

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur  
et de la Recherche Scientifique



Université Abderrahmane Mira-Bejaïa



Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés

*Mémoire de fin de cycle*

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Génie des procédés

Option : Génie Pharmaceutique

*Thème*

*Utilisation des cyclodextrines, liposomes et PEG pour améliorer la solubilité des principes actifs hydrophobes.*

Réalisé par :

M<sup>elle</sup> AGSOUS Maïssa

M<sup>elle</sup> SMAIL Nessrine

Membres du jury :

Président : Mr\_Rezgui.F

Examinatrice : Mme Belhadj.N

Promoteur : Mr FATMI S.

Co-promotrice : M<sup>elle</sup> TAOUZINAT.L

Année universitaire : 2019/2020



# *Remerciements*

*Tout d'abord nous tenons à remercier dieu, le tout puissant, de nous avoir guidé dans la réalisation de notre travail.*

*Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et nos sincères remerciements à notre encadrant Mr FATMI et notre Co-encadrante M<sup>elle</sup> TAOUZINAT, de nous avoir encadré, encouragé et guidé tout au long de ce travail, ainsi nous remercions les membres de jury.*

*Enfin, une pensée à tous nos anciens enseignants, ainsi toute personne qui a contribué de près ou de loin à la concrétisation de notre travail.*

*Smail N. Agrous M.*



# *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail particulièrement à mes chers parents qui ont consacré leur existence à bâtir la mienne, pour leur soutien, patience et soucis de tendresse et d'affection pour tout ce qu'ils ont fait pour que je puisse arriver à ce stade.*

*A la mémoire de mes grands-parents, que Dieu leur accorde sa miséricorde.*

*A mon cher frère Nassim et mes chères sœurs Ikram et Widad, pour leur encouragements permanents et leur soutien moral.*

*A toute ma famille, cousins, cousines et à tous ceux qui m'aiment.*

*Nessrine SMAÏL.*



# *Dédicaces*

*Je dédie cet humble travail à mes chers parents qui m'ont soutenus et encouragé tout le long de mon existence et tout particulièrement à mon cher père pour tout le soutien et la bienveillance qu'il m'a apporté.*

*Je le dédie à mon amie Sara pour ton soutien et ta présence dans les bons et les mauvais moments.*

*A toi qui lis ça, c'est tout en ton honneur.*

*Maïssa AGSOU*

## Liste des tableaux

Tableau 1: La variation de la structure chimique de l' $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ - et $\delta$ -vitamine E. ....	4
Tableau 2: Propriétés physico-chimiques de la vitamine E. ....	5
Tableau 3 : Les principales sources de vitamine E. ....	6
Tableau 4 : Différentes formes de la vitamine E.....	7
Tableau 5 : Caractéristiques physico-chimiques de la vitamine C.....	12
Tableau 6 : La teneur en de vitamine C de certains aliments.....	12
Tableau 7 : Propriétés physico-chimiques du cholestérol. ....	19
Tableau 8 : Exemples de groupement chimique associé au phosphate des phospholipides. ...	23
Tableau 9 : Principaux phospholipides et lipides utilisés dans la formulation des liposomes. 25	
Tableau 10 : Illustration d'exemple de la température de transition de phase de certains phospholipides.....	26
Tableau 11 : Classification des liposomes. ....	28
Tableau 12 : Propriétés physico-chimiques des CDs natives.....	35
Tableau 13 : Propriétés physiques des PEGs. ....	40
Tableau 14 : Résumé de l'article.....	46
Tableau 15 : Résumé de l'article.....	49
Tableau 16 : Résumé de l'article.....	53
Tableau 17 : Résumé de l'article.....	56
Tableau 18 : Quantités des réactifs utilisés et des complexes obtenues.....	58
Tableau 19 : Récapitulatif des rendements obtenus de chaque complexe NIT/ $\beta$ -CD.....	58
Tableau 20 : Résumé de l'article.....	60
Tableau 21 : Résumé de l'article.....	62
Tableau 22 : Résultats d'une étude de stabilité de 6 mois sur la vitamine C liposomale. ....	65
Tableau 23 : Résumé de l'article.....	67
Tableau 24 : Composition des larmes artificielles. ....	69
Tableau 25 : Propriétés physicochimiques de la formulation artificielle de la déchirure. ....	70

## Liste des figures

Figure 1 : Mécanisme antioxydant de la vitamine E.....	9
Figure 2: Structure de l'acide L-ascorbique.....	11
Figure 3: Réaction de la vitamine E avec des radicaux peroxydes et la régénération de la vitamine E radicalaire (alpha-tocophéryl) par la vitamine C .....	15
Figure 4 : Structure chimique du cholestérol .....	18
Figure 5 : Structure d'un liposome .....	22
Figure 6 : Représentation d'un phospholipide.....	23
Figure 7 : Différentes phases de liposomes suivant sa température de transition de phase. ....	26
Figure 8 : Représentation des liposomes multilamellaires et unilamellaires. ....	27
Figure 9 : Préparation des liposomes par injection éthanolique.....	30
Figure 10 : Schéma d'un liposome unilamellaire avec la localisation des molécules encapsulés en fonction de leur solubilité.....	32
Figure 11 : Structure de l' $\alpha$ , $\beta$ et $\gamma$ cyclodextrine .....	34
Figure 12 : Structure de la $\beta$ cyclodextrine. ....	35
Figure 13 : Représentation d'un complexe d'inclusion hôte-invité de cyclodextrines. ....	37
Figure 14 : Structure chimique générale des PEGs.....	39
Figure 15 : spectres $^1\text{H}$ -RMN partiels de la $\beta$ CD seule (a) et en présence de PVA (b) dans D20.....	47
Figure 16 : Diagramme de solubilité de phase obtenu pour le complexe RAMEB/PVA à 298K et pH 7. (Chaque point correspond à la moyenne des valeurs obtenues sur trois lots de même concentration).....	48
Figure 17 : Exemples de distributions de taille de liposomes chargés d'ascorbate de sodium, mesurées par la technique de diffusion dynamique de la lumière (DLS) et déterminées à partir d'images acquises par microscopie cryo TEM.....	64

## Liste des abréviations

**ANR** : Apports nutritionnels recommandé.

**LDL** : Lipoprotéines de faible densité.

**ERO** : Dérivées réactives de l'oxygène.

**ERN** : Dérivées réactives de l'azote.

**PLs** : Les phospholipides.

**MLV** : Vésicules multi-lamellaires.

**SUV** : Small unilamellar.

**LUV** : Large unilamellar.

**BPF** : Bilayer planar fragments.

**PAs** : Principe actif (s).

**CDs** : Cyclodextrine (s).

**SBE** : Sulfobutyléther.

**HP- $\beta$ -CD** : Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrine.

**PM- $\beta$ -CD** : Perméthyl- $\beta$ -cyclodextrine.

**M- $\beta$ -CD** : méthyl- $\beta$ -cyclodextrine.

**RMN** : Résonance magnétique.

**IR** : Infrarouge.

**DRX** : Diffraction des rayons X.

**MEB** : Microscopie électronique à balayage.

**ATG** : Analyse thermogravimétrique.

**DSC** : Analyse calorimétrique différentielle.

**PEGs** : Polyéthylène glycol (s).

**PEO** : oxyde de polyéthylène.

**PVA** : Propionate de vitamine A.

**PE** : Phosphatidyléthanolamine.

**CUR** : Curcumine.

**PCL** : Paclitaxel.

**NIT** : Nitroène.

**FRAP** : réduction du fer ferrique.

**Rdt** : Rendement.

**CLC** : complexe cholestérol/cyclodextrine.

**DLS** : Diffusion dynamique de la lumière.

**PC** : Phosphatidylcholine.

**HPMC** : Hydroxypropylméthylcellulose.

**ET** : Ecart-type.

**MDR** : résistance multi-médicament.



**Liste des tableaux.**

**Liste des figures.**

**Liste des abréviations.**

## **Sommaire**

Introduction générale.....	1
Partie Théorique .....	
La vitamine E.....	3
I.1. Introduction .....	3
I.2. Historique .....	3
I.3. Qu'est-ce que la vitamine E ?.....	3
I.4. Propriétés physico-chimiques de la vitamine E.....	4
I.5. Sources de la vitamine E.....	5
I.6. Rôles de la vitamine E .....	7
I.7. L'effet de la vitamine E sur la cellule spermatique .....	8
I.8. Mécanisme antioxydant .....	8
La vitamine C .....	10
I.9. Introduction .....	10
I.10. Description de la vitamine C .....	10
I.11. Historique de la vitamine C .....	11
I.12. Caractéristiques physico-chimiques de la vitamine C .....	12
I.13. Source de la vitamine C .....	12
I.14. Rôle de la vitamine C .....	13
I.15. Effet de la vitamine C sur la cellule spermatique .....	14
I.16. Mécanisme antioxydant .....	15

I.17. Effet synergique de la vitamine C et de la vitamine E .....	16
Le cholestérol .....	17
II.1. Introduction .....	17
II.2. Historique .....	17
II.3. Description .....	18
II.4. Propriétés physico-chimique du cholestérol.....	19
II.5. Rôles du cholestérol .....	19
II.6. Sources du cholestérol.....	20
II.7. Le cholestérol et la membrane spermatique .....	20
II.8. Mécanisme de protection cellulaire.....	20
Les liposomes .....	22
III.1. Introduction.....	22
III.2. Qu'est-ce qu'un liposome ? .....	22
III.3. Composition d'un liposome .....	23
III.4. Classification des liposomes .....	27
III.5. Stabilité des liposomes.....	28
III.6. Méthode de préparation des liposomes .....	29
III.7. avantages et inconvénients des liposomes .....	31
III.8. Encapsulation des substances dans les liposomes.....	31
III. 9. Facteurs influençant la capacité d'encapsulation des liposomes .....	32
III.10. Modes d'encapsulation .....	33
Les cyclodextrines .....	34
III.11. Introduction.....	34
III.12. Définition des cyclodextrines.....	34
III.13. Caractéristiques physico-chimiques des cyclodextrines .....	35
III.14. Dérivés des cyclodextrines.....	36
III.15. Avantages des cyclodextrines .....	36

III.16. Préparation des complexes d'inclusion.....	37
Polyéthylène glycol .....	39
III.17. Introduction.....	39
III.18. Définition .....	39
III.19. Structure des PEG .....	39
III.20. Leurs propriétés.....	39
III.21. Rôle des PEGs.....	40
III.22. Domaine d'application.....	41
III.23. Méthodes de préparation des complexes PEGs/PAs : .....	41
Etude de cas.....	
Introduction .....	45
ETUDE DE LA COMPLEXATION DE DERIVES DE LA VITAMINE A DANS LES CYCLODEXTRINES NATURELLES ET MODIFIEES .....	46
Cyclodextrin as a suitable solubilizing agent for in situ absorption study of poorly water- soluble drugs.....	49
Polyethylene glycol-phosphatidylethanolamine (PEG-PE)/vitamin E micelles for co- delivery of paclitaxel and curcumin to overcome multi-drug resistance in ovarian cancer .	53
Préparation des complexes d'insertions Nitron / $\beta$ -Cyclodextrine et leurs activités antioxydantes. ....	56
Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. ....	60
New oral liposomal vitamin C formulation: properties and bioavailability .....	62
Novel liposome-based and <i>in situ</i> gelling artificial tear formulation for dry eye disease treatment .....	67
Conclusion.....	74
Références bibliographiques.....	77

# **Introduction générale**

## **Introduction**

La recherche et le développement de nouvelles molécules thérapeutiques est de nos jours une nécessité, de part la forte demande en médicament à utilisation humaine ou vétérinaire. Cela dit, le monde revient au basic en exploitant, améliorant ou combinant une et/ou des molécules largement étudiées et utilisées dans le passé. Le défi, est généralement de trouver une forme pharmaceutique plus active, moins toxique et de meilleure biodisponibilité.

L'une des stratégies les plus prometteuses consiste à associer le principe actif à un vecteur (liposome, cyclodextrine (CD), polyéthylène glycol (PEG)...), afin d'améliorer les caractéristiques des principes actifs (PAs).

Dans ce sens, en choisissant : La vitamine E et le Cholestérol nous avons effectué une étude de comparaison entre les procédés classiques d'encapsulation et la complexation *in situ* (procédés moins coûteux et plus facile à mettre en place).

En effet, la vitamine E est un antioxydant puissant, luttant contre le stress oxydatif. Quant au cholestérol, il est utilisé pour la réduction de la perméabilité des membranes spermatiques ou autres (cryoprotecteur).

L'effet des systèmes d'encapsulation cités précédemment sur ses différents paramètres tel que : La solubilité, la dissolution, la biodisponibilité, l'innocuité et la stabilité n'est plus à démontrer car très intensivement étudié. [1]

A travers ce travail, nous espérons ouvrir une nouvelle porte en mettant en valeur une nouvelle méthode d'encapsulation ou pseudo-encapsulation : encapsulation *in situ*. Cette dernière, serait moins contraignante, plus pratique et très facilement transposable à l'échelle industrielle.

Les principaux objectifs de cette étude sont :

- D'effectuer une comparaison entre les procédés classiques d'encapsulation et la complexation *in situ*.
- D'étudier les propriétés physico-chimiques des molécules d'intérêt (vitamine E/Cholestérol) ; amélioration de la solubilité des molécules.
- De moduler les propriétés pharmacologiques (stress oxydatif/ motilité spermatique) des substances active afin d'optimiser leurs efficacité thérapeutiques.

Dans la présente étude, nous avons d'abord collecté des informations concernant les propriétés physico-chimiques et structures des deux antioxydants (la vitamine E et la vitamine C), et leur effet synergique.

Ensuite dans un deuxième chapitre de l'étude bibliographique, nous avons décrit le cholestérol comme un cryoconservateur de la membrane spermatique.

Dans un troisième chapitre, nous avons assemblé des informations sur les trois vecteurs (liposome, cyclodextrine et polyéthylène glycol).

Le dernier chapitre, nous l'avons consacré à une étude de cas qui résume des articles en relation à l'encapsulation et vectorisation de différentes substances actives par les liposomes, cyclodextrines et PEGs.

**Partie**  
**théorique**

## **La vitamine E**

### **I.1. Introduction**

La vitamine E est un terme générique qui fait référence à une famille de huit composés naturels, et est divisée en deux sous-groupes appelés tocophérols et tocotriénols. [2]

Il a été démontré que la vitamine E est l'antioxydant principal du piégeage des radicaux libres. L' $\alpha$ -tocophérol est le principal composant de la vitamine E, en raison de ses propriétés lipophiles et anti-oxydantes, 2R, 4R, 8R- $\alpha$ -tocophérol naturels jouent un rôle essentiel dans la protection des membranes biologiques. [3]

### **I.2. Historique**

En 1922, Herbert Evans et Katherine Bishop, chercheurs de l'université de Californie ont découvert une substance liposoluble dans le germe de blé et la laitue, qu'ils nommèrent initialement «facteur X», nécessaire pour le développement du fœtus chez les rats femelles.

En 1924, Bennett Sure de l'université de l'Arkansas, a montré que l'absence de «facteur X» dans un régime alimentaire chez les rats males, induit leur stérilité. Bennett surnomma ce composé vitamine E. elle recueille aussi le nom de tocophérol, du grec «tokos» qui signifie progéniture et «pherein» : porter. [4]

Les premières préparations de vitamine E ont été réalisées à partir de l'huile de germe de blé par Evans et Oliver Emerson en 1936, et en 1938 Erhard Fernholz en détermine la structure. La même année, le prix Nobel de chimie revient à Paul Karrer, après avoir réalisé la synthèse de l' $\alpha$ -tocophérol en mélange racémique. [5]

En 1968 le National Research Council des Etats-Unis déclare que la vitamine E est un élément nutritif essentiel pour l'homme. Historiquement, elle reste la vitamine de la reproduction. [4]

En 2000, les autorités médicales américaines et canadiennes ont augmenté sensiblement les apports nutritionnels recommandés (ANR) en vitamine E, le faisant passer de 10 mg à 15 mg par jour pour les personnes de plus de 14 ans. [6]

### **I.3. Qu'est-ce que la vitamine E ?**

La vitamine E est une substance liposoluble qui comprend 8 composés naturels :

- Les tocotriénols ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ) ;

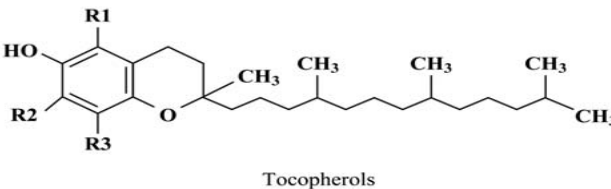
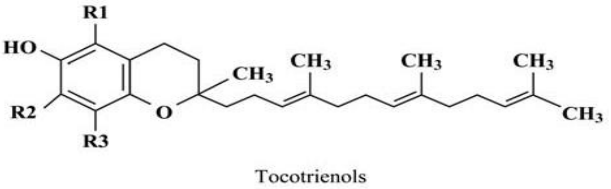


- Les tocophérols ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ). Les tocophérols sont composés d'un cycle chromanol mono-, di-, ou tri-méthyle auquel une chaîne carbonée latérale (chaîne phytyle) saturée de 16 carbones est attachée.

Les tocophérols diffèrent entre eux par le nombre et l'emplacement des groupes méthyles autour du cycle benzène du noyau chromanol.

La structure chimique des tocotriénols se compose aussi d'un cycle chromanol mono-, di- ou tri-méthyle avec une chaîne carbonée latérale qui contient 3 doubles liaisons en position 3, 7 et 11 [4]

**Tableau 1:** La variation de la structure chimique de l' $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - et  $\delta$ -vitamine E.

Composant	R1	R2	R3	Structure chimique
$\alpha$ -tocophérol	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	 <p style="text-align: center;">Tocopherols</p>
$\beta$ -tocophérol	CH <sub>3</sub>	H <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	
$\gamma$ -tocophérol	H <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	
$\delta$ -tocophérol	H <sub>3</sub>	H <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	
$\alpha$ -tocotrienol	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	 <p style="text-align: center;">Tocotrienols</p>
$\beta$ -tocotrienol	CH <sub>3</sub>	H <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	
$\gamma$ -tocotrienol	H <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	
$\delta$ -tocotrienol	H <sub>3</sub>	H <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	

#### I.4. Propriétés physico-chimiques de la vitamine E

- La vitamine E est un liquide visqueux, de consistance huileuse et de coloration jaune pâle à température ambiante.
- Elle est soluble dans les graisses, huiles et solvants organiques (éther, acétone, chloroforme, alcools éthyliques et méthyliques) et insoluble dans l'eau.

- L'oxydation de la vitamine E se fait en milieu basique à la lumière et à la température élevée.
- En l'absence d'oxygène et en milieu acide la vitamine E est stable.
- Elle présente une sensibilité aux rayons UV. [7]

**Tableau 2:** Propriétés physico-chimiques de la vitamine E. [7]

<b>Formule brute</b>	<b>C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O<sub>2</sub></b>
<b>Masse molaire</b>	<b>430 ,69 g/mol</b>
<b>Températures de fusion</b>	<b>3°C</b>
<b>Température d'ébullition</b>	<b>253°C</b>
<b>Solubilité</b>	<b>Soluble dans l'acétone, éthanol, éther et les huiles végétales. Insoluble dans l'eau.</b>
<b>Masse volumique</b>	<b>0,947-0,951 g/cm</b>

### **I.5. Sources de la vitamine E :**

La vitamine E est présente sous forme naturelles (d'origine animale et végétale), ou synthétique. [4]

#### **I.5.1. Origine naturelle :**

- **Animale :** les viandes, les œufs, le foie, le lait et ses dérivées.
- **Végétale :** les huiles d'origine végétales, les fruits secs (les noisettes, les arachides et les amandes). [4]

**Tableau 3 :** Les principales sources de vitamine E. [4].

<b>Sources naturelles de vitamine E</b>	<b>Masse de vitamine E en mg pour 100 g</b>
<b>Huile de germe de blé</b>	<b>150 à 500</b>
<b>Huile de soja</b>	<b>140</b>
<b>Huile d'arachide</b>	<b>15 à 30</b>
<b>Amande, noisette</b>	<b>15 à 20</b>
<b>Germes de céréales</b>	<b>14 à 20</b>
<b>Huile d'olive</b>	<b>8 à 20</b>
<b>Œuf, foie, maquereau</b>	<b>1 à 2</b>
<b>Lait maternel</b>	<b>0.7</b>
<b>Filet de bœuf, laitue</b>	<b>0.6</b>
<b>Banane, carotte</b>	<b>0.5</b>
<b>Gruyère</b>	<b>0.3</b>
<b>Tomate, orange</b>	<b>0.2</b>
<b>Lait de vache</b>	<b>0.06</b>

**I.5.2. Origine synthétique :**

On trouve la vitamine E synthétique sous forme de «dl-alpha tocophérol» dans les suppléments alimentaires en vitamine E. Elle existe également sous forme d'acétate ou succinate de tocophérol.

Bien que cette forme soit bénéfique, la forme naturelle est notamment recommandée. [4]

Tableau 4 : Différentes formes de la vitamine E. [4]

Nom	Masse moléculaire (g/mol)	Formule chimique
$\alpha$ -tocophérol	430,7	$C_{29}H_{50}O_2$
$\beta$ -tocophérol	416.7	$C_{28}H_{48}O_2$
$\delta$ -tocophérol	402.7	$C_{27}H_{46}O_2$
$\gamma$ -tocophérol	416.7	$C_{28}H_{48}O_2$
$\alpha$ -tocotrienol	424.7	$C_{29}H_{44}O_2$
$\beta$ -tocotrienol	410.6	$C_{28}H_{42}O_2$
$\delta$ -tocotrienol	396.6	$C_{27}H_{40}O_2$
$\gamma$ -tocotrienol	410.6	$C_{28}H_{42}O_2$
dl-alpha tocophérol	430.7	$C_{29}H_{50}O_2$
dl-alpha-Tocophérol Succinate	530.8	$C_{33}H_{54}O_5$
alpha-tocophérol acétate	472.7	$C_{31}H_{52}O_3$

### I.6. Rôles de la vitamine E :

La vitamine E est naturellement un antioxydant. Grâce à cette fonction, elle assure la protection des structures membranaires des cellules et prévient leur durcissement. Son rôle physiologique d'antioxydant permet de lutter contre les radicaux libres (les dérivés réactifs de l'oxygène), qui sont la cause d'agression des cellules appelé «stress oxydatif». [4].

La vitamine E est caractérisée par d'autres rôles :

- Elle protège contre les maladies cardio-vasculaires, en diminuant le taux du mauvais cholestérol (LDL).
- Elle renforce les défenses immunitaires, par son action d'anti-infectieuse.
- Elle participe à ralentir l'oxydation des acides gras insaturés.
- Elle prévient en retardant l'apparition de certains cancers.
- Elle est indispensable dans le développement des cellules sexuelles, et nécessaire durant la grossesse en développant convenablement les tissus générateur du sang chez le fœtus.
- La fertilité et la fécondité sont stimulées par le tocophérol. [7]

### **I.7. L'effet de la vitamine E sur la cellule spermatique**

La vitamine E ou  $\alpha$ -tocophérol agit sur la membrane du spermatozoïde par neutralisation de  $H_2O_2$  et prévient dans la dégradation des radicaux libres. La qualité de l'ADN des spermatozoïdes peut subir une altération provoquée par la carence en vitamine E.

De nombreuses études ont été effectuées chez l'animal et chez l'homme infertile, montrent que la supplémentation en vitamine E a un effet bénéfique sur la qualité des spermatozoïdes : diminution de la quantité des marqueurs de la peroxydation des lipides TBARS et amélioration de la motilité des spermatozoïdes. [7]

### **I.8. Mécanisme antioxydant**

In vivo, la vitamine E prévient dans la protection des structures sensibles à l'oxydation : les lipides, les bases nucléotidiques des brins d'ADN et des protéines. Dans ce mécanisme, la vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol) est oxydée par les molécules préalablement oxydées (radicaux libres), sous la forme régénérable (chrome-6-oxyle  $\alpha$ -tocophérol\*). Pour sa régénération, ce dernier entre dans plusieurs réactions de l'organisme, qui nécessite la présence d'une autre vitamine (la vitamine C). [8].

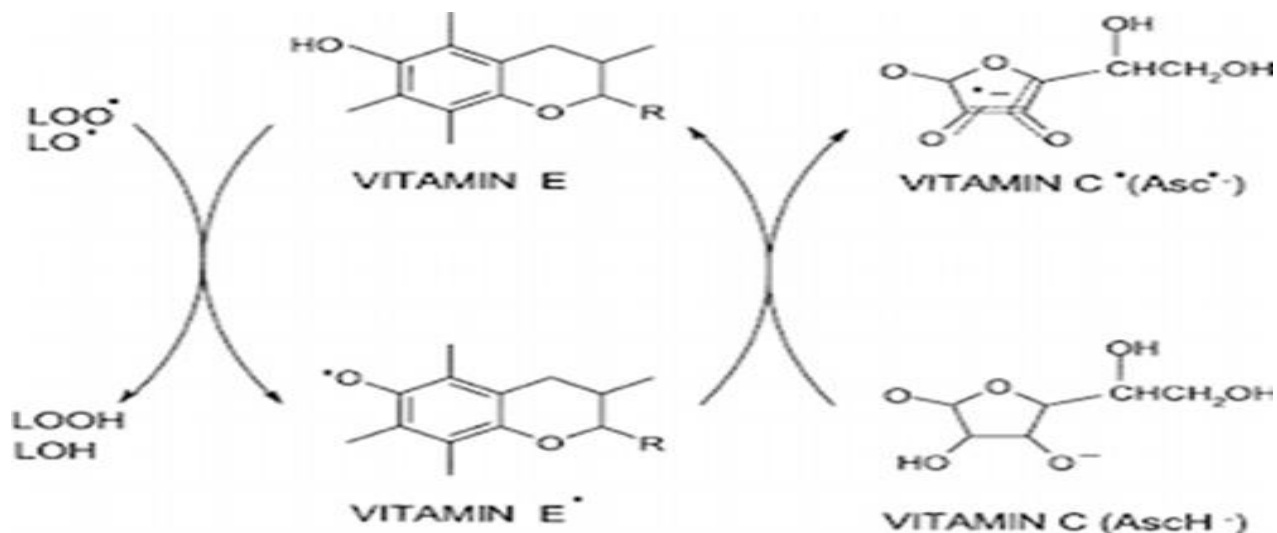


Figure 1 : Mécanisme antioxydant de la vitamine E.

## La vitamine C

### I.9. Introduction

Les vitamines sont des substances sans valeur énergétique qui jouent un rôle indispensable au sein de l'organisme et dont l'apport est quasi exclusivement exogène. [9]

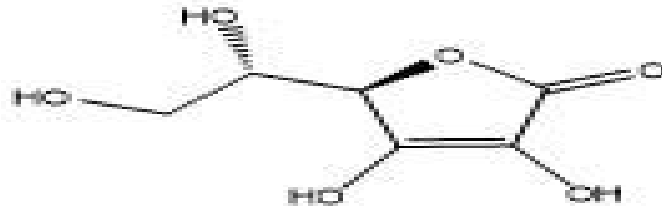
Dans le règne végétal et animal, la production endogène de vitamine C (ou acide L-ascorbique) est très répandue, seuls quelques organismes ne la synthétisent pas. C'est le cas de certains poissons (carpe, truite arc en ciel), des chauves-souris frugivores, des cochons d'Inde, de l'Homme et de certains primates. Ils ne peuvent pas transformer le glucose en acide ascorbique, par le biais de multiples réactions chimiques et enzymatiques, car ils ne possèdent pas le L-gulono- $\gamma$ -lactone déshydrogénase, enzyme contenue dans le foie. Du fait de cette carence, ces organismes et donc l'homme se retrouvent dans la nécessité d'un apport exogène. [10]

### I.10. Description de la vitamine C

La vitamine C ( $C_6H_8O_6$ ), de nomenclature chimique : 2-oxo-L-threohexono-1,4-lactone-2,3-enediol, est un composé organique hydrosoluble. [9]

La vitamine C, acide L-ascorbique, est un composé organique hydrosoluble, très répandue dans le monde vivant. [10] Elle peut être oxydée en acide déhydroascorbique ( $C_6H_6O_6$ ) préférentiellement dans les milieux alcalins. Ces 2 molécules actives vont coexister physiologiquement dans les liquides de l'organisme à des proportions différentes. En effet, l'acide déhydroascorbique ne représente que 5 à 20% de la vitamine C circulante dans le sang contre 80 à 95% pour l'acide L-ascorbique. [11]

La vitamine C appartient aux groupes des sucres à 6 atomes et est un dérivé du D-Glucose. Elle est composée d'une fonction cétone, d'un cycle lactone, d'une fonction ène-diol et de deux fonctions alcools : l'une primaire et l'autre secondaire. L'AA possède deux formes optiques : lévogyre et dextrogyre, mais seule la forme lévogyre, forme naturelle (acide L-ascorbique) est biologiquement active. [12] La vitamine C peut être extrait de la nature ou créé par voie de synthèse à partir du D-Glucose.



**Figure 2:** Structure de l'acide L-ascorbique.

### I.11. Historique de la vitamine C

C'est en 2018 que l'acide ascorbique, plus communément connue sous le nom de vitamine C, a fêté son anniversaire de demi-siècle depuis sa toute première isolation par le Hongrois Albert Szent-Giorgy au cours de ses recherches sur les mécanismes d'oxydations cellulaires. Micronutriment découvert suite à la propagation du scorbut dans les navires marins, la vitamine C connue de nos jours fut considéré comme antiscorbutique grâce aux travaux menés par le médecin de la flotte royale britannique écossais James Lind en 1747, il tente alors une expérience où il administre des doses importantes de jus de citron de façon quotidienne aux malades. En quelques jours, l'équipage tout entier est miraculeusement rétabli.

Le Hongrois Szent-Györgyi rebaptisera l'acide hexuronique, agent protecteur du jus de citron après sa découverte en 1928, en l'acide L-ascorbique, abréviation d'anti-scorbutique. Il s'agit de la vitamine C. La présence dans les jus d'orange et de citron de forts taux d'acide ascorbique associés à des sucres rend la purification de l'acide ascorbique très difficile. Szent-Györgyi résout ce problème en 1933 en utilisant le paprika [13]

La même année 1933, Walter Haworth en établit la formule chimique et le Suisse Tadeusz Reichstein en réalise la synthèse [13]

En 1970, le prix Nobel de chimie, Linus Pauling, élaborera la théorie selon laquelle les humains devaient consommer de fortes doses de vitamine C, au moins 2 à 3 g par jour, pour garder la bonne santé. L'idée venait de la constatation qu'il y a de très forts taux de vitamine C dans le foie des mammifères capables de synthétiser l'acide ascorbique, contrairement à l'homme ou aux singes.

En 2016 la production mondiale de vitamine C a atteint 110 000 tonnes. Cette vitamine est aujourd'hui omniprésente dans l'industrie agroalimentaire comme l'additif E300, du fait de son potentiel antioxydant et acidifiant. Elle est aussi disponible dans l'industrie pharmaceutique comme vitamine sous forme de gélules et de poudre à diluer.

### I.12. Caractéristiques physico-chimiques de la vitamine C

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche ou cristaux incolores se colorant par exposition à l'air et à l'humidité, facilement solubles dans l'eau [18], solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

L'acide ascorbique fond en se décomposant vers 190 °C. [14] (Tableau 5)

**Tableau 5 : Caractéristiques physico-chimiques de la vitamine C.** [15]

<b>Aspect</b>	<b>Poudre cristalline blanche ou légèrement jaunâtre.</b>
<b>Solubilité</b>	<b>Très soluble dans l'eau, peu soluble dans l'éthanol, insoluble dans l'éther.</b>
<b>Stabilité</b>	<b>Relativement stable à l'air sec, très oxydable en solution aqueuse et en mélanges, surtout en présence d'alcalin, de cuivre et de fer.</b>
<b>pH</b>	<b>2,4 à 2,8 dans une solution aqueuse à 2 %.</b>
<b>Intervalle de fusion</b>	<b>189°C-193°C avec une légère décomposition.</b>
<b>Pouvoir rotatoire spécifique</b>	<b><math>[\alpha]_D^{20} = +20,5^\circ \text{ à } +21,5^\circ</math> (Concentration = 10 % dans l'eau, 589 nm, 20°C)</b>

### I.13. Source de la vitamine C

La vitamine C est présente dans de nombreuses nourritures, incluant les agrumes (oranges, citrons, raisins), les légumes verts (épinards, brocolis, choux), les tomates et les pommes de terre. Les préparations culinaires peuvent dégrader ou détruire la vitamine C, ainsi que l'exposition à l'air, la dessiccation et le salage. La congélation n'entraîne pas la perte de la vitamine C, le tableau I.6. Illustre le taux de vitamine C en mg dans quelques fruits et légumes. [9]

**Tableau 6 :** La teneur en de vitamine C de certains aliments.



<b>Aliment</b>	<b>Teneur en vitamine C (mg/100g)</b>
<b>Cassis</b>	<b>200.00 mg</b>
<b>Persil</b>	<b>190.00 mg</b>
<b>Poivron rouge cru</b>	<b>162.00 mg</b>
<b>Herbes aromatiques (aliment moyen)</b>	<b>143.00 mg</b>
<b>Zeste de citron</b>	<b>129.00 mg</b>
<b>Poivron vert, jaune ou rouge cru</b>	<b>120.00 mg</b>
<b>Céréales pour petit déjeuner nature enrichies en vitamines et minéraux</b>	<b>100.00 mg</b>
<b>Raifort cru</b>	<b>97.30 mg</b>
<b>Kiwi</b>	<b>92.70 mg</b>
<b>Céréales aux fruits</b>	<b>90.00 mg</b>
<b>Poivron rouge cuit</b>	<b>81.00 mg</b>
<b>Poivron vert, jaune ou rouge cuit</b>	<b>74.40 mg</b>
<b>Litchi</b>	<b>71.50 mg</b>
<b>Poivron vert cuit</b>	<b>69.00mg</b>
<b>Fruits rouges</b>	<b>67.90 mg</b>
<b>Fraise</b>	<b>67.00 mg</b>
<b>Coulis de fruits rouges</b>	<b>60.90 mg</b>
<b>Papaye</b>	<b>59.70 mg</b>
<b>Choux de Bruxelles cuit</b>	<b>58.20 mg</b>
<b>Chou-fleur</b>	<b>57.90 mg</b>
<b>Jus d'orange pressé</b>	<b>53.80mg</b>
<b>Citron</b>	<b>53.00 mg</b>

#### **I.14. Rôle de la vitamine C**

Elle contribue au renforcement du système immunitaire,

- Stimule les défenses de l'organisme vis-à-vis des infections microbiennes,
- Possède un effet antiviral et favorise la synthèse de l'interféron, ce qui lui permet de combattre certains cancers et leucémies et de lutter contre les problèmes d'arthrose, de goutte, de rhumatisme, d'asthme, d'allergies, d'ulcères, de diabète, de troubles de la grossesse, de parturition, d'autisme, de schizophrénie... et autres maladies graves,

- joue un rôle dans la fabrication des globules rouges,
- favorise l'absorption digestive et l'utilisation du fer, ce qui contribue à accélérer la formation des globules rouges et donc de diminuer les risques d'anémie,
- joue un rôle dans les réactions d'hydroxylation pour la formation de presque tous les tissus conjonctifs.
- favorise la construction et la restauration des tissus tels que la peau, le cartilage, l'os, les dents, le muscle, les vaisseaux sanguins et retardant leur vieillissement,
- permet une meilleure réactivité aux chocs et une meilleure concentration,
- elle intervient dans de nombreuses sécrétions hormonales,
- joue un rôle dans la synthèse des acides nucléiques,
- intervient dans le métabolisme des lipides,
- favorise l'assimilation et la fixation du calcium dans l'os,
- elle intervient dans la respiration cellulaire en tant que transporteur d'hydrogène,
- elle a une activité antitoxique, elle transforme les métaux lourds, les substances cancérigènes et les toxines diverses en sels solubles, facilement éliminables par l'organisme,
- elle aurait aussi la propriété de prévenir la production d'histamine et de réduire l'inflammation,
- la vitamine C a une action tonifiante et antifatique, elle améliorerait la qualité du sperme et augmenterait le nombre de spermatozoïdes.

Dans notre étude on s'intéresse à l'effet de l'acide L-ascorbique sur la cellule spermatique.

### **I.15. Effet de la vitamine C sur la cellule spermatique**

La vitamine C est retrouvée à un niveau élevé dans le fluide épидидymaire et le plasma séminal en concentration 8 à 10 fois plus élevée que dans le plasma sanguin, cette concentration élevée protège les spermatozoïdes en évitant les lésions de leur ADN, une supplémentation en vitamine C a un effet positif sur la croissance des gonades et la qualité du sperme : augmentation du nombre de spermatozoïde, amélioration de la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes. ([16] ; [17])

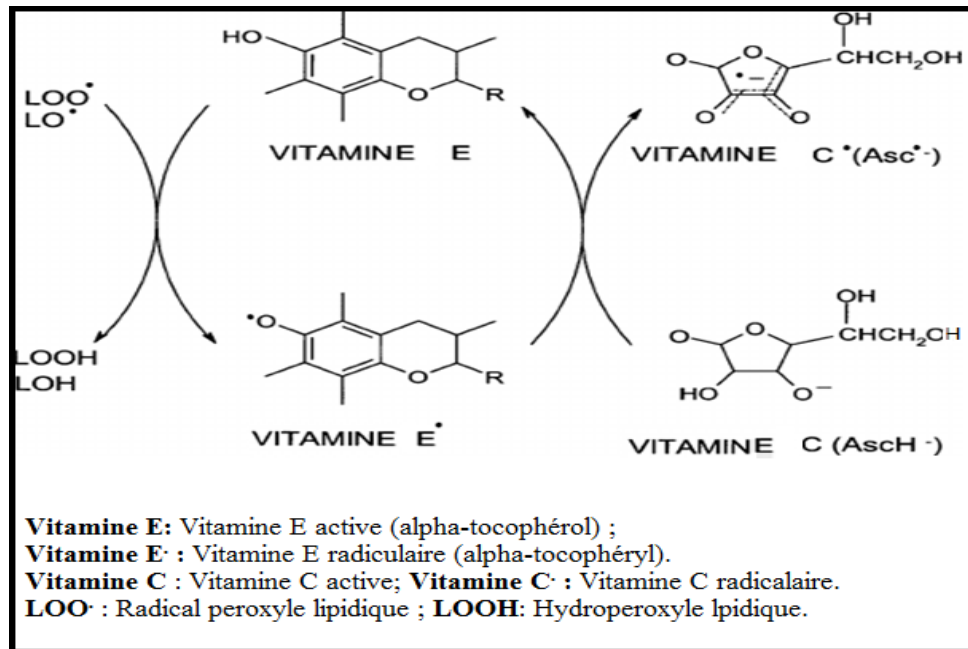
### **I.16. Mécanisme antioxydant**

Du fait de sa capacité à donner des électrons, l'ascorbate est un antioxydant puissant.

L'anion ascorbate  $AH^-$  piège les radicaux et donne un radical ascorbyl  $A^\cdot$ .



Ce radical est transformé en déhydroascorbate recyclé en acide ascorbique par une déhydroascorbate réductase avec utilisation de NADPH. Par ce mécanisme, la vitamine C hydrosoluble régénère la vitamine E à l'interface de la membrane. [19]



**Figure 3:** Réaction de la vitamine E avec des radicaux peroxydes et la régénération de la vitamine E radicalaire (alpha-tocophéryl) par la vitamine C [20].

Il piège les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO), tels le radical hydroxyle ( $\cdot OH$ ), l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot -}$ ) et les espèces réactives dérivées de l'azote (ERN), tel que le peroxy-nitrite. Sa concentration tissulaire élevée lui permet d'exercer une protection antioxydante efficace dans le sperme, vis-à-vis de l'attaque oxydative de l'ADN ([21], [22], [23]). L'ascorbate protège le plasma et les lipoprotéines de faible densité (LDL) en piégeant les ERO présentes dans la phase aqueuse avant qu'elles initialisent la peroxydation lipidique [24].

### I.17. Effet synergique de la vitamine C et de la vitamine E

Les effets vitaminiques ne peuvent être considérés isolément, en effet les vitamines influent l'une sur les autres de différentes manières ce qui se traduit par des interactions. L'effet

synergique est présent lorsque l'interaction résulte en un effet supérieur à la somme des effets produits par chaque vitamine seule. [24].

Maintes études ont mis en évidence l'effet synergique entre la vitamine C et E. En effet la capacité qu'à la vitamine C de préserver la vitamine E, in vivo et à régénérer la vitamine E n'est plus à démontrer. La vitamine E étant régénérée par la vitamine C, l'administration de vitamine C et de vitamine E contrecarre plus efficacement l'action délétère du stress oxydatif. [24].

## **Le cholestérol**

### **II.1. Introduction**

Le cholestérol est un composant lipidique majeur et indispensable de la membrane plasmique des cellules, appartient à la famille des stérols. Bien qu'il ait un certain nombre de fonctions différentes dans les cellules animales, l'un de ses principaux rôles est de moduler les propriétés physiques de la bicouche lipidique de la membrane plasmique [25].

### **II.2. Historique**

L'histoire du cholestérol a commencé en 1758, lorsque François-Paul Poulletier de la Salle a découvert une nouvelle substance organique dans les calculs biliaires. En 1816, un célèbre chimiste français Michel-Eugène Chevreul, énonce les caractéristiques physico-chimiques de cette substance lipidique et la nomme «cholestérine». En 1857, un pathologiste allemand, Rudolf Virchow, a relié les lésions artérielles (athéroscléroses) à une possible accumulation de cholestérine. En 1913 Nicolaï Anitschkow de Saint-Pétersbourg, en nourrissant des lapins avec du cholestérol, a induit une hypercholestérolémie et des lésions artérielles. Ensuite, plusieurs autres scientifiques ont travaillé sur le métabolisme, les propriétés, la fonction physiologique et le dosage du cholestérol. A la fin des années 1950 et 1960, des preuves épidémiologiques et cliniques sont apparues pour une implication directe de l'hypercholestérolémie, dans la progression de l'athérosclérose humaine et de la coronaropathie. En 1973, Akira Endo a découvert la première statine, à l'origine du traitement contre l'hypercholestérolémie [26] [27].

En 1985, l'importance du cholestérol fut relevée par l'attribution du prix Nobel de Médecine à J.L. Goldstein et Mickael S. Brown pour leur découverte portant sur la régulation du métabolisme du cholestérol [28].

Et en fin, en 2010 les directives américaines ont permis de cadrer et réguler l'utilisation du cholestérol en recommandaient d'en consommer en quantité ne dépassant pas 300 mg par jour [29].

### **II.3. Description**

Le cholestérol est une substance cireuse qui est présente dans le plasma sanguin et dans toutes les cellules animales. Chimiquement, le cholestérol est un composé organique appartenant à la famille des stéroïdes : sa formule moléculaire est  $C_{27}H_{46}O$ . À l'état pur, c'est une substance

cristalline blanche ou légèrement jaune, inodore et insipide. Le cholestérol est essentiel à la vie : c'est un composant principal de la membrane qui entoure chaque cellule, et c'est la matière de départ ou un composé intermédiaire à partir duquel le corps synthétise les acides biliaires, les hormones stéroïdes et la vitamine D. Il est synthétisé par le foie et plusieurs autres organes. Les êtres humains ingèrent également des quantités considérables de cholestérol au cours d'une alimentation normale. Un système compensateur régule la quantité du cholestérol synthétisée par le foie, pour maintenir la proportion bénéfique du cholestérol corporel. [30]

Le cholestérol comprend quatre cycles carbonés A, B, C et D (figure1), nommé «noyau cyclopentano-phénanthrénique». Sur le carbone 3, se fixe le groupement hydroxyle-OH qui constitue la tête polaire et donc la partie hydrophile du cholestérol. Cette molécule peut être totalement insoluble dans l'eau en estérifiant sa fonction OH par un acide gras, on parle donc d'ester de cholestérol [31].

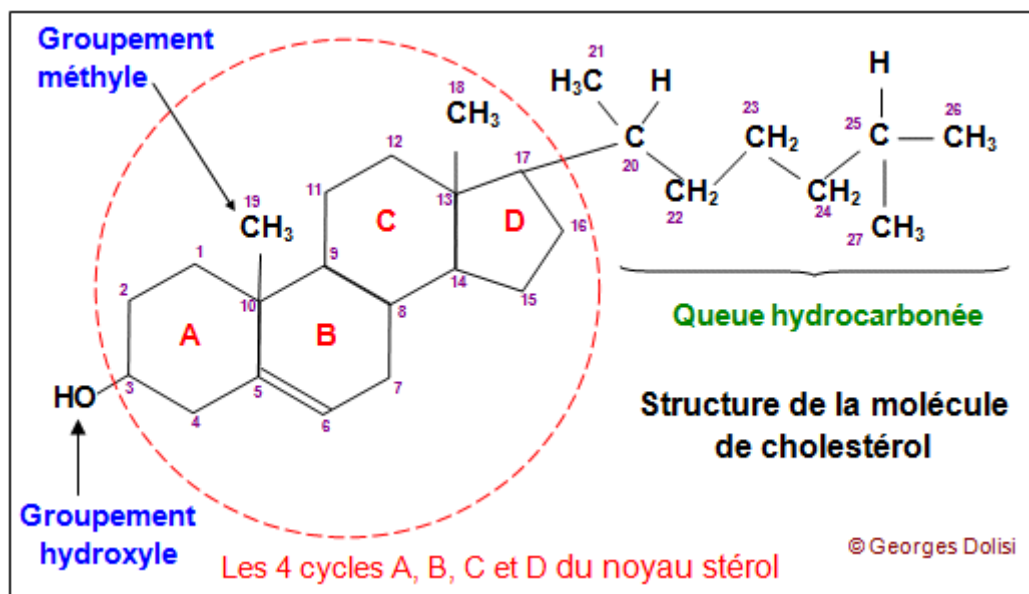


Figure 4 : Structure chimique du cholestérol.

#### II.4. Propriétés physico-chimique du cholestérol

Le cholestérol est une poudre cristalline blanche, inodore et insipide. Il est soluble dans les liquides organiques. Le cholestérol est sensible à l'action de la lumière.

**Tableau 7** : Propriétés physico-chimiques du cholestérol.

Nom chimique (IUPAC)	(3 $\beta$ )-cholest-5-en-3-ol
Formule chimique	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O
Masse moléculaire (g/mol)	386,654
Masse volumique (g/cm <sup>3</sup> )	1,07 à 20 °C
Point de fusion (°C)	147 à 150
Point d'ébullition (°C)	360
Point d'éclair (°C)	250
Solubilité	Pratiquement insoluble dans l'eau

## II.5. Rôles du cholestérol

- Le cholestérol est un composant important des membranes des cellules qui assure la stabilité et maintient la fluidité et la perméabilité membranaire.
- Il participe à la formation des sels biliaires qui sont essentiels pour décomposer les aliments et en assimiler les nutriments.
- Dans l'organisme, le cholestérol aide à synthétiser la vitamine D, indispensable dans la fixation du calcium.
- Le cholestérol intervient également dans la constitution de certaines hormones sexuelles telles que testostérone, progestérone, œstrogène et surrénales dont la cortisone.
- Il a un rôle important pour les synapses cérébrales ainsi que dans le système immunitaire. [27], [32].

## II.6. Sources du cholestérol

On trouve le cholestérol dans les aliments d'origine animale, telles que les fromages, le jaune d'œuf, la viande bovine et porcine. La synthèse de la grande proportion du cholestérol endogène se fait dans le cytoplasme des cellules du foie, qui s'effectue par l'enzyme HMG-CoA synthase (hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A synthase). [31]

## **II.7. Le cholestérol et la membrane spermatique**

Le cholestérol est l'un des constituants de la membrane spermatique, organisé en bicouche avec d'autres lipides et protéines. L'extrémité hydrophile de cette bicouche est orientée vers l'extérieur et l'extrémité hydrophobe vers l'intérieur de la membrane.

Les phospholipides et le cholestérol peuvent se déplacer latéralement dans la membrane spermatique. A la température basse, les phospholipides subissent une transition de phase, tandis que les autres constituants de la membrane spermatique ne subissent pas la transition de phase au même moment, ce qui conduit à l'instabilité de la membrane [7].

Cette sensibilité aux chocs froids dépend du rapport cholestérol/phospholipides. En effet, les espèces possédant des ratios cholestérol/phospholipides élevés sont plus résistantes aux dommages causés par le froid que les espèces à faibles ratios cholestérol/phospholipides [34].

Le cholestérol joue un rôle important dans la diminution de la perméabilité des membranes spermatiques, ce qui conduit à des transferts d'eau réduits, en maintenant intactes la structure membranaire des cellules lors des variations osmotiques pendant la cryoconservation [8].

## **II.8. Mécanisme de protection cellulaire**

Selon certaines études, le ratio cholestérol/phospholipides (C/P) élevé des membranes spermatiques de certaines espèces, permettait leur résistance au choc au froid ([34] ; [35] ; [36]). Ceci s'explique par le fait que le cholestérol ne subissant pas de transition de phase interagit avec les phospholipides membranaires et maintient la stabilité et la fluidité membranaire à basse température [37].

Le cholestérol a également un rôle important dans la réduction de la perméabilité des membranes spermatiques. Pendant la congélation, les cristaux extracellulaires se forment en premier rendant le milieu extracellulaire riche en soluté. Ceci crée un milieu hypertonique autour des cellules qui se déshydratent afin de rééquilibrer les concentrations en soluté intra et extracellulaire. Pendant la décongélation le phénomène inverse se produit avec une concentration en soluté plus importante dans les cellules que dans le milieu extracellulaire. Les cellules sont exposées à un milieu hypotonique. Afin de rééquilibrer les concentrations en soluté intra et extracellulaire, la cellule se réhydrate [38]. Ces variations d'osmolarité créent un stress important sur les membranaires cellulaires et sont en grande partie responsables des dysfonctionnements membranaires. Le cholestérol en réduisant la perméabilité membranaire diminue les transferts d'eau, maintenant intacte la structure membranaire des cellules pendant les variations osmotiques au moment de la cryoconservation. ([39] ; [40])



## **Les liposomes**

### **III.1. Introduction**

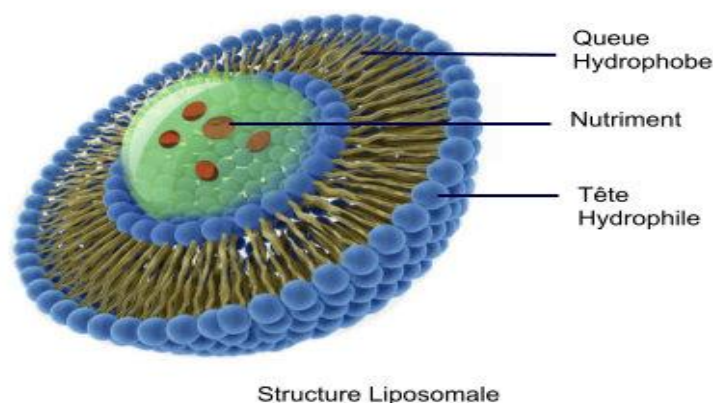
Les liposomes ont été découverts par Alec Bangham et ses collègues dans les années 1960 et ont été d'abord principalement utilisés comme modèle membranaire [41]. Le terme « liposome » dérive de deux mots d'origine grecque, « lipos » qui signifie gras et « soma » qui signifie corps [42].

Les liposomes ont d'abord été un outil d'étude précieux pour les physiciens et les physico-chimistes dans la compréhension du comportement des composés amphiphiles en solution. Ils furent ensuite traités par les biologistes comme modèle pour l'étude de perméabilité cellulaire avant d'être proposés, par la suite, comme vecteurs intracellulaires des substances médicamenteuses. Les applications des liposomes sont maintenant très variées dans différents secteurs tel que l'agroalimentaire, la cosmétique et la pharmacie [43].

### **III.2. Qu'est-ce qu'un liposome**

Les liposomes (Figure 5) sont des vésicules sphériques composées d'une ou plusieurs bicouches phospholipidiques entourant des compartiments aqueux [41], [42]

Ils sont caractérisés par la courbure des bicouches lipidiques composées de phospholipides entourant une partie du solvant environnant, mais aussi de cholestérol encapsulant un réservoir aqueux ou d'autres composés. La taille du liposome va dépendre de la technique utilisée pour le synthétiser, elle est environ 70 fois plus petite qu'un globule rouge, de l'ordre de quelques dizaines à quelques milliers de nanomètres de diamètre [44]. Les liposomes peuvent encapsuler et délivrer efficacement à la fois des substances hydrophiles (dans le noyau central aqueux), lipophiles (dans la membrane) et amphiphiles (à l'interface membrane/eau) [45], [4].



**Figure 5 :** Structure d'un liposome

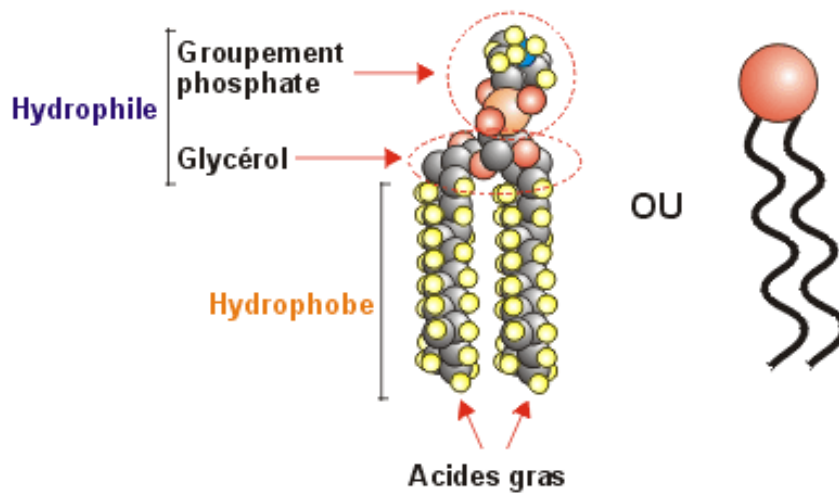
.Le liposome n'est pas une simple solution à un problème galénique (solubilité, stabilité, ...) mais un système de délivrance qui va déterminer le devenir *in vivo* du principe actif qu'il véhicule. Ils ont le principal avantage d'être à la fois non toxiques et biodégradables, du fait de leur composition en phospholipides qui sont des constituants naturels des membranes biologiques.

### III.3. Composition d'un liposome

Les liposomes sont constitués généralement d'un ou de plusieurs types de phospholipides. Ils sont non-toxiques, non-immunogènes, biocompatibles et biodégradables [46].Le cholestérol entre souvent dans la composition des liposomes. [42]

#### III.3.1. Les phospholipides

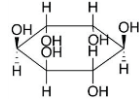
Les phospholipides (PLs) sont des molécules amphiphiles constituées d'une zone polaire ou chargée à forte affinité pour l'eau (figure 6), et d'une zone apolaire hydrophobe constituée de chaînes aliphatiques [4].



**Figure 6 :** Représentation d'un phospholipide.

Les phospholipides (PLs) sont formés d'un glycérol estérifié par deux acides gras (R1 et R2) et à un groupement phosphoryle. C'est ce groupement qui donne le nom aux différents PLs. [4]

**Tableau 8 :** Exemples de groupement chimique associé au phosphate des phospholipides [42].

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

Les phospholipides les plus utilisés sont les glycérophospholipides d'origine naturelle (lécithine de soja ou jaune d'œuf) ou synthétiques (phosphatidylcholines, phosphatidylglycérols et phosphatidyléthanolamine) et des sphingolipides (sphingomyélines). Les phospholipides naturels sont disponibles à différents degrés de pureté. Ils sont hétérogènes (longueur de chaîne lipidique, degré d'insaturation) et leur utilisation peut être limitée par des problèmes de stabilité chimiques (peroxydation, dégradation enzymatique). Les dérivés synthétiques sont d'une grande pureté, stables et définis selon leur composition. Les phospholipides pouvant former des bicouches ont deux chaînes hydrocarbonées (généralement de 14 à 18 atomes de carbone) qui peuvent être de même longueur ou, dans les phospholipides dit mixtes, de longueur différentes [47], [43].

Les molécules de phospholipides ont tendance à s'auto-organiser en solution, de manière à ce que les groupements polaires soient en contact avec des groupements polaires qui se trouvent dans le milieu environnant. L'incorporation dans la bicouche lipidique de phospholipides chargés négativement comme le phosphatidylglycérol, phosphatidylsérine, phosphatidylinositol, ou l'acide phosphatidique ou des lipides chargés positivement comme le stéarylamine permet de diminuer les phénomènes d'agrégation des vésicules entre elles [47],[48].

Des sphingolipides (sphingomyéline) peuvent entrer également dans la composition des liposomes [49]. La sphingomyéline avec le cholestérol sont à l'origine de la formation de micro-domaines rigides dans les membranes [49] ; [42].

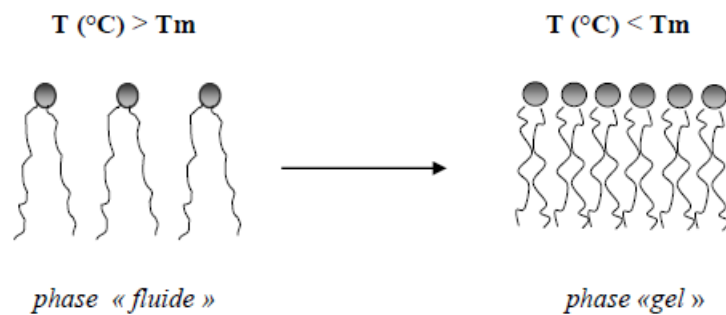
**Tableau 9 :** Principaux phospholipides et lipides utilisés dans la formulation des liposomes ([49] ; [50] ; [51] ; [42]).

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

Les phospholipides sont caractérisés par une température de transition de phase ( $T_m$ , melting temperature) qui correspond au passage d'un état gel ordonné vers un état fluide désordonné via un état intermédiaire  $P\beta$  ([52] ; [53]).

$T_m$  est un paramètre thermodynamique généralement utilisé pour étudier la fluidité de la bicouche lipidique. ([52] ; [53]).

La température de transition de phase varie en fonction de la longueur et du degré de saturation des chaînes d'acides gras des phospholipides. Ainsi, la  $T_m$  augmente proportionnellement avec la longueur des chaînes car les interactions de Van der Waals augmentent. Par contre, la  $T_m$  diminue avec le nombre d'insaturation qui défavorise les interactions entre les chaînes ([52]). Cette température doit être prise en considération lors de la préparation des liposomes. Ces derniers ne se forment qu'à une température supérieure à celle de leur transition de phase [52] ; [42].



**Figure 7 :** Différentes phases de liposomes suivant sa température de transition de phase.

Voici un tableau qui illustre quelque exemple de la température de transition de phase de certains phospholipides.

**Tableau 10 :** Illustration d'exemple de la température de transition de phase de certains phospholipides.

Phospholipides	$T_m$ ( $^{\circ}C$ )
DMPC (14 :0)	23
DPPC (16 :0)	41
DSPC (18 :0)	55
DOPE (18 :1)	-16

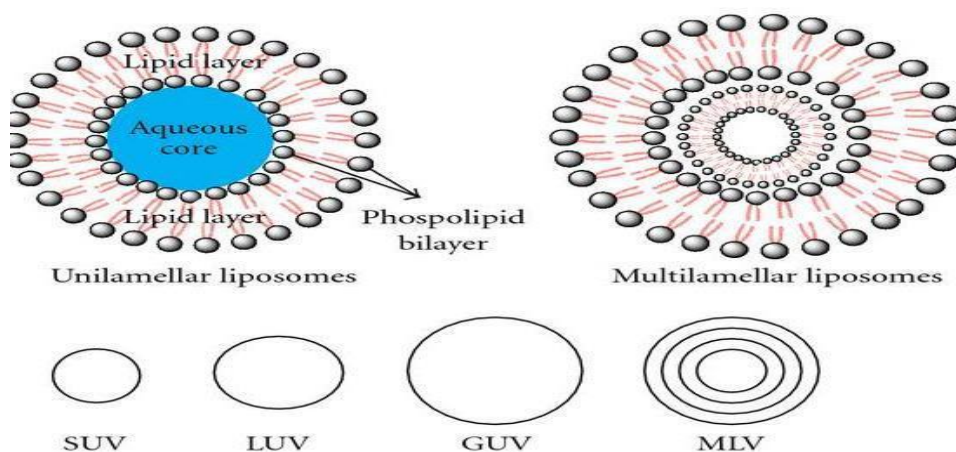
Les liposomes se forment que si la proportion en eau est suffisante et si sa température est supérieure à la température de transition de phase des phospholipides utilisés. Dans le cas de mélanges de phospholipides, la température de la phase aqueuse doit être supérieure à la  $T_m$  du phospholipide ayant la plus élevée [43].

### III.4. Classification des liposomes

Il existe différentes classes de liposomes. Leur classification et leur dénomination se fait le plus souvent selon des critères structuraux (taille, lamellarité), mais on peut aussi les classer selon des critères plus fonctionnels (composition et leur application *in vivo*) ou même, selon leur méthode de préparation [54].

#### III.4.1. Classification de liposomes selon leurs critères morphologique

Les différents liposomes se distinguent selon leur taille mais aussi selon leur nombre de bicouches lipidiques ou lamellarité. Plusieurs abréviations sont utilisées pour les désigner d'après ces deux critères [54]. On retrouve les multilamellaires (M.L.V) et les unilamellaires (S.U.V et L.U.V) dans la figure 8 et le tableau 11 [55].



**Figure 8 :** Représentation des liposomes multilamellaires et unilamellaires

**Tableau 11 :** Classification des liposomes.

Structure	SUV	LUV	MLV ou OLV	MVV
Représentation				
Taille	20-100 nm	100-1000 nm	Taille très hétérogène	> 1 $\mu\text{m}$
Capacité	Contient peu de principe actif	Contient beaucoup de principe actif	Capacité intermédiaire à celle de SUV et LUV	Peu utilisés
% d'encapsulation	0.5-1	35-60	5-15	
Stabilité	Plus le rayon de courbure est grand, plus faible est la tension de surface : MLV LUV SUV La stabilité est maximale entre 80 et 200 nm			

### **III.5. Stabilité des liposomes**

Une suspension liposomiale peut être sujette à des problèmes d'instabilité physique et chimique. La stabilité physique est reliée à la conservation de la taille des liposomes. La stabilité chimique est en relation avec la conservation de la structure et de la composition moléculaire des constituants [56]. Les principaux problèmes d'instabilité des liposomes et leurs solutions sont abordées ci-dessous.

#### **III.5.1. Agrégation des liposomes**

Dans une suspension liposomiale, des phénomènes de fusion ou coalescence peuvent se produire aboutissant à des agrégats. Ainsi, l'incorporation dans la bicouche lipidique de lipides chargés négativement ou positivement réduit le phénomène d'agrégation grâce à l'augmentation des forces électrostatiques répulsives entre les liposomes ([47] ; [48]). De plus, l'inclusion du cholestérol au sein des liposomes leur confère une meilleure stabilité ([57] ; [58]). Le greffage des polymères comme le polyéthylène glycol (PEG) à la surface des liposomes les stabilise. En effet, la PEGylation empêche les contacts inter-particulaires par répulsion stérique et l'adsorption des molécules de reconnaissance des systèmes immunitaires (les opsonines) ce qui augmente le temps de séjour de ces liposomes dans le système vasculaire [59].

#### **III.5.2. Dégradation chimique des liposomes**

Les phospholipides peuvent subir deux types de dégradation chimique : l'hydrolyse de leurs fonctions esters et la peroxydation des chaînes d'acides gras insaturés ([60] ; [61]). Ceci altère l'intégrité de la bicouche phospholipidique et peut entraîner la libération des principes actifs encapsulés.

### **III.6. Méthode de préparation des liposomes :**

Le choix de la méthode de préparation des liposomes dépend de plusieurs paramètres ([62]) :

1. Les propriétés physico-chimiques de la molécule encapsulée et celles des composants liposomiques.
2. La nature du milieu dans lequel les vésicules lipidiques sont dispersées.
3. La concentration de la concentration encapsulée et sa toxicité potentielle.

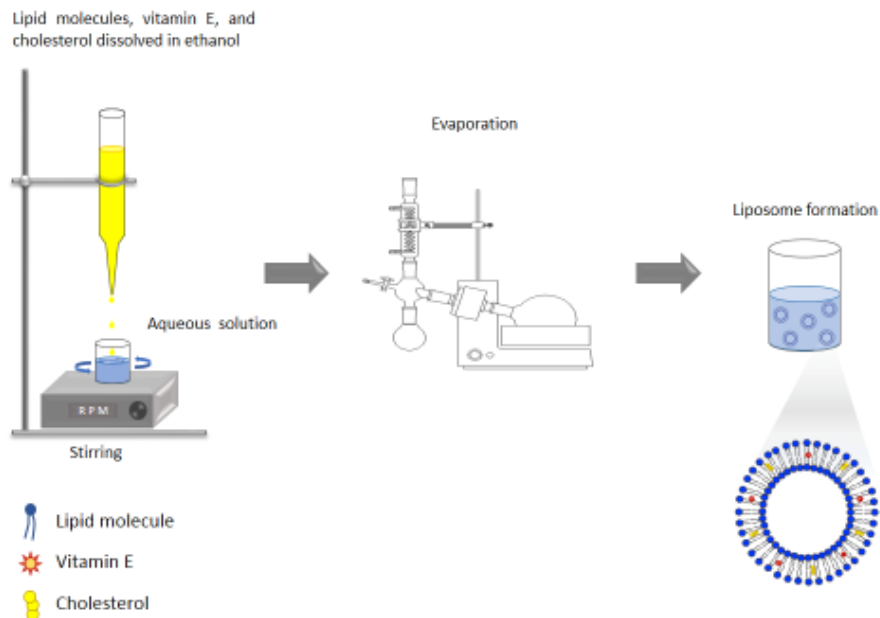
Les méthodes de préparation des liposomes se divisent en quatre groupes principaux ([63] ; [64]) :

- Les méthodes mécaniques de dispersion de phospholipides.
- Les méthodes basées sur l'élimination du détergent.

- Les méthodes basées sur la transformation des liposomes préformés : la congélation-décongélation (Freeze-thawmethod).
- Les méthodes basées sur l'élimination du solvant organique. [42]

### III.6.1. Les méthodes basées sur l'élimination du solvant organique

La méthode d'injection d'éthanol est décrite par Batzri et Korn en 1973. Elle consiste à dissoudre les phospholipides dans l'éthanol. La phase organique résultante est ensuite injectée à l'aide d'une seringue dans une solution aqueuse soumise à une agitation magnétique à une température supérieure à la  $T_m$  du phospholipide. Dès que la phase organique entre en contact avec la phase aqueuse, les molécules de lipides se précipitent et forment des fragments de bicouches planes « bilayer planar fragments ou BPF », qui eux-mêmes forment des liposomes [65]. Enfin, l'éthanol et une partie de l'eau sont éliminés à l'aide d'un évaporateur rotatif sous pression réduite ([66] ; [67], [68] ; [42]). (Figure 9).



**Figure 9** : Préparation des liposomes par injection éthanolique.

La méthode d'injection d'éthanol présente plusieurs avantages par rapport aux autres techniques utilisées pour la préparation des liposomes ([66] ; [69] ; [70] ; [71] ; [67] ; [72]) :

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



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

On obtient des liposomes unilamellaires dont le diamètre dépend de la vitesse d'injection, de la vitesse d'agitation et de la concentration en phospholipides dans l'éthanol.[43]

Plusieurs paramètres modifient les caractéristiques des liposomes. Plus la concentration des lipides dans la phase organique augmente plus la taille des liposomes augmente ([73];[67]). De plus, la taille des vésicules décroît avec l'augmentation de la vitesse d'agitation de la phase aqueuse [67] et augmente avec l'augmentation du rapport volumique solvant/eau ([72];[74]). En revanche, la vitesse d'injection de la solution organique ([67];[68];[73]), la variation du pH du milieu [74] et le contenu en cholestérol n'affectent pas la taille des liposomes [67], [42].

### **III.7. avantages et inconvénients des liposomes**

#### **III.7.1. Avantages**

- Les liposomes sont biocompatibles, entièrement biodégradables, non toxiques et non immunogènes.
- Les liposomes sont adaptés pour la livraison du PA d'hydrophobe et hydrophile.
- Les liposomes protègent le PA encapsulé dans le milieu extérieur.
- Les liposomes réduisent la toxicité des agents encapsulés et augmentent l'effet des médicaments chimio- thérapeutiques.
- Les liposomes réduisent l'exposition des tissus sensibles aux PAs toxiques.
- Les liposomes fournissent une libération prolongée.
- Les liposomes modifient la pharmacocinétique et la pharmacodynamie du médicament.
- Les liposomes peuvent être administrés par des voies diverses [75].

#### **III.7.2. Inconvénients :\_[4]**

- Le coût de production élevé.
- Courte demi-vie.
- Problème de stabilité.
- Fuites et fusion des PA(s) encapsulés [76].

### **III.8. Encapsulation des substances dans les liposomes**

L'encapsulation efficace et stable de substances médicamenteuses dans les liposomes est l'un principal challenge de l'industrie pharmaceutique depuis plus de 10 ans. L'encapsulation d'une molécule dépend beaucoup de ses propriétés physicochimique (taille, charge, hydrophobicité...) mais aussi des caractéristiques du liposome lui-même (taille, type, composition et concentration en lipides...).

Dans toutes les méthodes de préparation des liposomes, on peut incorporer des substances dans la phase aqueuse ou dans la phase organique selon leur polarité. Le principe actif est ajouté avec la phase organique quand il est lipophile. On peut alors très schématiquement définir deux types d'association des molécules à l'intérieur des vésicules : dans le compartiment aqueux (ou les espace inter lamellaires) pour les substances hydrosolubles, et dans les bicouches lipidiques pour les substances liposolubles. D'autre part, l'encapsulation des substances peut se faire de façon passive au cours de leur préparation, ou de façon dite active, en introduisant les substances à encapsuler dans des liposomes préformés [42].

Plusieurs paramètres permettent d'évaluer l'efficacité de l'encapsulation après élimination des substances non encapsulées, tels que : la mesure de l'efficacité de l'encapsulation par la mesure du taux d'encapsulation, l'encapsulation pondérée et le volume aqueux d'encapsulation.

### **III. 9. Facteurs influençant la capacité d'encapsulation des liposomes**

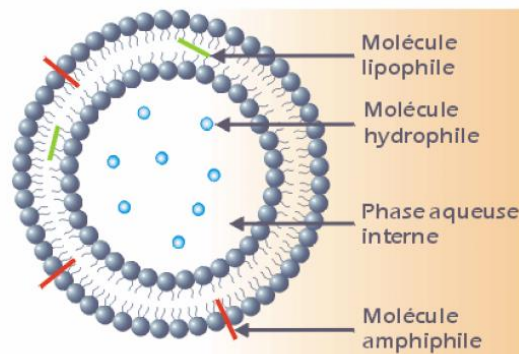
#### **III.9.1. Types de substances à encapsuler**

Le principal critère qui détermine l'efficacité de l'encapsulation est lié à l'hydrophobicité du composé. La plupart des molécules peuvent être classées en trois catégories selon leurs propriétés hydrophiles, lipophiles ou amphiphiles [77], [43]. (Figure 10).

Les substances hydrophiles sont les plus faciles à encapsuler, on peut les dissoudre directement dans la phase aqueuse. Ce sont aussi les plus intéressantes du fait qu'elles pénètrent souvent mal dans les cellules d'où l'intérêt de leur encapsulation. Sans pour autant négliger la charge des composés hydrophiles qui peuvent influencer l'efficacité de l'encapsulation et sa stabilité dans le temps.

**-Les substances hydrophobes :** sont plus difficile à encapsuler et se comportent différemment, certains seront partiellement ou totalement fixés sur la membrane, suivant la concentration, et certains non.

**-Les substances amphiphiles :** sont plus compliquées à encapsuler quel que soit le type de liposome. Ces composés peuvent passer à travers la membrane et se distribuer dans la bicouche lipidique et dans la phase aqueuse mais ils s'échappent rapidement des liposomes.



**Figure 10 :** Schéma d'un liposome unilamellaire avec la localisation de molécules encapsulées en fonction de leur solubilité. [78]

### III.9.2. Types de liposomes

La capacité à transporter les molécules est différente selon le type de liposomes :

LUV > MLV > SUV. En effet, plus la taille des liposomes est importante, plus la capacité d'encapsulation sera grande [43].

### III.10. Modes d'encapsulation

L'encapsulation des PA se fait généralement au cours du procédé de fabrication des liposomes en ajoutant la substance destinée à être encapsulée dans la phase aqueuse pour un PA hydrophile et dans la phase organique pour un PA hydrophobe, dans le cas de l'encapsulation passive. En revanche, l'encapsulation active consiste à introduire les substances à encapsuler dans les liposomes préformés.

## Les cyclodextrines

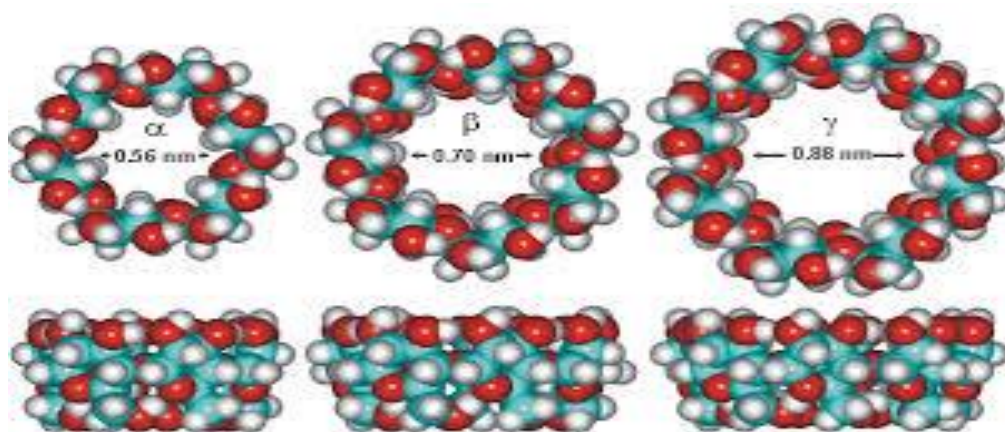
### III.11. Introduction

Les cyclodextrines (CDs) sont des molécules de plus en plus utilisés dans le domaine industriel. Leur capacité à renfermer des molécules hydrophobes au sein de leur cavité, formant ainsi des complexes, permet leurs utilisations dans plusieurs domaines tels que l'agroalimentaire, la cosmétique et la pharmaceutique.

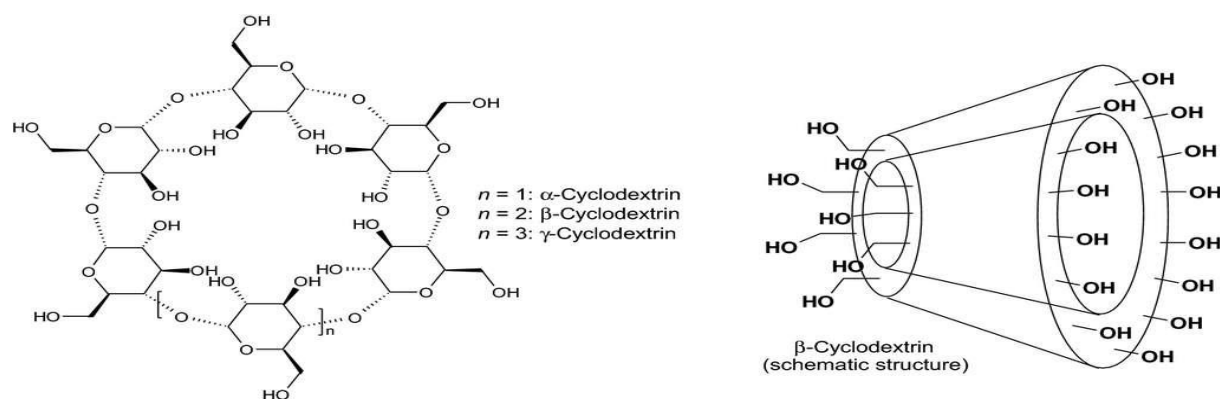
### III.12. Définition des cyclodextrines

Les CDs sont produites à partir d'amidon ou de dérivés d'amidon en utilisant cyclodextrine glycosyl transférase (Cgtase) contenant six, sept ou huit résidus de glucose liés par des liaisons glycosidiques  $\alpha$  (1-4) [79] (figure 11 et 12). Leur structure en trois dimensions apparaît sous la forme d'un cône tronqué à l'extérieur duquel se trouvent les groupements hydroxyyles. La partie extérieure est donc relativement hydrophile. Les groupements hydroxyyles secondaires portés par les carbones C2 et C3 se situent sur le côté le plus large du cône appelé face secondaire tandis que les hydroxyyles primaires en C6 se trouvent du côté le plus étroit (face primaire). L'intérieur de la cavité est tapissé par des squelettes carbonés et oxygène en liaison éther, ce qui lui confère un caractère apolaire ([80], [81]).

C'est en grande partie grâce à leur caractère amphiphile que les CDs sont capable d'interagir avec une large variété de molécules pour former des complexes d'inclusion de type hôte-invité.



**Figure 11** : Structure de l' $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  cyclodextrine



**Figure 12 :** Structure de la  $\beta$  cyclodextrine.

### III.13. Caractéristiques physico-chimiques des cyclodextrines

Les CDs natives sont des composés cristallins, homogènes et non-hygroscopiques [81]. Leurs principales propriétés sont regroupées dans le tableau 1 ci-dessous.

**Tableau 12 :** Propriétés physico-chimiques des CDs natives ([82] ; [83] ; [84]).

Propriété	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Nombres d'unités de glucose	6	7	8
Formule moléculaire	$(C_6H_{10}O_5)_6$	$(C_6H_{10}O_5)_7$	$(C_6H_{10}O_5)_8$
Carbones asymétriques	30	35	40
Masse moléculaire (g/mol)	972	1135	1297
Diamètre de la cavité (Å)	5.7	7.8	9.5
Diamètre de la périphérie (Å)	14.6-15	15.4-15.8	17.5-17.9
Volume de la cavité (Å <sup>3</sup> )	173	262	427
Hauteur du cône (Å)	7.8	7.8	7.8
Molécules d'eau retenues dans la cavité	6-8	11-12	13-17
Température de fusion (°C)	275	280	275
pKa à 25°C	12.3	12.2	12.1
LogP à 25°C	-13	-14	-17
Solubilité dans l'eau à 25°C (mg/ml)	145	18.5	232

### III.14. Dérivés des cyclodextrines

Les CDs natives présentent en réalité plusieurs inconvénients. En effet des trois types de cyclodextrines, seules la  $\beta$ -CD et la  $\gamma$ -CD ont une cavité de diamètre adéquat pour renfermer des molécules thérapeutiques. L' $\alpha$ -CD ne permet que de retenir les molécules de faible poids

moléculaire par ailleurs les gaz. Mais la  $\beta$ -CD est de loin la moins soluble des trois cyclodextrines natives, ce qui limite l'intérêt son utilisation. Enfin, pendant de nombreuses années, la  $\gamma$ -CD n'a été qu'un sous-produit de l'obtention de l' $\alpha$ -CD ou la  $\beta$ -CD. [85]

Les groupements hydroxyles des CDs natives et surtout la  $\beta$ -CD peuvent être modifiés par voie chimique ou enzymatique [78]. Les CDs peuvent être modifiés par substitution de l'atome d'hydrogène ou du groupe hydroxyle tout entier par une grande variété des groupements, neutres ou ioniques tels que les groupes alkyles, hydroxyalkyles, sulfobutyles, glucosyles, acétyles, etc. [85]

Les dérivés de cyclodextrines fréquemment rencontrés dans le domaine pharmaceutique sont de type méthyle, hydroxy propylée (HP) et sulfobutyléther (SBE) [87].

De nombreux dérivés de CD ont été synthétisés pour différents objectifs [86] :

- Améliorer la capacité de complexation des CD.
- Augmenter leur solubilité aqueuse (surtout celle des  $\beta$ -CD).
- Introduire des groupements spécifiques.

On s'intéressera dans notre cas à la Perméthyl bêta-cyclodextrine (PM- $\beta$ -CD).

### **III.15. Avantages des cyclodextrines**

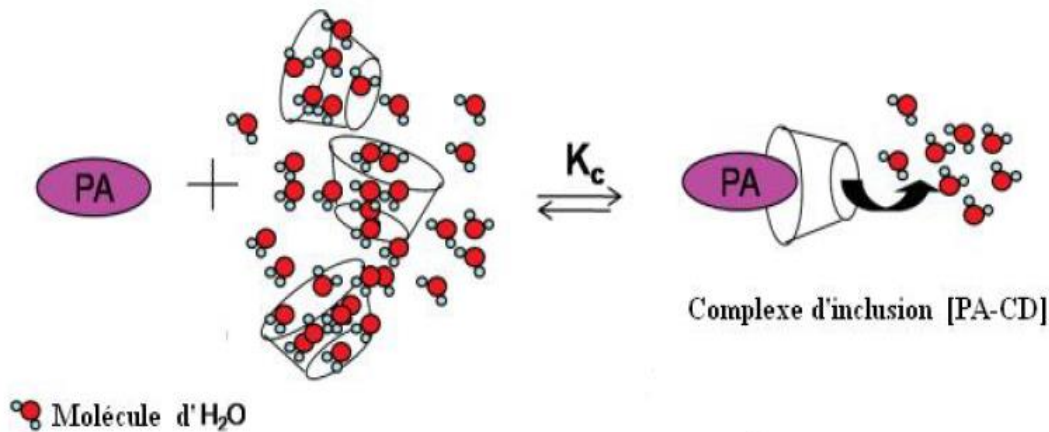
Les CDs présentent les avantages suivants ([82] ; [88]) :

- Biocompatibilité, biodégradabilité et non-toxicité (le glucose est le produit majeur de la dégradation) ;
- Non volatilité et non inflammabilité ;
- Faible activité pharmacologique ;
- Absence d'absorption dans la gamme d'UV utilisée pour la détection des solutés ;
- Stabilité dans une large gamme de pH ;
- Augmentation de la stabilité chimique, physique et thermique de la molécule encapsulée ;
- Augmentation de la solubilité aqueuse des molécules hydrophobes encapsulées ;
- Vitesse de libération contrôlée des molécules encapsulées ;
- Amélioration des activités biologiques de la molécule encapsulée.

### **III.16. Préparation des complexes d'inclusion**

Le caractère amphiphile des cyclodextrines leur permet de solubiliser dans l'eau des molécules hydrophobes par formation de complexes d'inclusion.

Ces molécules pénètrent dans la cavité par la plus grande ouverture et le côté le plus accessible. La molécule invitée est incluse d'une manière à éloigner sa portion polaire pour avoir un maximum de contact avec la cavité hydrophobe, et sa partie polaire interagit avec la surface hydrophile de la CD (figure 13) [82]



**Figure 13 :** Représentation d'un complexe d'inclusion hôte-invité de cyclodextrines.

Plusieurs méthodes de préparation sont utilisées pour former des complexes d'inclusion comme : Co-précipitation, Co-mélange, pétrissage, extrusion, neutralisation, Co-évaporation, lyophilisation, atomisation ou pulvérisation, inclusion à sec, inclusion en suspension, inclusion en méthode humide, inclusion par micro-ondes, inclusion au CO<sub>2</sub> supercritique [89].

### III.16.1. Co-évaporation

La méthode de Co-évaporation est basée sur la préparation d'un mélange de cyclodextrines et de principe actif destiné à être encapsulé avec l'ajout d'un solvant approprié. Elle consiste à éliminer le solvant par évaporation et condensation dans un ballon d'évaporation par rotation sous vide afin de récupérer un complexe d'inclusion sous forme d'une poudre sèche.

### III.16.2. Méthodes de caractérisation des complexes d'inclusion

Les structures des complexes d'inclusion peuvent être caractérisées par diverses techniques d'analyse physico-chimiques telles que :

- Méthode spectrophotométrie UV-visible
- Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)
- Spectroscopie infrarouge (IR)
- Diffraction des rayons X (DRX)
- Microscopie électronique à balayage (MEB)

**Chapitre III : les systèmes d'encapsulation (liposomes, cyclodextrines et PEG).**

- Analyse thermogravimétrique (ATG)
- Analyse calorimétrique différentielle (DSC)
- Test de dissolution



## Polyéthylène glycol

### III.17. Introduction

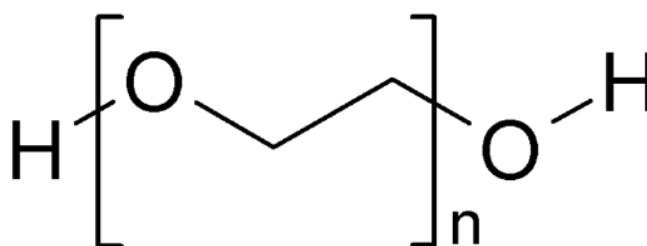
Le polyéthylène glycol (PEG) est un polymère d'oxyde d'éthylène, également appelé oxyde de polyéthylène (PEo) et polyoxyéthylène (PoE). Les polymères ont été classés en fonction de leur gamme de poids moléculaire et présentent des propriétés uniques (par exemple, point de congélation/fusion, solubilité) en fonction de leur poids moléculaire et de leur structure (par exemple linéaire ou ramifiée). Les PEGs sont largement utilisés comme ingrédients pharmaceutiques dont les pommades, les suppositoires, les crèmes, les lotions, les lubrifiants, les matériaux d'enrobage des comprimés et solubilisant pour injection. Ce polymère a une faible toxicité car il est éliminé par les voies rénale et hépatique [90].

### III.18. Définition

Les polyéthylènes glycol, PEG : HO-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-H, sont des polyéthers linéaires de masse moléculaire inférieure à 20000 g.mol<sup>-1</sup>, synthétisés à partir de monomère d'oxyde d'éthylène. Ce sont des polymères, ou n indique le nombre moyen de groupes oxyéthyléniques avec (n ≥ 4). Dans le domaine pharmaceutique et médical, on les appelle «Macrogol» [91].

### III.19. Structure des PEG

Les PEGs (polyéthylène glycol), sont de formule chimique générale **H-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-OH**.



**Figure 14 :** Structure chimique générale des PEGs.

### III.20. Leurs propriétés

Le polyéthylène glycol est un polymère linéaire, chimiquement neutre.

Les PEGs et dérivés ayant un poids moléculaire moyens inférieur à 600 g.mol<sup>-1</sup> sont des liquides visqueux incolores à température ambiante, par contre les PEGs et dérivés de poids moléculaire plus élevés (supérieur à 600 g.mol<sup>-1</sup>) sont des solides blancs cireux.

### Chapitre III : les systèmes d'encapsulation (liposomes, cyclodextrines et PEG).

Les PEGs sont facilement solubles dans les solvants polaires et non polaires et insolubles dans les hydrocarbures aliphatiques [92].

Les PEGs de forme liquide (de masse moléculaire faible), peuvent être utilisé comme des solvants.

Ils sont reconnus par le système immunitaire [93].

**Tableau 13 :** Propriétés physiques des PEGs. [91]

Propriétés / Nom du PEG	PEG200 PEG-4	PEG 400 PEG-8	PEG 600 PEG-12	PEG 1500 PEG-32	PEG 4000 PEG-90	PEG 6000 PEG-135
Valeur moyenne du n	4	8.2-9.1	12.5-13.9	29-36	68-84	158-204
Valeur moyenne du poids moléculaire en g.mol <sup>-1</sup>	190-210	380-420	570-630	1300-1600	3000-3700	7000-9000
Température de fusion en C°	/	4-8	20-25	44-48	54-58	56-63
Masse volumique à 25 C° en g.cm <sup>3</sup>	1.127	1.128	1.128	1.210	1.212	1.21
Point d'éclair en C°	/	223-245	/	266	270	270

#### **III.21. Rôle des PEGs**

- Les PEGs ont une grande capacité de liaison hydrogène et, par conséquent, la modification chimique des matériaux avec du PEG «PEGylation» entraîne des changements importants dans leurs propriétés physico-chimiques. La PEGylation améliore non seulement les propriétés physico-chimiques d'un composé, mais également sa pharmacocinétique et sa biodistribution [90].

- Le PEG augmente l'activité enzymatique dans les interactions coenzyme NADP/PEG.

- En raison de ces propriétés amphiphile, le PEG favorise la restauration des membranes cellulaires endommagées [94].

- Les PEGs aident à augmenter le volume du contenu intestinal et améliorent son hydratation [95].

### **III.22. Domaine d'application**

Les PEGs sont appliqués dans plusieurs domaines comme :

- Le secteur pharmaceutique et cosmétique, comme base de pommade, dans les crèmes et les lotions.
- Le domaine médical, les macrogols sont utilisés dans la cicatrisation des plaies et la régénération des tissus.
- Les industries du textile et du cuir, comme plastifiants, agents antistatique et agents émulsifiants.
- L'industrie du caoutchouc, comme lubrifiants, agents de démoulage et accélérateurs de vulcanisation.
- L'industrie céramique, comme plastifiants et agents liants.
- Les PEG200 à PEG600 sont utilisés comme composants des fluides de travail des métaux [92].

### **III.23. Méthodes de préparation des complexes PEGs/PAs :**

Le polyéthylène glycol est un polymère biocompatible. En raison de sa solubilité dans l'eau et sa faible toxicité, il est utilisé dans le piégeage des molécules hydrophobes.

Il existe plusieurs types de PEG de poids moléculaires distincts, qui fait que leurs températures de fusion sont différentes. Les PEGs de poids moléculaire entre 1500 et 20000, sont utilisés dans la dispersion solide : la dispersion d'un ou plusieurs principes actifs dans une matrice solide inerte [96].

#### **III.23.1. Les méthodes de préparation des dispersions solides**

- **Procédé de fusion :**

Cette méthode a été utilisée pour la première fois en 1961 par Sekiguchi et Obi. Son principe de base est le chauffage du mélange physique d'un ou plusieurs principes actifs et d'un vecteur hydrophile, à une température légèrement supérieure à leur point eutectique, jusqu'à ce qu'ils fondent. Ensuite la masse fondue est refroidie et solidifiée rapidement dans un bain de glace sous agitation.

- **Méthode d'évaporation de solvant :**

La méthode d'évaporation de solvant a été appliquée par Tachibana et Nakamura en 1965. Elle a été développée principalement pour les composants instables à la chaleur, Le principe de

cette méthode est de dissoudre dans un solvant volatil le PA et le vecteur. La dispersion solide est obtenue en évaporant le solvant sous agitation constante.

- **Atomisation (séchage par pulvérisation) :**

Le séchage par pulvérisation est l'une des plus anciennes méthodes de séchage des matériaux, en particulier des matériaux thermosensibles tels que les aliments et les produits pharmaceutiques. Dans cette méthode, le principe actif est dissous dans un solvant approprié, et le vecteur est dissous dans l'eau pour préparer la solution d'alimentation. Ensuite, les deux solutions sont mélangées jusqu'à ce que la solution soit claire. Dans cette procédure, les solutions d'alimentation sont d'abord pulvérisées dans une chambre de séchage par une buse à haute pression pour former de fines gouttelettes.

- **Lyophilisation :**

La lyophilisation est un procédé alternatif à la méthode d'évaporation du solvant dans lequel la substance active et le vecteur sont dissous dans un solvant, puis la solution est congelée dans l'azote liquide pour former une dispersion moléculaire lyophilisée. Cette méthode est généralement utilisée pour les produits thermolabiles qui sont instables dans les solutions aqueuses mais stables à l'état sec pendant des périodes de stockage prolongées.

- **La méthode de Co-précipitation :**

Dans cette méthode, le vecteur est d'abord dissous dans un solvant pour préparer une solution, et le principe actif est incorporé dans la solution sous agitation pour former un mélange homogène. Ensuite, de l'eau est ajoutée goutte à goutte au mélange homogène pour induire une précipitation. Enfin, le précipité est filtré et séché.

- **Méthode de pétrissage :**

Dans ce procédé, le vecteur est dispersé dans une petite quantité d'eau et transformé en pâte. Ensuite, la molécule active est ajoutée et soigneusement pétrie. La formulation finale est séchée et tamisée si nécessaire [97].

- **Procédé d'émulsification :**

Dans un premier temps, la dispersion du principe actif dans un solvant qui est dispersé dans une phase aqueuse contenant un agent tensioactif. Ensuite l'évaporation du solvant organique par rotavapeur pour obtenir à la fin le précipité solide et stable [96].

# **Etude de cas**

# **Introduction**

## **Introduction**

On rencontre fréquemment le problème d'insolubilité de plusieurs principes actifs hydrophobes. Pour améliorer la solubilité de ces derniers, plusieurs systèmes d'encapsulation ont été mis en place afin de bénéficier de leurs propriétés thérapeutiques. Dans la présente étude, nous avons sélectionné quelques systèmes étudiés auparavant.

La première étude traite la complexation de dérivé de la vitamine A (Propionate de vitamine A), par les cyclodextrines naturelles ( $\alpha$ CD,  $\beta$ CD et  $\gamma$ CD) et modifiée : Per-(2,6-O-diméthyle)-P-cyclodextrine (RAMEB).

La seconde, présente des études réalisées pour encapsuler une substance de faible solubilité dans l'eau (la phénytoïne), par différents système d'encapsulation (PEG 400 ;  $\beta$ -cyclodextrine et HP- $\beta$ -Cyclodextrine).

L'article qui suit, repose sur le mode d'encapsulation par les micelles mixtes composées de polyéthylène glycol, phosphatidyléthanolamine et de vitamine E pour co-charger deux principes actifs : la curcumine et le paclitaxel afin d'évaluer l'efficacité anticancéreuse de ces formulations micellaires.

Ensuite, nous avons traité l'étude de la synthèse des complexes d'inclusion de nitrones par la  $\beta$ -Cyclodextrine et leur activité antioxydante.

Après ça, on a abordé la complexation du cholestérol par le Méthyl- $\beta$ -Cyclodextrine et leur effet dans la conservation du sperme bovin.

Et pour finir, on s'est intéressé à la formulation de liposomes et ce en deux parties : primo la préparation de la vitamine C liposomale et deusio l'encapsulation de cholestérol dans des liposomes et utilisation des antioxydants (vitamine C et vitamine E).

## ETUDE DE LA COMPLEXATION DE DERIVES DE LA VITAMINE A DANS LES CYCLODEXTRINES NATURELLES ET MODIFIEES

### Objectifs major de l'étude

- ✓ Solubilisation et de stabilisation du rétinol, par les cyclodextrines naturelles ou modifiées.

**Tableau 14** : Résumé de l'article.

Système d'encapsulation	Cyclodextrines.
Mode d'encapsulation	Complexation.
Principe actif	Propionate de vitamine A (le rétinol)
Méthode d'encapsulation	Co-évaporation et lyophilisation.
Protocole	<p>à une solution 10 mM de CD (pour 1' <math>\alpha</math>CD, la <math>\beta</math>CD et la <math>\gamma</math>CD) on ajoute 200 <math>\mu</math>L d'une solution acétonique de propionate de vitamine A 1M (concentration finale 20 mM). Pour la RAMEB les essais sont effectués avec une solution 50 mM en CD et 20 mM en propionate de vitamine A.</p> <p>On laisse sous hotte ventilée (pour évaporer l'acétone) et sous agitation pendant 24h. Ensuite on centrifuge 6 minutes à 6000 tours/minute les solutions obtenues. Les phases aqueuses sont filtrées sur Millex-SG 0,22 <math>\mu</math>m, congelées et lyophilisées en vue d'une étude par RMN après redissolution de 10 mg de filtrat dans 0,4 mL de D<sub>2</sub>O. Les précipités, si y en a, sont lavés par centrifugation par 2x3 mL d'eau pour éliminer les CD libres et 2x3 mL d'éther pour éliminer le propionate de vitamine A libre, puis séchés sous un courant d'azote, congelés et lyophilisés en vue d'une étude par RMN après redissolution de 10mg de précipité dans 0,4 mL de d<sub>6</sub>-DMSO.</p>
Résultats majeurs	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <math>\alpha</math>CD : solution trouble et homogène avec une couche supérieure huileuse jaune (propionate de vitamine A).</li> <li>▪ (<math>\beta</math>CD et <math>\gamma</math>CD) : on obtient un précipité blanc et une suspension blanche surmontés par une couche huileuse jaune.</li> </ul>
Référence	[98]

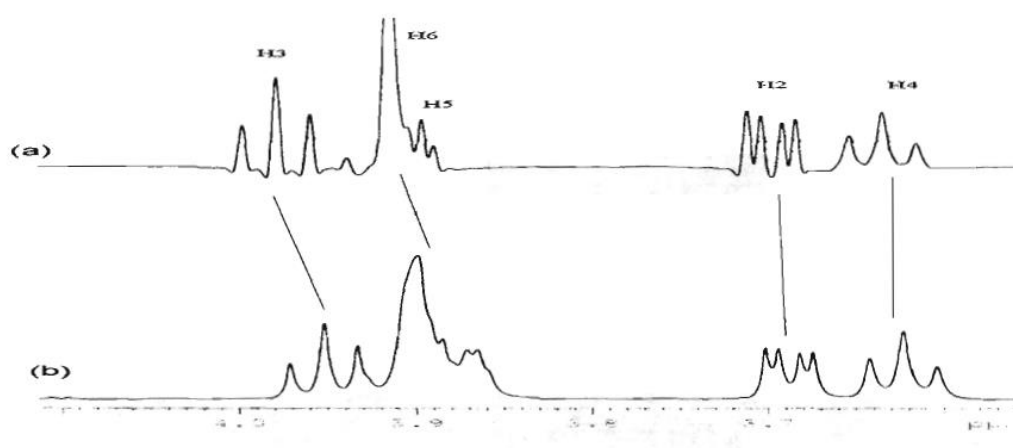


## Discussion des Résultats

### $\alpha$ CD, $\beta$ CD et $\gamma$ CD

Pour la détermination de la réalité de l'inclusion l'étude par  $^1\text{H}$ -RMN sur les précipités obtenus mets en évidence la présence de la CD ( $\beta$ CD ou  $\gamma$ CD) et du propionate de vitamine A. Ceci dit la propionate de vitamine A se trouve à l'état complexé car le PVA libre est éliminé par lavage à l'éther.

De plus, la mise en évidence des variations de déplacement chimiques des protons internes de la CD (H3 et H5) par rapport à un spectre de référence de la molécule de CD seule (effectué dans les mêmes conditions opératoires) dans le cas des complexes  $\beta$ CD/PVA et  $\gamma$ CD/PVA apporte une preuve sur la réalité de l'inclusion (figure 15).



**Figure 15** : spectres H-RMN partiels de la  $\gamma$ -CD seule (a) et en présence de PVA (b) dans D2O.

Quant à l' $\alpha$ -CD elle ne donne aucun complexe avec le PVA ce qui s'explique par son faible diamètre intérieur.

L'expérimentation a démontré une stœchiométrie de 2 :1 pour le complexe  $\beta$ -CD/PVA et 1 :1 pour la  $\gamma$ -CD/PVA. Ces résultats sont cohérents avec la différence de taille entre la  $\beta$ -CD et la  $\gamma$ -CD. Or, la  $\gamma$ -CD ayant une plus grande cavité permet d'inclure la majeure partie du propionate de vitamine A, tandis que la cavité de la  $\beta$ -CD, étant nettement plus petite, laisse libre une grande partie de la PVA ce qui lui permet de s'inclure dans une deuxième molécule de  $\beta$ -CD.

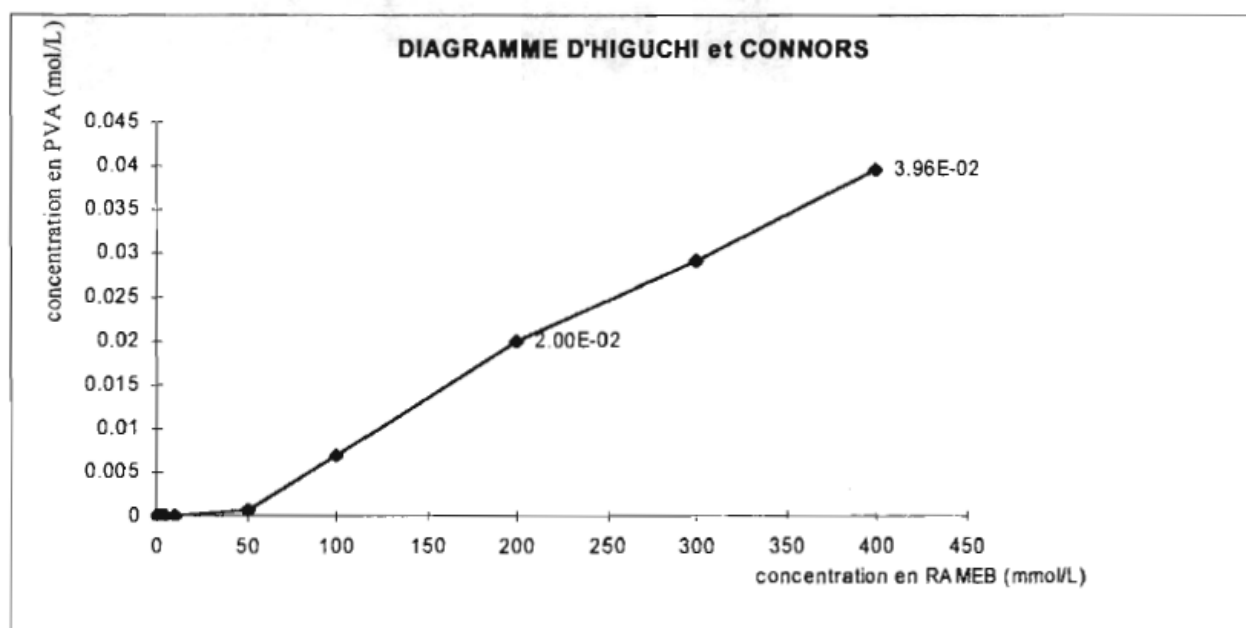
Une étude comparative entre des lots de PVA pure et des lots de PVA inclus dans les  $\beta$ -CD et les  $\gamma$ -CD pour déterminer l'influence de la lumière, de la température et de l'oxygène sur la stabilité du propionate de vitamine A. les résultats démontrent une forte dégradation en ce qui

concerne le complexe  $\beta$ -CD/PVA au bout de 6 mois, et l'efficacité de la protection de la molécule invitée sous forme de complexe solide et ce pendant 6 mois pour les PVA inclus dans la  $\gamma$ -CD . Néanmoins, Les spectres RMN montrent que seul l'ester terminal se dégrade, ce qui laisse entendre que cette partie du PVA reste en dehors de la cavité de la  $\gamma$ -CD et n'est pas protégée ou subit une hydrolyse.

**per-(2,6-0-diméthyle)-Pcyclodextrine (RAMEB).**

L'étude H-RMN de la phase aqueuse démontre que les protons H<sub>3</sub> et H<sub>5</sub> de la CD subissent une variation de déplacement chimique significative du phénomène d'inclusion, le propionate de vitamine A forme donc un complexe soluble dans l'eau avec la RAMEB avec une protection l'ensemble du propionate de vitamine A.

Le diagramme de solubilité de phase d'Higuchi et Connors (figure 16) montre une stœchiométrie de 1 :1.



**Figure 16 :** Diagramme de solubilité de phase obtenu pour le complexe RAMEB/PVA à 298K et pH 7. (Chaque point correspond à la moyenne des valeurs obtenues sur trois lots de même concentration).

## Cyclodextrin as a suitable solubilizing agent for in situ absorption study of poorly water-soluble drugs.

(Les cyclodextrines comme agent solubilisant approprié pour l'étude d'absorption in situ de médicaments peu solubles dans l'eau).

### Objectifs major de l'étude

- ✓ Etude de l'encapsulation de différents principes actifs par 7 agents solubilisant différents dont les Cyclodextrines et les HP- $\beta$ -CD.
- ✓ Rechercher un agent solubilisant approprié pour l'étude d'absorption in situ de composés peu solubles dans l'eau.

**Tableau 15** : Résumé de l'article.

Système d'encapsulation	Cyclodextrines
Mode d'encapsulation	Complexation par dispersion et sonification.
Principe actif	La phénytoïne
Méthode de préparation	La dispersion suivie d'une sonification et d'une centrifugation.
Protocole	<p>La phénytoïne a été dispersée dans le PBS de D, (la solution saline tamponnée au phosphate (PBS) de Dulbecco (pH7.4)), contenant ces excipients solubilisant à des concentrations de 1, 2 et 5 % (v/v ou w/v), sauf le HP-b-CD. Les concentrations finales de phénytoïne devaient être de 1, 2 et 5 mM. La dispersion de phénytoïne a été sonifiée pendant 30 min et laissée reposer pendant 30 min à température ambiante, suivie d'une centrifugation à 27 000 x g pendant 30 min à 25 ° C. Le liquide surnageant a été pris pour déterminer la concentration de phénytoïne dissoute dans un milieu d'essai.</p> <p>Solution témoins : solution de phénytoïne dissoute à 1, 2 et 5 mM dans du méthanol</p>
Références	[99]

Résultats majeurs			
Milieu d'essai	Concentration des agents solubilisant		
	1%	2%	5%
D PBS seul	16.8 ± 0.4	14.9 ± 0.4 19.5 ± 0.4	14.9 ± 0.4 19.5 ± 0.4
+ PEG 400	17.6 ± 0.2	18.3 ± 0.2	16.8 ± 1.1
+β-CD	100.2 ± 0.4	100.9 ± 0.4	100.9 ± 0.4
+ HP-β-CD	93.3 ± 1.1	100.4 ± 0.0	–

Le tableau 15 montre la dissolution de la phénytoïne dans le PBS de D contenant chacun des agents solubilisant à des concentrations de 1, 2 ou 5 % (v/v ou w/v).

Chaque valeur représente le pourcentage dissous dans le milieu d'essai (la moyenne de 3 essais).

### **Discussion des Résultats**

La concentration finale de phénytoïne a été ciblée à 1 mM lorsqu'elle s'est complètement dissoute dans un milieu d'essai. À des concentrations de 1 et 2 %, les capacités de solubilisation du PEG 400 étaient faibles et presque comparables à celles du PBS de D seul. Même à une concentration de 5 %, ils n'ont dissous que 20 à 30 % de la phénytoïne, bien qu'ils aient présenté des capacités de solubilisation légèrement supérieures à celles du PBS de D seul.

D'autre part, les β-CD et HP-β-CD ont exercé des capacités de solubilisation relativement élevées. Ils ont dissous complètement la phénytoïne à des concentrations de 2 et 5 %. L'observation à l'œil nu a indiqué que la phénytoïne était complètement dissoute dans 1 % des milieux HP-β-CD. Toutefois, après une centrifugation à grande vitesse, il a été démontré que la concentration de phénytoïne dans le surnageant était d'environ 80 et 95 % de celle du témoin, respectivement. Ces résultats laissaient entendre que l'observation à l'œil nu ne vérifiait pas toujours la dissolution complète d'un composé dans un milieu.

La solubilisation des β-CD seuls dans les PBS de D à 5% est faible donc il ne s'est pas solubilisé complètement. Toutefois, la dispersion de 5 % de β-CD a maintenu une capacité de solubilisation relativement élevée et a complètement dissous la phénytoïne, indépendamment des concentrations de phénytoïne.

Cette étude appuie la théorie de Tsuruoka et al. (1981) qui démontre que le β-CD augmentait considérablement la biodisponibilité orale de la phénytoïne en augmentant sa solubilité. Pour finir, cette étude démontre que le β-CD est un agent de solubilisation très puissant face aux

composé les moins solubles dans l'eau comme la phénytoïne et ceci à de très faibles concentration (1% soit environ 8.8mM).Même si la HP- $\beta$ -CD peut être une très bonne alternative à la  $\beta$ -CD mais elle exige une plus grande concentration.

**Polyethylene glycol-phosphatidylethanolamine (PEG-PE)/vitamin****E micelles for co-delivery of paclitaxel and curcumin to overcome****Multi-drug resistance in ovarian cancer**

(Micelles de polyéthylène glycol-phosphatidylethanolamine (PEG-PE)/vitamine E pour l'administration conjointe de paclitaxel et de curcumine pour surmonter la résistance aux médicaments multiples dans le cancer de l'ovaire).

**Objectifs major de l'étude**

- ✓ Co-charger la curcumine et le paclitaxel dans les micelles mixtes de PEG-PE / vitamine E et d'évaluer l'efficacité anticancéreuse de ces formulations micellaires in vitro ainsi qu'in vivo contre SK-OV-3 et SK -OV-3TR cellules d'adénocarcinome ovarien humain.
- ✓ L'administration simultanée des deux composés dans un système d'administration de médicament micellaire, tout en minimisant le nombre d'événements d'administration de médicament, peut avoir le potentiel d'être un traitement efficace pour les cancers résistants.

**Tableau 16** : Résumé de l'article.

Système d'encapsulation	PEG2000-DSPE
	PEG-PE / vitamine E
Mode d'encapsulation	Micelles mixtes
Principe actif	Curcumine (CUR)
	Paclitaxel (PCL)
Méthode de préparation	Formulation des micelles mixtes chargées en PCL et/ou CUR dans les complexes PEG-PE/Vitamine E par la méthode d'hydratation en couche mince.
Protocole	Des micelles mixtes chargées en PCL et / ou CUR ont été préparées par le procédé d'hydratation en couche mince. Divers % en poids de PCL (1 mg / ml dans une solution méthanolique d'acide acétique à 0,1%) et / ou de CUR (2 mg / ml dans une solution

	<p>méthanolique d'acide acétique à 0,1%) ont été ajoutés à PEG2000-DSPE et de vitamine E (89:11 molaire ratio) solution dans le chloroforme. Une concentration de 5 mM de matériau formant des micelles a été utilisée dans toutes les expériences. Les solvants organiques ont été éliminés par évaporation rotative pour former un film mince de mélange médicament / matériau formant des micelles. Ce film a été davantage séché sous vide poussé (<math>2 \times 10^{-3}</math> mbar) pendant au moins 12 h, pour éliminer tout solvant organique restant. Des micelles mixtes chargées de médicament ont été formées en remettant le film en suspension dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) pH 7,4. Le mélange a été incubé dans un bain-marie à 40 ° C pendant 10 minutes et ensuite vortexé pendant au moins 5 minutes pour assurer une remise en suspension correcte du film. Les médicaments non incorporés en excès ont été séparés par centrifugation (13,500 g) pendant 5 min, puis filtration à travers un filtre seringue de 0,2 µm pour éliminer tout médicament non incorporé qui est encore présent dans la solution et pour stériliser la solution avant utilisation in vitro ou in vivo.</p>
<p>Résultats majeurs</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ une encapsulation plus élevée peut être obtenue pour les deux médicaments individuellement. Cependant, la stabilité des micelles à des concentrations plus élevées est relativement compromise.</li> <li>▪ Une efficacité de chargement, d'environ 90% avec les quantités optimisées de médicament.</li> <li>▪ D'après le profil de libération in vitro, observation d'un modèle de libération lente du médicament piégé à partir des micelles. Une libération rapide d'environ 10% s'est produite dans les 4 premières heures et seulement 10% de plus après 48 heures.</li> </ul>
<p>Références</p>	<p>[100]</p>

### **Discussion des résultats**

L'efficacité et stabilité d'encapsulation élevées est attribuée à l'hydrophobicité des médicaments et à l'efficacité de ces micelles dans la solubilisation de ces médicaments lipophiles.

Cette libération lente confirme la stabilité des micelles chargées de médicament. De plus, le profil de libération des micelles co-chargées par rapport aux micelles contenant un seul médicament n'était pas différent.



## Préparation des complexes d'insertions Nitrone / $\beta$ -Cyclodextrine et leurs activités antioxydantes.

### Objectifs major de l'étude

- ✓ La synthèse des complexes d'inclusion, à partir des interactions entre les cyclodextrine et une série de nitrones.
- ✓ L'amélioration de l'activité antioxydante des nitrones par la complexation de ces derniers dans les cyclodextrine.

**Tableau 17** : Résumé de l'article.

Système d'encapsulation	$\beta$ -Cyclodextrine
Mode d'encapsulation	Complexation par dispersion
Principe actif	Nitrone
Méthode de préparation	La complexation de différents nitrones avec la $\beta$ -Cyclodextrine dans l'eau distillée sous agitation. Les complexes obtenus sont séchés et conservés à basse température afin de les analyser
Protocole	<p>Introduire un mélange équimolaire de nitrones, <math>\beta</math>-Cyclodextrine <math>n=12,5.10^{-3}</math> mol avec de l'eau distillé sous agitation pendant 36 à 48h.</p> <p>Le complexe est obtenu par agitation après un certain temps, puis la filtration, le lavage du mélange avec l'eau distillée et l'éther froid pour éliminer les molécules non complexée.</p> <p>Le solide récupéré est séché à 65°C pendant 6 à 12h et conservé entre 0 à 4°C. les masses expérimentales et théoriques sont regroupées dans le tableau (02).</p> <p>La complexation de C-aryl, N-phénylnitronne/ <math>\beta</math>-CD a été effectuée en utilisant la méthode standard, le complexe 1/2 a été obtenu par agitation pendant 36 à 48h à 25 °C d'une quantité équimolaire de nitrone avec une solution de <math>\beta</math>-CD dans l'eau distillée. Lors de la formation du complexe, la nitrone flottait au début de la réaction sur la surface de l'eau, puis disparaît dans la solution qui devient claire. Ce dernier a été séparé par filtration, les rendements obtenus de chaque complexe NIT/ <math>\beta</math>-CD sont</p>

	résumé dans le tableau (18)
Résultats majeurs	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Les complexes d'inclusion nitrone/<math>\beta</math>-CD obtenus ont des faibles rendements.</li> <li>▪ L'évaluation de l'activité antioxydante des nitrones et leurs complexes réalisés par les deux techniques (méthode de <math>\beta</math>-carotène et la méthode du piégeage du radical libre), ont montré que l'activité antioxydante des nitrones est améliorée par l'amélioration de leur solubilité.</li> <li>▪ L'activité des nitrones est inférieure à celle de BHA (21,38%) (antioxydant phénolique de référence), sauf dans le cas de la nitrone hydroxylée qui présente une meilleure activité (24,86%)</li> <li>▪ les résultats du test par la méthode de <math>\beta</math>-carotène, montre que les complexes présente une meilleur activité par rapport aux nitrones.</li> <li>▪ La méthode FRAP, a montré que l'activité antioxydante des nitrones ne dépend pas uniquement du phénomène de solubilité.</li> </ul>
Références	[101]

**Tableau 18** : Quantités des réactifs utilisés et des complexes obtenues.

Les produits	p-NO <sub>2</sub>	p-Cl	p-OCH <sub>3</sub>	p-OH	p-H
Masse molaires des nitrones (g/mol)	242	231.5	227	213	197
Masse utilisées des nitrones	0.060	0.057	0.050	0.053	0.056
Masse utilisée de $\beta$ -CD	0.142	0.142	0.142	0.142	0.142
Masses expérimentales obtenues (mg)	0.0091	0.0218	0.0150	0.0121	0.0035
Masse théorique (mg)	0.062	0.057	0.050	0.056	0.053

**Tableau 19** : Récapitulatif des rendements obtenus de chaque complexe NIT/  $\beta$ -CD.

Complexe 1 : 2	NO <sub>2</sub>	CL	H	OH	OCH <sub>3</sub>
Rdt (%)	11,67	38,24	30	6,6	21,6

### Discussion des résultats

Dans la synthèse du complexe C-aryl, N-phénylnitronne/  $\beta$ -CD, le faible rendement des complexes, est due au fait que ces derniers sont régis par des interactions inter moléculaire de type Van Der Waals et liaison d'hydrogène et l'absence des liaisons covalentes.

A partir de la méthode du piégeage du radical libre DPPH, l'activité de nitronne hydroxylé est meilleure (24,86%), cela est attribué à son double action de piégeur. La première action est due à la présence de la fonction nitronne qui réagit avec le radical libre. La deuxième action est due à la présence de la fonction phénol, connu par leurs fortes activités à piéger les radicaux libres.

La méthode  $\beta$ -carotène confirme la méthode du piégeage du radical libre DPPH, cela confirme que les complexes obtenus sont de bons donneurs de protons et que l'insertion dans la cavité du cyclodextrine améliore leur solubilité dans l'émulsion aqueuse.

Lors du test FRAP, les résultats montre que l'activité des nitrones ne dépend pas uniquement de leur solubilité, car par exemple le complexe 1/1 des nitrones nitrés et chlorés présente une meilleure activité que celle des nitrones et des complexe 1/2 correspondants.

## Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm.

(Effet de la cyclodextrine chargée de cholestérol sur la cryosurvie du sperme de taureau.)

### Objectifs major de l'étude

- ✓ Déterminer si le traitement du sperme de taureau avec des cyclodextrines chargées en cholestérol (CLC) pouvait augmenter les pourcentages de cellules mobiles et viables après congélation et également pour développer un protocole de congélation optimal pour le sperme de taureau traité avec CLC.

**Tableau 20** : Résumé de l'article.

Systeme d'encapsulation	Méthyl- $\beta$ -cyclodextrine
Mode d'encapsulation	complexation par dispersion
Principe actif	Cholestérol
Méthode de préparation	Dans un premier temps, le mélange physique du cholestérol avec le chloroforme, puis avec la solution contenant le méthyl- $\beta$ -cyclodextrine et méthanol. Une solution de CLC dans le TALP a été préparée pour le travail.
Protocole	200 mg du cholestérol ont été dissous dans 1 ml de chloroforme. 1 g de méthyl- $\beta$ -cyclodextrine a été dissous dans 2 ml de méthanol. 0,45 ml de la solution de cholestérol a été ajoutée à la solution de cyclodextrine, agitée jusqu'à ce que la solution combinée soit claire. La solution est placée dans une boîte de Pétri ou le solvant a été éliminé à l'aide d'un courant d'azote gazeux. Séchage naturel des cristaux résultants pendant 24 h à 22 °C. Une solution de travail a été préparée en ajoutant 50 mg de CLC à 1 ml de TALP à 37 ° C et en mélangeant brièvement la solution à l'aide d'un mélangeur vortex.
Résultats majeurs	▪ Les spermatozoïdes congelés dans du jaune d'œuf, Tris contenant 1,5 mg de CLC présentaient des pourcentages plus élevés de spermatozoïdes mobiles (60%) que les spermatozoïdes congelés dans

	<p>du jaune d'œuf Tris seul (42%).</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ pour la viabilité des spermatozoïdes, dans laquelle les échantillons témoins incubés à 22 ° C présentait des pourcentages plus élevés de cellules viables (38±6) que les échantillons à 37 ° C (18±4).</li> </ul>
Références	[102]

### **Discussion des résultats**

Lorsque des niveaux suffisants de cholestérol étaient ajoutés aux liposomes composés de lécithine et de cholestérol, les membranes liposomales ne subissaient pas de transition de phase lorsqu'elles étaient exposées à de basses températures

Bien qu'il soit important d'ajouter les CLC aux spermatozoïdes dans un milieu sans lipides, la température à laquelle les CLC et les spermatozoïdes co-incubent semble être moins importante, car un bénéfice similaire a été observé indépendamment du fait que la température de co-incubation soit de 22 ou 37 °C.

De plus, un bénéfice similaire a été observé pour les spermatozoïdes incubés pendant aussi peu que 15 min, comme pour les spermatozoïdes incubés avec des CLC pendant 60 min. Cela indique que le transfert du cholestérol de la cyclodextrine au spermatozoïde est rapide et qu'un transfert adéquat se produit en 15 minutes à 22 ° C.

Cependant, une co-incubation plus longue des CLC avec le sperme, ou l'incubation des CLC avec du sperme à des températures plus élevées, n'est pas préjudiciable. Cela pourrait être important dans le développement de nouvelles procédures de cryoconservation utilisant la technologie CLC, car les CLC peuvent être ajoutés aux éjaculats immédiatement après le prélèvement avant qu'ils n'atteignent la température ambiante, sans nuire aux cellules.

## New oral liposomal vitamin C formulation: properties and bioavailability.

(Nouvelle formulation orale de vitamine C liposomale : propriétés et biodisponibilité).

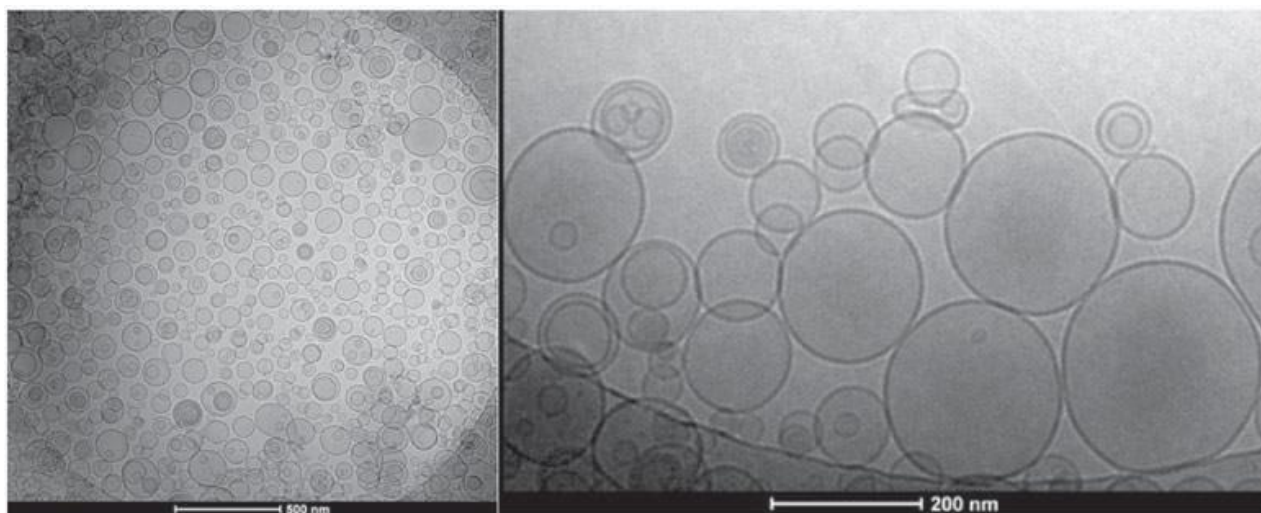
### Objectifs major de l'étude

- ✓ La formulation liposomale d'une population uniforme de vésicules lipidiques sans application d'un quelconque solvant organique indésirable, avec une stabilité à long terme.

**Tableau 21** : Résumé de l'article.

Système d'encapsulation	Les liposomes
Mode d'encapsulation	Complexation par dispersion
Principe actif	La vitamine C
Méthode de préparation	La formulation des liposomes à partir du mélange physique de deux solvants : une solution de lipides et de glycérine et une solution aqueuse de l'ascorbate de sodium.
Protocole	La formulation liposomale de vitamine C a été préparée en utilisant la glycérine pharmacologiquement acceptée, comme solvant pour les lipides. L'autre caractéristique unique de la formulation est une teneur élevée en lipides, c'est-à-dire plus de 20% p / p. La teneur élevée en lipides se traduit par une efficacité d'encapsulation élevée. Les liposomes ont été formulés en mélangeant deux solvants : des lipides contenant de la glycérine (1: 1 p / p) et la solution aqueuse contenant de l'ascorbate de sodium, avec une concentration d'API égale à 20% p / p. La population uniforme de liposomes s'est formée spontanément lors du mélange. La teneur élevée en lipides (plus de 20%) dans le mélange résulte en une phase aqueuse structurée, caractérisée par une viscosité élevée et une consistance gélatineuse. Pour les études de contrôle, la solution aqueuse d'ascorbate de sodium a été échangée contre de l'eau pure. Les liposomes pour la validation de

	<p>la méthode HPLC ont été préparés par hydratation avec du formiate d'ammonium 20 mM, pH 3,2 et 33,3% (p / p) d'ascorbate de sodium. Après chaque préparation de suspension de liposomes, la taille et la polydispersité ont été mesurées pour confirmer la création d'une population de liposomes monodispersés.</p> <p>L'efficacité d'encapsulation (%EE) de la vitamine C dans les liposomes a été déterminée par ultrafiltration à travers des membranes avec une masse de coupure de 50 kDa (SpectrumLabs, Rancho Dominguez, CA), suivie d'une détermination par HPLC UV-VIS de la teneur en vitamine C dans le perméat. La stabilité des liposomes pendant l'ultrafiltration a été contrôlée à l'aide de mesures DLS. Le pourcentage de l'efficacité d'encapsulation de la vitamine C a été calculé selon la formule :</p> $EE_{vitC} = (1 - m_{libre} / m_{total}) \times 100$ <p>ou <math>m_{libre}</math> est la masse de vitamine C dans le perméat et <math>m_{total}</math> est la masse totale de vitamine C dans l'échantillon.</p>
<p>Résultats majeurs</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ La stabilité de la vitamine C liposomale a été déterminée pour six séries d'échantillons et un résumé des données analytiques est présenté dans le tableau (22)</li> <li>▪ La méthode présentée de préparation des liposomes contenant de la vitamine C produit une seule population de vésicules comme la montre la figure (17).</li> <li>▪ après l'absorption orale de 10 g d'ascorbate de sodium sous forme de solution aqueuse ou de formulation de liposomes, les résultats montre que le traitement avec la vitamine c liposomale atteint des valeurs plus élevées (<math>C_{max} = 303 \mu\mu</math>) que dans le traitement avec la solution aqueuse de vitamine C (<math>C_{max} = 180 \mu\mu</math>).</li> <li>▪ En outre, pour la formulation liposomale, le temps de retard de la concentration maximale de vitamine C dans le sang (<math>T_{max}</math>) est plus long d'environ 1 h par rapport à la forme libre (<math>T_{max} = 180</math> min vs. 96 min). La demi-vie accrue (<math>t_{1/2} &gt; 6</math> h vs. <math>t_{1/2} = 4</math> h) et l'AUC élevée (<math>81\ 570 \mu\mu \cdot \text{min}</math> vs. <math>45\ 330 \mu\mu \cdot \text{min}</math>).</li> </ul>
<p>Références</p>	<p>[103];[104];[105];[106]</p>



**Figure 17** : Exemples de distributions de taille de liposomes chargés d'ascorbate de sodium, mesurées par la technique de diffusion dynamique de la lumière (DLS) et déterminées à partir d'images acquises par microscopie cryo-TEM

**Tableau 22** : Résultats d'une étude de stabilité de 6 mois sur la vitamine C liposomale.

Mois	Teneur en ascorbate de sodium		Teneur en phospholipide		L'efficacité d'encapsulation (EE)		Diamètre hydrodynamique		Polydispersité		Potentiel Zeta	
	Moyenne	S.D	Moyenne	S.D	Moyenne	S.D	Moyenne	S.D	Moyenne	S.D	Moyenne	S.D
	[mg/g]		[mg/g]		[%]		[nm]		[-]		[mV]	
0	203	2	131	12	51	2	170	20	0.16	0.03	- 47	8
1	203	3	130	17	50	4	167	27	0.15	0.04	- 48	7
2	202	3	131	18	50	5	171	24	0.16	0.05	- 46	8
3	202	3	130	12	50	5	174	18	0.14	0.02	- 45	8
4	201	3	130	17	50	4	168	20	0.17	0.03	- 48	6
5	201	3	131	20	50	6	173	26	0.18	0.02	- 47	8
6	201	2	130	22	50	4	168	25	0.17	0.03	- 47	7



## **Discussion des résultats**

Les résultats de l'étude de la biodisponibilité montrent une amélioration de la biodisponibilité de la vitamine C, cela est dû à la présence de liposomes.

La dégradation de la vitamine C peut être considérablement réduite par son association avec les interfaces lipidiques, qui sont abondantes dans la formulation liposomale. [104]

L'efficacité de la formulation liposomale dépend, en plus de la teneur en vitamine C, de la qualité des liposomes quantifiés par leur distribution de taille. [105] ; [106]

La méthode présentée de préparation des liposomes contenant de la vitamine C produit une seule population de vésicules, comme démontré par les techniques de la diffusion dynamique de la lumière (DLS) et de microscopie électronique.

Lors de l'évaluation de l'efficacité de la formulation, il a été démontré que les vésicules lipidiques n'interfèrent pas avec l'accessibilité de la vitamine C aux cellules, quel que soit leur type. Cela implique que, si une certaine concentration d'acide ascorbique dans le tube digestif est maintenu pendant une période de temps suffisante, le niveau d'absorption élevé sera atteint et maintenu.

La possibilité de délivrer de fortes doses de vitamine C pendant une période prolongée, puisque la capsule lipidique atténue l'irritation du tractus gastro-intestinal qui accompagne généralement de fortes doses orales d'ascorbate.

## Novel liposome-based and in situ gelling artificial tear formulation for dry eye disease treatment

(Nouvelle formulation artificielle à base de liposome et gélifiant in situ pour le traitement des maladies oculaires sèches)

### Objectifs major de l'étude

- ✓ concevoir et de caractériser une nouvelle formulation artificielle de larme gélifiante in situ contenant à la fois des composants lipidiques et aqueux.

**Tableau 23** : Résumé de l'article.

Système d'encapsulation	Liposomes
Mode d'encapsulation	Hydratation à couche mince
Principe actif	Cholestérol. Vitamine E. Vitamine A.
Méthode de préparation	Hydratation à couche mince suivie d'une sonification et une extrusion.
Protocole	400 mg de phosphatidylcholine (PC), 50 mg de cholestérol (chol), 4 mg de vitamine E (vit E) et 400 ng de vitamine A (vit A) ont été dissous dans 25 mL de chloroforme. Le solvant a été évaporé dans un évaporateur rotatif. Le film lipidique sec obtenu a été hydraté avec 10 mL d'un milieu aqueux composé de 1,68 % de tréhalose, 0,84 % d'acide borique (H3BO3) et 0,08 % de tétraborate de sodium anhydre (Na2B4O7). Pour obtenir une population homogène de vésicules lipidiques, la suspension liposomale a été sonifiée et extrudé, forcée à travers les filtres en polycarbonate avec des pores de 0,2 µm.  La suspension liposomale a été diluée avec des solutions de gomme gellan, d'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC), de lévocarnitine (L-carnitine), de chlorure de sodium (NaCl) et de chlorure de potassium (KCl) pour obtenir la formulation définitive de la déchirure artificielle. La préparation a été

	effectuée dans des conditions aseptiques. Le milieu aqueux, les polymères et les solutions électrolytiques ont été stérilisés à la vapeur, tandis que la solution de L-carnitine a été stérilisée par filtration.
Résultats majeurs	<p>Une nouvelle formulation à base de liposomes et de gelling in situ a été développée.</p> <p>Les propriétés physicochimiques, la tolérance in vitro et in vivo ont été évaluées.</p> <p>La formulation a montré des propriétés appropriées pour l'administration ophtalmique topique.</p> <p>Une bonne tolérance in vitro et in vivo a été observée.</p> <p>La nouvelle déchirure artificielle peut être bénéfique dans le traitement de la maladie de l'œil sec.</p>
Référence	[107]

**Tableau 24 :** Composition des larmes artificielles.

Composant de la formulation	Concentration (% poids/volume)
PC (liposomes)	0.5
Gellan gum	0.25
HPMC	0.12
L-carnitine	0.1
Vit E	0.005
Vit A	0.0005
NaCl	0.05
KCl	0.05
Trehalose	1.68
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.84
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	0.08

## **Discussion des Résultats**

### **Caractérisation de la formulation de la déchirure artificielle**

Les résultats obtenus dans la caractérisation des propriétés physicochimiques de la déchirure artificielle sont présentés au tableau 9. Les données ont été exprimées sous forme d'écart-type moyen (ET).

**Tableau 25** : Propriétés physicochimiques de la formulation artificielle de la déchirure.

Propriété	Plus au moins
Taille des liposomes (nm)	200.1 ±4.4
pH	7.6 ±0.1
Tension superficielle (mN/m)	53.4 ± 1.1
Viscosité <sup>a</sup>	4.0 ± 0.1

<sup>a</sup> Dans l'intervalle de la vitesse de cisaillement de 200-1000 s<sup>-1</sup>.

Les nanoparticules liposomales de la formulation ont montré une distribution de taille unimodale.

### **Études de tolérance in vitro**

Viabilité cellulaire des cellules de carcinome épithélial humain (HeLa) et des cellules de macrophages murins (J774) après une exposition de 2 heures à la formulation artificielle de la déchirure. Les cellules non traitées ont été utilisées comme témoins négatifs (viabilité cellulaire à 100 %), les cellules traitées avec une solution de chlorure de benzalkonium à 0,005 % (BAK) comme témoins positifs (mort cellulaire) et les cellules traitées avec une solution de NaCl à 0,9 % comme référence. La viabilité des cellules a été mesurée par MTT et a donné plus de 90 % dans les deux lignées cellulaires.

### **Études de tolérance in vivo**

Avant l'expérience, les six animaux avaient une surface oculaire normale et ne présentaient aucun signe clinique ni inconfort. Au cours de l'expérience, les animaux n'ont montré ni inconfort ni signes cliniques (grade 0) dans les 24 heures suivant la première instillation de la déchirure artificielle.

Le DED est associé aux altérations et à l'instabilité du film lacrymal ; par conséquent, la restauration du film lacrymal est fondamentale dans sa gestion. Cette étude visait à développer une nouvelle formulation artificielle de larme qui ressemble à des déchirures naturelles et reconstitue le film lacrymal. Des liposomes, composés de PC et de Chol, ont été employés pour reconstituer les lipides du film lacrymal. Les antioxydants vit A et vit E et les

osmoprotectants L-carnitine et tréhalose ont été incorporés pour améliorer l'efficacité potentielle de la déchirure artificielle dans le traitement du syndrome de l'œil sec (DED).

Quant à la formulation d'une déchirure artificielle, les principaux paramètres physicochimiques tels que le pH, la tension superficielle et la viscosité suggèrent une bonne diffusion de la formulation sur la surface oculaire sans provoquer d'instabilité du film lacrymal, de vision floue ou d'inconfort. En outre, les nanoparticules liposomales de la déchirure artificielle avaient une taille appropriée pour une formulation ophtalmique topique. La déchirure artificielle a démontré l'absence de toxicité dans les lignées cellulaires HeLa et J774. La formulation n'a pas causé d'inconfort ni de signes cliniques chez les lapins, ce qui indique une bonne tolérance in vivo.

## **Comparaison**

Dans la première étude les CD naturelles connues auparavant pour leurs propriétés à former des complexes et à solubiliser les molécules hôtes insoluble initialement dans l'eau, ont été confrontés aux CD modifiées présentant des caractéristiques plus intéressantes telle que une plus grande cavité et des potentiels de dégradations plus faibles que les CD naturelles.

D'autre part, la deuxième étude a éclairé le fait que les CD pouvaient solubiliser même des molécules quasi insolubles dans l'eau sans pour autant avoir le moindre impact sur leur absorption in situ et ce à de très faibles concentration.

Les micelles mixtes, composées de PEG-PE/vitamine E ont une capacité efficace dans la solubilisation de la curcumine et de co-charger le paclitaxel dans une même formulation. Cette combinaison a inversé le développement de la résistance multi-médicaments.

L'utilisation de la  $\beta$ -cyclodextrine dans la complexation des nitrones a amélioré leur solubilité et par conséquence l'activité antioxydante d'une série de nitrones aromatique.

L'application des cyclodextrines de type Méthyl- $\beta$ -cyclodextrine chargés de cholestérol, dans le traitement de la semence bovine a résolu le problème de congélation des spermatozoïdes.

L'encapsulation de la substance hydrophile (vitamine C) par les liposomes a montré une augmentation de sa biodisponibilité et son efficacité dans la délivrance de fortes doses de vitamine C pendant une période prolongée, cela ne provoque pas d'irritations du tractus gastro-intestinal à cause de la présence de la capsule lipidique.

L'utilisation de liposomes pour synthétiser des larmes artificielles dans le but de soigner le syndrome de l'œil sec a prouvé son efficacité et son innocuité de par sa très forte analogie à la composition des larmes naturelles

# **Conclusion**

## Conclusion

Les études abordées dans cette partie traitent les différents modes d'encapsulation et de solubilisation des principes actifs hydrophobes. Elles sont portés sur la diversité des molécules solubilisâtes, Cyclodextrines et PEG, et sur une multitude de molécules hydrophobes, la vitamine E, la vitamine A, le cholestérol, la nitroène, et la phénytoïne.

En effet, Le propionate de vitamine A (PVA) forme un complexe d'inclusion stable avec la  $\beta$ -Cyclodextrine, la  $\gamma$ -Cyclodextrine et le Per (2,6-O-diméthyle)- $\beta$ -Cyclodextrine (RAMEB). Le complexe  $\beta$ -cyclodextrine/ Propionate de vitamine A ( $\beta$ CD/PVA) induit une dégradation de la molécule hôte au bout de quelques mois. Le complexe  $\gamma$ CD/PVA est très stable et permet une protection efficace sous forme de complexe solide insoluble dans l'eau. Enfin, le complexe RAMEB/PVA de stœchiométrie 1:1 est soluble dans l'eau. D'après ses divers travaux, les CD naturelles qu'elles soient ou modifiées ont prouvées leur capacités à former des complexes d'inclusion avec les molécules les moins soluble. La diversité d'application des CD que ça soit en complexe solide insoluble dans l'eau, ou en complexe soluble dans l'eau. Bien que les CD naturelles soient efficaces et s'adaptent à la plupart des composés hydrophobes, les CD modifiées restent une très bonne alternative et ouvrent un champ illimité de possibilité de formation de complexes d'inclusions avec diverses molécules. Ces travaux ont démontrés l'efficacité incontestable des CD dans le domaine pharmaceutique.

La  $\beta$ -CD est l'un des agents solubilisant des molécules hydrophobes *in situ* les plus puissant et ce même à faible concentration. une concentration de 1% en  $\beta$ -CD peut s'avérer suffisante pour solubiliser la plupart des molécules hydrophobes sans pour autant avoir le moindre impact sur les systèmes l'absorption intestinale *in situ*. Car d'après les travaux récents de développement, les concentrations en molécules hydrophobe utilisés dans l'expérimentation *in situ* ne dépassent pas les 1 mM.

Le développement de la résistance multi-médicaments (MDR) est l'un des principaux facteurs conduisant à l'échec de nombreuses chimiothérapies conventionnelles. Les deux propriétés intrinsèques du Curcumine (CUR), sa toxicité envers les cellules cancéreuses et sa capacité d'inversion MDR, peuvent avoir un grand potentiel en clinique lorsqu'il est utilisé en association avec des agents chimio thérapeutiques. Ici, ils ont démontré l'efficacité des micelles mixtes Polyéthylène glycol- phosphatidylethanolamine/ vitamine E (PEG-PE/vitE) dans la solubilisation du CUR et la capacité de le co-charger avec du Paclitaxel (PCL) dans la même formulation. Ces micelles combinées présentent des avantages significatifs *in vitro* et *in vivo* par rapport à la pharmacothérapie individuelle et en particulier lorsqu'il s'agit de tumeurs



résistantes. La combinaison de CUR, un inhibiteur de NF- $\kappa$ B sûr et efficace, avec la PCL a réussi à inverser la MDR dans un modèle d'adénocarcinome ovarien humain résistant, comme le montre l'amélioration spectaculaire de l'efficacité de la PCL. Cette modalité de thérapie combinée pourrait avoir des avantages cliniques significatifs pour le traitement du cancer de l'ovaire résistant.

Des complexes d'inclusions ont été préparés à partir de  $\beta$ -cyclodextrine et une série de nitrones. Les rendements obtenus sont faibles. Cela a été attribué aux faibles interactions qui régissent entre les nitrones et les cyclodextrine. L'évaluation de l'activité antioxydante des nitrones et leurs complexes réalisés par les deux techniques (méthode de  $\beta$ -carotène et la méthode du piégeage du radical libre), ont montré que l'activité antioxydante des nitrones est améliorée par l'amélioration de leur solubilité. La méthode de réduction du fer ferrique (FRAP), a montré que l'activité antioxydante des nitrones ne dépend pas uniquement du phénomène de solubilité.

Une procédure simple pour charger le cholestérol dans les cyclodextrines et ajouter des cyclodextrines chargées de cholestérol au sperme de taureau est décrite, qui se traduit par des pourcentages plus élevés de cellules motiles et viables après décongélation. Des expériences supplémentaires ont permis de déterminer que le cholestérol ajouté s'incorpore dans tous les compartiments de la membrane plasmique des spermatozoïdes. Cette technique est prometteuse pour améliorer la cryosurvie du sperme de taureau, et éventuellement d'autres types de cellules.

L'encapsulation de la vitamine C dans des liposomes entraîne l'amélioration de la biodisponibilité de la vitamine C au niveau physiologique, sans compromettre sa puissance au niveau cellulaire. La formulation liposomale de la vitamine C, outre sa forte activité, telle qu'elle est assurée par une biodisponibilité élevée, doit également satisfaire à des exigences réglementaires strictes concernant la teneur en composés potentiellement nocifs, la stabilité et la reproductibilité des processus de production. Dans le document, il a été démontré que la nouvelle préparation liposomale peut être produite avec des paramètres critiques stables tels que : la composition chimique et l'homogénéité de la population de liposomes. En outre, le processus de production à base de glycérine surmonte le principal obstacle, commun à d'autres processus de production, à savoir la nécessité d'utiliser des solvants organiques pharmacologiques indésirables tels que l'éthanol.

En conclusion, les résultats obtenus dans le cadre de l'étude menée sur la formulation de larmes artificielles à base de liposomes, cholestérol, vitamine C et vitamine C ont démontré

que la formulation de larme artificielle à base de liposomes in situ présente des propriétés appropriées pour l'administration ophtalmique topique et est bien tolérée.

**Références  
bibliographique**

- [1] **Taouzinet L. Fatmi S. Khellouf A. Skiba M. & Iguer-ouada M.** *Alpha Tocopherol Loaded in Liposome: Preparation, Optimization, Characterization and Sperm Motility Protection.* Drug Delivery Letters. VI 10, (2020).
- [2] **Lindberg A.E.** *Vitamin E: Nutrition, Side Effects, and Supplements.* Nutrition and Diet Research Progress. Nova Science Publishers, Inc. New York. P 2. (2011).
- [3] **Perly B. Smith I.C.P. Hughes L. Burton G.W. & Ingold K.U.** *Estimation of the location of natural  $\alpha$ -tocopherol in lipid bilayers by  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes. VI 819, (September 1985). P 131-135.
- [4] **Daoud L. & Ouyahia E.D.** *Préparation, optimisation et caractérisation des liposomes de vitamine E.* Mémoire de master. Université A. Mira-Bejaia. (2016).
- [5] **Benhenia, K. Rahab H. Smadi M.A. Benmakhlouf H. Lamara A. Idres T. & Iguer-ouada M.** *Beneficial and harmful effects of cyclodextrin-vitamin E complex on cryopreserved ram sperm.* Animal Reproduction Science. VI 195, (Juin 2018).
- [6] **Warner M.** *Vitamin E.* Pharmacy Today. VI 26, (avril 2020). P 16.
- [7] **Iguer-ouada M.** *Effect of cyclodextrins, cholesterol and vitamin E and their complexation on cryopreserved epididymal ram semen.* Small rumi. (Juin 2016).
- [8] **Leger C.L.,** *La vitamine E : état actuel des connaissances, rôle dans la prévention cardio-vasculaire, biodisponibilité.* Oléagineux, Corps Gras, Lipides. Volume 7, Numéro 3, (Mai - Juin 2000). P 65-258.
- [9] **Gillam W.S.** *Polarographic Determination of Vitamin C in Fruits and Vegetables.* Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition, VI 17. (Mai 2002).
- [10] **Schwartz E.** *La vitamine C.* Monographie. Dess de cosmetologie. université du Québec à Chikoutimi. (2016).
- [11] **Bernard M.** *Les nouveaux visages du scorbut en 2010 : étude rétrospective du statut en vitamine C de patients hospitalisés dans les services de post-urgences médicales de l'hôpital Purpan durant l'année 2010.* Thèse. Université de Toulouse 3, France. (2011).
- [12] **Martini M.C. & Seiller M.** *Actifs et additifs cosmétiques.* 3ème édition. (2006).
- [13] **BERCHE B.** *L'histoire du scorbut.* Biologie et histoire Scorbut. Revue de Biologie Médicale n°347. (2019).
- [14] **PHARMACOPÉE EUROPÉENNE 6e EDITION** publiée le (16 juillet 2007).

- [15] **JEHL B & MADET N.** *L'acide ascorbique et son utilisation en tant qu'additif dans les industries alimentaires. Licence IUP SIAL.* Université PARIS XII VAL DE MARNE, France. (2004).
- [16] **Poncelet C & Sifer C.** *Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain,* Springer-Verlag France, Paris. (2011).
- [17] **Hamadou D. & Kais S.** *Contribution à la recherche de l'effet amélioratif des vitamines C et E sur l'épididyme de lapin (Orictolagus cuniculus), traité parla lambda-cyhalothrine.* Mémoire de master. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. (2017).
- [18] **Samuni A. Aronovitch J Godinger D. Chevion M. & Czapski G.** *On the cytotoxicity of vitamin C and metal ions A site-specific Fenton mechanism.* Cellular Biochemistry and Physical Chemistry, the Hebrew University of Jerusalem - EJB 83 0525. Eur. J. Biochem. VI 137. (1983) P 119- 124.
- [19] **Valko M. Izakovic M. Mazur M.J. Rhodes C. & Telser J.** *Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence.* Molecular and Cellular Biochemistry VI 266, (2004), P 37–56.
- [20] **Delamere N.** *Ascorbic Acid and the Eye.* Subcellular Biochemistry. (1996), P 313-329.
- [21] **Fraga C.G. Motchnik P.A. Shigenaga M.K. Helbock HJ. Jacob RA. & Ames B.N.** *L'acide ascorbique protège contre les dommages oxydatifs endogènes de l'ADN dans le sperme humain.* PNAS 88 (24). (1991). P 11003-11006.
- [22] **Levine M. Dhariwal KR. Wang Y et al.** *Ascorbic acid in neutrophils.* In: Frei B Natural Oxidants in Health and Disease. Academic Press, San Diego. (1994). P 469-488.
- [23] **Frei B. Stocker R. & Ames B.N.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, (1988). P9748-9752.
- [24] **Guilland JC.** *Les interactions entre les vitamines A, D, E et K : synergie et/ou compétition.* OCL, Oilseeds and Fats, Crops and Lipids, (2011).
- [25] **Todd P.W. McMullen Ruthven N.A.H. Lewis & Ronald N. McElhaney.** *Differential Scanning Calorimetric and Fourier Transform Infrared Spectroscopic Studies of the Effects of Cholesterol on the Thermotropic Phase Behavior and Organization of a Homologous Series of Linear Saturated Phosphatidylserine Bilayer Membranes.* Biophysical Journal, VI 79. (Octobre 2000). P 2056–2065.

- [26] **Schlienger J.L.** *L'édifiante histoire du cholestérol : de la pierre de fiel au récepteur aux LDL : The edifying cholesterol story : From 'gall stone' to the LDL receptor.* Médecine des Maladies Métaboliques. VI 6. (Fevrier 2012). P 97-103.
- [27] **Zubiria L.** *Cholestérol : un lipide essentiel à l'organisme.* PasseportSanté.net (Juin 2018).
- [28] **Maxfield F. & Tabas, I.** *Role of cholesterol and lipid organization in disease.* Nature. VI 438, 2005. P 612–621.
- [29] **Juneau M.D.** *Les œufs : à consommer avec modération.* Institut de Cardiologie de Montréal. (2 septembre 2019).
- [30] **Aakanksha G.** *Cholesterol,* Encyclopaedia Britannica, mise à jour le : (06 février 2020).
- [31] **POMMIER A.** *Rôle du cholestérol et des récepteurs nucléaires LXRs dans le cancer de la prostate.* Université Blaise Pascal, (2010).
- [32] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 5997, *Cholesterol,* (2020).
- [33] **Iguer-Ouada M. Khellouf A. Benhenia K. & Fatmi, S.** *The complementary effect of cholesterol and vitamin e preloaded in cyclodextrins on frozen bovine semen: motility parameters, membrane integrity and lipid peroxidation.* Cryo letters, VI 39. (Novembre 2018) P 113-120.
- [34] **Darin-Bennett A. & White I.** *Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock.* Cryobiology. VI 14. (Septembre 1977) P 70-466.
- [35] **Watson P.** *The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein.* Journal of reproduction and fertility. VI 62. (Aout 1981). P 92-483.
- [36] **White I G.** *Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review.* Reproduction, fertility, and development. VI 5. (Fevrier 1993). P 58-639.
- [37] **Drobnis E.Z. Crowe L.M. Berger T. Anchordoguy T.J. Overstreet J.W & Crowe J.H.** *Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model.* J Exp Zool. VI 265. (1993). P 7-432
- [38] **Mazur P.** *Freezing of living cells: mechanisms and implications.* Am J Physiol VI 247. (1984). P 42-125.

- [39] **Glazar A.I. Mullen S.F. Liu J. Benson J.D. Critser J.K. Squires E.L & Graham J.K.** *Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol.* Cryobiology VI 59. (2009). P 6-201.
- [40] **Aksoy M. Akman O. Lehimcioglu NC & Erdem H.** *Cholesterol-loaded cyclodextrin enhances osmotic tolerance and inhibits the acrosome reaction in rabbit spermatozoa.* Anim Reprod Sci VI 120. ( 2010). P 72-166
- [41] **Bangham AD. Standish M.M. & Watkins J.C.** *Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids.* Journal of Molecular Biology VI 13. (1965). P 238-252.
- [42] **Sebaaly C. Charcosset C. Stainmesse S. Fessi H. & Greige-gerges H.** *Clove essential oil-in-cyclodextrin-in-liposomes in the aqueous and lyophilized states: From laboratory to large scale using a membrane contactor.* Carbohydrate Polymers. VI 138, (novembre 2015).
- [43] **Mougin-Degraef M. Jestin E. Faivre-chauve A. Hindré F. Mishra A. Thedrez P. Saie-Maurel C. Chatal J.F. Barbet J. & Gestin and J.F.** *Lipidic Nanocapsules: a new tool for radioimmunotherapy of cancers.* European journal of nuclear medicine and molecular imaging. VI 33. (Septembre 2006). P 104.
- [44] **Edwards K.A. & Baeumner A.J.** *Analysis of liposomes.* Talanta, 2006.
- [45] **Ghanbarzadeh,S. Khorrami,A & Arami, S.** J Pharm. Investig, VI 44. (2014). P 33-39.
- [46] **Laouini A. Jaafar-Maalej C. Limayem-Blouza I. Sfar S. Charcosset C. & Fessi, H.** *Preparation, characterization and applications of liposomes: State of the art.* Journal of Colloid Science and Biotechnology. VI 1. (2012a). P 147-168.
- [47] **Weinstein JN. & Leserman L.D.** *Liposomes as drug carriers in cancer chemotherapy.* Pharmacology and Therapeutics. VI 24. (1984). P 207-233.
- [48] **Piel G. Piette M. Barillaro V. Castagne D. Evrard B. & Delattre L.** *Betamethasoneincyclodextrin- in-liposome: the effect of cyclodextrins on encapsulation efficiency and release kinetics.* International Journal of Pharmaceutics. VI 312. (2006). P 75-82.
- [49] **Shashi K. Satinder K. & Bharat P.** *A complete review on: Liposomes.* International Research Journal of Pharmacy. VI 3. (2012). P 10-16.
- [50] **Immordino M.L. Dosio F. & Cattell L.** *Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential.* International Journal of Nanomedicine. VI 1. (2006). P 297-315.

- [51] **Fattal E. Couvreur P. & Puisieux F.** *Méthodes de préparation des liposomes.*  
Et In **Delattre J. Couvreur P. Puisieux F. Philippot J.R. & Schuber F.** *les liposomes : Aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques.* Paris : les éditions INSERM. (1993). P 7-42.
- [52] **Lorin A. Flore C. Thomas A. & Brasseur R.** *Les liposomes : description, fabrication et applications.* Biotechnology, Agronomy, Society and Environment. VI 8. (2004). P 163-176.
- [53] **Maxfield FR. & Tabas I.** *Role of cholesterol and lipid organization in disease.* Review. Nature. VI 438. (2005). P 612-621.
- [54] **Rickwood E. & Hames B.M.** *Liposomes - A practical approach.* New R.R.C. (1990).
- [55] **R R C New.** *Liposomes: a practical approach.* Oxford; New York: IRL Press; New York: Oxford University Press. (1990).
- [56] **Chen C. Han D. Cai C & Tang X.** *An overview of liposome lyophilization and its future potential.* Journal of Controlled Release. VI 142. (2010). P 299-311.
- [57] **Tseng L.P. Liang H.J. Chung T.W. Huang Y.Y. & Liu D.Z.** *Liposomes incorporated with cholesterol for drug release triggered by magnetic field.* Journal of Medical and Biological Engineering. VI 27. (2007). P 29-34.
- [58] **Kyrikou I. Georgopoulos A. Hatziantoniou S. Mavromoustakos T. & Demetzos C.** *A comparative study of the effects of cholesterol and sclareol, bioactive labdane type diterpene, on phospholipid bilayers.* Chemistry and Physics of Lipids. VI 133. (2005). P 125-134.
- [59] **Kontogiannopoulos K.N. Tsermentseli S.K. Assimopoulou A.N. & Papageorgiou V.P.** *Sterically stabilized liposomes as a potent carrier for shikonin.* Journal of Liposome Research. VI 24. (2014). P 230-240.
- [60] **Mosca M. Ceglie A. & Ambrosone L.** *Effect of membrane composition on lipid oxidation in liposomes.* Chemistry and Physics of Lipids. VI 164. (2011). P 158-165.
- [61] **Liu W. Ye A. Liu C. Liu W. & Singh H.** *Structure and integrity of liposomes prepared from milk- or soybean-derived phospholipids during in vitro digestion.* Food Research International. VI 48. (2012). P 499-506.
- [62] **Mozafari M.R. Johnson C. Hatziantoniou S. & Demetzos C.** *Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology.* Journal of Liposome Research. VI 18. (2008). P 309-327.
- [63] **Rongen H.A. Bult A. & Van Bennekom W.P.** *Liposomes and immunoassays.* Journal of Immunological Methods. VI 204. (1997). P 105-133.



- [64] **Akbarzadeh A. Sadabady R.R. Daaran S. Joo S.W. Zarghami N. Hanifehpour Y. Samiei M. Kouhi M. & Nejati-Koshki K.** *Liposome: classification, preparation, and applications.* Nanoscale Research Letters VI 8. (2013). P 102-110.
- [65] **Lasic D.D.** *The mechanism of vesicle formation.* Biochemical Journal. VI 256. (1988). P 1-11.
- [66] **Batzri S. & Korn E.D.** *Single bilayer liposomes prepared without sonication.* Biochimica et Biophysica Acta. VI 298. (1973). P 1015-1019.
- [67] **Jaafar-Maalej C. Diab R. Andrieu V. Elaissari A. & Fessi H.** *Ethanol injection method for hydrophilic and lipophilic drug-loaded liposome preparation.* Journal of Liposome Research. VI 20. (2010). P 228-243.
- [68] **Song J. Shi F. Zhang Z. Zhu F. Xue J. Tan X. Zhang L. & Jia X.** *Formulation and evaluation of celastrol-loaded liposomes.* Molecules. VI 16. (2011). P 7880-7892.
- [69] **Wang C.H. & Huang Y.Y.** *Encapsulating protein into preformed liposomes by ethanoldestabilized method.* Artificial cells, blood substitutes, and biotechnology. VI 31. (2003). P 303-312.
- [70] **Wagner A. Vorauer-Uhl K. & Katinger H.** *The cross flow injection technique: an improvement of the ethanol injection method.* Journal of Liposome Research. VI 12. (2002). P 259-270.
- ET Wagner A. Platzgummer M. Kreismayr G. Quendler H. Stiegler G. Ferko B. Vecera G. Vorauer-Uhl K. & Katinger H.** *GMP production of liposomes: a new industrial approach.* Journal of Liposome Research. VI 16. (2006). P 311-319.
- [71] **Justo O.R. & Moraes A.M.** *Economical feasibility evaluation of an ethanol injection liposome production plant.* Chemical Engineering and Technology. VI 33. (2010). P 15-20.
- ET Justo O.R. & Moraes A.M.** *Analysis of process parameters on the characteristics of liposomes prepared by ethanol injection with a view to process scale-up: Effect of temperature and batch volume.* Chemical Engineering and Technology. VI 89. (2011). P 785-792.
- [72] **Yang K. Delaney J.T. Ulrich S. Schubert U.S. & Fahr A.** *Fast high-throughput screening of temoporfin-loaded liposomal formulations prepared by ethanol injection method.* Journal of Liposome Research. VI 22. (2012). P 31-41.

- [73] **Kremer J.M. Esker M.W. Pathmamanoharan C. & Wiersema P.H.** *Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection method.* Biochemistry. VI 16. (1977). P 3932-3935.
- [74] **Maitani Y. Soeda H. Junping W. & Takayama K.** *Modified ethanol injection method for liposomes containing  $\beta$ -sitosterol  $\beta$ -D-glucoside.* Journal of Liposome Research. VI 11. (2001). P 115-125.
- [75] **Uchegbua I.F. & Vyas S.P.** *Non-Ionic Surfactant Based Vesicles Niosomes in Drug Delivery.* Int J Pharm. VI 172. (1998). P 33-70.
- ET Bangham A.D. Horne R.W. Glauert A.M. Dingle J.T. & Lucy J.A.** *Action of saponin on biological cell membranes.* Nature. VI 196. (1962). P 952-955.
- [76] **Horne R.W. Bangham A.D. & Whittaker V.P.** *Negatively Stained Lipoprotein Membranes,* Nature. VI 200 (4913). (1963). P 1340.
- [77] **Thoma K. & Vetter O.** *Pharmaceutical quality of liposomes, requirements for applicability.* In: *Liposomes, New systems and new trend in their applications ; Puisieux F, Couvreur P, Delattre J, Devissaguet J-P.* Editions de Santé. (1995). P 321-370.
- [78] **Devoisselle J .M.** *Les liposomes : aspects pharmaceutiques, comportement in vivo et réalités cliniques.* La lettre du Pharmacologue. VI 11 n°10 (1997). P 203-209.
- [79] **Szejtli J.** *Past, present and future of cyclodextrin research.* Pure Appl. Chem. VI 76 (10). (2004). P 1825-1845.
- [80] **Yang L.J. Yang B. Chen W. Huang R. Yan S.J. & Lin J.** *Host-guest system of nimbin and  $\beta$ - cyclodextrin or its derivatives: Preparation, characterization, inclusion mode, and solubilization.* Journal of Agricultural and Food Chemistry. VI 58. (2010). P 8545-8552.
- [81] **Zafar N. Fessi H. & Elaissari A.** *Cyclodextrin containing biodegradable particles: From preparation to drug delivery applications.* International Journal of Pharmaceutics. VI 461. (2014). P 351-366.
- [82] **Szjetli.** *Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry.* Chem. Rev. VI 98 (1998). P 1743-1753.
- [83] **Challa R. Ahuja A. Ali J. & Khar R.K.** *Cyclodextrins in drug delivery: An updated review.* AAPS Pharmscitech. VI 6. (2005). P 329-357.
- [84] **Loftsson T. Brewster M.E.** *Pharmaceutical applications of cyclodextrins: effects on drug permeation through biological membranes.* Journal of Pharmacy and Pharmacology. VI 63. (2011). P 1119-1135.

- [85] **Romain J.** *Cyclodextrines hydrophiles : caractérisation et étude de leur propriétés énantioselective et complexante.* Utilisation de la chromatographie en phase liquide et de la spectrométrie de masse (2007).
- [86] **Szente L. & Szejtli J.** *Highly soluble cyclodextrin derivatives: Chemistry, properties and trends in development.* Advance Drug Delivery Reviews. VI 36. (1999). P 17-38.
- [87] **Mosher G. & Thompson D.O.** *Complexation and Cyclodextrins.* In: Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. VI 19, Swarbrick, J. and Boylan, J.C.E. (Eds.), Marcel Dekker, New York, (2000). P 49-88.
- [88] **Nuchuchua O. Saesoo S. Sramala I. Puttipipathachorn S. Soottitantawat A. & Ruktanonchai U.** *Physicochemical investigation and molecular modeling of cyclodextrin complexation mechanism with eugenol.* Food Research International. VI 42. (2009). P 1178-1185.
- [89] **Nasir A. Harikimar S.L. & Amanpreet K.** *Cyclodextrins: an excipient tool in drug delivery.* International Research Journal of Pharmacy. VI 3. (2012). P 44-50.
- [90] **Ishihara H.** *Current Status and Prospects of Polyethyleneglycol-Modified Medicines.* Biological & pharmaceutical bulletin, (2013).
- [91] **Balès, N.,** *LES PEGS,* DESS DE COSMETOLOGIE, Monographie, université du Québec à Chicoutimi, (2014).
- [92] **Hoechst.** *Polyethylenglykole.* Communication of the Hoechst AG to the Deutsche Wissenschaftliche Gesellschaft für Erdöl, Erdgas und Kohle. (1992a).
- [93] **BRITTON KEYS K.** (1998).
- [94] **Togo T. Alderton J.M. Alderton J.M. BI G.Q. & Steinhardt R.A.** *The mechanism of facilitated cell membrane resealing.* J. Cell Sci.VI 112. (1999). P 719-731.
- [95] **Boucheffa B. & Mennas DJ.** *L'intérêt du polyéthylène glycol dans la solubilisation du cholestérol et de la vitamine E pour une conservation optimale du sperme bovin,* mémoire de master. Université A. MIRA – Bejaia, (2016).
- [96] **FATMI S.** *Formulation et caractérisation d'un anticancéreux à base de polymère hydrophile et de cyclodextrines,* thèse de doctorat. Université A. MIRA – Bejaia, (2015).
- [97] **Tran P. Pyo Y.C. Kim D.H. Lee S.E. Kim J.K. & Park J.S.** *Overview of the Manufacturing Methods of Solid Dispersion Technology for Improving the Solubility of Poorly Water-Soluble Drugs and Application to Anticancer Drugs.* Pharmaceutics. VI 11(3). (2019). P 132.

- [98] **WEISSE S.** *Etude de la complexation de dérivé de la vitamine A dans les cyclodextrines naturelles et modifiées*, thèse doctorale, Université de Paris XI (2002).
- [99] **Oda M. Saitoh H. Kobayashi M. & Aungst B.J.** *Cyclodextrin as a suitable solubilizing agent for in situ absorption study of poorly water-soluble drugs.* International journal of pharmaceutics. VI 280. (2004). P 95–102.
- [100] **Abouzeid A.H. Patel N.R. & Torchilin V.P.** *Polyethylene glycol phosphatidylethanolamine (PEG PE)/vitamin E micelles for co-delivery of paclitaxel and curcumin to overcome multi drug resistance in ovarian cancer.* International Journal of Pharmaceutics. VI 464. (2014). P 178-184.
- [101] **Aimeur C. & Teffat D.** *Préparation des complexes d'insertions nitroène /  $\beta$ -Cyclodextrine et leurs activités antioxydantes.* Mémoire de master. Université Saad Dahlab de Blida. (2019).
- [102] **Purdy P.H. & Graham J.K.** *Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm.* Cryobiology. VI 48. (2004). P 36–45.
- [103] **Dalek P. Łukawski M. Borowik T. Foryś A. Langner M. Witkiewicz W. & Przybyło M.** *New oral liposomal vitamin C formulation: properties and bioavailability.* Journal of Liposome Research. VI 30. Pologne, (2019).
- [104] **Wechtersbach L. Poklar Ulrich N. & Cigi\_c B.** *Liposomal stabilization of ascorbic acid in model systems and in food matrices.* LWTfood science and technology. VI 45(1). (2012). P 43–49.
- [105] **Ensign L.M. Cone R. & Hanes J.** *Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: the gastrointestinal mucus barriers.* Advanced drug delivery reviews. VI 64(6). (2012). P 557–570.
- [106] **Beilstein F. et al.** *Characteristics and functions of lipid droplets and associated proteins in enterocytes.* Experimental cell research. VI 340(2). (2016). P 172–179.
- [107] **Duygu A. Molina-Martínez I.T. Gómez-Ballesteros M. Guzmán-Navarro M. Benítez-del-Castillo M & Herrero-Vanrell R.** *Novel liposome-based and in situ gelling artificial tear formulation for dry eye disease treatment.* Contact Lens and Anterior Eye. VI 41. (2017).

## **Résumé**

Dans ce travail nous avons pu recueillir des informations concernant trois substances de différentes natures : hydrophiles (vitamine C), lipophiles (vitamine E) et amphiphile (le cholestérol), et trois système d'encapsulation (les liposomes, les cyclodextrine et le polyéthylène glycol).

Afin de suivre le comportement et d'évaluer l'effet de ces systèmes de vectorisation, sur la vitamine C, la vitamine E, le cholestérol et/ou autres, nous avons fait appel à une étude de cas.

Les résultats de chaque cas étudiés montrent que l'utilisation de ces systèmes d'encapsulation, améliore la solubilité, la stabilité et donc la biodisponibilité des principes actifs.

**Mots clés :** complexation, vitamine E, Cholestérol, solubilité.

## **Abstract**

In this work, we were able to collect information about three substances of different natures: hydrophilic (vitamin C), lipophilic (vitamin E) and amphiphilic (cholesterol), and three encapsulation systems (liposomes, cyclodextrins and polyethylene glycol).

In order to monitor the behaviour and to evaluate the effect of these vectorization systems on vitamin C, vitamin E, cholesterol and/or others, we used a case study.

The results of each case study show that the use of these encapsulation systems improves the solubility, stability and therefore bioavailability of the active ingredients.

**Key words:** complexation, vitamin E, cholesterol, solubility.