzadeh, S. (2014). Preparation and characterization of stable nanoliposomal formulation of fluoxetine as a potential adjuvant therapy for drug-resistant tumors. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, *13*(SUPPL), 3–14.

Hall, O. J., Limjunyawong, N., Vermillion, M. S., Robinson, D. P., Wohlgemuth, N., Pekosz, A., Klein, S. L. (2016). Progesterone-Based Therapy Protects Against Influenza by Promoting Lung Repair and Recovery in Females. *PLoS Pathogens*, *12*(9), 1–22. http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005840

Hamishehkar, H., Ghanbarzadeh, S., Sepehran, S., Javadzadeh, Y., Adib, Z. M., & Kouhsoltani, M. (2015). Histological assessment of follicular delivery of flutamide by solid lipid nanoparticles: potential tool for the treatment of androgenic alopecia. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, (July), 1–8. http://doi.org/10.3109/03639045.2015.1062896

Han, K. H., Kim, M.-K., Kim, H. S., Chung, H. H., & Song, Y. S. (2013). Protective Effect of Progesterone during Pregnancy against Ovarian Cancer. *Journal of Cancer Prevention*, *18*(2), 113–122. http://doi.org/10.15430/JCP.2013.18.2.113

Heerklotz, H. (2004). The microcalorimetry of lipid membranes. *Journal of Physics Condensed Matter*, *16*(15). http://doi.org/10.1088/0953-8984/16/15/R01

Higuchi, T. (1963). Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *52*(12), 1145–1149. http://doi.org/10.1002/jps.2600521210

Hosseinabadi, T., Vahidi, H., Nickavar, B., & Kobarfard, F. (2015). Biotransformation of progesterone by whole cells of filamentous fungi Aspergillus brasiliensis. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, *14*(3), 919–924.

Huijbregts, R. P. H., Helton, E. S., Michel, K. G., Sabbaj, S., Richter, H. E., Goepfert, P. A., & Hel, Z. (2013). Hormonal contraception and hiv-1 infection: Medroxyprogesterone acetate suppresses innate and adaptive immune mechanisms. *Endocrinology*, *154*(3), 1282–1295. http://doi.org/10.1210/en.2012-

1850

Irani, J., Salomon, L., Oba, R., Bouchard, P., & Mottet, N. (2010). Efficacy of venlafaxine, medroxyprogesterone acetate, and cyproterone acetate for the treatment of vasomotor hot flushes in men taking gonadotropin-releasing hormone analogues for prostate cancer: a double-blind, randomised trial. *The Lancet Oncology*, *11*(2), 147–154. http://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70338-9

Javanainen, M., Martinez-Seara, H., & Vattulainen, I. (2017). Nanoscale Membrane Domain Formation Driven by Cholesterol. *Scientific Reports*, *7*(1), 1143. http://doi.org/10.1038/s41598-017-01247-9

Jiang, Q., Yang, X., Du, P., Zhang, H., & Zhang, T. (2016). Dual strategies to improve oral bioavailability of oleanolic acid: Enhancing water-solubility, permeability and inhibiting cytochrome P450 isozymes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *99*(November), 65–72. http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.11.013

Kaddah, S., Khreich, N., Kaddah, F., Charcosset, C., & Greige-Gerges, H. (2018). Cholesterol modulates the liposome membrane fluidity and permeability for a hydrophilic molecule. *Food and Chemical Toxicology*, *113*(January), 40–48. http://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.017

Kasubuchi, M., Watanabe, K., Hirano, K., Inoue, D., Li, X., Terasawa, K., … Kimura, I. (2017). Membrane progesterone receptor beta (mPRβ/Paqr8) promotes progesterone-dependent neurite outgrowth in PC12 neuronal cells via non-G protein-coupled receptor (GPCR) signaling. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–12. http://doi.org/10.1038/s41598-017-05423-9

Khreich, N., Lamourette, P., Boutal, H., Devilliers, K., Créminon, C., & Volland, H. (2008). Detection of Staphylococcus enterotoxin B using fluorescent immunoliposomes as label for immunochromatographic testing. *Analytical Biochemistry*, *377*(2), 182–188. http://doi.org/10.1016/j.ab.2008.02.032

Korkmaz, F., Kirbiyik, H., & Severcan, F. (2005). Concentration dependent different action of progesterone on the order, dynamics and hydration states of the head group of dipalmitoyl-phosphatidylcholine membrane. *Spectroscopy*, *19*(4), 213–219. http://doi.org/10.1155/2005/641043

Lei, B., Mace, B., Dawson, H. N., Warner, D. S., Laskowitz, D. T., & James, M. L. (2014). Anti-inflammatory effects of progesterone in lipopolysaccharide-stimulated BV-2 microglia. *PLoS ONE*, *9*(7), 3–9. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0103969

Magarkar, A., Dhawan, V., Kallinteri, P., Viitala, T., Elmowafy, M., Róg, T., & Bunker, A. (2014). Cholesterol level affects surface charge of lipid membranes in saline solution. *Scientific Reports*, *4*, 5005. http://doi.org/10.1038/srep05005

Magon, N., & Kumar, P. (2012). Hormones in pregnancy. *Nigerian Medical Journal*, *53*(4), 179. http://doi.org/10.4103/0300-1652.107549

McConnell, H. M., & Radhakrishnan, A. (2003). Condensed complexes of cholesterol and

phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1610*(2), 159–173. http://doi.org/10.1016/S0005-2736(03)00015-4

Mehanna, M. M., El-Kader, N. A., & Samaha, M. W. (2017). Liposomes as potential carriers for ketorolac ophthalmic delivery: Formulation and stability issues. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *53*(2), 1–10. http://doi.org/10.1590/s2175-97902017000216127

Miao, Z. L., Deng, Y. J., Du, H. Y., Suo, X. Bin, Wang, X. Y., Wang, X., … Duan, N. (2015). Preparation of a liposomal delivery system and its in vitro release of rapamycin. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *9*(3), 941–946. http://doi.org/10.3892/etm.2015.2201

Micks, E., Raglan, G. B., & Schulkin, J. (2015). Bridging progestogens in pregnancy and pregnancy prevention. *Endocrine Connections*, *4*(4), R81–R92. http://doi.org/10.1530/EC-15-0093

Mills, T. T., Toombes, G. E. S., Tristram-Nagle, S., Smilgies, D., Feigenson, G. W., & Nagle, J. F. (2008). Order Parameters and Areas in Fluid-Phase Oriented Lipid Membranes Using Wide Angle X-Ray Scattering. *Biophysical Journal*, *95*(2), 669–681. http://doi.org/10.1529/biophysj.107.127845

Miranda, D., & Lovell, J. F. (2016). Mechanisms of light-induced liposome permeabilization. *Bioengineering & Translational Medicine*, *1*(3), 267–276. http://doi.org/10.1002/btm2.10032

Moussatche, P., & Lyons, T. J. (2012). Non-genomic progesterone signalling and its non-canonical receptor. *Biochemical Society Transactions*, *40*(1), 200–204. http://doi.org/10.1042/BST20110638

Mueck, A. O., Ruan, X., Seeger, H., Fehm, T., & Neubauer, H. (2014). Genomic and non-genomic actions of progestogens in the breast. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *142*, 62–67. http://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.08.011

Najafinobar, N., Mellander, L. J., Kurczy, M. E., Dunevall, J., Angerer, T. B., Fletcher, J. S., & Cans, A.-S. (2016). Cholesterol Alters the Dynamics of Release in Protein Independent Cell Models for Exocytosis. *Scientific Reports*, *6*(1), 33702. http://doi.org/10.1038/srep33702

Nasr, M., Taha, I., & Hathout, R. M. (2013). Suitability of liposomal carriers for systemic delivery of risedronate using the pulmonary route. *Drug Delivery*, *20*(8), 311–318. http://doi.org/10.3109/10717544.2013.835160

Nelson, G. J. (1967). Lipid composition of erythrocytes in various mammalian species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, *144*(2), 221–232. http://doi.org/10.1016/0005-2760(67)90152-X

Novak, I., & Kovač, B. (1999). Electronic structure and biological activity of steroids. *Biophysical Chemistry*, *78*(3), 233–240. http://doi.org/10.1016/S0301-4622(99)00027-7

Ohvo-Rekila, H. (2002). Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Progress in Lipid Research*, *41*(1), 66–97. http://doi.org/10.1016/S0163-7827(01)00020-0

Ong, S., Chitneni, M., Lee, K., Ming, L., & Yuen, K. (2016). Evaluation of Extrusion Technique for

Nanosizing Liposomes. *Pharmaceutics*, *8*(4), 36. http://doi.org/10.3390/pharmaceutics8040036

Oren, I., Fleishman, S. J., Kessel, A., & Ben-Tal, N. (2004). Free diffusion of steroid hormones across biomembranes: A simplex search with implicit solvent model calculations. *Biophysical Journal*, *87*(2), 768–779. http://doi.org/10.1529/biophysj.103.035527

Pandya, M. R., Gopeenathan, P., Gopinath, P. M., Das, S. K., Sauhta, M., & Shinde, V. (2016). Evaluating the clinical efficacy and safety of progestogens in the management of threatened and recurrent miscarriage in early pregnancy - A review of the literature. *Indian Journal of Obstetrics and Gynecology Research*, *3*(2), 157–166.

Phillips, M. C., & Finer, E. G. (1974). The stoichiometry and dynamics of lecithin-cholesterol clusters in bilayer membranes. *BBA - Biomembranes*, *356*(2), 199–206. http://doi.org/10.1016/0005-2736(74)90283-1

Redondo-Morata, L., Giannotti, M. I., & Sanz, F. (2012). Influence of cholesterol on the phase transition of lipid bilayers: A temperature-controlled force spectroscopy study. *Langmuir*, *28*(35), 12851–12860. http://doi.org/10.1021/la302620t

Regidor, P.-A. (2014). Progesterone in Peri- and Postmenopause: A Review. *Geburtshilfe Und Frauenheilkunde*, *74*(11), 995–1002. http://doi.org/10.1055/s-0034-1383297

Rheinstädter, M. C., & Mouritsen, O. G. (2013). Small-scale structure in fluid cholesterol-lipid bilayers. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, *18*(5), 440–447. http://doi.org/10.1016/j.cocis.2013.07.001

Romero, A. I., Villegas, M., Cid, A. G., Parentis, M. L., Gonzo, E. E., & Bermúdez, J. M. (2018). Validation of kinetic modeling of progesterone release from polymeric membranes. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *13*(1), 54–62. http://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.08.007

Saito, H., & Shinoda, W. (2011). Cholesterol effect on water permeability through DPPC and PSM lipid bilayers: A molecular dynamics study. *Journal of Physical Chemistry B*, *115*(51), 15241–15250. http://doi.org/10.1021/jp201611p

Schubert, T., Schneck, E., & Tanaka, M. (2011). First order melting transitions of highly ordered dipalmitoyl phosphatidylcholine gel phase membranes in molecular dynamics simulations with atomistic detail. *Journal of Chemical Physics*, *135*(5), 1–11. http://doi.org/10.1063/1.3615937

Seifert-Klauss, V., & Prior, J. C. (2010). Progesterone and Bone: Actions Promoting Bone Health in Women. *Journal of Osteoporosis*, *2010*, 1–18. http://doi.org/10.4061/2010/845180

Shchelkunova, T. A., & Morozov, I. A. (2015). Molecular basis and tissue specificity of the progestin effect. *Molecular Biology*, *49*(5), 649–667. http://doi.org/10.1134/S0026893315050155

Simons, K., & Sampaio, J. L. (2011). Membrane organization and lipid rafts. *Perspect Biol*, *3*(10), a004697. http://doi.org/10.1101/cshperspect.a004697

Singh, M., Su, C., & Ng, S. (2013). Non-genomic mechanisms of progesterone action in the brain. *Frontiers in Neuroscience*, *7*(7 SEP), 1–7. http://doi.org/10.3389/fnins.2013.00159

Singhvi, G., & Singh, M. (2011). Review : in-Vitro Drug Release Characterization Models. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research*, *II*(I), 77–84.

Sinreih, M., Zukunft, S., Sosič, I., Cesar, J., Gobec, S., Adamski, J., & Lanišnik Rižner, T. (2015). Combined Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Analysis of Progesterone Metabolites. *PLOS ONE*, *10*(2), e0117984. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0117984

Smith, E. A., Wang, W., & Dea, P. K. (2012). Effects of cholesterol on phospholipid membranes: Inhibition of the interdigitated gel phase of F-DPPC and F-DPPC/DPPC. *Chemistry and Physics of Lipids*, *165*(2), 151–159. http://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2011.12.006

Soema, P. C., Willems, G. J., Jiskoot, W., Amorij, J. P., & Kersten, G. F. (2015). Predicting the influence of liposomal lipid composition on liposome size, zeta potential and liposome-induced dendritic cell maturation using a design of experiments approach. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *94*, 427–435. http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.06.026

Subramanian, S., Khan, I., Korale, O., Alhnan, M. A., Ahmed, W., Najlah, M., … Elhissi, A. (2016). A simple approach to predict the stability of phospholipid vesicles to nebulization without performing aerosolization studies. *International Journal of Pharmaceutics*, *502*(1–2), 18–27. http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.01.070

Teir, M. M. a B. U., Ghithan, J. H., & Darwish, S. M. (2011). Study of Progesterone interaction with Human Serum Albumin : Spectroscopic approach, *5*(1), 35–47.

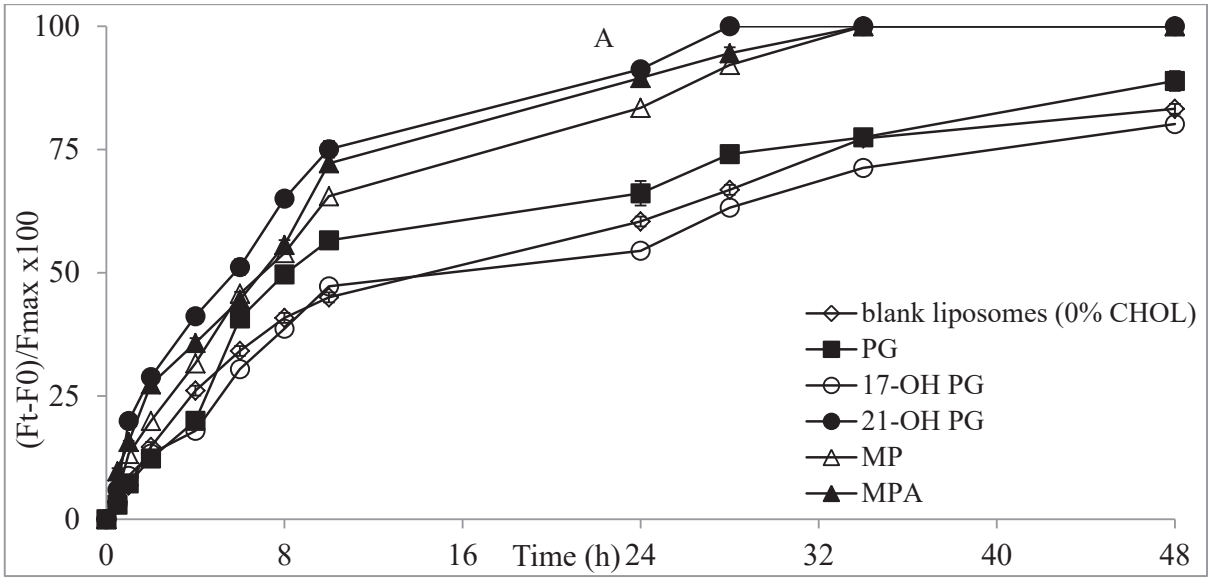
Toppozini, L., Meinhardt, S., Armstrong, C. L., Yamani, Z., Kucerka, N., Schmid, F., & Rheinstadter, M. C. (2014). Structure of cholesterol in lipid rafts. *Physical Review Letters*, *113*(22), 1–5. http://doi.org/10.1103/PhysRevLett.113.228101

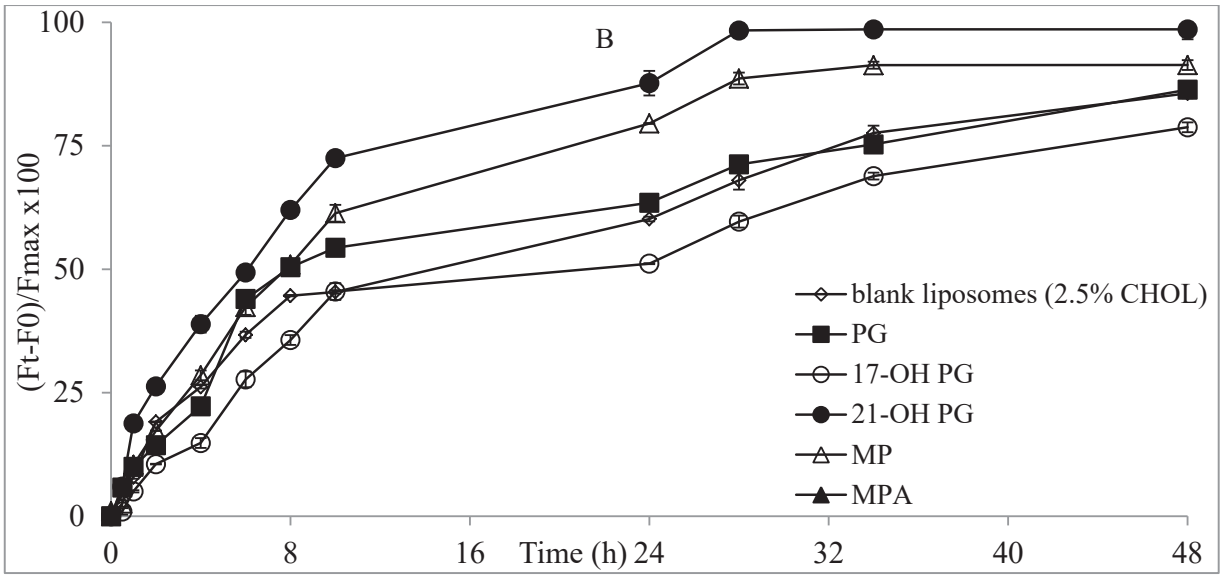
Tsuda, K., Kinoshita, Y., & Nishio, I. (2002). Synergistic role of progesterone and nitric oxide in the regulation of membrane fluidity of erythrocytes in humans: An electron paramagnetic resonance investigation. *American Journal of Hypertension*, *15*(8), 702–708. http://doi.org/10.1016/S0895-7061(02)02965-5

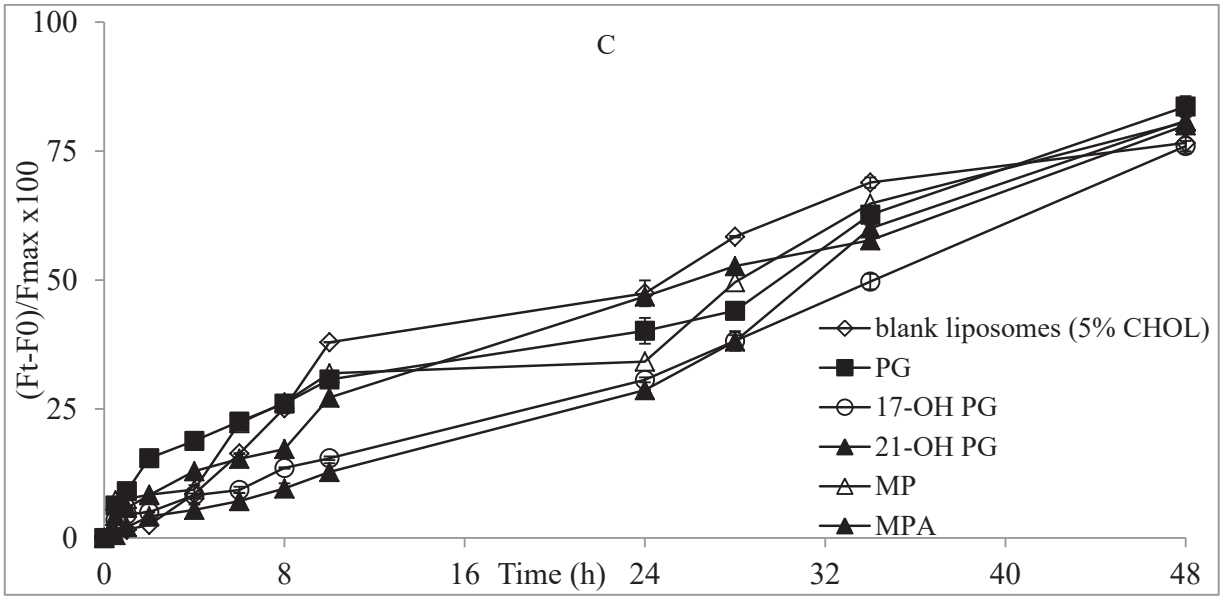
Waheed, Q., Tjörnhammar, R., & Edholm, O. (2012). Phase Transitions in Coarse-Grained Lipid Bilayers Containing Cholesterol by Molecular Dynamics Simulations. *Biophysical Journal*, *103*(10), 2125–2133. http://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.10.014

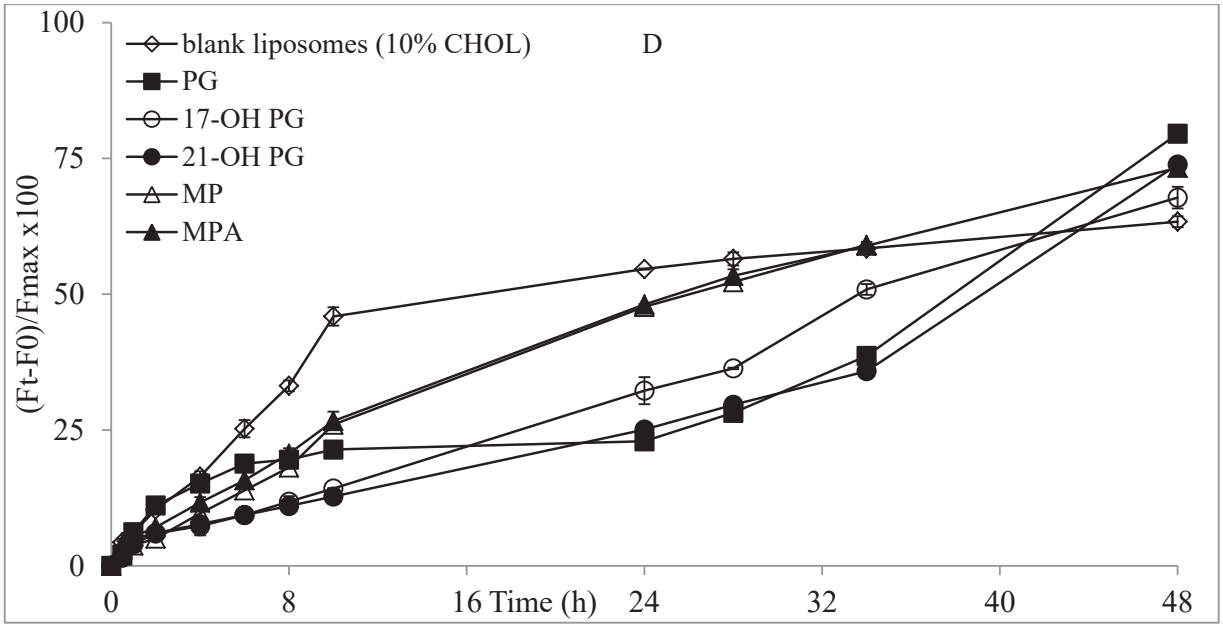
Zhou, Q., Liu, L., Zhang, D., & Fan, X. (2012). Preparation and characterization of gemcitabine liposome injections. *Pharmazie*, *67*(10), 844–847. http://doi.org/10.1691/ph.2012.1157

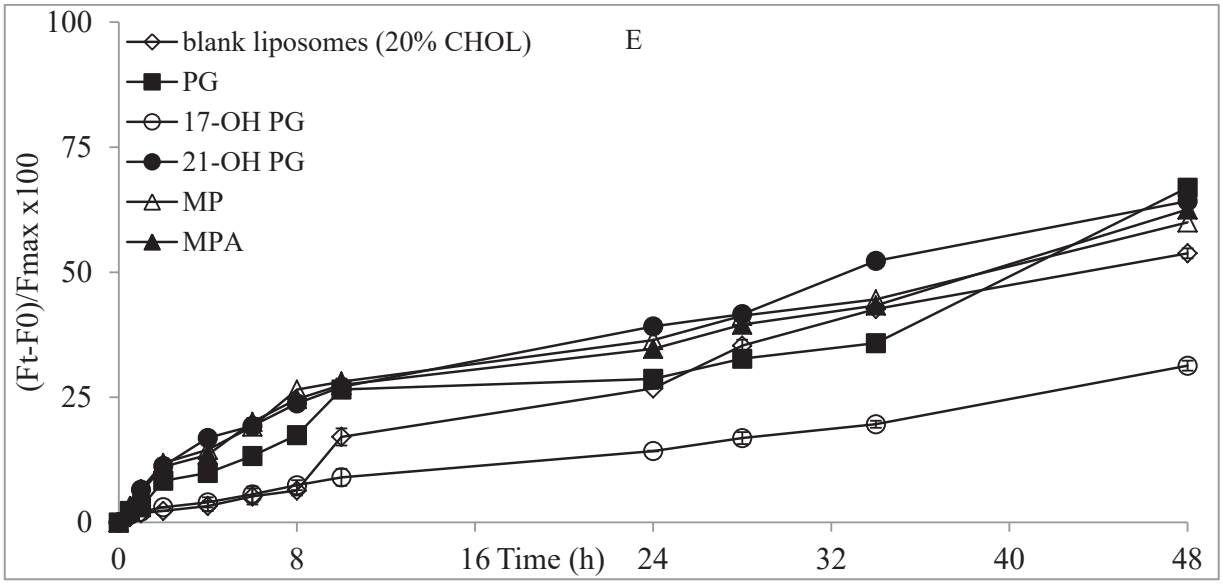
**Supplementary data – Article 3**

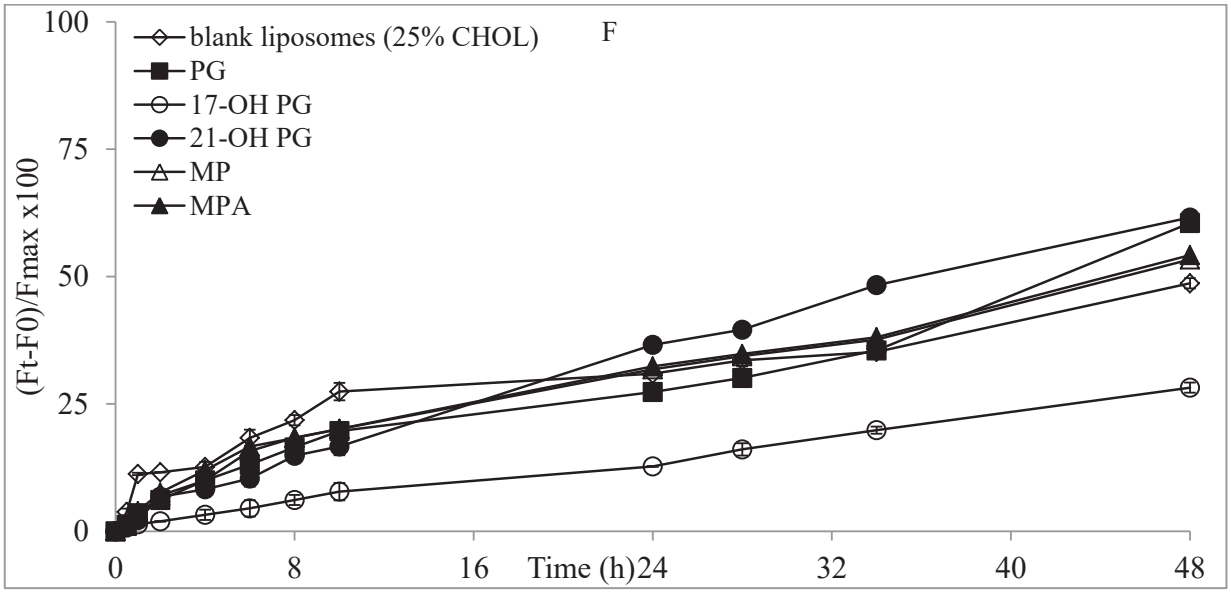


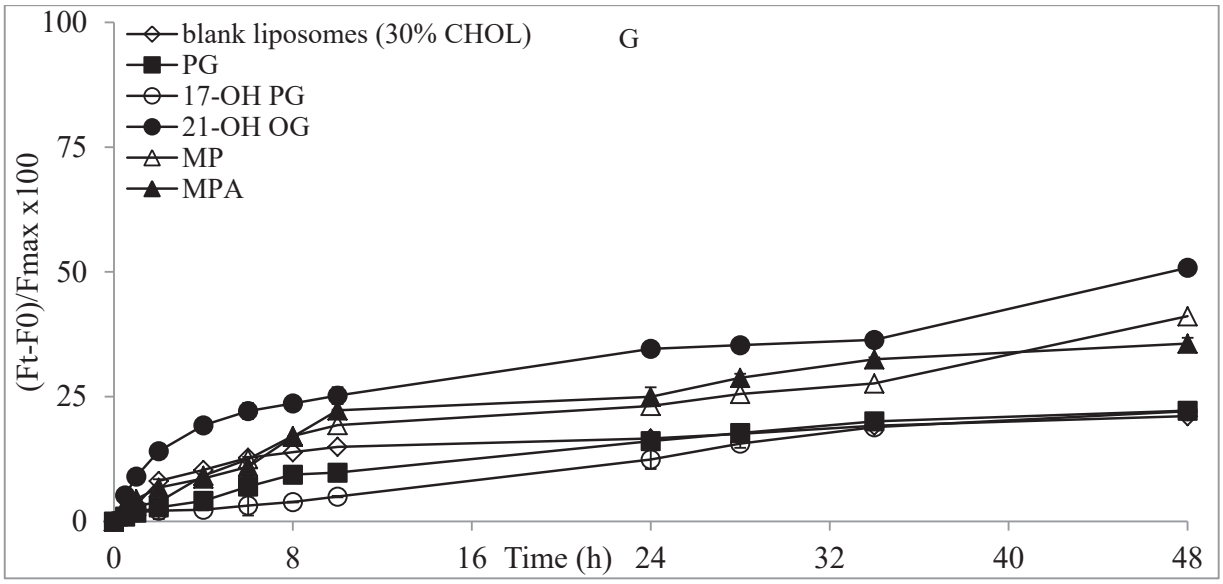




C
100
75
50
25
0
(Ft-F0)/Fmax x100
0
8
16
Time (h)
24
32
40
48
blank liposomes (5% CHOL)
PG
17-OH PG
21-OH PG
MP
MPA


100
75
50
25
0
(Ft-F0)/Fmax x100
blank liposomes (10% CHOL)
D
PG
17-OH PG
21-OH PG
MP
MPA
0
8
16 Time (h)
24
32
40
48


E
blank liposomes (20% CHOL)
PG
17-OH PG
21-OH PG
MP
MPA
(Ft-F0)/Fmax x100
Time (h)
0
25
50
75
100
0
8
16
24
32
40
48


F
blank liposomes (25% CHOL)
PG
17-OH PG
21-OH PG
MP
MPA
(Ft-F0)/Fmax x100
Time (h)
0
25
50
75
100
0
8
16
24
32
40
48


G
blank liposomes (30% CHOL)
PG
17-OH PG
21-OH OG
MP
MPA
(Ft-F0)/Fmax x100
Time (h)
0
25
50
75
100
0
8
16
24
32
40
48

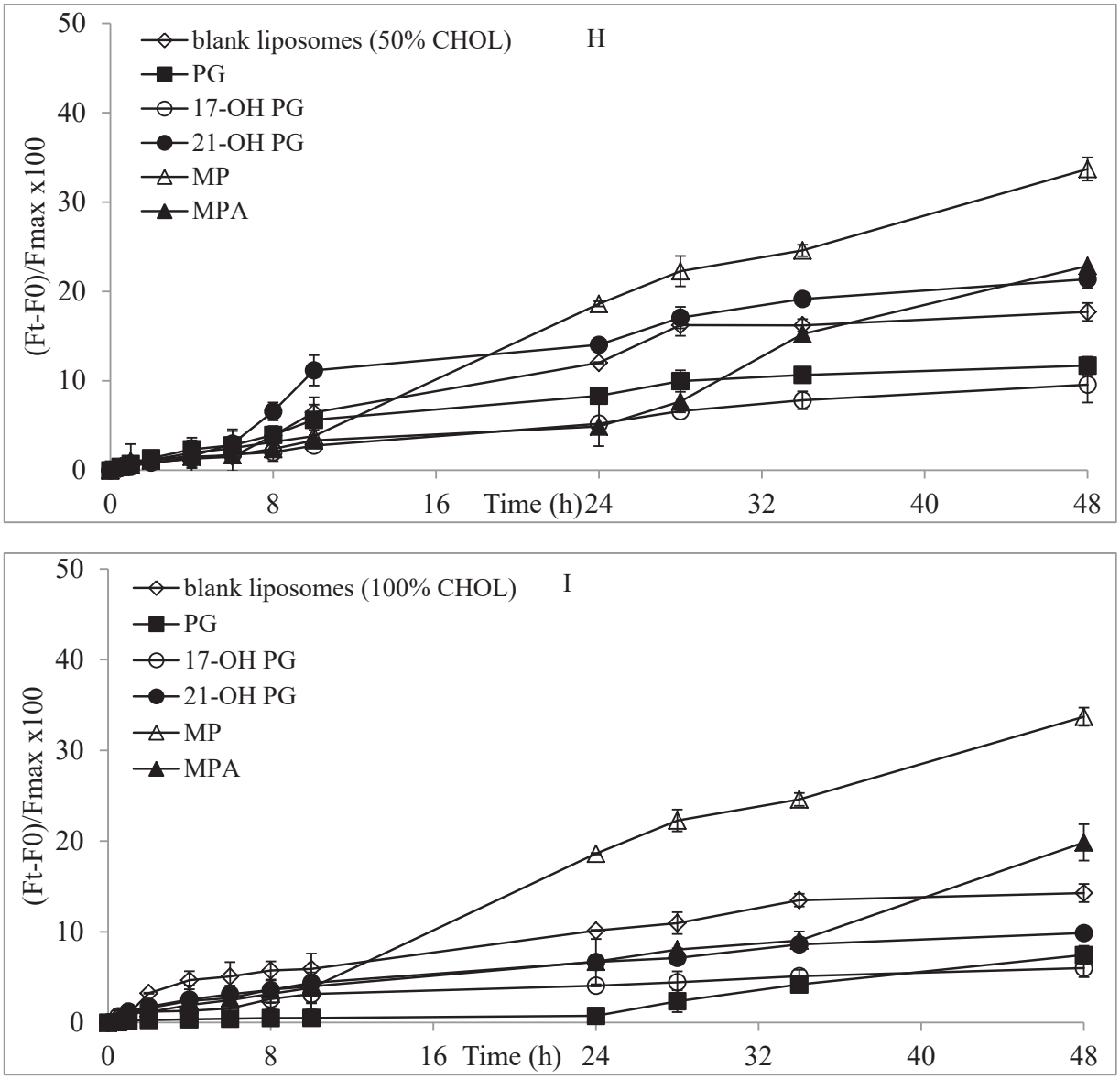



**Fig. S1.** SRB release curves of DPPC liposomes exposed to progestogens at 2.5 mol% over 48 h at 37˚C and containing various CHOL%: (A) 0%, (B) 2.5%, (C) 5%, (D) 10%, (E) 20%, (F) 25%, (G) 30%, (H) 50% and (I) 100%.

# Article 4

**Effect of membrane composition and period of incubation on the liposome membrane fluidity and permeability: Application to oleanolic acid and erythrodiol**

**Samar Kaddah[a,b], Nathalie Khreich[a], Fouad Kaddah[c],Catherine Charcosset[b], Hélène Greige-Gerges[a,*]**

[a]Bioactive Molecules Research Laboratory, Faculty of Sciences, Lebanese University, Lebanon
[b]Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (LAGEP), Université Claude Bernard, Lyon 1, France
[c]École Supérieure d'ingénieurs de Beyrouth, Université Saint Joseph, Beyrouth, Mar Roukoz-Dekwaneh, Lebanon
*Corresponding author: greigegeorges@yahoo.com; hgreige@ul.edu.lb

**<u>En préparation</u>**

**ABSTRACT**

Given that the pharmacological properties of drugs are associated with the changes of the lipid membrane properties, this study aims to investigate the effect of the liposome composition and experimental protocol design on pentacyclic triterpenes (TTPs) including oleanolic acid (OA)- and erythrodiol (ER)-modulating membrane fluidity and permeability. TTPs-loaded liposomes consisting of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and cholesterol (CHOL) were prepared by reverse phase evaporation (REV) technique at DPPC:CHOL:TTP molar ratios of 100:100:2.5 and 100:100:10. The formulations were chacarterized for their size and homogeneity. Changes in DPPC membrane fluidity (CHOL% 0, 10, 20, 30 and 100) after exposure to OA and ER were carried out by using 5- and 16-doxyl stearic acids (DSA) as spin probes. For permeability studies, the TTPs-loaded liposomes and the preformed liposomes exposed to TTPs (2.5 mol%) were compared for the leakage of an encapsulated fluorescent dye, sulforhodamine B (SRB), at 37˚C in tris HCl buffer (pH 7.4) containing NaCl. The apparent release constants were determined by the Higuchi model for two release phases (from 0 to 10 h, and from 10 to 48 h). All formulations exhibited a monodispersed size distribution where the mean particle value was about three times larger than the last membrane they were extruded through (0.4 μm). Fluidity studies showed that OA and ER both affect the upper and deeper regions of the membrane at 30˚C while OA and ER affect the hydrophobic core and the polar head groups region at 40˚C, respectively. Permeability studies showed the TTP concentration, CHOL content and the period of incubation all represent the main factors controlling the membrane properties rather than the experimental protocol design.

**Keywords: cholesterol, erythrodiol, fluidity, Higuchi, oleanolic acid, permeability.**

## 1. Introduction

The significant demand of phytochemicals and plant extracts as the triterpenoids (TTPs) derived from their promising role in the treatment of various chronic and degenerative diseases (Ayeleso & Matumba, 2017; Žiberna et al., 2017). In addition to the well-known genomic action of TTPs, emerging data points toward their multiple biological targets via non-genomic signaling pathways (Haller, Mikics, & Makara, 2008; Xu, Wang, Pu, Tao, & Zhang, 2018). Several works have demonstrated that TTPs affect the membrane fluidity of biomimetic model membranes (Abboud, Charcosset, & Greige-Gerges, 2016; Broniatowski, Flasiński, Zięba, & Miśkowiec, 2014; Han, Ko, Park, Jin, & Kim, 1997), epidermal permeability barrier functions (Lin et al., 2016), membrane-bound ATPase enzymes (Senthil, Sridevi, &

Pugalendi, 2007), and the localization and physiological function of membrane-associated proteins (Prades et al., 2011).

TTPs are synthesized through squalene cyclization, a $C_{30}$ hydrocarbon structure defined as the precursor of all steroids (Zhao et al., 2017). They are found in medicinal herbs, cereals, cuticular waxes of fruits and vegetables including olives, virgin olive oil and leaves of Olea europaea (Skaziel et al., 2012).
Oleanolic acid (OA) (Fig. 1A), a pentacyclic TTP, exists in nature in free acid form or as an aglycone precursor for TTP saponins (Lopez et al., 2014). Current knowledge highlights the role of OA as an anti-inflammatory (Wozniak et al., 2015), antioxidant (Ayeleso & Matumba, 2017), hypoglycemic (Alqahtani et al., 2013), anti-bacterial (Penduka et al., 2014), anti-HIV (Jesus, Lago, Laurenti, Yamamoto, & Passero, 2015), hepatoprotective (Xue et al., 2017), osteoprotective (Cao et al., 2018) and cardioprotective agents (Senthil et al., 2007), as well as immunological adjuvants (Cruz et al., 2015). Recently, new hybrid radiolabeled nanoparticles including OA have been experimentally used for the diagnosis and therapeutic monitoring of tumors (Kim et al., 2016).

Erythrodiol (ER) (Fig. 1B), an intermediate from which OA is formed (Martín, Hernández, Córdova, & Nieto, 2012), is a natural dialcohol pentacyclic TTP. ER is widely distributed in plant kingdom, either in free form or esterified with fatty acids (Lopez et al., 2014). It is considered as a relevant marker for olive oil authenticity (Yang et al., 2017). As for OA, ER showed vasorelaxant, cardiotonic and antidysrythmic activities in animal models (Rodríguez-Rodríguez, Herrera, Perona, & Ruiz-Gutiérrez, 2004) as well as antioxidant and antithrombotic properties (Allouche, Beltrán, Gaforio, Uceda, & Mesa, 2010). Also, ER showed suppressive effects on skin tumor formation in mice (Nishino et al., 1988).

OA and ER inhibited the growth of tumor cell lines from various cancers, including colon, brain and breast cancer (Allouche et al., 2011; Juan, Wenzel, Daniel, & Planas, 2008; Wang et al., 2013). In addition, the prophylactic administration of OA and ER showed significant protection against experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), an experimental model of multiple sclerosis (Martín et al., 2012).
However, few studies have explored the effect of TTPs on the phospholipid membrane properties (Bailey et al., 2009; Prades et al., 2011), specifically on the liposome permeability and fluidity.

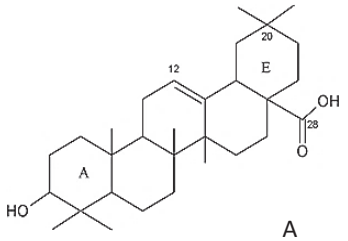
Cholesterol is an essential component of mammalian cell membranes (Dawaliby et al., 2016). The effect of CHOL on the structural and dynamic properties of synthetic and natural membranes is well established in terms of rigidity (Najafinobar et al., 2016), thickness (Cathcart, Patel, Dies, Rheinstädter,

& Fradin, 2015), fluidity (Redondo-Morata, Giannotti, & Sanz, 2012), stability of membranes (Toppozini et al., 2014) and drug-loading into liposomes (Haeri, Alinaghian, Daeihamed, & Dadashzadeh, 2014). Given the structural similarities of TTPs with CHOL, they may affect the physical membrane properties in the same way (Prades et al., 2011).

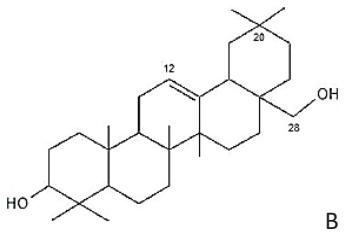
The poor permeability and water solubility of pentacyclic TTPs limited their use as galenic agents (Valdés, Morales, Rodríguez, & Günther, 2016). Consequently, the bioactive compounds were delivered through nanometric systems. Liposomes, defined as spherical vesicles entrapping both hydrophobic and hydrophilic compounds, are used as biomimetic model membrane systems (Agarwal et al., 2016). In our previous publications, the effect of ER on the CHOL-free DPPC membrane fluidity (Abboud et al., 2016) as well as on the physicochemical properties of membranes (Habib, Jraij, Khreich, Charcosset, & Greige-Gerges, 2015) was studied using liposomes model membranes. Also, the effect of tetracyclic TTPs on the membrane permeability of liposomes differing by their CHOL content was performed (unpublished data).

Here we are investigating the effect of OA and ER on the DPPC membrane permeability and fluidity of liposomes containing various CHOL content. Fluidity studies were carried out on preformed DPPC liposomes (CHOL% 0, 10, 20, 30 and 100) exposed or not to TTPs by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy using 5- and 16-DSA as spin probes. TTP to DPPC molar ratio was of 2.5%. For permeability studies, SRB (Bischof et al., 1995), calcein (Ahumada, Calderon, & Lissi, 2016) and carboxyfluorescein (Düzgüneş, Faneca, & Lima, 2010) were the most fluorophores used for monitoring changes in membrane permeability. TTPs were added to various SRB-loaded batches (CHOL% 0, 2.5, 5, 10, 20, 25, 30, 50 and 100) exposed or not to TTPs at 2.5%. The liposome suspensions were compared for the leakage of SRB during 48 h at 37˚C. The apparent release constants were then determined using Higuchi model.

In parallel, TTPs were added during liposome preparation at 2.5 and 10%. This step is considered as a modification in the experimental protocol design, and the release kinetics of SRB were studied during 10 days at 37˚C. The liposome preparations were characterized for their size and homogeneity by laser granulometry.



A



B

**Fig.1.** Structure of oleanolic acid (A) and erythrodiol (B)

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) (purity ≥ 99%) was purchased from Lipoid Gmbh, Germany. CHOL (purity 99%), SRB (95% content dye), gel sephadex G25 were all purchased from Sigma-Aldrich, Germany. 5- and 16-DSA were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Triton X-100 and Trizma Base were purchased from Sigma-Aldrich, Switzerland. The organic solvents chloroform and methanol were from Sigma-Aldrich, France, and diethyl-ether was from VWR Chemicals Prolabo, France.

### 2.2. Preparation of liposomes

Two approaches were used to study the effect of TTPs on liposome membrane. The first approach consisted of exposing the preformed DPPC liposomes to TTPs, while in the second approach TTPs were added during the liposome preparation.

#### 2.2.1. Preparation of liposomes containing SRB followed by exposure to TTPs

Liposomes were prepared by reverse phase evaporation technique. 25 μmol of DPPC was dissolved in 5 ml of a mixture of organic solvents: chloroform, diethyl-ether and methanol (6:6:1, v:v:v) (Khreich et al., 2008). The liposomal suspension was sonicated (Sonicator starsonic 35) for 1 min at 60˚C under nitrogen stream to avoid lipid oxidation. 0.75 ml of SRB solution (150 mM) prepared in 0.1 M tris-HCl buffer (pH 7.4) was added to the mixture followed by a sonication of the solution for 6 min at 60˚C under nitrogen stream. The organic solvents were removed at 45˚C using a rotary vacuum evaporator (Heidolph, Germany). A dark purple lipid film was obtained, and 1.5 ml of SRB solution was added followed by a sonication for 5 min at 60˚C under a nitrogen stream. SRB was added to ensure its loading upon reconstitution of liposomes during evaporation and/or sonication steps. The liposomal suspension was stored at 4˚C until use.

The same protocol was used for the preparation of DPPC vesicles containing cholesterol. A stock solution of cholesterol was prepared in chloroform (25 mg/ml), and aliquots were added to DPPC before

the first sonication at CHOL to DPPC molar percentage of 2.5, 5, 10, 20, 25, 30, 50 and 100%. Three batches were prepared for each formulation.

The SRB-loaded liposomes were then exposed to TTPs. TTPs stock solutions were prepared in methanol (2.5 mg/ml), and aliquots were added to the above-mentioned SRB-loaded liposomes suspensions to obtain TTP to DPPC percentage of 2.5. The percentage of methanol was lower than 4%. The same percentage was added for blank liposomes. These batches were used for monitoring the released SRB during 48 h.

2.2.2. Preparation of TTPs-loaded liposomes containing SRB

Following the above-described protocol, liposomes composed of an equimolar mixture of DPPC (25 μmol) and CHOL (25 μmol) (CHOL 100%) were prepared. Aliquots from TTP stock solution were added before the first sonication. The TTP percentage was of 2.5% or 10%. Three batches were prepared for each formulation. They were analyzed for their size and homogeneity as detailed below. Also, they were used also for monitoring the released SRB during 10 days.

2.3. Preparation of spin-labeled liposomes exposed to TTPs

The same protocol described above (paragraph 2.2.1) was applied to prepare liposomes batches (CHOL% of 0, 10, 20, 30 and 100) in the presence of the spin probe (5- or 16-DSA) that was added during liposome preparation before the first sonication at a probe molar percentage of 1 mol%. Three batches were prepared for each spin-labeled formulation.

2.4. Extrusion and purification of liposomes

The liposome suspensions (SRB- and spin-labeled) were incubated in a 60˚C water bath for 35 min and then extruded using an “Avanti” mini-extruder (Avanti Polar Lipids, Switzerland) five times through a 1 μm polycarbonate membrane, followed by five times through a 0.4 μm membrane.
The extruded spin-labeled vesicles were ultracentrifuged (Optima$^{TM}$ Ultracentrifuge, Beckman Coulter, USA) at 40,000 g for 1 h at 4˚C, and the resulting pellets were then kept in a desiccator overnight to remove the residual solvent before EPR analysis.
The SRB-loaded liposomes were centrifuged at 21,400 g for 1 h at 4˚C to eliminate the excess buffer. The pellets were suspended with a small volume of tris-HCl buffer containing NaCl (150 mM) then

purified from unloaded molecules by molecular sieve chromatography using sephadex G25 column. They were stored at 4˚C until use for membrane permeability study.

## 2.5. Characterization of blank and TTPs-loaded liposomes

### 2.5.1. Vesicle size analysis

The liposomes particle size was analyzed by laser granulometry (Partica-LA-950V2 Laser Diffraction Particle Size Distribution Analyzer, Horiba, Japan) that allowed the detection of particles from 0.01 µm to 3000 µm. In addition, the polydispersity index, defined as the width of the liposome size distribution, was assessed by the mean of span factor. This parameter is an indicator of the level of homogeneity (Karn, Cho, Park, Park, & Hwang, 2013) and uniformity of the liposome preparation (Mehanna et al., 2017). The span factor was calculated as follows (Nasr, Taha, & Hathout, 2013) :

Span = $\frac{d90 - d10}{d50}$ Equation (1)

where $d_{10}$, $d_{50}$ and $d_{90}$ were the diameters at 10%, 50% and 90% of the cumulative intensity, respectively. If the span factor < 0.4, the size distribution was considered to be monodispersed (Hamishehkar et al., 2015).

The size particle and span values were expressed as the means of three different measurements ± standard deviation.

## 2.6. Electron paramagnetic resonance spectroscopy measurements

Changes in DPPC membrane fluidity for liposomes (CHOL% 0, 10, 20, 30 and 100) exposed to TTPs were carried out at 30 and 40˚C, according to the procedure described previously (Kaddah, Khreich, Kaddah, Charcosset, & Greige-Gerges, 2018). The maximum hyperfine splitting ($2A_{max}$) (1) and the rotational correlation time ($\tau_c$) (2) were determined from 5- and 16-DSA spectra, respectively. They are defined as follows:

(3) The outermost separation between the spectral extrema (Fig. 2A)

(4) $\tau_c = (6.5\text{x}10^{-10})$ x $W_0$ x $[(h_0/h_{-1})^{0.5} - 1]$ (Fig. 2B), where $W_0$ was the width of the central line at half-height, and $h_0$ and $h_{-1}$ were the amplitude of the center- and high-field lines (Keith, Bulfield, & Snipes, 1970).

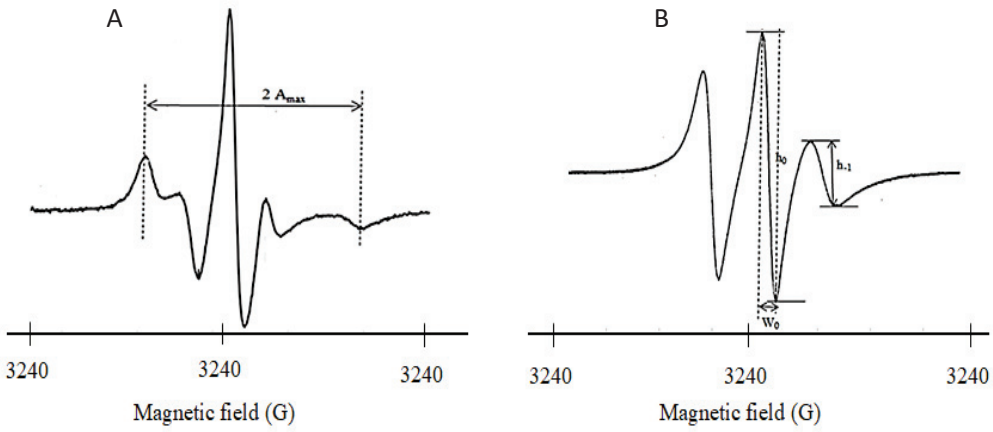



**Fig.2.** EPR spectra of 5-DSA (A) and 16-DSA (B) labeled-DPPC liposomes.

2.7. Permeability study

2.7.1. Preparation of liposomes suspensions for fluorescence measurements

The suspensions of SRB-loaded liposomes were diluted in tris-HCl buffer (0.1 M; pH 7.4) containing NaCl (150 mM) to obtain absorbance values of 1.0. They were then used for SRB release kinetics. It was demonstrated by Chen et al. (1988) that SRB formed dimers when encapsulated at high concentration, and exhibited an absorption spectrum with two peaks at 532 and 568 nm (70% of the height of the 532 nm peak) for loaded- and free-SRB, respectively. The optical density measurements were determined using a spectrophotometer (Nicolet evolution 300 Thermoelectron, England). The diluted batches were used for fluorescence measurements.

2.7.2. SRB release kinetics

Permeability study was carried out at 37˚C by monitoring the release of SRB from blank and TTPs-loaded liposomes (2.5 or 10 mol%) over time as well as from preformed liposomes exposed or not to TTPs (2.5 mol%). A high concentration of encapsulated SRB in liposomes led to self-quenching. The release of SRB from vesicles led to an increase in the fluorescence signal. Fluorescence measurements were performed using a spectrofluorometer (Thermo Spectronic, Aminco Bowman Series 2, USA). The fluorescence signal was measured at an excitation wavelength of 535 nm. The emission spectra were recorded in the range of 540-700 nm. The release of SRB from vesicles was calculated according to the formula:

Release SRB (%)= $\frac{Ft - F0}{Fmax}$ x 100 Equation (2)

where $F_t$ was the fluorescence of the suspension at time t, $F_0$ was the initial fluorescence measured at time $t_0$, and $F_{max}$ was the maximal fluorescence achieved by the addition of buffer containing Triton X-100 (1%) leading to the total release of SRB from vesicles.

2.7.2.1. Kinetic modeling of SRB release profiles

The apparent release constants were determined by fitting the SRB release kinetics data into the Higuchi diffusion-controlled model expressed by the following equation (Higuchi, 1963) :

$Q = K_H \times t^{1/2}$ Equation (3)

where $Q$ corresponded to the percentage of released SRB in the medium at time t, and $K_H$ was the Higuchi release constant.

2.8. Statistics

To assess significant differences between values, statistical analysis was carried out using the Student's t-test. A P value < 0.05 was considered statistically significant.

**3. Results and discussion**

3.1. Liposome size and span analysis

The mean size distribution of blank and TTPs-loaded liposomes was determined by laser granulometry after extrusion and separation on sephadex G25 column, respectively. The liposome size distribution for the TTPs-loaded liposomes was presented in Fig.3.

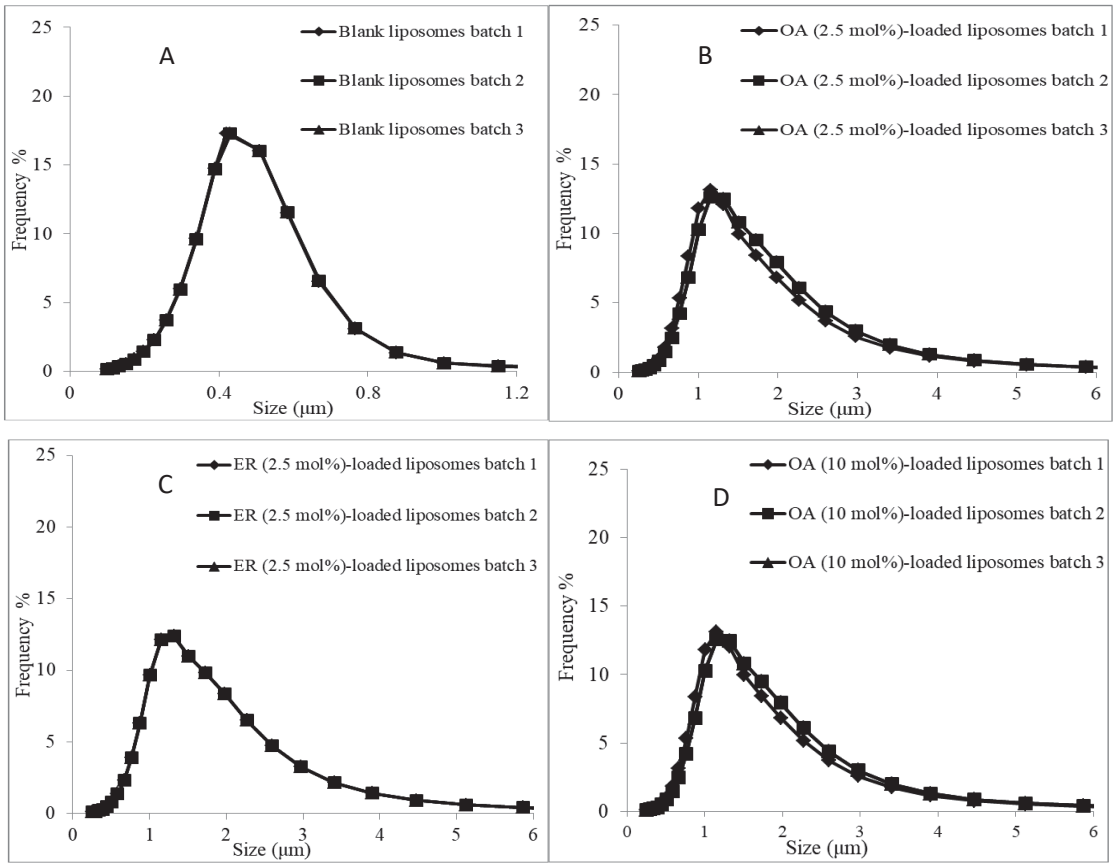



**Fig.3.** Liposome size distribution determined by laser granulometry of blank and TTPs-loaded liposomes. (A) Blank liposomes; TTPs (2.5 mol%)-loaded liposomes: (B) OA, (C) ER; TTPs (10 mol%)-loaded liposomes: (D) OA. Measurements were performed on three different batches.

Blank liposomes (Fig. 3A) have a mean diameter equal to 0.42 ± 0.00 µm. Compared to blank liposomes, TTPs-loaded liposomes showed a unimodal-Gaussian size distribution where the mean particle size was about three times larger than the control. The liposome mean size values listed in Table 1 were 1.26 and 1.32 µm for OA-(Fig. 3B) and ER-(Fig. 3C) loaded liposomes, respectively. Also, the size distribution of liposomes did not change with increasing the OA content to 10 mol% (Fig. 3D). It is well-documented that the variation in the liposome size distribution could be due to the processing parameters as the sonication and extrusion (Ong, Chitneni, Lee, Ming, & Yuen, 2016; Soema, Willems, Jiskoot, Amorij, & Kersten, 2015). The significant increase in the liposome size could be due to the aggregation of vesicles as described by Biruss et al. (2007) (Biruss, Dietl, & Valenta, 2007).

In another study, a significant expansion in the acyl chain cross-sectional area of lipid molecule was observed by X-ray diffraction for DPPC liposomes loaded with ursolic acid (UA) (pentacyclic TTP acid) at 10 mol% (Lorincz, Mihály, Németh, Wacha, & Bóta, 2015). Given that OA and ER shared the same

TTP backbone with UA, they could promote the expansion of the lipid acyl chains leading to an increase in the liposome size distribution.

**Table 1**

Mean size distribution and span value of TTPs-loaded liposomes determined by laser granulometry

| TTPs-loaded liposomes | [a]Size (μm) | [a]Span value | [b]Size (μm) | [b]Span value |
|---|---|---|---|---|
| Blank | 0.42 ± 0.00 | 0.40 ± 0.00 | | |
| Erythrodiol | 1.32 ± 0.00* | 0.34 ± 0.05 | | |
| Oleanolic acid | 1.26 ± 0.04* | 0.34 ± 0.04 | 1.26 ± 0.05 | 0.34 ± 0.05 |

Values are expressed as the mean of three different measurements ± SD
[a]Batches prepared at a molar ratio DPPC:CHOL:TTP of 100:100:2.5
[b]Batches prepared at a molar ratio DPPC:CHOL:TTP of 100:100:10
*P < 0.05 compared with the blank liposomes value

In addition, the width of liposome size distribution expressed by the "span factor" was calculated according to Equation (1), and the span values were listed in Table 1. Blank liposomes have a span value of 0.40 ± 0.00. Compared to blank liposomes, there was no significant effect (P > 0.05) of TTPs loaded at 2.5 or 10 mol% on the width of the liposome size distribution, and the span values were of 0.34. According to literature, the size distribution was considered as narrow or monodispersed for span values < 0.4 (Guo, Quan, Fang, Cun, & Yang, 2015; Zhou, Liu, Zhang, & Fan, 2012). This indicated that the drug loading did not alter the homogeneity of the liposomes suspensions, and generated vesicles with uniform size distribution.

3.2. Electron paramagnetic resonance study

EPR spin labeling spectroscopy is a highly sensitive technique used to monitor the dynamic changes within the lipid membranes (Stepien, Polit, & Wisniewska-Becker, 2015). In our work, changes in DPPC membrane fluidity (CHOL% 0, 10, 20, 30 and 100) exposed or not to TTPs (2.5 mol%) were carried out at 30 and 40˚C. 5- and 16-DSA are used as spin probes where their paramagnetic doxyl groups were attached to C5 (close to the bilayer interface region) and C16 (hydrophobic end) positions of the hydrocarbon chain (Kornmueller et al., 2016). The fluidity of the membrane can be estimated from the maximum hyperfine splitting ($2A_{max}$) (Fig. 4A and B) and the rotational correlation time ($\tau_c$) (Fig. 4C and D) obtained from 5- and 16-DSA spectrum, respectively.



$S_o$ $S_o/L_d$ $L_o$ $S_o$ $S_o/L_d$ $L_o$

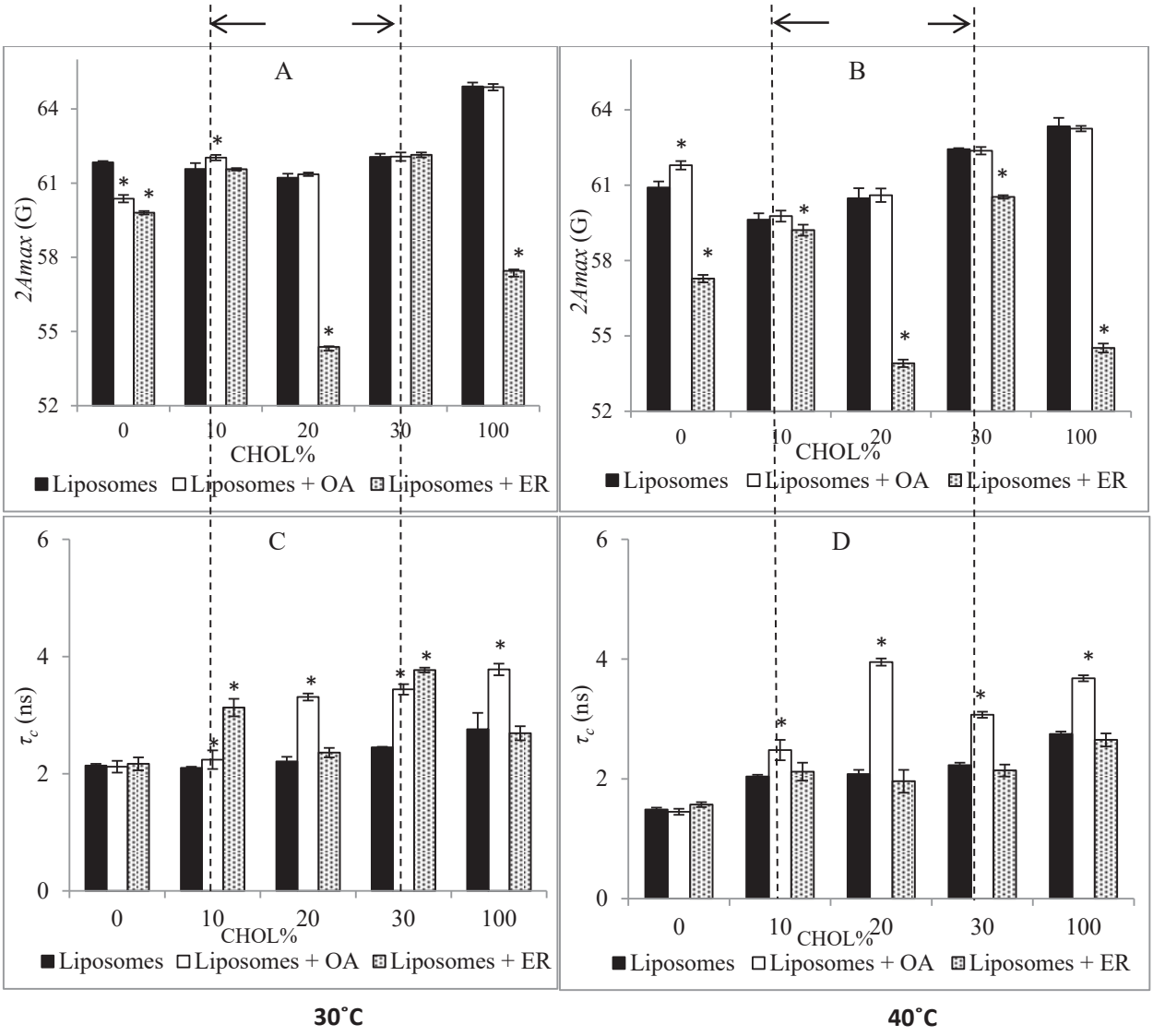



**Fig.4**. Effect of temperature and CHOL content on the maximum hyperfine splitting ($2A_{max}$) and the rotational correlation time ($\tau_c$) for spin-labeled DPPC liposomes (CHOL% 0, 10, 20, 30 and 100) exposed or not to TTPs (2.5 mol%). (A) $2A_{max}$ at 30˚C, (B) $2A_{max}$ at 40˚C, (C) $\tau_c$ at 30˚C, (D) $\tau_c$ at 40˚C.
$S_o$: solid-ordered phase, $S_o/L_d$: solid-ordered/liquid-disordered phase, $L_o$: liquid-ordered phase
Values are expressed as the mean of three independent measurements ± SD.
*P < 0.05 compared with the control value

At CHOL% 0, DPPC exists in a gel or solid-ordered ($S_o$) state (~30C˚) (Attwood, Choi, & Leonenko, 2013). It undergoes a gel to liquid crystalline phase transition at the main phase temperature of 41˚C (Perez-Camacho and Ruiz-Suarez 2017) which is close to the studied temperature of 40˚C. This phase transition is accompanied with an increase in the membrane fluidity (Heerklotz, 2004).

Since the maximum hyperfine splitting and the rotational correlation time are inversely related to the fluidity, a decrease in the EPR parameters were observed for blank liposomes with the raise of

temperature which was in agreement with previous data (Coderch et al., 2000; Kaddah et al., 2018; Zhao, Feng, Kocherginsky, & Kostetski, 2007).

Compared to the control (CHOL% 0), OA and ER increased the membrane fluidity at 30 and 40˚C at the upper region of the membrane, except for the formulations exposed to OA at 40˚C (near Tm) where a decrease in the membrane fluidity was observed. These findings were in agreement with previous data showing the fluidizing effect of ER (2.5 mol%) on the CHOL-free DPPC liposomes membranes (Abboud et al., 2016). Also, it was demonstrated that OA exerted a fluidizing effect on the CHOL-free DPPC liposomes membranes at gel state and a condensing effect in the liquid crystalline state (Han et al., 1997).

It is worth to mention that the molecular dynamics were not affected by TTPs at the hydrophobic end, meaning that TTPs were localized near the polar headgroups region of phospholipids in the absence of CHOL. This was in agreement with the calorimetric studies showing that TTPs interact with the polar headgroups (Habib et al., 2015; Prades et al., 2011). This was also reported for others TTPs as cucurbitacin E (Habib et al., 2013), dexamethasone (Bhardwaj & Burgess, 2010), cortisol, cortisone and fludrocortisone acetate (Abboud et al., 2016)

At intermediate CHOL content (10 and 20%), a solid-ordered/liquid-disordered ($S_o/L_d$) phase transition occurs (Schubert, Schneck, & Tanaka, 2011). This was accompanied with the ordering and condensing effect of CHOL (Magarkar et al., 2014) leading to a decrease in the cross-sectional area per molecule (Saito & Shinoda, 2011) and membrane fluidity (Mills et al., 2008), and an increase in membrane thickness (Rheinstädter & Mouritsen, 2013). Blank liposomes (CHOL% 10 and 20) exhibited unstable variations of the $2A_{max}$ and $\tau_c$ values which were not in accordance with the CHOL lipid packing properties. Compared to the controls (CHOL% 10 and 20), OA decreased the membrane fluidity of the upper region of the membrane for formulations (CHOL% 10) at 30˚C, and at the hydrophobic end for formulations (CHOL% 10 and 20) at 30 and 40˚C while the molecular dynamics were not affected by OA elsewhere. This means that OA was displaced toward the hydrophobic core at 40˚C (near $T_m$). Similarly, ER decreased the membrane fluidity at the hydrophobic end for formulations (CHOL% 10) at 30˚C. However, ER increased the membrane fluidity of the upper region for formulations (CHOL% 20) at 30˚C and for formulations (CHOL% 10 and 20) at 40˚C, and no effect on the molecular dynamics was detectable by the presence of ER elsewhere. This means that ER was localized close to the upper region of the membrane at 40˚C near (Tm). The heterogeneous distribution of CHOL into CHOL-poor and CHOL-rich domains within the lipid membrane assigned to the $S_o/L_d$ phase transition (Javanainen, Martinez-Seara, & Vattulainen, 2017) could affect the localization and/or the orientation of TTPs within

the lipid bilayer. It was reported that the non-uniformity of the bilayer environment may influence the position of pentacyclic TTPs in synthetic model membranes (Prades et al., 2011).

Above CHOL% 30, the liquid-ordered ($L_o$) phase occurs (Redondo-Morata et al., 2012), and this is accompanied with the formation of raft structures defined as entities rich in CHOL (Gulshan & Smith, 2014; Javanainen et al., 2017). Compared to the controls (CHOL% 30 and 100), OA decreased the membrane fluidity of the deeper region of the membrane for formulations (CHOL% 30 and 100) at 30 and 40˚C while no changes on the molecular dynamics were detectable at the upper region of the membrane. Our findings were in agreement with previous data showing that OA molecules penetrate deeply into the lipid membrane (Javanainen et al., 2017; Prades et al., 2011). In addition, structure-activity analysis indicates that the carboxyl group at C17 position which is near to the two methyl groups at C20 position promoted the raft stabilization by the tight packing of OA with phospholipids in a manner resembling to CHOL (Bayer et al., 2011).This was translated by the decrease in the membrane permeability at the hydrophobic core of the membrane, meaning that the biological activities of TTPs could be related to TTPs membrane interactions (Tsuchiya, 2015). For example, the antiarrhythmic properties of OA were attributed to its membrane stabilizing action (Senthil et al., 2007).
Also, ER decreased the membrane fluidity at the hydrophobic end for formulations (CHOL% 30) at 30˚C. However, ER increased the membrane fluidity close to the upper region of the membrane was observed for formulations (CHOL% 30 and 100) while no changes on the molecular dynamics were reported at 40˚C. This means that ER was displaced toward the polar head groups region of phospholipids at 40˚C (near $T_m$).

Although OA and ER share similar backbone, the ability of OA to displace toward the hydrophobic core could be related to the dimerization of OA molecules through H-bonding between the carboxylic groups that prevails the OA-water hydrogen bonds (Lorincz et al., 2015; Teixeira, Garcia, Ilharco, Gonçalves Da Silva, & Fernandes, 2010). It seems that the lipophilicity of TTPs (log P) is not the main factor controlling their effect on the membrane fluidity. According to literature, the log P value of OA is 6.12 (PubChem) which is smaller than that of ER (7.6;(Abboud et al., 2016)) despite the fluidity studies showed the ability of OA to localize at the hydrophobic core following CHOL addition.

On the overall, OA and ER both affect the upper and deeper regions of the membrane at 30˚C (< $T_m$). At 40˚C (near $T_m$), ER tends to localize close to the interface of the lipid bilayer and increases the membrane fluidity while OA was displaced toward the hydrophobic end and decreased the membrane fluidity.

3.3. Permeability study

For permeability studies, liposomes are prepared by reverse phase evaporation (REV) technique as their large aqueous core is suitable for the high loading of hydrophilic molecules (Khreich et al., 2008). In the present work, the release kinetics of SRB from TTPs-loaded liposomes was followed, and the TTP percentage was of 2.5%, and 10% (OA). Also, the SRB release from the preformed DPPC liposomes differing by their CHOL content (from 0 to 100%) and exposed to TTPs at 2.5% was studied.

3.3.1. Release kinetics of SRB from TTPs-loaded liposomes

Although the phospholipid:cholesterol stoichiometry has been a matter of debate (Castanho, Prieto, & Jameson, 1999),1:1 or 2:1 molar ratios are considered to be the most widely used for DPPC:CHOL binary mixture (Briuglia, Rotella, McFarlane, & Lamprou, 2015). Previous data showed that the DPPC:CHOL molar ratio of 1:1 is stable in water (Collins & Phillips, 1982), and is considered as a "long-lived complex" (Phillips & Finer, 1974). For this reason, the DPPC:CHOL molar ratio of 1:1 is primarily chosen and the permeability study of TTPs-loaded liposomes was carried out at 37˚C over 10 days. The SRB release kinetics from blank and TTPs-loaded liposomes were presented in Fig.5.

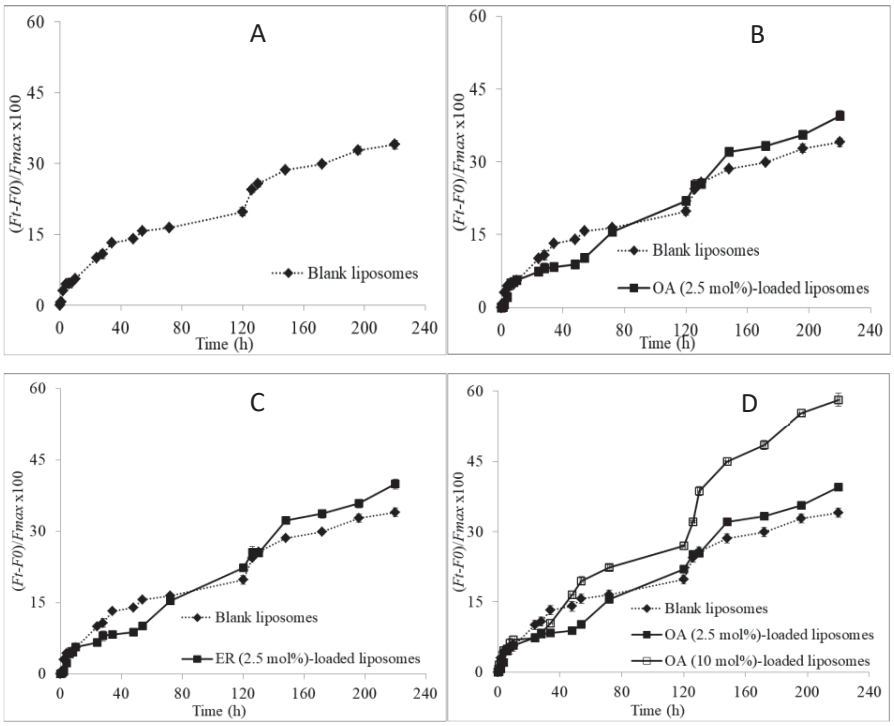



**Fig.5.** The $(F_t\text{-}F_0)/F_{max}$ x100 variation with time at 37˚C for TTPs-loaded liposomes. (A) Blank liposomes, TTPs (2.5 mol%)-loaded liposomes: (B) OA-, (C) ER, TTPs (10 mol%)-loaded liposomes: (D) OA. Values are expressed as the mean of three independent release kinetics ± SD.

The percentage of released SRB from blank liposomes (Fig. 5A) was 14 and 34% at 48 and 220 h, respectively. Similar SRB release kinetics were obtained for OA- and ER-loaded liposomes (Fig. 5B and C), and the percentage of released SRB was equal to 8% at 48 h. The decrease in the membrane permeability is associated with formation of rafts domains leading to a packed and rigid structure (Choi et al., 2014).Permeability studies were consistent with the EPR measurements showing a decrease in the membrane permeability and fluidity (CHOL% 100). This confirms the stabilization of raft domains by the light packing of OA with phospholipids as described by Lopez et al. (2014) (Lopez et al., 2014). In contrast, the decrease in the membrane permeability in the presence of ER was not consistent with the EPR measurements (increase in the membrane fluidity close to the polar region at CHOL% 100). It was demonstrated by Han et al. (1997) that the proper orientation of the molecules might be the main factor modulating the membrane fluidity while their distribution within the lipid membrane promote their condensing effect (Han et al., 1997).

After 220 h, OA and ER produced a weak difference in the SRB release kinetics where $(F_t\text{-}F_0)/F_{max}$ x 100 was equal to 39%. It is well-known that raft domains are transient structures with a short lifetime (Meinhardt, Vink, & Schmid, 2013; Sezgin, Levental, Mayor, & Eggeling, 2017).This was translated by an increase in the release of SRB after a long period of incubation. In addition, the effect of TTP on the membrane permeability could be time-dependent. It was reported that the inhibition of the growth of cancers cells by OA was time-dependent (Zhu, Huang, & Wu, 2015), and this was also reported for ER (Allouche et al., 2011).

On the overall, OA and ER both decreased the membrane permeability over 48 h of incubation while a moderate effect on the release kinetics of SRB was observed after 220 h. Hence, the effect of TTP on the bilayer permeability was studied at 10 mol%, and OA was selected as a model. The SRB release kinetics from OA-loaded liposomes at 10 mol% were presented in (Fig. 5D), and the SRB release kinetics from OA-loaded liposomes at 2.5 mol% were added to the release curves for comparison.

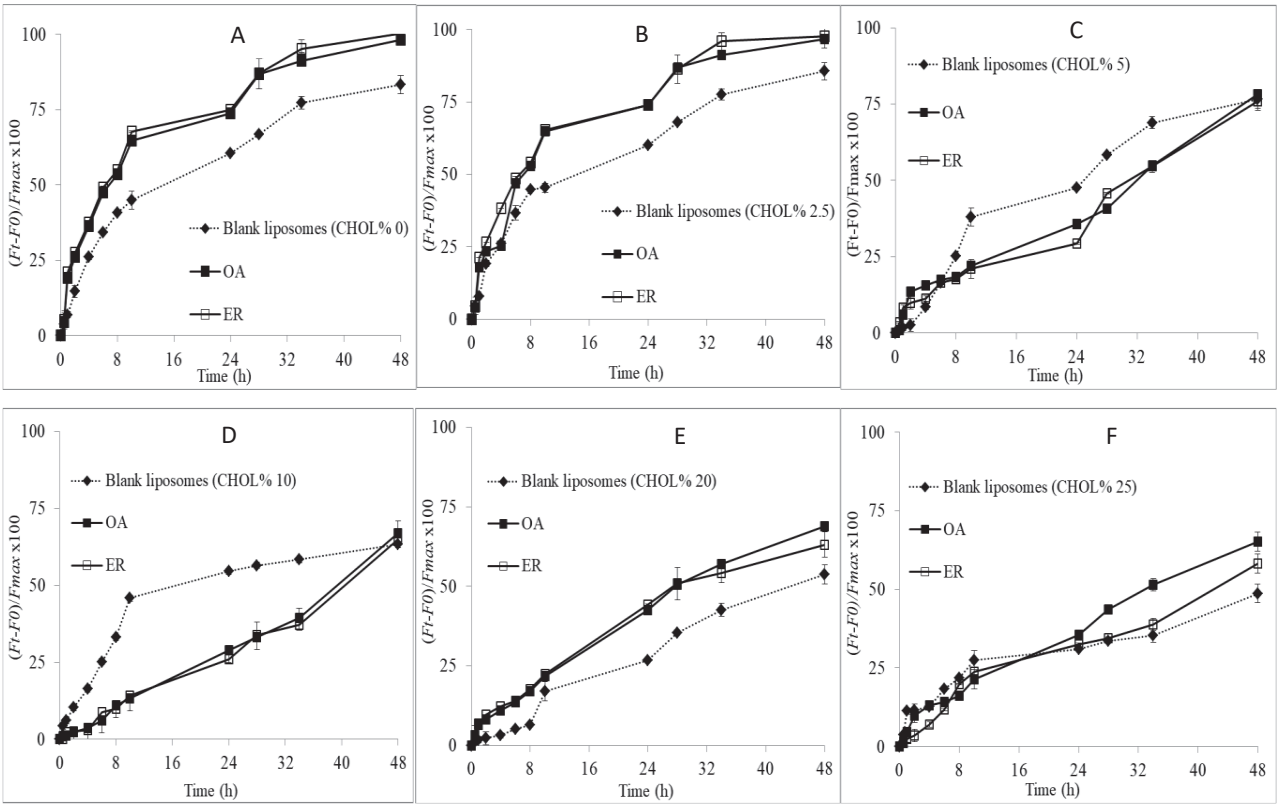
Compared to blank liposomes, a strong difference in the release of SRB was observed when the OA content was increased from 2.5 to 10 mol%. The percentage of released SRB was equal to 16 and 58% at 48 and 220 h, respectively. It seems that the effect of TTP on the membrane permeability could be dose-dependent. In another study, it was reported that increasing the UA content to 10 mol% into DPPC liposomes induces a shape transition from regular to irregular vesicles with the formation of non-layered (cubic or hexagonal) and amorphous nanostructures (Lorincz et al., 2015). The distortion of the lipid

bilayer following TTP content increase may explain the increase in the release of SRB from OA-loaded liposomes at 10 mol%.

Another possible explanation could be related to the limit of solubility of the TTP into liposomes. It was reported that the limit of TTP miscibility in DPPC membranes was of 20:1 (phospholipid:TTP molar ratio) (Prades et al., 2011), which is equivalent to DPPC:TTP molar ratio of 100:5. Here increasing the OA content at 10 mol% could promote its precipitation promoting the destabilization the lipid membrane, thus an increase in the release of SRB.

3.3.2. Release kinetics of SRB from DPPC liposomes differing by CHOL content and exposed to TTPs

The SRB release kinetics from the various DPPC formulations (CHOL% 0, 2.5, 5, 10, 20, 25, 30, 50 and 100) exposed to TTPs at 2.5 mol% were followed over 48 h at 37˚C. The kinetic release curves were presented in Fig.6.



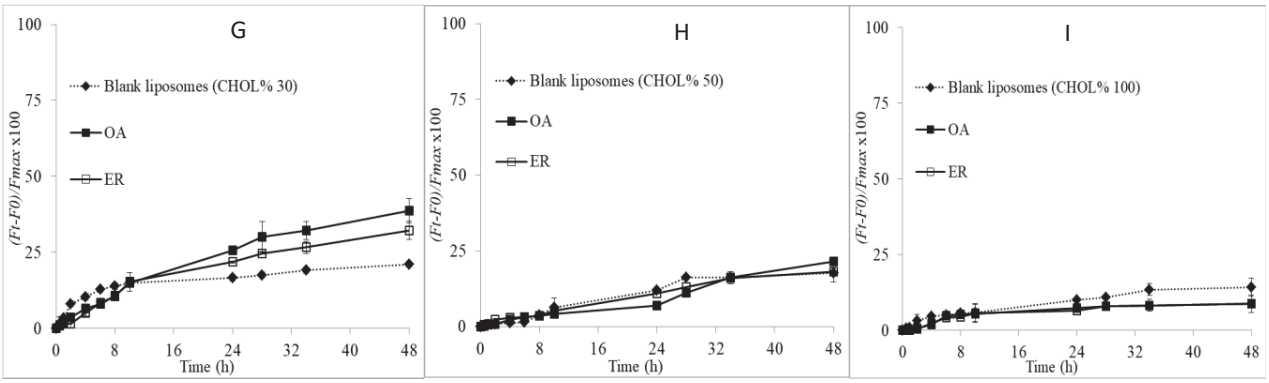



**Fig.6.** SRB release curves of DPPC liposomes exposed to TTPs at 2.5 mol% over 48 h at 37˚C and containing various CHOL%: (A) 0%, (B) 2.5%, (C) 5%, (D) 10%, (E) 20%, (F) 25%, (G) 30%, (H) 50% and (I) 100%. Values are expressed as the mean of three independent release kinetics ± SD.

Blank liposomes differing by their CHOL content were compared for the leakage of SRB, and the results were in accordance with previous SRB release kinetics showing a biphasic pattern except for formulations loaded at high CHOL content (50 and 100%) (Kaddah et al., 2018). The SRB release kinetics were then fitted into various mathematical models. The release constant values ($K_1$ and $K_2$) were determined in order to explore the SRB release mechanisms from the different formulations (Singhvi & Singh, 2011). In our study, the Higuchi model based on diffusion-controlled process (Romero et al., 2018) was selected, and the release constants values $K_1$ (Fig. 7A) and $K_2$ (Fig. 7B) for the first (from 0 to 10 h) and second (from 10 to 48 h) release phases were determined for blank liposomes (CHOL% 0-100) exposed or not to TTPs at 2.5 mol%.

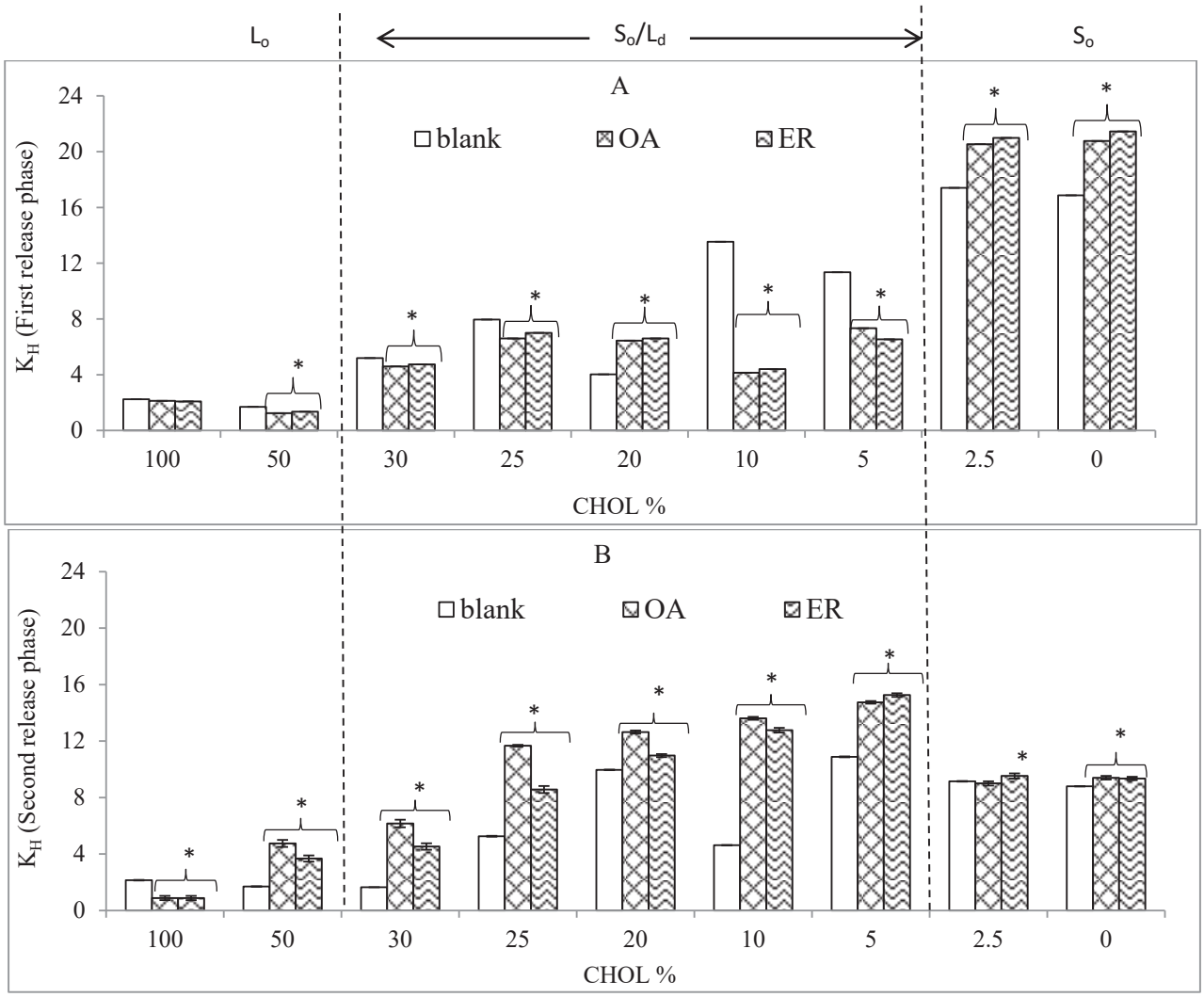



**Fig.7.** Higuchi SRB release constants determined for the two release phases for blank liposomes (CHOL% 0-100) exposed or not to TTPs at 2.5 mol%. (A) $K_1$ values: first phase, from 0 to 10 h; (B) $K_2$ values: second phase, from 10 to 48 h. Values are expressed as the mean of three different measurements ± SD.

$S_o$: solid-ordered phase, $S_o/L_d$ : solid-ordered/liquid-disordered phase, $L_o$: liquid-ordered phase.

*P < 0.05 compared with the control value

In our previous publication, blank liposomes exhibited a decrease in the membrane permeability for SRB following CHOL addition (from 0 to 100% CHOL) (Kaddah et al., 2018).

Blank liposomes (CHOL% 0, 2.5) ($S_0$ state) showed an increase in the Higuchi release constants (Fig. 7A and B), and this confirms the fluidizing effect of CHOL at low content in the gel phase (Smith, Wang, & Dea, 2012). Compared to the controls (CHOL% 0 and 2.5), TTPs increased the membrane permeability for formulations (CHOL% 0 and 2.5) in the first and second release phases (except at CHOL% 2.5 exposed to OA in the second phase where no effect on the membrane permeability was

observed). These results confirmed also the fluidizing effect of TTPs demonstrated by EPR measurements at the gel state.

At intermediate CHOL content (5, 10, 20 and 25%) ($S_o/L_d$ state), blank liposomes (CHOL% 5-25) showed unstable variations of the Higuchi release constants following CHOL addition which are not in accordance with the condensing and ordering effect of CHOL. Compared to the controls (CHOL% 5, 10, 20 and 25), OA and ER increased the membrane permeability in the first release phase for formulations (CHOL% 5, 10 and 25) while the contrary effect was observed for formulations (CHOL% 20). This confirms also the condensing effect of OA in a manner resembling to CHOL. In the second release phase, OA and ER both increased the membrane permeability for formulations (CHOL% 5-25), and this could be associated to the heterogeneous distribution of CHOL affecting the position of TTP within the lipid bilayer.

Above CHOL% 30 ($L_o$ state) and compared to the controls (CHOL% 30, 50 and 100), TTPs decreased the membrane permeability for formulations in the first release phase (CHOL% 30 and 50) while no effect of TTPs was observed at CHOL% 100. Similarly, OA and ER decreased the membrane permeability for formulations (CHOL% 100) in the second release phase. The contrary effect was obtained for formulations (CHOL% 30 and 50) exposed to both OA and ER in the second release phase. The raft domains assigned to the $L_o$ state are short-lived, transient and highly dynamic entities (Martinez-Seara, Róg, Karttunen, Vattulainen, & Reigada, 2010; Sezgin et al., 2017), and this was associated with the increase of the liposome membrane permeability exposed to TTPs in the second release phase whatever was the CHOL content (except at CHOL 100%). Also, the distortion of the lipid membrane following its exposure to TTPs cannot be excluded. A recent study showed that treating the human hepatocellular carcinoma HepG2 cells with OA induced morphological changes in terms of cell shrinkage and membrane blebbing (Zhu et al., 2015). This may explain the distortion of the lipid membrane in the second release phase leading to an increase in the liposome membrane permeability.

In parallel, it is worth to mention that similar Higuchi release constants were obtained for the TTP-loaded liposomes and the formulations exposed to TTPs (data not shown). The modification in the experimental protocol design derived from a previous study showing a difference between the SRB release kinetics profiles obtained from formulations exposed to, or loaded with tetracyclic TTPs (unpublished data). The drug structural feature seems to be the main factor modulating the membrane properties. These findings render the selection of the appropriate experimental protocol design more complex as the latter is strongly related to the therapeutic outcomes.

On the overall and above CHOL% 5, TTPs tend to decrease the bilayer permeability in the first release phase while the contrary effect was observed in the second release phase.

## 4. Conclusion

To sum up, we studied the parameters that control the effect of oleanolic acid and erythrodiol on the bilayer permeability and fluidity of DPPC liposomes differing by their CHOL content. Two approaches were adopted in the experimental protocol design investigation (loading liposomes with TTPs or treating liposomes by TTPs). OA and ER both induce an increase in the liposome size with a monodispersed size distribution. Fluidity and permeability studies showed that the CHOL content, TTP concentration, period of incubation are the main factors modulating the membrane properties rather than the experimental protocol design. The results of this study could be used as a suitable tool for understanding and predicting the effect of the lipophilic drugs on liposome membrane properties as well as for optimizing the drug delivery systems based on liposomes.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.


## Acknowledgments

Authors thank the Agence Universitaire de la Francophonie (PCSI 2015-2017).


## References


Abboud, R., Charcosset, C., & Greige-Gerges, H. (2016). Tetra- and Penta-Cyclic Triterpenes Interaction with Lipid Bilayer Membrane: A Structural Comparative Study. *Journal of Membrane Biology*, *249*(3), 327–338. http://doi.org/10.1007/s00232-016-9871-8

Agarwal, R., Iezhitsa, I., Agarwal, P., Abdul Nasir, N. A., Razali, N., Alyautdin, R., & Ismail, N. M. (2016). Liposomes in topical ophthalmic drug delivery: an update. *Drug Delivery*, *23*(4), 1075–1091. http://doi.org/10.3109/10717544.2014.943336

Ahumada, M., Calderon, C., & Lissi, E. A. (2016). temperature dependence of bilayer properties in liposomes and the use of fluorescent probes as a tool to elucidate the permeation mechanism of hydrophilic solutES, *3*, 60–62.

Allouche, Y., Beltrán, G., Gaforio, J. J., Uceda, M., & Mesa, M. D. (2010). Antioxidant and antiatherogenic

activities of pentacyclic triterpenic diols and acids. *Food and Chemical Toxicology*, *48*(10), 2885–2890. http://doi.org/10.1016/j.fct.2010.07.022

Allouche, Y., Warleta, F., Campos, M., Sánchez-Quesada, C., Uceda, M., Beltrán, G., & Gaforio, J. J. (2011). Antioxidant, antiproliferative, and pro-apoptotic capacities of pentacyclic triterpenes found in the skin of olives on MCF-7 human breast cancer cells and their effects on DNA damage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(1), 121–130. http://doi.org/10.1021/jf102319y

Alqahtani, A., Hamid, K., Kam, A., Wong, K. H., Abdelhak, Z., Razmovski-Naumovski, V., … Li, G. Q. (2013). The Pentacyclic Triterpenoids in Herbal Medicines and Their Pharmacological Activities in Diabetes and Diabetic Complications. *Current Medicinal Chemistry*, *20*(7), 908–931. http://doi.org/10.2174/092986713805219082

Attwood, S., Choi, Y., & Leonenko, Z. (2013). Preparation of DOPC and DPPC Supported Planar Lipid Bilayers for Atomic Force Microscopy and Atomic Force Spectroscopy. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(2), 3514–3539. http://doi.org/10.3390/ijms14023514

Ayeleso, T., & Matumba, M. (2017). Oleanolic Acid and Its Derivatives: Biological Activities and Therapeutic Potential in Chronic Diseases. *Molecules*, *22*(11), 1915. http://doi.org/10.3390/molecules22111915

Bailey, R. W., Nguyen, T., Robertson, L., Gibbons, E., Nelson, J., Christensen, R. E., … Bell, J. D. (2009). Sequence of physical changes to the cell membrane during glucocorticoid-induced apoptosis in S49 lymphoma cells. *Biophysical Journal*, *96*(7), 2709–2718. http://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.12.3925

Bayer, M., Proksch, P., Felsner, I., Brenden, H., Kohne, Z., Walli, R., … Grether-Beck, S. (2011). Photoprotection against UVAR: Effective triterpenoids require a lipid raft stabilizing chemical structure. *Experimental Dermatology*, *20*(11), 955–958. http://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2011.01350.x

Bhardwaj, U., & Burgess, D. J. (2010). Physicochemical properties of extruded and non-extruded liposomes containing the hydrophobic drug dexamethasone. *International Journal of Pharmaceutics*, *388*(1–2), 181–189. http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.01.003

Biruss, B., Dietl, R., & Valenta, C. (2007). The influence of selected steroid hormones on the physicochemical behaviour of DPPC liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids*, *148*(2), 84–90. http://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2007.04.009

Bischof, J. C., Padanilam, J., Holmes, W. H., Ezzell, R. M., Lee, R. C., Tompkins, R. G., … Toner, M. (1995). Dynamics of Cell-Membrane Permeability Changes at Supraphysiological Temperatures. *Biophys J*, *68*(6), 2608–2614. http://doi.org/10.1016/S0006-3495(95)80445-5

Briuglia, M. L., Rotella, C., McFarlane, A., & Lamprou, D. A. (2015). Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. *Drug Delivery and Translational Research*, *5*(3), 231–242. http://doi.org/10.1007/s13346-015-0220-8

Broniatowski, M., Flasiński, M., Zięba, K., & Miśkowiec, P. (2014). Interactions of pentacyclic triterpene acids with cardiolipins and related phosphatidylglycerols in model systems. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1838*(10), 2530–2538. http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.05.027

Cao, S., Dong, X.-L., Ho, M.-X., Yu, W.-X., Wong, K.-C., Yao, X.-S., & Wong, M.-S. (2018). Oleanolic Acid

Exerts Osteoprotective Effects and Modulates Vitamin D Metabolism. *Nutrients*, *10*(2), 247. http://doi.org/10.3390/nu10020247

Castanho, M. A. R. B., Prieto, M., & Jameson, D. M. (1999). The pentaene macrolide antibiotic filipin prefers more rigid DPPC bilayers: A fluorescence pressure dependence study. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1419*(1), 1–14. http://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00049-8

Cathcart, K., Patel, A., Dies, H., Rheinstädter, M., & Fradin, C. (2015). Effect of Cholesterol on the Structure of a Five-Component Mitochondria-Like Phospholipid Membrane. *Membranes*, *5*(4), 664–684. http://doi.org/10.3390/membranes5040664

Choi, Y., Attwood, S. J., Hoopes, M. I., Drolle, E., Karttunen, M., & Leonenko, Z. (2014). Melatonin directly interacts with cholesterol and alleviates cholesterol effects in dipalmitoylphosphatidylcholine monolayers. *Soft Matter*, *10*(1), 206–213. http://doi.org/10.1039/C3SM52064A

Coderch, L., Fonollosa, J., De Pera, M., Estelrich, J., De La Maza, A., & Parra, J. . (2000). Influence of cholesterol on liposome fluidity by EPR. *Journal of Controlled Release*, *68*(1), 85–95. http://doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00240-6

Collins, J. J., & Phillips, M. C. (1982). The stability and structure of cholesterol-rich codispersions of cholesterol and phosphatidylcholine. *Journal of Lipid Research*, *23*(2), 291–8. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7077143

Cruz, M. D. F. S. J., Pereira, G. M., Ribeiro, M. G., Da Silva, A. M., Tinoco, L. W., Da Silva, B. P., & Parente, J. P. (2015). Ingasaponin, a complex triterpenoid saponin with immunological adjuvant activity from Inga laurina. *Carbohydrate Research*, *420*, 23–31. http://doi.org/10.1016/j.carres.2015.11.008

Dawaliby, R., Trubbia, C., Delporte, C., Noyon, C., Ruysschaert, J. M., Van Antwerpen, P., & Govaerts, C. (2016). Phosphatidylethanolamine is a key regulator of membrane fluidity in eukaryotic cells. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(7), 3658–3667. http://doi.org/10.1074/jbc.M115.706523

Düzgüneş, N., Faneca, H., & Lima, M. C. (2010). Methods to monitor liposome fusion, permeability, and interaction with cells. *Methods Mol Biol.*, *606*, 209–32. http://doi.org/10.1007/978-1-60761-447-0_16

Gulshan, K., & Smith, J. D. (2014). Sphingomyelin regulation of plasma membrane asymmetry, efflux and reverse cholesterol transport. *Clinical Lipidology*, *9*(3), 383–393. http://doi.org/10.2217/clp.14.28

Guo, W., Quan, P., Fang, L., Cun, D., & Yang, M. (2015). Sustained release donepezil loaded PLGA microspheres for injection: Preparation, in vitro and in vivo study. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *10*(5), 405–414. http://doi.org/10.1016/j.ajps.2015.06.001

Habib, L., Jraij, A., Khreich, N., Charcosset, C., & Greige-Gerges, H. (2015). Effect of Erythrodiol, A Natural Pentacyclic Triterpene from Olive Oil, on the Lipid Membrane Properties. *Journal of Membrane Biology*, *248*(6), 1079–1087. http://doi.org/10.1007/s00232-015-9821-x

Haeri, A., Alinaghian, B., Daeihamed, M., & Dadashzadeh, S. (2014). Preparation and characterization of stable nanoliposomal formulation of fluoxetine as a potential adjuvant therapy for drug-resistant tumors. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, *13*(SUPPL), 3–14.

Haller, J., Mikics, É., & Makara, G. B. (2008). The effects of non-genomic glucocorticoid mechanisms on bodily

functions and the central neural system. A critical evaluation of findings. *Frontiers in Neuroendocrinology*. http://doi.org/10.1016/j.yfrne.2007.10.004

Hamishehkar, H., Ghanbarzadeh, S., Sepehran, S., Javadzadeh, Y., Adib, Z. M., & Kouhsoltani, M. (2015). Histological assessment of follicular delivery of flutamide by solid lipid nanoparticles: potential tool for the treatment of androgenic alopecia. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, (July), 1–8. http://doi.org/10.3109/03639045.2015.1062896

Han, S. K., Ko, Y. I., Park, S. J., Jin, I. J., & Kim, Y. M. (1997). Oleanolic acid and ursolic acid stabilize liposomal membranes. *Lipids*, *32*(7), 769–773. http://doi.org/10.1007/s11745-997-0098-9

Heerklotz, H. (2004). The microcalorimetry of lipid membranes. *Journal of Physics Condensed Matter*, *16*(15). http://doi.org/10.1088/0953-8984/16/15/R01

Higuchi, T. (1963). Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *52*(12), 1145–1149. http://doi.org/10.1002/jps.2600521210

Javanainen, M., Martinez-Seara, H., & Vattulainen, I. (2017). Nanoscale Membrane Domain Formation Driven by Cholesterol. *Scientific Reports*, *7*(1), 1143. http://doi.org/10.1038/s41598-017-01247-9

Jesus, J. A., Lago, J. H. G., Laurenti, M. D., Yamamoto, E. S., & Passero, L. F. D. (2015). Antimicrobial activity of oleanolic and ursolic acids: An update. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2015*(Figure 1). http://doi.org/10.1155/2015/620472

Juan, M. E., Wenzel, U., Daniel, H., & Planas, J. M. (2008). Erythrodiol, a natural triterpenoid from olives, has antiproliferative and apoptotic activity in HT-29 human adenocarcinoma cells. *Molecular Nutrition and Food Research*, *52*(5), 595–599. http://doi.org/10.1002/mnfr.200700300

Kaddah, S., Khreich, N., Kaddah, F., Charcosset, C., & Greige-Gerges, H. (2018). Cholesterol modulates the liposome membrane fluidity and permeability for a hydrophilic molecule. *Food and Chemical Toxicology*, *113*(January), 40–48. http://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.017

Karn, P. R., Cho, W., Park, H. J., Park, J. S., & Hwang, S. J. (2013). Characterization and stability studies of a novel liposomal cyclosporin a prepared using the supercritical fluid method: Comparison with the modified conventional Bangham method. *International Journal of Nanomedicine*, *8*, 365–377. http://doi.org/10.2147/IJN.S39025

Keith, A., Bulfield, G., & Snipes, W. (1970). Spin-Labeled Neurospora Mitochondria. *Biophysical Journal*, *10*(7), 618–629. http://doi.org/10.1016/S0006-3495(70)86324-X

Khreich, N., Lamourette, P., Boutal, H., Devilliers, K., Créminon, C., & Volland, H. (2008). Detection of Staphylococcus enterotoxin B using fluorescent immunoliposomes as label for immunochromatographic testing. *Analytical Biochemistry*, *377*(2), 182–188. http://doi.org/10.1016/j.ab.2008.02.032

Kim, E., Noh, K., Lee, S. J., Shin, B., Hwang, J. T., Lee, S. W., … Kang, W. (2016). Simultaneous determination of 3-O-acetyloleanolic acid and oleanolic acid in rat plasma using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *118*, 96–100. http://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.10.030

Kornmueller, K., Lehofer, B., Meindl, C., Fröhlich, E., Leitinger, G., Amenitsch, H., & Prassl, R. (2016). Peptides at the Interface: Self-Assembly of Amphiphilic Designer Peptides and Their Membrane Interaction Propensity. *Biomacromolecules*, *17*(11), 3591–3601. http://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b01089

Lopez, S., Bermudez, B., Montserrat-De La Paz, S., Jaramillo, S., Varela, L. M., Ortega-Gomez, A., … Muriana, F. J. G. (2014). Membrane composition and dynamics: A target of bioactive virgin olive oil constituents. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1838*(6), 1638–1656. http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.01.007

Lorincz, A., Mihály, J., Németh, C., Wacha, A., & Bóta, A. (2015). Effects of ursolic acid on the structural and morphological behaviours of dipalmitoyl lecithin vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1848*(5), 1092–1098. http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.01.010

Martín, R., Hernández, M., Córdova, C., & Nieto, M. L. (2012). Natural triterpenes modulate immune-inflammatory markers of experimental autoimmune encephalomyelitis: therapeutic implications for multiple sclerosis. *British Journal of Pharmacology*, *166*(5), 1708–23. http://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01869.x

Martinez-Seara, H., Róg, T., Karttunen, M., Vattulainen, I., & Reigada, R. (2010). Cholesterol Induces Specific Spatial and Orientational Order in Cholesterol/Phospholipid Membranes. *PLoS ONE*, *5*(6), e11162. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0011162

Meinhardt, S., Vink, R. L. C., & Schmid, F. (2013). Monolayer curvature stabilizes nanoscale raft domains in mixed lipid bilayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(12), 4476–4481. http://doi.org/10.1073/pnas.1221075110

Mills, T. T., Toombes, G. E. S., Tristram-Nagle, S., Smilgies, D., Feigenson, G. W., & Nagle, J. F. (2008). Order Parameters and Areas in Fluid-Phase Oriented Lipid Membranes Using Wide Angle X-Ray Scattering. *Biophysical Journal*, *95*(2), 669–681. http://doi.org/10.1529/biophysj.107.127845

Najafinobar, N., Mellander, L. J., Kurczy, M. E., Dunevall, J., Angerer, T. B., Fletcher, J. S., & Cans, A.-S. (2016). Cholesterol Alters the Dynamics of Release in Protein Independent Cell Models for Exocytosis. *Scientific Reports*, *6*(1), 33702. http://doi.org/10.1038/srep33702

Nasr, M., Taha, I., & Hathout, R. M. (2013). Suitability of liposomal carriers for systemic delivery of risedronate using the pulmonary route. *Drug Delivery*, *20*(8), 311–318. http://doi.org/10.3109/10717544.2013.835160

Nishino, H., Nishino, A., Takayasu, J., Hasegawa, T., Iwashima, A., Hirabayashi, K., … Shibata, S. (1988). Inhibition of the Tumor-Promoting Action of 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate by some Oleanane-Type Triterpenoid Compounds. *Cancer Research*, *48*(18), 5210–5215.

Ong, S., Chitneni, M., Lee, K., Ming, L., & Yuen, K. (2016). Evaluation of Extrusion Technique for Nanosizing Liposomes. *Pharmaceutics*, *8*(4), 36. http://doi.org/10.3390/pharmaceutics8040036

Penduka, D., Mosa, R., Simelane, M., Basson, A., Okoh, A., & Opoku, A. (2014). Evaluation of the anti-Listeria potentials of some plant-derived triterpenes. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, *13*(1). http://doi.org/10.1186/s12941-014-0037-1

Phillips, M. C., & Finer, E. G. (1974). The stoichiometry and dynamics of lecithin-cholesterol clusters in bilayer

membranes. *BBA - Biomembranes*, *356*(2), 199–206. http://doi.org/10.1016/0005-2736(74)90283-1

Prades, J., Vögler, O., Alemany, R., Gomez-Florit, M., Funari, S. S., Ruiz-Gutiérrez, V., & Barceló, F. (2011). Plant pentacyclic triterpenic acids as modulators of lipid membrane physical properties. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1808*(3), 752–760. http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.12.007

Redondo-Morata, L., Giannotti, M. I., & Sanz, F. (2012). Influence of cholesterol on the phase transition of lipid bilayers: A temperature-controlled force spectroscopy study. *Langmuir*, *28*(35), 12851–12860. http://doi.org/10.1021/la302620t

Rheinstädter, M. C., & Mouritsen, O. G. (2013). Small-scale structure in fluid cholesterol-lipid bilayers. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, *18*(5), 440–447. http://doi.org/10.1016/j.cocis.2013.07.001

Rodríguez-Rodríguez, R., Herrera, M. D., Perona, J. S., & Ruiz-Gutiérrez, V. (2004). Potential vasorelaxant effects of oleanolic acid and erythrodiol, two triterpenoids contained in 'orujo' olive oil, on rat aorta. *British Journal of Nutrition*, *92*(04), 635. http://doi.org/10.1079/BJN20041231

Romero, A. I., Villegas, M., Cid, A. G., Parentis, M. L., Gonzo, E. E., & Bermúdez, J. M. (2018). Validation of kinetic modeling of progesterone release from polymeric membranes. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *13*(1), 54–62. http://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.08.007

Saito, H., & Shinoda, W. (2011). Cholesterol effect on water permeability through DPPC and PSM lipid bilayers: A molecular dynamics study. *Journal of Physical Chemistry B*, *115*(51), 15241–15250. http://doi.org/10.1021/jp201611p

Schubert, T., Schneck, E., & Tanaka, M. (2011). First order melting transitions of highly ordered dipalmitoyl phosphatidylcholine gel phase membranes in molecular dynamics simulations with atomistic detail. *Journal of Chemical Physics*, *135*(5), 1–11. http://doi.org/10.1063/1.3615937

Senthil, S., Sridevi, M., & Pugalendi, K. V. (2007). Cardioprotective Effect of Oleanolic Acid on Isoproterenol-Induced Myocardial Ischemia in Rats. *Toxicologic Pathology*, *35*(3), 418–423. http://doi.org/10.1080/01926230701230312

Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S., & Eggeling, C. (2017). The mystery of membrane organization: Composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *18*(6), 361–374. http://doi.org/10.1038/nrm.2017.16

Singhvi, G., & Singh, M. (2011). Review : in-Vitro Drug Release Characterization Models. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research*, *II*(I), 77–84.

Smith, E. A., Wang, W., & Dea, P. K. (2012). Effects of cholesterol on phospholipid membranes: Inhibition of the interdigitated gel phase of F-DPPC and F-DPPC/DPPC. *Chemistry and Physics of Lipids*, *165*(2), 151–159. http://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2011.12.006

Soema, P. C., Willems, G. J., Jiskoot, W., Amorij, J. P., & Kersten, G. F. (2015). Predicting the influence of liposomal lipid composition on liposome size, zeta potential and liposome-induced dendritic cell maturation using a design of experiments approach. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *94*, 427–435. http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.06.026

Stepien, P., Polit, A., & Wisniewska-Becker, A. (2015). Comparative EPR studies on lipid bilayer properties in

nanodiscs and liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1848*(1), 60–66. http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.10.004

Teixeira, A. C. T., Garcia, A. R., Ilharco, L. M., Gonçalves Da Silva, A. M. P. S., & Fernandes, A. C. (2010). Phase behaviour of oleanolic acid, pure and mixed with stearic acid: Interactions and crystallinity. *Chemistry and Physics of Lipids*, *163*(7), 655–666. http://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2010.06.001

Toppozini, L., Meinhardt, S., Armstrong, C. L., Yamani, Z., Kucerka, N., Schmid, F., & Rheinstadter, M. C. (2014). Structure of cholesterol in lipid rafts. *Physical Review Letters*, *113*(22), 1–5. http://doi.org/10.1103/PhysRevLett.113.228101

Tsuchiya, H. (2015). Membrane interactions of phytochemicals as their molecular mechanism applicable to the discovery of drug leads from plants. *Molecules*, *20*(10), 18923–18966. http://doi.org/10.3390/molecules201018923

Valdés, K., Morales, J., Rodríguez, L., & Günther, G. (2016). Potential use of nanocarriers with pentacyclic triterpenes in cancer treatments. *Nanomedicine*, *11*(23), 3139–3156. http://doi.org/10.2217/nnm-2016-0251

Wang, J., Yu, M., Xiao, L., Xu, S., Yi, Q., & Jin, W. (2013). Radiosensitizing effect of oleanolic acid on tumor cells through the inhibition of GSH synthesis in vitro. *Oncology Reports*, *30*(2), 917–924. http://doi.org/10.3892/or.2013.2510

Xu, C., Wang, B., Pu, Y., Tao, J., & Zhang, T. (2018). Techniques for the analysis of pentacyclic triterpenoids in medicinal plants. *Journal of Separation Science*, *41*(1), 6–19. http://doi.org/10.1002/jssc.201700201

Xue, S., Yin, J., Shao, J., Yu, Y., Yang, L., Wang, Y., Ye, H. (2017). A Synthetic-Biology-Inspired Therapeutic Strategy for Targeting and Treating Hepatogenous Diabetes. *Molecular Therapy*, *25*(2), 443–455. http://doi.org/10.1016/j.ymthe.2016.11.008

Yang, S. T., Kreutzberger, A. J. B., Kiessling, V., Ganser-Pornillos, B. K., White, J. M., & Tamm, L. K. (2017). HIV virions sense plasma membrane heterogeneity for cell entry. *Science Advances*, *3*(6), 1–13. http://doi.org/10.1126/sciadv.1700338

Zhao, L., Feng, S.-S., Kocherginsky, N., & Kostetski, I. (2007). DSC and EPR investigations on effects of cholesterol component on molecular interactions between paclitaxel and phospholipid within lipid bilayer membrane. *International Journal of Pharmaceutics*, *338*(1–2), 258–266. http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.01.045

Zhou, Q., Liu, L., Zhang, D., & Fan, X. (2012). Preparation and characterization of gemcitabine liposome injections. *Pharmazie*, *67*(10), 844–847. http://doi.org/10.1691/ph.2012.1157

Zhu, Y. Y., Huang, H. Y., & Wu, Y. L. (2015). Anticancer and apoptotic activities of oleanolic acid are mediated through cell cycle arrest and disruption of mitochondrial membrane potential in HepG2 human hepatocellular carcinoma cells. *Molecular Medicine Reports*, *12*(4), 5012–5018. http://doi.org/10.3892/mmr.2015.4033

Žiberna, L., Šamec, D., Mocan, A., Nabavi, S., Bishayee, A., Farooqi, A., … Nabavi, S. (2017). Oleanolic Acid Alters Multiple Cell Signaling Pathways: Implication in Cancer Prevention and Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(3), 643. http://doi.org/10.3390/ijms18030643

## Discussion générale

L'objectif de ce travail vise à étudier l'effet des triterpènes tétra- et pentacyliques sur la perméabilité et la fluidité des liposomes de type DPPC. Le taux de CHOL a été considéré vue les proportions existantes dans les cellules des eucaryotes (7-55 mol%) (Van Meer, Voelker, & Feigenson, 2008; Yeagle, 1991). Etant donné que l'étude a fait appel à une série de composés de structure proche, une relation structure-activité serait discutée. C'est ainsi que notre étude est la première à présenter les différentes fluctuations que peut subir la perméabilité d'une membrane en fonction des concentrations graduelles en CHOL et de la structure d'une molécule donnée de TTP sur la perméabilité membranaire.

### Tableau 2

Les différents motifs structuraux des triterpènes tétra- et pentacycliques

| Variables | log P* | C1=C2 | C3=O | C3-OH | C4=C5 | C4-2CH3 | C5=C6 | C6-CH3 | C6=C7 | C8-CH3 | C10-CH3 | C11=O | C11-OH | C12=C13 | C13-CH3 | C14-CH3 | C17-OH | C17-CH3COOH | C20=O | C20-2CH3 | C21-OH | C21-CH3COOH | C28-COOH | C28-OH |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **TTPs tétracycliques Corticoïdes** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Cortisol (C) | 1,6 | | + | | + | | | | | | + | | + | | + | | + | | + | | + | | | |
| Cortisone (Cn) | 1,5 | | + | | + | | | | | | | + | | | + | | + | | + | | + | | | |
| Fludrocortisone acétate (FA) | 1,7 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Méthylprednisolone (MP) | 1,9 | + | + | | + | | | + | | | + | | + | | + | | + | | + | | + | | | |
| Prednisolone (PL) | 1,6 | + | + | | + | | | | | | + | | + | | + | | + | | + | | + | | | |
| Prednisone (P) | 1,5 | + | + | | + | | | | | | | + | | | + | | + | | + | | + | | | |
| **Progestatifs** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 17-hydroxyprogestérone (17-OH PG) | 3,2 | | + | | + | | | | | | + | | | | + | | + | | + | | | | | |
| 21-hydroxyprogestérone (21-OH PG) | 2,9 | | + | | + | | | | | | + | | | | + | | | | + | | + | | | |
| Médroxyprogestérone (MPG) | 3,5 | | + | | + | | | + | | | + | | | | + | | + | | + | | | | | |
| Médroxyprogestérone acétate (MPGA) | 4,1 | | + | | + | | | + | | | + | | | | + | | | + | + | | | | | |
| Progestérone (PG) | 3,9 | | + | | + | | | | | | + | | | | + | | | | + | | | | | |
| **TTPs pentacycliques** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Acide oléanolique (OA/oleanolic acid) | 7,5 | | | + | | + | | | | + | + | | | + | | + | | | | + | | | + | |
| Erythrodiol (ER) | 7,6 | | | + | | + | | | | + | + | | | + | | + | | | | + | | | | + |

*PubChem

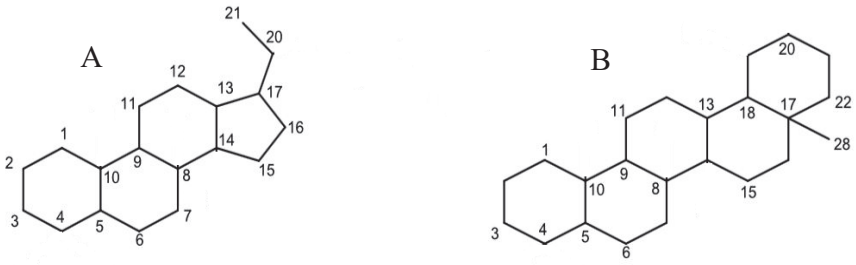



**Figure 26.** Structure de base des triterpènes. (A) triterpènes tétracycliques, (B) triterpènes pentacycliques**.**

Le tableau 2 présente les différents motifs structuraux présents sur le squelette des TTPs tétra- (Figure 26.A) et pentacycliques (Figure 26.B). Nous avons suivi deux approches expérimentales dans les études des propriétés physiques des membranes; les liposomes chargés de TTPs ou ceux exposés aux TTPs. Le choix de l'approche expérimentale n'a jamais été justifié dans la littérature, cependant, d'après nos travaux, c'est un facteur primordial à prendre en considération dans l'analyse des résultats.

Les études de perméabilité des formulations de DPPC à différents taux en CHOL ont montré un profil biphasique de la libération de la SRB pour les formulations (CHOL% 0-30) alors qu'un profil monophasique pour les formulations préparées à forte concentration en CHOL (50 et 100%). Ceci met en relief l'importance du profil des courbes à prendre en considération dans les études de cinétique. En se basant sur le profil biphasique, les constantes de libération ($K_1$ : première phase de libération/0-10 h ; $K_2$ : deuxième phase de libération/10-48 h) ont été déterminées par le modèle de Higuchi. On suppose que la première phase de libération correspond aux molécules de SRB adsorbées sur la surface des liposomes et/ou présentes à l'intérieur de la membrane alors que la deuxième phase de libération correspond à la diffusion des molécules de SRB du compartiment aqueux des liposomes vers le milieu extérieur. Bien que de nombreux modèles mathématiques ont été appliqués, le modèle de Higuchi a été choisi comme le mécanisme de libération est supposé suivre la loi de Fick (Refai, Hassan, & Abdelmonem, 2017). De même, le modèle de Higuchi est le plus couramment utilisé dans les études des cinétiques de libération à travers les bicouches lipidiques (Barzegar-Jalali et al., 2008; Javadzadeh et al., 2010).

Les constantes de libération ($K_1$ et $K_2$) obtenues à partir des liposomes préformés présentant différents taux en CHOL ont été calculées. Les résultats ont été discutés à la lumière de l'état de phase de la membrane déterminé dans les travaux de la littérature. Les tableaux 3, 4 et 5 représentent les constantes

de libération $K_1$ obtenues à partir des liposomes préformés de DPPC à différents taux en CHOL et exposés ou non à des TTPs.

**Tableau 3**
Les constantes de libération $K_1$ obtenues des formulations de DPPC (CHOL% 0 et 2,5) exposées ou non aux triterpènes

| | | Liposomes + TTPs / $K_1$ | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| CHOL% | liposomes blancs / $K_1$ | **Effet perméabilisant*** | **Effet stabilisant*** | **Pas d'effet** | **Etat de la membrane** | **Remarques** |
| 0 | 16,87 ± 0,00 | 21-OH PG / 24,32 ± 0,03<br>MPGA / 21,77 ± 0,04<br>ER / 21,45 ± 0,04<br>MPG / 21,32 ± 0,00<br>MP / 20,77 ± 0,06<br>OA / 20,77 ± 0,05<br>PL / 19,77 ± 0,05<br>P / 19,48 ± 0,13<br>PG / 19,35 ± 0,06<br>FA / 19,35 ± 0,03<br>17-OH PG / 18,81 ± 0,05<br>C / 17,42 ± 0,40<br>Cn / 17,35 ± 0,17 | | | -La membrane de DPPC existe dans un état solide-ordonné ($S_o$) ou gel (T~30˚C) (Attwood, Choi, & Leonenko, 2013). La membrane subit une transition de phase à une $T_m$ de 41˚C (Schubert, Schneck, & Tanaka, 2011) où la fluidité augmente (Heerklotz, 2004). | -A 0 mol% de CHOL, tous les TTPs perméabilisent la bicouche lipidique.<br>- La 21-OH PG représente l'effet perméabilisant le plus remarquable parmi les TTPs. |
| 2,5 | | 21-OH PG / 23,34 ± 0,07<br>MPGA / 21,38 ± 0,05<br>ER / 20,99 ± 0,05<br>MP / 20,62 ± 0,05<br>OA / 20,62 ± 0,04<br>MPG / 20,41 ± 0,05<br>PL / 19,94 ± 0,08<br>P / 19,22 ± 0,16<br>PG / 18,81 ± 0,24<br>FA / 18,65 ± 0,34<br>C / 17, 73 ± 0,22 | 17-OH PG / 14,85 ± 0,34<br>Cn / 14,58 ± 0,17 | | | |

*P< 0,05 en comparant à la valeur des liposomes blancs

Les formulations (CHOL% 0 et 2,5) montrent que les TTPs tendent à augmenter la perméabilité de la membrane à l'exception de la cortisone et la 17-OH PG à 2,5 mol% en CHOL. Tous les TTPs semblent affecter la perméabilité de la membrane et ceci est en relation avec la structure des TTPs. La fonction polaire en position C3 et la double liaison en position C3-C4 sont reportées comme étant des perturbateurs de la membrane et ceci en accord avec les travaux de Wenz (2012). En effet, les travaux de

Wenz ont montré que les principes actifs ayant des traits structuraux tels que le groupement carbonyle en position C3 et une double liaison en position C4-C5 sont considérés comme des perturbateurs de la membrane (Wenz, 2012). Les TTPs étudiés présentent une fonction polaire en position C3 telle qu'une fonction carbonyle comme dans le cas des progestatifs et des corticoïdes et une fonction hydroxyle dans le cas des TTPs pentacycliques (Tableau 2). En outre, les corticoïdes et les progestatifs présentent une double liaison en position C3-C4. L'effet perturbateur se trouve accompagné avec l'effet perméabilisant des TTPs. Cependant, l'ordre perméabilisant des TTPs est conservé même avec l'ajout de 2,5 mol% de CHOL. Ceci montre que l'état de phase de la membrane ($S_o$) est intact et les TTPs se comportent comme le CHOL à faible taux (2,5%). Cependant l'effet remarquable de la 21-OH PG peut être corrélé à son effet fluidifiant de la membrane de DPPC (Abboud, Greige-Gerges, & Charcosset, 2015). La 21-OH PG présente une particularité dans sa structure par la présence d'un groupement hydroxyle libre en position C21 susceptible de défavoriser les liaisons d'hydrogène intramoléculaires et par la suite déstabiliser la membrane. La MPGA occupe le second rang comme perméabilisant de la membrane (Tableau A) et ceci peut être associé à la présence d'un groupement méthyle supplémentaire en position C6, responsable de la perturbation de la conformation de la molécule (Carillo, Arco, Wang, & Tzou, 2015) et par conséquent déstabiliser la membrane. L'effet de la MPGA était légèrement supérieur à celui de la MP et ceci peut être associé à la présence d'un groupement acétate en position C17 susceptible de perturber davantage l'organisation de la bicouche lipidique. Il semble que les progestatifs sont plus efficaces que les corticoïdes dans la perméabilisation de la membrane. Les progestatifs sont exempts de substituants en position C11 et la prednisone et la prednisolone présentent une double liaison en C1-C2. Il semble que la présence d'un substituant en position C11 et/ou une double liaison en position C1-C2 peut limiter le rôle perturbateur de la molécule. Cependant, la diminution de la perméabilité en présence de la 17-OH PG peut être liée à la présence d'un groupement hydroxyle en position C17 qui joue le rôle de stabilisateur au contraire de la double liaison présente en position C3-C4 décrite comme perturbateur. On suppose que la position de la double liaison dans la molécule peut moduler son effet sur la perméabilité membranaire. Quant aux TTPs pentacycliques, l'effet perméabilisant de OA à l'état gel n'était pas compatible avec les travaux de Han et collaborateurs montrant que la présence de l'OA engendre une réduction de la libération de la calcéine à partir de liposomes de DPPC chargés en OA de type MLVs dans la phase gel et fluide (Han, Ko, Park, Jin, & Kim, 1997). Il semble que le même principe actif peut affecter différemment la membrane dépendamment de l'approche expérimentale adaptée. Dans la phase gel, l'effet perméabilisant des TTPs dans la première phase de libération est étroitement lié à la structure plus que la composition de la membrane.

**Tableau 4**

Les constantes de libération $K_1$ obtenues des formulations de DPPC (CHOL% 5, 10, 20 et 25) exposées ou non aux triterpènes

| | | Liposomes + TTPs / $K_1$ | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| CHOL% | liposomes blancs / $K_1$ | **Effet perméabilisant*** | **Effet stabilisant*** | **Pas d'effet** | **Etat de la membrane** | **Remarques** |
| 5 | 11,35 ± 0,00 | | P / 10,65 ± 0,03<br>PL / 10,42 ± 0,05<br>MP / 9,79 ± 0,34<br>PG / 9,46 ± 0,31<br>FA / 7,99 ± 0,23<br>MPGA / 7,56<br>OA / 7,34 ± 0,04<br>Cn / 7,18 ± 0,17<br>C / 6,62 ± 0,22<br>ER / 6,54 ± 0,33<br>17-OH PG / 4,65 ± 0,21<br>21-OH PG / 3,93 ± 0,04 | | | |
| 10 | 13,54 ± 0,01 | | PL / 8,96 ± 0,05<br>MP / 8,93 ± 0,08<br>Pn / 8,67 ± 0,43<br>FA / 8,12 ± 0,47<br>MPGA / 8,04 ± 0,05<br>MPG / 7,77 ± 0,33<br>PG / 7,38 ± 0,22<br>Cn / 6,51 ± 0.11<br>C / 6,09 ± 0,07<br>ER / 4,41 ± 0,05<br>17-OH PG / 4,33 ± 0,16<br>21-OH PG / 4,07 ± 0.09 | | | |
| 20 | 4,23 ± 0,00 | MPG / 9,42 ± 0,03<br>21-OH PG / 9,06 ± 0.07<br>MPGA / 9,03 ± 0,03<br>C / 7,87 ± 0,22<br>PG / 7,46 ± 0.12<br>ER / 6,69 ± 0,07<br>MP / 6,59 ± 0.33<br>OA / 6,45 ± 0.22<br>FA / 6,42 ± 0.54<br>PL / 6,36 ± 0,33<br>P / 6,23 ± 0,20 | 17-OH PG / 2,71 ± 0,13 | | | |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Cn / 5,00 ± 0,15 | | | | |
| 25 | 7,96 ± 0,00 | | MPGA / 7,10 ± 0,05<br>MPG / 7,03 ± 0,15<br>ER / 7,00 ± 0,06<br>FA / 6,85 ± 0,06<br>OA / 6,60 ± 0,05<br>PG / 6,46 ± 0,35<br>MP / 6,18 ± 0,05<br>21-OH PG / 5,54 ± 0,06<br>C / 4,49 ± 0,23<br>P / 3,99 ± 0,25<br>PL / 3,60 ± 0,22<br>Cn / 3,02 ± 0,13<br>17-OH PG/ 2,41 ± 0,05 | | | |

L'effet des TTPs sur les formulations (CHOL% 5 et 10) montrent une controverse par rapport aux résultats obtenus précédemment. Tous les TTPs diminuent la perméabilité de la membrane avec un effet remarquable de la 21-OH PG. Ces observations peuvent être liées à la transition de phase de la membrane de DPPC (CHOL% > 5) (Redondo-Morata, Giannotti, & Sanz, 2012). C'est la phase $S_o/L_d$ associée à la présence des domaines riches et pauvres en CHOL (Javanainen, Martinez-Seara, & Vattulainen, 2017). Il semble que l'hétérogénéité de la membrane engendre une modulation dans la localisation et/ou l'orientation des TTPs au sein de la membrane. Par ailleurs, les images TEM réalisées pour les formulations de DPPC à différents taux en CHOL montrent une transition d'une forme irrégulière vers une forme sphérique, régulière et homogène (CHOL% > 5). L'effet des TTPs dépend de l'organisation de la bicouche (forme régulière/irrégulière) ainsi que la composition de la membrane en CHOL. Dans cette situation, les TTPs présentent un effet condensant comme le CHOL. De façon intéressante, les corticoïdes sont moins stabilisants que les progestatifs et les TTPs pentacycliques. On suppose que les corticoïdes sont associés aux domaines pauvres en CHOL d'où leur effet moins condensant.

Pour un même état de phase $S_o/L_d$ et en augmentant le taux en CHOL à 20 mol%, tous les TTPs perméabilisent la bicouche lipidique à l'exception du 17-OH PG. De nouveau, un effet remarquable en présence de la 21-OH PG et les progestatifs méthylés est observé. L'augmentation graduelle de la concentration de CHOL peut moduler la distribution des domaines riches et pauvres en CHOL et par conséquent, l'orientation et/ou la localisation des TTPs change.

La dernière proportion en CHOL de 25 mol% relative à l'état $S_o/L_d$ montre aussi que les TTPs produisent une diminution de la perméabilité membranaire. à l'exception du 17-OH PG. Les progestatifs méthylés présentent un effet remarquable parmi les TTPs étudiés et un effet modéré pour la 21-OH PG, les corticoïdes et les TTPs pentacycliques. Cependant, le CHOL engendre un effet condensant et qui est associé à une diminution du volume moléculaire occupé par les chaînes des phospholipides (Saito & Shinoda, 2011) et l'augmentation de l'épaisseur de la membrane (Rheinstädter & Mouritsen, 2013). A notre connaissance, l'effet du CHOL sur les molécules adsorbées à la surface des liposomes n'a jamais été traité. Il semble que l'effet des TTPs sur la perméabilité membranaire n'est pas affecté par l'état de phase de la membrane à 20% en CHOL. Pour des études postérieures, il s'avère nécessaire de déterminer le rendement d'encapsulation (loading rate) du CHOL pour chaque formulation dans le but de vérifier à quel point l'effet perméabilisant des TTPs est lié à la composition et l'organisation de la membrane ou aux motifs structuraux caractéristiques de chaque TTP.

**Tableau 5**

Les constantes de libération $K_1$ obtenues des formulations de DPPC (CHOL% 30, 50 et 100) exposées ou non aux triterpènes

| | | Liposomes + TTPs / $K_1$ | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| CHOL% | liposomes blancs / $K_1$ | **Effet permeabilisant*** | **Effet stabilisant*** | **Pas d'effet** | **Etat de la membrane** | **Remarques** |
| 30 | 5,20 ± 0,00 | 21-OH PG/ 8,34 ± 0,04<br>MPGA / 6,50 ± 0,22<br>MPG / 6,44 ± 0,21 | ER / 4,74 ± 0,22<br>OA / 4,60 ± 0,13<br>C / 4,19 ± 0,32<br>PG / 3,35 ± 0,21<br>Cn / 2,78 ± 0,26<br>FA / 2,19 ± 0,11<br>MP / 1,88 ± 0.20<br>P / 1,67 ± 0,33<br>17-OH PG / 1,41 ± 0,17<br>PL / 1,24 ± 0,41 | | La membrane de DPPC existe dans un état liquide-ordonné (Lo) (Redondo-Morata et al., 2012). Des entités riches En CHOL sont formées: les structures rafts ou les nanodomaines (Wahhed et al., 2012). | -A 30 mol% de CHOL, La 21-OH PG et les progestatifs méthylés perméabilisent la bicouche lipidique.<br>Tous les autres TTPs diminuent la perméabilité de la membrane et plus spécifiquement la 17-OH PG et la PL.<br>-A 50 mol% de CHOL, 21-OH PG perméabilise la membrane. La PG, PL et C n'exercent aucun effet sur la membrane.<br>-Tous les autres TTPs diminuent la perméabilité de la membrane et plus spécifiquement en |
| 50 | 1,70 ± 0,00 | 21-OH PG / 2,99 ± 0,32 | ER / 1,35 ± 0,07<br>MP / 1,31 ± 0,04<br>OA / 1,25 ± 0,22<br>FA / 1,24 ± 0,34<br>MPG / 1,21 ± 0,27<br>P / 1,13 ± 0,33<br>MPGA / 0,96 ± 0,23<br>Cn / 0,98 ± 0,24 | PG / 1,68 ± 0,00<br>C / 1,68 ± 0,45<br>PL / 1,51 ± 0,34 | | |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 17-OH PG / 0,85 ± 0,36 | | | présence de la 17-OH PG. -A 100 mol% de CHOL, la MPG perméabilise la membrane. les autres progestatifs en plus de la C et Cn diminuent la perméabilité de la membrane. Tous les autres TTPs n'affectent pas la membrane. |
| 100 | 2,24 ± 0,00 | MPG / 4,84 ± 0,33 | C / 1,76 ± 0,00<br>Cn / 1,59 ± 0,03<br>21-OH PG / 1,43 ± 0,34<br>17-OH PG / 0,86 ± 0,43<br>PG / 0,27 ± 0,20 | PL / 2,35 ± 0,00<br>MP / 2,35 ± 0,02<br>P / 2,30 ± 0,16<br>FA / 2,17 ± 0,34<br>OA / 2,13 ± 0,24<br>ER / 2,09 ± 0,12 | | |

*P< 0,05 en comparant à la valeur des liposomes blancs

Le tableau 5 présente des valeurs de $K_1$ obtenues des formulations préparées à forte concentration en CHOL (30, 50 et 100%) exposées ou non aux TTPs.

Les formulations préparées à 30 mol% de CHOL montrent que la 21-OH PG et les progestatifs méthylés perméabilisent la membrane alors que tous les autres TTPs diminuent la perméabilité membranaire. Dans cette situation, la membrane subit une transition de phase de l'état $S_o/L_d$ à l'état $L_o$. On assume que l'organisation des chaînes lipidiques et la présence des structures rafts à forte concentration en CHOL peut moduler l'orientation et/ou la localisation des TTPs dans la membrane ce qui explique la divergence entre les résultats observés entre 20 et 30 mol% en CHOL. L'effet déstabilisant est remarquable pour la prednisolone et la 17-OH PG. Ceci peut être associé à la fonction hydroxyle en position C17 de la 17-OH PG ou la double liaison en position C1-C2. A forte concentration en CHOL (50 et 100%), l'effet perméabilisant demeure persistant avec la 21-OH PG et la MPG à 50 et 100% en CHOL, respectivement. L'effet stabilisant est remarquable en présence de la 17-OH PG à 50% en CHOL et en présence de la PG à 100% en CHOL.

La première période de libération de la SRB montre que l'effet des TTPs sur la perméabilité de la membrane est étroitement lié à la composition de la membrane au-delà de 5% en CHOL. L'effet des substituants ne peut pas être exclu à la condition de vérifier le taux d'incorporation du CHOL dans chaque formulation. Les progestatifs y compris la 21-OH PG et les progestatifs méthylés semblent être les plus potentiels à perméabiliser la membrane. La présence d'un groupement hydroxyle libre en position C21 ainsi que la présence d'une fonction méthyle supplémentaire sont considérées comme étant

des éléments perturbateurs de la membrane. D'un autre côté, la présence d'une double liaison en position C1-C2, une fonction hydroxyle proche d'une fonction carbonyle, une fonction polaire en position C11 comme dans le cas des corticoïdes peuvent être considérées comme éléments promoteurs de la stabilisation d'une membrane présentant un taux important ou relativement important en CHOL. La composition de la membrane ainsi que l'approche expérimentale adoptée demeurent les facteurs primordiaux qui modulent l'effet des TTPs sur la perméabilité de la membrane.

Quant aux valeurs de $K_2$, les différentes valeurs reflètent le passage de la SRB du milieu intra-vésiculaire vers l'extérieur ou du cœur hydrophobe de la membrane vers l'extérieur. Les tableaux 6, 7 et 8 présentent des valeurs de $K_2$ obtenues des liposomes préparés à différents taux en CHOL et exposés ou non aux TTPs.

**Tableau 6**

Les constantes de libération $K_2$ obtenues des formulations de DPPC (CHOL% 0 et 2,5) exposées ou non aux triterpènes.

| | | Liposomes + TTPs / $K_2$ | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| CHOL% | liposomes blancs / $K_2$ | **Effet perméabilisant** | **Effet stabilisant** | **Pas d'effet** | **Etat de la membrane** | **Remarques** |
| 0 | 8,80 ± 0,00 | C / 11,82 ± 0,06<br>Cn / 11,78 ± 0,24<br>P / 11,44 ± 0,14<br>PL / 11,09 ± 0,23<br>MP / 10,96 ± 0,25<br>MPG / 9,90 ± 0,00<br>FA / 9,43 ± 0,34<br>OA / 9,40 ± 0,24<br>ER / 9,35 ± 0,22<br>17-OH PG / 9,10 ± 0,11<br>PG / 8,64 ± 0,12 | MPGA / 7,88 ± 0,00<br>21-OH PG / 7,09 ± 0,06 | | -La membrane de DPPC existe dans un état solide-ordonné (So) ou gel (T~30˚C) (Attwood et al., 2013). La membrane subit une transition de phase à une Tm de 41˚C (Schubert et al., 2011) où la fluidité augmente (Heerklotz, 2004).<br><br>-A 2,5 mol% de CHOL, la membrane existe à l'état So. | -Le cortisol présente l'effet perméabilisant le plus puissant parmi les TTPs à 0 et 2,5% en CHOL.<br><br>- Les progestatifs tendent à affecter de façon modéré ou à diminuer la perméabilité membranaire. |
| 2,5 | 9,15 ± 0,00 | C / 11,97 ± 0,23<br>Cn / 11, 70 ± 0,11<br>P / 11,16 ± 0,23<br>MP / 10,88 ± 0,25<br>PL / 10,60 ± 0,05<br>ER / 9,53 ± 0,34<br>FA / 9,45 ± 0,21 | PG / 8,58 ± 0,05<br>MPG / 8,57 ± 0,06<br>21-OH PG / 7,45 ± 0,00<br>MPGA / 6,96 ± 0,23 | 17-OH PG / 9,18 ± 0,26<br>OA / 9,00 ± 0,24 | | |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | |

*P< 0,05 en comparant à la valeur des liposomes blancs

Le tableau 6 présente les valeurs de $K_2$ obtenues à partir des formulations (CHOL% 0 et 2,5). En comparant aux liposomes blancs (CHOL% 0), tous les TTPs perméabilisent la membrane sauf la MPGA et la 21-OH PG. Le cortisol montre l'effet perméabilisant le plus remarquable parmi les TTPs et pourtant son effet était modéré dans la première phase de libération. Bien que les travaux de la littérature montrent qu'OA possède un effet stabilisant sur la membrane de DPPC à l'état gel (Han et al., 1997), l'effet perméabilisant de l'OA est aussi maintenu dans la deuxième phase de libération. De nouveau, l'approche expérimentale semble un paramètre primordial dans la modulation de l'effet des TTPs

En comparant aux liposomes blancs (CHOL% 2,5), tous les corticoïdes perméabilisent la membrane ainsi que l'ER. Cependant, OA et 17-OH PG n'exercent aucun effet sur la perméabilité de la membrane alors que les autres progestatifs diminuent la perméabilité membranaire. Il est important de mentionner que l'ordre perméabilisant des TTPs est presque conservé comme dans le cas de la première phase de libération. La diminution de la perméabilité en présence des progestatifs ainsi que l'absence de l'effet de 17-OH PG et OA peut être associée à une modulation dans l'orientation et/ou la localisation de ces molécules suite à l'introduction de 2,5 mol% de CHOL. A l'état $S_o$ et dépendamment de la période d'incubation, la bicouche lipidique représente une organisation distincte différente de celle présente dans la première phase de libération due peut être à l'introduction des TTP dans la bicouche. Ceci est traduit par une série de TTPs ayant un effet perméabilisant spécifique à chaque période d'incubation. Le tableau 6 présente les valeurs de $K_2$ obtenues des formulations (CHOL% 0 et 2,5).

**Tableau 7**

Les constantes de libération $K_2$ obtenues des formulations de DPPC (CHOL% 5, 10, 20 et 25) exposées ou non aux triterpènes.

| | | Liposomes + TTPs / $K_2$ | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| CHOL% | liposomes blancs / $K_2$ | **Effet permeabilisant*** | **Effet stabilisant*** | **Pas d'effet** | **Etat de la membrane** | **Remarques** |
| 5 | 10,88 ± 0,00 | 21-OH PG / 18,53 ± 0,01<br>17-OH PG / 15,81 ± 0,02<br>ER / 15,26 ± 0,02<br>C / 15,04 ± 0,05<br>Cn / 14,78 ± 0,04<br>OA / 14,74 ± 0,07<br>FA / 14,04 ± 0,05 | | | - La membrane de DPPC existe dans un état solide-ordonné/liquide-desordonné ($S_o/L_d$) (Redondo- | -Tous les TTPs perméabilisent la membrane à 5 et 10 et 25% en CHOL où le 21-OH PG présente l'effet remarquable |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | PG / 14,02 ± 0,35<br>MPGA / 13,62 ± 0,06<br>MPG / 13,56 ± 0,07<br>MP / 12,83 ± 0,06<br>PL / 12,21 ± 0,06<br>21,15 ± 0,09 | | | Morata et al., 2012). Des domaines riches et pauvres en CHOL sont présentes dans la membrane (Javanainen et al., 2017). | parmi les TTPs.<br><br>-La FA perméabilise la membrane a 20% de CHOL. |
| 10 | 4,62 ± 0,00 | 21-OH PG / 15,12 ± 0,09<br>PG / 14,36 ± 0,08<br>17-OH PG / 14,32 ± 0,45<br>OA / 13,61 ± 0,06<br>C / 12,97 ± 0,45<br>ER / 12,77 ± 0,34<br>MPG / 12,35 ± 0,24<br>MPGA / 12,32 ± 0,24<br>P / 11,96 ± 0,34<br>Cn / 11,80 ± 0,23<br>FA / 11,41 ± 0,56<br>PL / 11,31 ± 0,23<br>MP / 11,31 ± 0,13 | | | | |
| 20 | 9,96 ± 0,01 | FA / 12,66 ± 0,05<br>OA / 12,64 ± 0,34<br>MP / 12,43 ± 0,30<br>ER / 10,97 ± 0,21<br>P / 10,34 ± 0,24<br>PL / 10,29 ± 0,34 | MPGA / 8,89 ± 0,35<br>C / 8,82 ± 0,24<br>MPG / 8,19 ± 0,22<br>Cn / 6,63 ± 0,12<br>17-OH PG / 5,68 ± 0,21 | 21-OH PG / 9,93 ± 0,21<br><br>PG / 9,73 ± 0,02 | | |
| 25 | 5,96 ± 0,01 | 21-OH PG / 11,93 ± 0,32<br>OA / 11,67 ± 0,32<br>P / 10,79 ± 0,21<br>PL / 10,49 ± 0,32<br>PG / 10,15 ± 0,22<br>MP / 10,07 ± 0,12<br>C / 9,40 ± 0,11<br>FA / 8,97 ± 0,45<br>MPGA / 8,67 ± 0,23<br>ER / 8,57 ± 0,12<br>MPG / 8,47 ± 0,12 | | 17-OH PG / 5,39 ± 0,42<br>Cn / 5,07 ± 0,01 | | |

*P< 0,05 en comparant à la valeur des liposomes blancs

En comparant aux liposomes blancs (CHOL% 5 et 10) (Tableau 7), les résultats sont totalement opposés à ceux obtenus dans la première phase d'incubation et les TTPs tendent à augmenter la perméabilité de la membrane. la 21-OH PG et son effet remarquable sur la perméabilité membranaire est de nouveau retenu et ceci peut être associé à la transition de phase $S_o/L_d$ et la présence des domaines riches et pauvres en CHOL. Il semble que l'effet perturbateur des substituants est étroitement lié à la période d'incubation et l'organisation de la membrane relative à l'état de phase.

En comparant aux liposomes blancs (CHOL% 20), la FA présente l'effet perceptible dans la perméabilisation de la membrane parmi les autres TTPs et ceci a été uniquement observé dans ces conditions. La fluorine limite l'insertion de la molécule dans la membrane et peut être associé aux domaines pauvres en CHOL permettant ainsi de perméabiliser la membrane.

En comparant aux liposomes blancs (CHOL% 25), tous les TTPs perméabilisent la membrane sauf la cortisone et la 17-OH PG qui n'exercent aucun effet. Ces résultats s'opposent à ceux obtenus dans la première phase de libération et ceci est lié à la structure hétérogène de la membrane en présence des domaines riches et pauvres en CHOL. Ces observations confirment de nouveau que l'effet des TTPs sur la perméabilité de la membrane en première phase de libération est lié à l'état de phase de la membrane.

A l'état $S_o/L_d$, la 21-OH PG possède l'effet perméabilisant le plus remarquable parmi les TTPs et ceci peut être associé à plusieurs facteurs: la présence du groupement perturbateur OH en position C21 et l'organisation de la membrane (état de phase) qui peut être distincte selon la période d'incubation.

**Tableau 8**

Les constantes de libération $K_2$ obtenues des formulations de DPPC (CHOL% 30, 50 et 100) exposées ou non aux triterpènes.

| | | Liposomes + TTPs / $K_2$ | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| CHOL % | liposomes blancs / $K_2$ | **Effet perméabilisant*** | **Effet stabilisant*** | **Pas d'effet** | **Etat de la membrane** | **Remarques** |
| 30 | 1,65 ± 0,01 | MP / 9,12 ± 0,23<br>21-OH PG / 6,31 ± 0,11<br>OA / 6,16 ± 0,12<br>MPG / 5,43 ± 0,10<br>17-OH PG/ 4,71 ± 0,12<br>ER / 4,53 ± 0,22 | | | - La membrane de DPPC existe dans un état liquide-ordonné (Lo) (Redondo-Morata et al., | -Tous les TTPs perméabilisent la membrane à 30% en CHOL avec un effet remarquable en présence de la MP. |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | FA / 4,46 ± 0,12<br>MPGA / 3,74 ± 0,12<br>PG / 3,39 ± 0,23<br>PL / 2,69 ± 0,12<br>C / 2,40 ±0,07<br>P / 2,32 ± 0,16<br>Cn / 2,06 ± 0,15 | | | 2012). Des entités riches En CHOL sont formées: les structures rafts ou les nanodomaines (Wahhed et al., 2012). | -Les TTPs tendent à augmenter la perméabilité de la membrane à 50% en CHOL avec un effet remarquable pour la MPG. |
| 50 | 1,70 ± 0,01 | MPG / 7,87 ± 0,12<br>MP / 5,33 ± 0,11<br>MPGA / 5,28 ± 0,06<br>OA / 4,74 ± 0,22<br>ER / 3,68 ± 0,00<br>FA / 3,34 ± 0,16<br>21-OH PG / 2,85 ± 0,15<br>P / 2,47 ± 0,33<br>PL / 2,12 ± 0,10<br>C / 2,12 ± 0.15<br>Cn / 2,10 ± 0,34 | | 17-OH PG / 1,86 ± 0,05<br>PG / 1,68 ± 0,34 | | -Seuls les progestatifs méthylés perméabilisent la membrane à 100% en CHOL. A l'exception de la PG, tous les TTPs tendent à diminuer la perméabilité de la membrane. |
| 100 | 2,14 ± 0,00 | MPG / 4,13 ± 0,07<br>MPGA / 3,87 ± 0,43 | C / 1,53 ± 0,00<br>21-OH PG / 1,49 ± 0,22<br>P / 1,20 ± 0,00<br>FA / 1,00 ± 0,09<br>OA / 0,88 ± 0,12<br>ER / 0,88 ± 0,13<br>P / 0,86 ± 0,22<br>Cn / 0,79 ± 0,11<br>17-OH PG / 0,77 ± 0,13<br>MP / 0,75 ± 0.56 | PG / 1,85 ± 0,00 | | |

*P< 0,05 en comparant à la valeur des liposomes blancs

En comparant aux liposomes (CHOL% 30 et 50) (Tableau 8), tous les TTPs perméabilisent la membrane sauf la PG et la 17-OH PG qui ne montrent aucun effet sur la perméabilité membranaire à 50 mol% de CHOL. Ces résultats sont aussi contradictoires avec ceux obtenus dans la première phase de libération. La MP et la MPG produisent l'effet perméabilisant le plus remarquable parmi les TTPs et ceci peut être dû à la présence du groupement méthyle supplémentaire perturbant la conformation des molécules et par la suite ces molécules déstabilisent la membrane. Bien que la membrane existe à l'état $L_o$, l'effet

perméabilisant de la majorité des TTPs peut être lié à la courte durée de vie des structures rafts qualifiés d'entités transitoires (Sezgin, Levental, Mayor, & Eggeling, 2017) et par conséquent, la membrane est déstabilisée par les TTPs.

En comparant aux liposomes (CHOL% 100), les progestatifs méthylés perméabilisent uniquement la membrane alors que tous les autres TTPs diminuent la perméabilité membranaire à l'exception de la PG. L'effet perméabilisant des TTPs dans la seconde phase de libération semble ne pas être corrélé à l'état de phase de la membrane.

En parallèle, nous nous sommes intéressés à comparer les profils de libération obtenus des formulations (CHOL% 100) exposés aux TTPs et celles chargées en TTPs.

On remarque que les liposomes préformés et exposés aux TTPs tels que FA, P, PL, MP, OA et ER n'affectent pas la perméabilité membranaire à la première phase de libération (Tableau 5). Cependant TTPs cités ci-dessus diminuent la perméabilité de la membrane dans le cas des liposomes chargés. L'approche expérimentale doit être prise en considération dans les études de cinétique. Néanmoins, nous sommes intéressés à déterminer la composition de la membrane des liposomes chargés en TTPs. Les résultats ont montré que le taux de rendement (loading rate) des TTPs est important en présence de cortisol (~ 97%), cependant son effet perméabilisant est modéré. Ceci montre que l'effet perméabilisant des TTPs est indépendant de son incorporation dans la membrane.

Par ailleurs, les études de fluidité menées par EPR et réalisées sur des liposomes préformés et traités par les TTPs montrent que l'OA tend à diminuer la fluidité au cœur hydrophobe de la membrane pour les concentrations intermédiaires et fortes en CHOL et ceci est associé à la particularité de l'OA de s'insérer profondément dans la bicouche lipidique. Or, OA tend à perméabiliser la membrane dans les concentrations intermédiaires en CHOL et ceci peut être associé à l'orientation de la molécule au sein de la membrane.

Dans le tableau 9, on présente un récapitulatif des effets des TTPs sur la perméabilité de la membrane des liposomes.

**Tableau 9**

Effet des triterpènes sur la perméabilité de la membrane

| | CHOL % | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | | 2,5 | | 5 | | 10 | | 20 | | 25 | | 30 | | 50 | | 100 | |
| **Principe actif** | **K1** | **K2** | **K1** | **K2** | **K1** | **K2** | **K1** | **K2** | **K1** | **K2** | **K1** | **K2** | **K1** | **K2** | **K1** | **K2** | **K1** | **K2** |
| 17-OH PG | +/- | +/- | - | | - | +/- | - | + | - | - | - | | - | +/- | - | | - | - |
| 21-OH PG | + | - | + | - | - | + | - | + | + | | - | + | + | + | +/- | +/- | - | - |
| MPG | + | + | + | - | - | + | - | + | + | - | - | +/- | +/- | + | - | + | + | +/- |
| MPGA | + | - | + | - | - | + | - | + | + | - | - | +/- | +/- | +/- | - | + | - | +/- |
| PG | +/- | +/- | +/- | - | - | + | - | + | +/- | | - | + | - | +/- | | | - | |
| C | +/- | + | +/- | + | - | + | - | + | +/- | - | - | + | - | +/- | | +/- | - | - |
| Cn | +/- | + | - | + | - | + | - | + | +/- | - | - | | - | +/- | - | +/- | - | - |
| FA | +/- | +/- | +/- | +/- | - | + | - | + | +/- | + | - | + | - | + | - | +/- | | - |
| MP | + | + | + | + | - | +/- | - | + | +/- | + | - | + | - | + | - | + | | - |
| PL | + | + | +/- | + | - | +/- | - | + | +/- | +/- | - | + | - | +/- | - | +/- | | - |
| P | +/- | + | +/- | + | - | + | - | + | +/- | +/- | - | + | - | +/- | - | +/- | | - |
| OA | + | +/- | + | | - | + | - | + | +/- | + | - | + | - | + | - | + | | - |
| ER | + | +/- | + | +/- | - | + | | + | +/- | +/- | - | +/- | - | + | - | +/- | | - |

+ : TTP perméabilise la membrane
+/- : TTP perméabilise la membrane de façon modéré
- : TTP diminue la perméabilité de la membrane
*les cases vides signifient que les TTPs n'affectent pas la perméabilité de la membrane ($P > 0,05$).

Le tableau 9 présente un récapitulatif sur l'effet des TTPs sur la perméabilité de la membrane. La 21-OH PG et les progestatifs méthylés affectent potentiellement la perméabilité membranaire. Par ailleurs, le 17-OH PG présente l'effet stabilisant parmi les TTPs.

Références


Abboud, R., Greige-Gerges, H., & Charcosset, C. (2015). Effect of Progesterone, Its Hydroxylated and Methylated Derivatives, and Dydrogesterone on Lipid Bilayer Membranes. *The Journal of Membrane Biology*, *248*(4), 811–824. http://doi.org/10.1007/s00232-015-9803-z

Attwood, S., Choi, Y., & Leonenko, Z. (2013). Preparation of DOPC and DPPC Supported Planar Lipid Bilayers for Atomic Force Microscopy and Atomic Force Spectroscopy. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(2), 3514–3539. http://doi.org/10.3390/ijms14023514

Barzegar-Jalali, M., Adibkia, K., Valizadeh, H., Shadbad, M. R. S., Nokhodchi, A., Omidi, Y., … Shadbad, S. (2008). Kinetic analysis of drug release from nanoparticles. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences : A Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe Canadienne Des Sciences Pharmaceutiques*, *11*(1), 167–177.

Carillo, K. D., Arco, S., Wang, C., & Tzou, D. M. (2015). Solid-state NMR investigation of effect of fluorination

and methylation on prednisolone conformation. *Steroids*, *104*, 263–269. http://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.10.012

Han, S. K., Ko, Y. I., Park, S. J., Jin, I. J., & Kim, Y. M. (1997). Oleanolic acid and ursolic acid stabilize liposomal membranes. *Lipids*, *32*(7), 769–773. http://doi.org/10.1007/s11745-997-0098-9

Heerklotz, H. (2004). The microcalorimetry of lipid membranes. *Journal of Physics Condensed Matter*, *16*(15). http://doi.org/10.1088/0953-8984/16/15/R01

Javadzadeh, Y., Ahadi, F., Davaran, S., Mohammadi, G., Sabzevari, A., & Adibkia, K. (2010). Preparation and physicochemical characterization of naproxen-PLGA nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *81*(2), 498–502. http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.07.047

Javanainen, M., Martinez-Seara, H., & Vattulainen, I. (2017). Nanoscale Membrane Domain Formation Driven by Cholesterol. *Scientific Reports*, *7*(1), 1143. http://doi.org/10.1038/s41598-017-01247-9

Redondo-Morata, L., Giannotti, M. I., & Sanz, F. (2012). Influence of cholesterol on the phase transition of lipid bilayers: A temperature-controlled force spectroscopy study. *Langmuir*, *28*(35), 12851–12860. http://doi.org/10.1021/la302620t

Refai, H., Hassan, D., & Abdelmonem, R. (2017). Development and characterization of polymer-coated liposomes for vaginal delivery of sildenafil citrate. *Drug Delivery*, *24*(1), 278–288. http://doi.org/10.1080/10717544.2016.1247925

Rheinstädter, M. C., & Mouritsen, O. G. (2013). Small-scale structure in fluid cholesterol-lipid bilayers. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, *18*(5), 440–447. http://doi.org/10.1016/j.cocis.2013.07.001

Saito, H., & Shinoda, W. (2011). Cholesterol effect on water permeability through DPPC and PSM lipid bilayers: A molecular dynamics study. *Journal of Physical Chemistry B*, *115*(51), 15241–15250. http://doi.org/10.1021/jp201611p

Schubert, T., Schneck, E., & Tanaka, M. (2011). First order melting transitions of highly ordered dipalmitoyl phosphatidylcholine gel phase membranes in molecular dynamics simulations with atomistic detail. *Journal of Chemical Physics*, *135*(5), 1–11. http://doi.org/10.1063/1.3615937

Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S., & Eggeling, C. (2017). The mystery of membrane organization: Composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *18*(6), 361–374. http://doi.org/10.1038/nrm.2017.16

Van Meer, G., Voelker, D. R., & Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: Where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *9*(2), 112–124. http://doi.org/10.1038/nrm2330

Wenz, J. J. (2012). Predicting the effect of steroids on membrane biophysical properties based on the molecular structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1818*(3), 896–906. http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.12.021

Yeagle, P. L. (1991). Modulation of membrane function by cholesterol. *Biochimie*, *73*(10), 1303–1310. http://doi.org/10.1016/0300-9084(91)90093-G

**Conclusion et perspectives**

Nos objectifs étaient d'étudier l'effet des TTPs penta- et tétracycliques sur la membrane des liposomes de type DPPC. La variation du taux de CHOL est un facteur pris en considération.

Dans une première étape, les liposomes de DPPC préparés à différents taux en CHOL sont caractérisées en termes de morphologie, de taille et d'homogénéité en absence des triterpènes. Les images TEM montrent une transition d'une forme irrégulière pour les formulations (< 2,5 mol%) vers une forme régulière, sphérique et homogène pour les formulations (CHOL% 5-100). Les résultats de DLS montrent une augmentation graduelle de la taille des liposomes de 220 à 472 nm suite à l'addition du CHOL (≤ 30 mol%) cependant la taille des liposomes ne varient pas à forte concentration en CHOL (50 et 100 mol%). L'homogénéité des liposomes déterminée par le PdI montre des valeurs inférieures à 0,42 indiquant une population de liposomes monodispersée. En parallèle, des liposomes chargés en TTPs préparés à 100% en CHOL sont caractérisés en termes de composition, de taille et d'homogénéité. La composition des liposomes est déterminée par des méthodes analytiques et spectroscopiques et les résultats montrent que les taux d'incorporation du CHOL et de DPPC sont supérieurs à 95% à l'exception de la 21-OH PG ayant un taux d'incorporation de DPPC de 89%. En se basant sur la masse initiale de DPPC ou du CHOL ajoutée initialement à la suspension liposomiale lors de la préparation des liposomes, les taux de rendement du CHOL et de DPPC sont supérieurs à 90 et 78%, respectivement. L'encapsulation des TTPs à 2,5 mol% n'affecte pas l'incorporation du CHOL et de DPPC. L'efficacité d'encapsulation des TTPs à 2,5 mol% obtenue est supérieure à 78%. Quant au rendement d'encapsulation des TTPs, le cortisol, la cortisone, la méthylprednisolone, la prednisolone, la prednisone et la 21-hydroxyprogestérone (21-OH PG) présentent des rendements d'encapsulation supérieurs à 78%. Cependant, des taux de rendements modérés compris entre 48 et 69% sont obtenus en présence de la dydrogestérone, la 21-OH PG, la fludrocortisone acétate et la medroxyprogestérone. De faibles rendements d'encapsulation sont obtenus en présence de la 17-hydroxyprogestérone, la progestérone et la medroxyprogestérone et les valeurs sont 14, 11 et 4%, respectivement. La distribution de taille des liposomes chargés de TTPs déterminée par la granulométrie laser montre un profil gaussien de type monomodal ayant une taille proche de celle de la dernière membrane de polycarbonate de 0,4 μm impliquée dans l'extrusion. Cependant, la taille des liposomes encapsulant l'OA et l'ER est de trois fois supérieure à celle des liposomes blancs.

La deuxième partie expérimentale de notre thèse porte sur l'effet des TTPs sur la perméabilité de la membrane des liposomes en se basant sur deux approches expérimentales : les liposomes chargés de

TTPs et les formulations exposés aux TTPs. Les études de perméabilité ont montré que la 21-OH PG et les progestatifs méthylés perméabilisent potentiellement la membrane des liposomes dans le cas des liposomes chargés de TTPs et préparés à 100% en CHOL aussi bien les liposomes préformés et exposés aux TTPs. Cet effet perméabilisant est associé à des traits structuraux des TTPs tels que le groupement hydroxyle libre en position C21 et le groupement méthyle supplémentaire sur le squelette des TTPs considérés comme étant des perturbateurs de la membrane. Dans le cas des liposomes préformés et exposés aux TTPs, les composés tendent à diminuer la perméabilité de la membrane au-delà de 5% en CHOL dans la première phase de libération comme si l'effet perméabilisant des TTPs est étroitement lié à l'état de phase de la membrane. Par ailleurs, les TTPs tendent à augmenter la perméabilité de la membrane dans la deuxième phase de libération

La troisième partie expérimentale de notre thèse porte sur l'effet de l'acide oléanolique, l'erythrodiol et la méthylprednisolone (MP) sur la fluidité des liposomes préformés à différents taux en CHOL par la résonance paramagnétique électronique. Ces trois composés affectent les têtes polaires des phospholipides et le cœur hydrophobe de la membrane. Ils tendent à diminuer la fluidité de la membrane pour des concentrations intermédiaires en CHOL. A forte concentration en CHOL, la fluidité de la membrane augmente en présence de la MP et l'ER et plus spécifiquement dans la région polaire de la membrane alors qu'elle diminue en présence de l'OA dans la région hydrophobe de la membrane.

En conclusion, la composition de la membrane y compris la concentration en CHOL, l'état de phase de la membrane, la structure et la concentration du TTP, la période d'incubation et l'approche expérimentale sont les principaux facteurs modulant la fluidité et la perméabilité de la membrane.

Les perspectives de ce travail comportent la détermination de la composition des liposomes (mol de DPPC/mol de CHOL/mol de TTP) pour chaque formulation. Cependant, les motifs structuraux ne sont pas uniquement impliqués dans la perturbation de la membrane. Certains facteurs comme l'hydrophobicité du principe actif, les liaisons hydrogène, les interactions de van der Waals, etc ne peuvent pas être exclus. Il serait intéressant de regrouper tous ces facteurs en un modèle de régression logistique afin de prédire l'effet des principes actifs sur les propriétés physiques des membranes dépendamment de leur structure chimique.

# Communications

**Orale**

1. Effect of cholesterol on liposome membrane permeability: applications to corticoids. Kaddah S., Charcosset C., Greige-Gerges H. Bubble and Drop. June 2017 – Lyon, France.

2. Effect of cholesterol on liposome membrane permeability: application to progestogens. Kaddah S., Khreich N., Charcosset C., Greige-Gerges H. Journée des jeunes chercheurs. 22-23 June 2016 – Lyon, France.

**Par affiche**

1. Pentacyclic triterpenes from olive oil modulate the lipid membrane permeability of liposomes. Kaddah S., Khreich N., Charcosset C., Greige-Gerges H. 3rd international conference on natural poducts utilization. October 2017-Bansko, Bulgaria.

2. Cholesterol membrane content affects progesterons effects on liposome membrane permeability. Kaddah S., Khreich N., Charcosset C., Greige-Gerges H. 5$^{th}$ international Symposium on phospholipids. September 2017-Heidelberg, Germany.

3. Corticoids modulate the membrane permeability of liposomes. European network for oxysterol research. Kaddah S., Khreich N., Charcosset C., Greige-Gerges H. September 2017-Belgium.

4. Cholesterol modulates lipid membrane permeability. Kaddah S., Khreich N., Charcosset C., Greige-Gerges H. Lebanese Association for the Advancement of Science-LAAS. May 2017-Lebanon.

5. Effet des triterpènes penta-et tétra-cycliques sur la perméabilité membranaire en utilisant les liposomes comme modèle membranaire. Kaddah S., Khreich N., Charcosset C., Greige-Gerges H. Journée des Jeunes Chercheurs. Mai 2017-Lyon, France.

6. Effet des glucocorticoïdes sur la perméabilité membranaire en utilisant les liposomes comme modèle membranaire. Kaddah S., Khreich N., Charcosset C., Greige-Gerges H. 22nd Scientific International Conference: The social Avenues of the Research. Mai 2016-Liban.

7. Effet de la progestérone et de la dydrogestérone sur la perméabilité membranaire en utilisant les liposomes comme modèle membranaire. Kaddah S., Khreich N., Charcosset C., Greige-Gerges H. Journée Franco-Libanaise Jfl3. octobre 2015 - Liban.