



HAL
open science

Délivrance orale d'insuline par double encapsulation : développement et évaluation de l'efficacité et de la sécurité des systèmes entériques et nanoparticulaires

Pauline Guhmann

► **To cite this version:**

Pauline Guhmann. Délivrance orale d'insuline par double encapsulation : développement et évaluation de l'efficacité et de la sécurité des systèmes entériques et nanoparticulaires. Sciences pharmaceutiques. Université de Strasbourg, 2013. Français. NNT : 2013STRAJ061 . tel-01071851

HAL Id: tel-01071851

<https://theses.hal.science/tel-01071851>

Submitted on 6 Oct 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Centre européen d'étude du Diabète

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

Discipline : Science de la Vie et de la Santé

Spécialité : Aspect Moléculaire et Cellulaire de la Biologie

Délivrance orale d'insuline par double encapsulation : développement et évaluation de l'efficacité et de la sécurité des systèmes entériques et nanoparticulaires

Par Pauline GUHMANN

Soutenue publiquement le 20/09/2013 devant le jury composé de :

Docteur Séverine SIGRIST
Professeur Françoise PONS
Professeur Gilles PONCHEL
Professeur Bertrand RIHN
Professeur Armelle BAEZA-SQUIBAN
Professeur Florent MEYER
Professeur Michel PINGET

Strasbourg
Strasbourg
Châtenay-Malabry
Nancy
Paris
Strasbourg
Strasbourg

Co-Directeur de thèse
Directeur de thèse
Rapporteur externe
Rapporteur externe
Examineur externe
Examineur interne
Invité

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord le Pr Michel Pinget, de m'avoir accueillie et permise de faire cette thèse au sein de son laboratoire, le Centre européen d'étude du diabète.

Je tiens aussi à remercier tout particulièrement le Dr Séverine Sigrist, pour avoir accepté de diriger ma thèse. Je te remercie pour tout le temps que tu m'as accordé durant ces trois années. Merci aussi pour ta disponibilité, ton investissement, et surtout ta patience ; et enfin merci pour ta confiance.

Je remercie également le Pr Françoise Pons, pour avoir accepté la co-direction de cette thèse. Merci à vous pour votre soutien sans faille et votre implication dans mes travaux ainsi que dans la correction de ce manuscrit.

Je remercie vivement les membres de mon jury pour l'honneur que vous me faites d'avoir accepté de juger ce travail : Pr Gilles Ponchel, Professeur à l'Université Paris-Sud 11 et membre de l'Institut Galien Paris-Sud (UMR CNRS 8612), Pr Bertrand Rihn, Professeur à l'Université de Lorraine et membre du laboratoire « Cibles thérapeutiques, formulation et expertise pré-clinique du médicament » (EA 3452), Pr Armelle Baeza-Squiban, Professeur à l'Université Paris Diderot 7 et membre du laboratoire des Réponses Moléculaires et Cellulaires aux Xénobiotiques (EAC CNRS 4413), et Pr Florent Meyer, Professeur et Praticien hospitalier à la Faculté de Chirurgie Dentaire de Strasbourg et membre du laboratoire Biomatériaux et bioingénierie (Unité Inserm 1121).

Ce travail a été celui d'un projet et d'une équipe. Merci au Pr Yves Frère et au Dr Nathalie Auberval de l'institut Charles Sadron, pour leurs implications et leurs précieux conseils. Merci aussi à Akkiz Bekel, pour les rendements d'encapsulation de l'insuline et qui m'ont permise de finir ce travail à temps.

Je remercie tout particulièrement Carole Mura, appelée « 6-7 ». Merci à toi pour ton efficacité, ta bonne humeur et le temps précieux que tu m'as fait gagner. Je n'oublie pas Elodie Seyfritz et William Bietiger pour leurs disponibilités et pour m'avoir formée à mon arrivée au

laboratoire. Enfin, un merci aussi à ma « Caco-girl », Harzo Hamdard, pour ton soutien « cellulaire » et tes réinterprétations de la chanson française.

Merci à mes amis les thésards. En chef de file, Kevin, l'ancien « chef des thésards ». Merci à toi pour les conseils précieux que tu as pu me donner et merci pour tes blagues pas toujours drôles, mais tu sais que je suis ton meilleur public. Merci à Remmelt, qui m'a supportée durant 3 ans et a participé à mes délires de fin de journée. J'espère que tu n'es pas dégouté à vie de la purée mousseline. Merci à Doudou pour m'avoir aidée sur les synthèses et les chirurgies, mais aussi pour avoir été mon garde du corps durant notre fameux séjour à Paris. Merci à Aida, qui a été épargnée de mes caprices de chef.

Merci à toute l'équipe du labo, qui a participé de près ou de loin à l'aboutissement de cette thèse. Merci pour votre bonne humeur et pour les bons p'tits-dèj. Merci à mon Claudio pour ton « Joyce du fond fin de j'sais pas où », Steph, Allan, Elisa, Nathalie S., Elodie C., Anaïs, Fred. Je n'oublie pas la dream team de Defymed : Richard, Charles-Thibault et Jordan.

Mes remerciements vont aussi à toutes les équipes externes qui ont contribué à ce travail : Dr Nathalie Reix du Laboratoire d'Explorations Fonctionnelles par les Isotopes pour les études de tomographie aux rayons X, Claudine Ebel, de l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire pour son aide concernant les études de cytométrie en flux, au Dr Guy Roussel de l'INSERM U1109 MN3T pour la microscopie à illumination structurée, à Christian Blanck, de l'Institut Charles Sadron pour les clichés de microscopies électronique en transmission, et au Dr Marie-France Champy de l'Institut Clinique de la Souris pour l'ELISA Multiplex des cytokines.

Je remercie également les personnes que j'ai pu côtoyer durant cette thèse : Aymeric, Gigi, Pierre, et Pierre-Edouard, qui m'a beaucoup conseillée au début de ma thèse.

Merci aux médecins du service d'Endocrinologie, de Diabétologie et des Maladies métaboliques, Dr François Moreau, Pr Nathalie Jean Didier et Dr Lucille Ratheau.

Je tiens à remercier les toutes les personnes de l'Institut Prévention Santé et tout spécialement Carine, Mr Mignot et Mr Seyller.

Je voulais aussi remercier mes amis, de Strasbourg, de France et de l'autre bout du monde, qui m'ont soutenue et encouragée. Merci à vous pour tous les bons moments passés et à venir, merci de m'avoir supportée durant ces dernières années.

Mes derniers remerciements, et non des moindres, s'adressent naturellement à ma famille. Merci maman pour m'avoir soutenue durant ces 3 années et merci pour tes petits plats qui ont su me remonter le moral. Un grand merci à toi papa, pour avoir toujours été là pour moi, merci pour tes encouragements et ton soutien sans faille. Merci à vous de m'avoir soutenue dans mes choix. Merci à ma sœur adorée, Julie, qui m'a toujours encouragée, et qui avec Jaïme, me fera un des plus beaux cadeaux qui l'on puisse avoir, être tata d'un super petit bout.

Je voulais aussi remercier une personne, qui a beaucoup compté, une personne qui m'a toujours témoignée ses encouragements et sa gentillesse. Merci pour ton sourire, merci mamie.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES.....	10
LISTE DES TABLEAUX.....	17
LISTE DES ABREVIATIONS.....	18

1. PROBLEMATIQUE 20

2. INTRODUCTION 22

2.1. Le diabète.....	23
2.1.1. Définition du diabète et épidémiologie.....	23
2.1.2. La glycémie et sa régulation.....	25
2.1.2.1. Régulation de la glycémie par le pancréas et l'intestin.....	25
2.1.2.1.1. Par le pancréas.....	25
2.1.2.1.1.1. Structure du pancréas.....	25
2.1.2.1.1.2. Régulation glycémique impliquant le pancréas.....	26
2.1.2.1.2. Par l'intestin.....	31
2.1.2.2. Apport et production de glucose.....	32
2.1.2.3. Utilisation et stockage du glucose.....	33
2.1.3. Le diabète de type 1.....	34
2.1.3.1. Facteurs génétiques.....	35
2.1.3.2. Facteurs environnementaux.....	35
2.1.3.3. Pathogénie du diabète de type 1.....	36
2.1.4. Le diabète de type 2.....	38
2.1.4.1. Les facteurs génétiques.....	38
2.1.4.2. Les facteurs environnementaux.....	39
2.1.4.3. La pathogénie du diabète de type 2.....	39
2.1.5. Les complications.....	41
2.1.5.1. Complications aiguës.....	41
2.1.5.1.1. Complications liées à l'hyperglycémie.....	41
2.1.5.1.2. Conséquences de l'hypoglycémie.....	41
2.1.5.2. Complications chroniques.....	42
2.1.5.2.1. La macroangiopathie.....	42

2.1.5.2.2.	La microangiopathie	42
2.2.	Les traitements actuels du diabète par l'insuline	43
2.2.1.	L'insuline et son historique	43
2.2.2.	Structure de l'insuline	44
2.2.3.	Les différents types d'insuline utilisés dans le traitement du diabète	45
2.2.3.1.	Les analogues rapides	46
2.2.3.2.	Les analogues lents	47
2.2.3.3.	Les analogues intermédiaires et premix.....	48
2.2.4.	Les modes d'administration	49
2.2.4.1.	Les stylos injecteurs.....	50
2.2.4.2.	Les pompes à insuline.....	51
2.2.4.2.1.	La pompe externe	51
2.2.4.2.2.	La pompe implantable	52
2.2.4.3.	Les limites des modes d'administrations actuels.....	52
2.2.5.	La recherche de nouvelles formes d'insulinothérapie.....	54
2.2.5.1.	Greffe de pancréas	55
2.2.5.2.	Transplantation d'îlots pancréatiques	55
2.2.5.3.	Pancréas artificiel.....	55
2.2.5.4.	Pancréas bioartificiel.....	56
2.2.5.5.	Voies alternatives de délivrance de l'insuline	57
2.3.	L'insulinothérapie par voie orale	59
2.3.1.	Intérêts et limites de la voie orale.....	59
2.3.1.1.	Présentation de la voie orale	59
2.3.1.2.	Intérêts de la voie orale.....	60
2.3.1.3.	Limites de la voie orale.....	61
2.3.1.3.1.	Barrières chimiques et enzymatiques	61
2.3.1.3.2.	Barrières physiques.....	62
2.3.1.3.2.1.	Barrière structurale	62
2.3.1.3.2.2.	Barrière sécrétrice.....	64
2.3.2.	Les différentes stratégies actuelles pour la délivrance orale d'insuline	66
2.3.2.1.	Insuline modifiée	66
2.3.2.2.	Inhibiteurs de protéases	67
2.3.2.3.	Promoteurs d'absorption.....	67
2.3.2.4.	Vectorisation de l'insuline par des particules.....	68

2.3.3.	L'insuline orale : où en sommes-nous ?	68
2.4.	Les systèmes nanoparticulaires pour la délivrance orale de l'insuline	70
2.4.1.	Les vecteurs de nature lipidique	71
2.4.1.1.	Les liposomes	71
2.4.1.2.	Les particules et capsules lipidiques	72
2.4.2.	Les vecteurs à base de polymères	73
2.4.2.1.	Polymères naturels	73
2.4.2.2.	Polymères synthétiques	76
2.5.	Les nanoparticules de PLGA pour la délivrance d'insuline	77
2.5.1.	Les systèmes nanoparticulaires à base de PLGA	77
2.5.1.1.	Le PLGA	77
2.5.2.	La synthèse des NPs de PLGA	78
2.5.3.	Potentialisation des NPs de PLGA	80
2.5.3.1.	Le coating par le chitosane	80
2.5.3.2.	Le coating par le PEG	80
2.5.4.	NPs de PLGA et délivrance de l'insuline	81
2.6.	La sécurité des systèmes nanoparticulaires	82
2.6.1.	Internalisation et devenir cellulaire des NPs	82
2.6.2.	Dommmages cellulaires engendrés et mécanismes d'action	85
2.6.3.	Facteurs influençant la toxicité des NPs	91
3.	CONTEXTE ET OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE	95
3.1.	Le contexte	96
3.2.	Les objectifs	99
4.	MATERIELS ET METHODES	100
4.1.	Développement de la gélule entérique gastrorésistante	101
4.1.1.	Présentation de la gélule	101
4.1.2.	Etude <i>in vivo</i> de la gastrorésistance de la gélule entérique	101
4.1.2.1.	Evaluation de la gastrorésistance de la gélule par tomographie à densité de rayons X	101
4.1.2.2.	Evaluation de la gastrorésistance de la gélule par mesure de la délivrance de principes actifs	102
4.2.	Développement des nanoparticules d'insuline	103

4.2.1.	Synthèse des NPs	103
4.2.1.1.	Principe	103
4.2.1.2.	Matériels	103
4.2.1.3.	Méthode de synthèse des NPs.....	104
4.2.2.	Purification des NPs	105
4.2.2.1.	Caractérisation des NPs par diffusion dynamique de la lumière	106
4.2.2.2.	Observation des NPs par microscopie électronique en transmission	107
4.2.3.	Détermination du rendement d'encapsulation de l'insuline dans les NPs	107
4.3.	Etudes <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> de l'efficacité et de la sécurité des NPs d'insuline.....	108
4.3.1.	Etudes <i>in vitro</i> de l'efficacité et de la sécurité des NPs	108
4.3.1.1.	Lignées cellulaires	108
4.3.1.1.1.	Lignée Caco-2.....	108
4.3.1.1.2.	Lignée Rev HT29 MTX M6.....	108
4.3.1.1.3.	Culture cellulaire	110
4.3.1.1.4.	Mise en place du modèle de co-culture Caco-2/Rev	110
4.3.1.1.4.1.	Evaluation de la résistance électrique trans-épithéliale.....	111
4.3.1.1.4.2.	Mise en évidence de la production de mucus	112
4.3.1.2.	Etude de l'internalisation et de la sécurité des NPs dans les différents modèles cellulaires	113
4.3.1.2.1.	Evaluation de l'internalisation des NPs et de la viabilité des cellules. 114	
4.3.1.2.1.1.	Quantification de l'internalisation des NPs par cytométrie en flux	114
4.3.1.2.1.2.	Evaluation de la viabilité cellulaire au cours des expériences d'internalisation par cytométrie en flux	116
4.3.1.2.2.	Mise en évidence de l'internalisation des NPs par microscopie à illumination structurée.....	117
4.3.1.1.	Etude de l'exocytose des NPs.....	118
4.3.1.1.	Etude des mécanismes impliqués dans l'internalisation des NPs.....	118
4.3.1.1.1.	Effet de la température	119
4.3.1.1.2.	Effets d'inhibiteurs des voies d'endocytose	119
4.3.1.2.	Evaluation de la sécurité des NPs	120
4.3.1.2.1.	Etude de la résistance électrique trans-épithéliale.....	120
4.3.1.2.2.	Etude de la perméabilité apparente.....	120
4.3.1.2.3.	Evaluation de la production de mucus.....	121

4.3.1.2.4.	Evaluation de la sécrétion de cytokines.....	122
4.3.2.	Evaluation de l'efficacité et de la sécurité des NPs <i>in vivo</i>	123
4.3.2.1.	Mise en place du modèle de rats insulinopéniques.....	123
4.3.2.2.	Etude de l'efficacité des NPs à délivrer l'insuline.....	124
4.3.2.2.1.	Implantation de cathéters au niveau du péritoine	124
4.3.2.2.2.	Implantation de cathéters au niveau du duodénum	125
4.3.2.2.3.	Implantation de cathéters au niveau de la carotide.....	126
4.3.2.2.4.	Administration des NPs aux animaux et suivi de la glycémie	127
4.3.2.2.5.	Etude de la biodisponibilité après administration en IP ou ID	127
4.3.2.3.	Evaluation de la sécurité des NPs <i>in vivo</i>	128
4.4.	Analyse statistique des résultats.....	128
5.	RESULTATS ET DISCUSSION.....	129
5.1.	Développement de la gélule gastrorésistante	130
5.1.1.	Publication : Evaluation de la gastrorésistance de la gélule par tomodensitométrie et mesure de la délivrance d'acétaminophène.....	130
5.1.2.	Résultats complémentaires : évaluation de la gastrorésistance de la gélule par mesure de la délivrance de l'ibuprofène	134
5.1.3.	Discussion	135
5.2.	Evaluation <i>in vitro</i> de l'internalisation et de la sécurité des nanoparticules	136
5.2.1.	Développement des outils : nanoparticules et modèles cellulaires	137
5.2.1.1.	Développement des nanoparticules d'insuline	137
5.2.1.1.1.	Caractérisation des NPs par diffusion dynamique de la lumière.....	137
5.2.1.1.2.	Observation des NPs au microscope électronique en transmission.....	139
5.2.1.1.3.	Détermination du rendement d'encapsulation de l'insuline	140
5.2.1.2.	Mise en place du modèle de co-culture Caco-2 / Rev	141
5.2.1.2.1.	Evaluation de la résistance électrique trans-épithéliale.....	142
5.2.1.2.2.	Evaluation de la production de mucus.....	142
5.2.1.3.	Discussion.....	143
5.2.2.	Evaluation <i>in vitro</i> de l'internalisation et de la sécurité des NPs.....	147
5.2.2.1.	Internalisation, viabilité et mort cellulaire en fonction de la dose de NPs	148
5.2.2.2.	Internalisation, viabilité et mort cellulaire en fonction de la taille des NPs	153
5.2.2.2.1.1.	4 h d'incubation	153

5.2.2.2.1.2.	24 h d'incubation	157
5.2.2.3.	Impact des NPs sur la perméabilité des cultures cellulaires, la production du mucus et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires	161
5.2.2.3.1.	Impact des NPs sur la résistance électrique trans-épithéliale	162
5.2.2.3.1.1.	4 h d'incubation	162
5.2.2.3.1.2.	24 h d'incubation	166
5.2.2.3.2.	Impact des NPs sur la perméabilité apparente	169
5.2.2.3.2.1.	4 h d'incubation	169
5.2.2.3.2.2.	24 h d'incubation	171
5.2.2.3.3.	Impact des NPs sur la production de mucus	172
5.2.2.3.4.	Impact des NPs sur la sécrétion de cytokines	173
5.2.3.	Discussion	176
5.3.	Evaluation des modalités de passage des nanoparticules	182
5.3.1.	Etude des mécanismes impliqués dans l'internalisation des NPs	182
5.3.1.1.	Effet de la température sur l'internalisation des NPs	182
5.3.1.2.	Effet d'inhibiteurs des voies d'internalisation	184
5.3.2.	Etude de l'exocytose des NPs	185
5.3.3.	Visualisation de l'internalisation par microscopie à illumination structurée ...	187
5.4.	Evaluation de l'efficacité et de la sécurité des NPs <i>in vivo</i>	189
5.4.1.	Mise en place du modèle de rats insulinopéniques	189
5.4.2.	Efficacité des NPs	192
5.4.2.1.	Evaluation de la glycémie	192
5.4.2.2.	Evaluation de la biodisponibilité de l'insuline	194
5.4.3.	Evaluation de la sécurité des NPs <i>in vivo</i> par l'étude histopathologique de l'intestin	196
5.4.4.	Discussion	197

6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES 203

BIBLIOGRAPHIE	210
COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	230

LISTE DES FIGURES

Figure 2-1 : Prévalence du diabète à travers le monde en 2011 et prévisions pour 2030 (20-79 ans), et pourcentage de projection.....	24
Figure 2-2 : Prévalence des patients non diagnostiqués en 2011 (20-79ans).....	24
Figure 2-3 : Schématisation de la structure du pancréas	26
Figure 2-4 : Sécrétion physiologique d’insuline en fonction des apports en glucose (repas)..	27
Figure 2-5 : Mécanisme de la sécrétion d’insuline	28
Figure 2-6 : Représentation du récepteur de l’insuline	28
Figure 2-7 : Effet de l’insuline lors de la fixation sur son récepteur et de la phosphorylation d’IRS-1 et IRS-2.....	29
Figure 2-8 : Schématisation de l’effet de l’insuline sur la glycémie.....	29
Figure 2-9 : Structure primaire du glucagon	30
Figure 2-10 : Schématisation des actions périphériques du glucagon	30
Figure 2-11 : Structure primaire du GLP-1	31
Figure 2-12 : Schématisation des effets du GLP-1	32
Figure 2-13 : Schématisation de la distribution du glucose aux différents organes après ingestion de 100 g de glucose	33
Figure 2-14 : Schématisation de la régulation globale de la glycémie impliquant le stockage, la production et l’utilisation du glucose ainsi que la libération de l’insuline.....	34
Figure 2-15 : Schématisation des mécanismes immunitaires impliqués dans la destruction des cellules β pancréatiques.....	37
Figure 2-16 : Schématisation du développement de la pathogénie du diabète de type 1.....	38
Figure 2-17 : Schématisation des mécanismes impliqués dans l’hyperglycémie du diabète de type 2.....	40
Figure 2-18 : Structure de l’insuline	44
Figure 2-19 : Schématisation de la biosynthèse d’insuline.....	45
Figure 2-20 : Modifications de la structure de l’insuline native dans le cadre des analogues de l’insuline.....	46
Figure 2-21 : Schématisation de la formation de monomères pour les analogues de l’insuline et l’insuline humaine	47
Figure 2-22 : Schématisation de la structure et du mode d’action de l’insuline dégludec.....	48
Figure 2-23 : Photographie et schématisation de stylos injecteurs	50

Figure 2-24 : Photographie d'une pompe externe	51
Figure 2-25 : Schématisation d'une pompe implantable et de son implantation au niveau de l'abdomen.....	52
Figure 2-26 : Histogrammes représentant les raisons du refus des praticiens à débiter l'insulinothérapie chez les diabétiques de type 2	53
Figure 2-27 : Histogrammes représentant les raisons du refus des patients atteints de diabète de type 2 à l'insulinothérapie	54
Figure 2-28 : Schématisation du principe du pancréas artificiel externe	56
Figure 2-29 : Schématisation de l'encapsulation des cellules sécrétrices d'insuline dans le cadre du pancréas bioartificiel.....	56
Figure 2-30 : Photographies représentant les inhalateurs développés pour la délivrance d'insuline par voie pulmonaire.....	57
Figure 2-31 : Schématisation de la structure de l'épithélium intestinal et de ses surfaces de contact	60
Figure 2-32 : Schématisation de la diffusion de l'insuline après administration par voie sous-cutanée et orale.....	61
Figure 2-33 : Schématisation de la structure cellulaire de l'épithélium intestinal	62
Figure 2-34 : Schématisation des voies de passage de la barrière épithéliale de l'intestin.....	63
Figure 2-35 : Schématisation des jonctions intercellulaire des entérocytes.....	64
Figure 2-36 : Schématisation de l'épaisseur <i>in vivo</i> des couches de mucus chez le rat.....	65
Figure 2-37 : Schématisation de l'insuline HIM2 modifiée par liaison covalente à un oligomère.....	67
Figure 2-38 : Schématisation des différents vecteurs pour la délivrance d'insuline par voie orale.....	71
Figure 2-39 : Schématisation des différents types de liposomes monocouches	72
Figure 2-40 : Schématisation des différents types de vecteurs colloïdaux biodégradables	73
Figure 2-41 : Schématisation de la déacétylation de la chitine	75
Figure 2-42 : Schématisation de la dégradation du PLGA en acide lactique et acide glycolique métabolisés par le cycle de Krebs	77
Figure 2-43 : Schématisation des émulsions simples et doubles	79
Figure 2-44 : Schématisation des différentes voies d'entrée des NPs dans la cellule.....	83
Figure 2-45 : Schématisation de la distribution des NPs dans la cellule.....	85
Figure 2-46 : Schématisation des réactions en cascade et du rôle du stress oxydant générés par les NPs.....	86

Figure 2-47 : Schématisation du modèle hiérarchisé du stress oxydant	87
Figure 2-48 : Schématisation de l'effet de perméabilité et de rétention attribué aux NPs.....	89
Figure 2-49 : Schématisation de l'autophagie en présence de NPs.....	90
Figure 2-50 : Schématisation de la relation entre taille, surface, volume et nombre des NPs .	91
Figure 2-51 : Schématisation de l'influence des charges de surface des NPs sur l'internalisation cellulaire.....	92
Figure 2-52 : Représentation graphique de la proportion de molécules en surface en fonction du diamètre des NPs.....	93
Figure 2-53 : Schématisation de la formation de la couronne protéique autour de la NP	93
Figure 2-54 : Schématisation de la formation d'agglomérats et d'agrégats particuliers.....	94
Figure 3-1 : Schématisation du concept du vecteur pharmaceutique pour la délivrance d'insuline par voie orale.....	96
Figure 3-2 : Schématisation du principe de la délivrance de l'insuline par voie orale basée sur le système de la double encapsulation.....	98
Figure 4-1 : Photographie et caractéristiques de la gélule entérique adaptée au rat	101
Figure 4-2 : Equation de la biodisponibilité relative.....	103
Figure 4-3 : Schéma représentant le procédé de synthèse des NPs.....	105
Figure 4-4 : Procédé de purification des NPs.....	106
Figure 4-5 : Schématisation de la diffusion de la lumière par les nanoparticules.....	106
Figure 4-6 : Equation de Stokes-Einstein.....	107
Figure 4-7 : Schématisation de la différenciation des cellules HT29 après traitement au méthotrexate.....	109
Figure 4-8 : Photographie et schématisation d'une culture sur insert.....	111
Figure 4-9 : Schématisation de la mesure de TEER.....	112
Figure 4-10 : Schématisation du principe de la cytométrie en flux et de la détection des NPs fluorescentes.....	114
Figure 4-11 : Représentation d'un histogramme de cytométrie en flux montrant des cellules FITC+ et FITC-.....	115
Figure 4-12 : Schématisation du marquage cellulaire par l'iodure de propidium et l'annexine V.....	116
Figure 4-13 : Schématisation des résultats de marquage sous la forme de cytogramme	117
Figure 4-14 : Formule permettant le calcul de la perméabilité apparente.....	121
Figure 4-15 : Schématisation du principe de l'ELISA Multiplex	122

Figure 4-16 : Structure d'une molécule de glucose (A) et d'une molécule de streptozotocine (B).....	123
Figure 4-17 : Représentation de l'implantation du cathéter en intrapéritonéal.....	125
Figure 4-18 : Photographie du cathéter intraduodéal et de l'implantation chez le rat	125
Figure 4-19 : Schématisation de l'implantation du cathéter intraduodéal	126
Figure 4-20 : Schématisation du système cardiovasculaire de la région du cou.....	126
Figure 5-1 : Graphique représentant les cinétiques de délivrance de l'ibuprofène chez le rat après gavage avec des gélules enrobées et non enrobées.....	134
Figure 5-2 : Profil de distribution de l'intensité en fonction de la taille des NPs de 200 nm	138
Figure 5-3 : Profil de distribution de l'intensité en fonction de la taille des NPs de 400 nm	138
Figure 5-4 : Profil de distribution de l'intensité en fonction de la taille des NPs de 600 nm	138
Figure 5-5 : Profil de distribution de l'intensité en fonction de la taille des NPs de 800 nm	139
Figure 5-6 : Observation des NPs de différentes tailles en microscopie électronique en transmission.....	140
Figure 5-7 : Détermination du rendement d'encapsulation des NPs de 200 et 400 nm.....	141
Figure 5-8 : Evolution de la résistance électrique trans-épithéliale des différentes cultures en fonction du temps après ensemencement	142
Figure 5-9 : Photographie en microscopie optique des différentes cultures après coloration au bleu alcian et à l'hématoxyline.....	143
Figure 5-10 : Quantification de l'internalisation par cytométrie en flux des NPs de 200 nm en fonction de la dose après 4 h d'incubation avec une monoculture de cellules Caco-2	149
Figure 5-11 : Quantification de l'internalisation par cytométrie en flux des NPs de 200 nm en fonction de la dose après 4 h d'incubation avec la co-culture Caco-2/Rev	150
Figure 5-12 : Comparaison de l'internalisation des NPs de 200 nm en fonction de la dose après 4 h d'incubation entre les mono-cultures et les co-cultures.....	151
Figure 5-13 : Quantification par cytométrie en flux de la viabilité des cellules Caco-2 et co-cultures après incubation pendant 4 h avec des doses croissantes de NPs de 200 nm.....	152
Figure 5-14 : Cytogrammes moyens des cellules incubées avec 20 mg de NPs de 200 nm pendant 4 h et les cellules contrôles, représentant la répartition des cellules en fonction du marquage à l'iodure de propidium et à l'annexine-V APC.....	153
Figure 5-15 : Quantification de l'internalisation par cytométrie en flux des NPs en fonction de leur taille après incubation pendant 4 h avec les cellules Caco-2	154
Figure 5-16 : Quantification de l'internalisation par cytométrie en flux des NPs en fonction de leur taille après 4 h d'incubation avec les co-cultures	155

Figure 5-17 : Comparaison des internalisations des NPs de différentes tailles après 4 h d'incubation avec les mono-cultures et les co-cultures.....	156
Figure 5-18 : Quantification par cytométrie en flux de la viabilité cellulaire des cellules Caco-2 et co-cultures après 4 h d'incubation avec 20 mg de NPs de différentes tailles.....	156
Figure 5-19 : Cytogrammes moyens des cellules incubées avec des NPs de 200 nm pendant 4 h représentant la répartition des cellules en fonction du marquage à l'iodure de propidium et à l'annexine-V.....	157
Figure 5-20 : Internalisation, quantifiée par cytométrie en flux, des NPs de 200 et 400 nm par les cellules Caco-2 après 4h ou 24h d'incubation.....	158
Figure 5-21 : Internalisation, quantifiée par cytométrie en flux, des NPs de 200 et 400 nm par les co-cultures après 4 h et 24 h d'incubation.....	159
Figure 5-22 : Comparaison de l'internalisation des NPs de 200 et 400 nm par cytométrie en flux après 24 h d'incubation par les cellules Caco-2 et les co-cultures.....	160
Figure 5-23 : Quantification par cytométrie en flux de la viabilité cellulaire des cellules Caco-2 et des co-cultures après 24 h d'incubation avec 20 mg de NPs de 200 et 400 nm.....	160
Figure 5-24 : Cytogrammes moyens des cellules incubées avec des NPs de 400 nm pendant 24 h représentant la répartition des cellules en fonction du marquage à l'iodure de propidium et à l'annexine-V.....	161
Figure 5-25 : Evolution de la TEER des cellules Caco-2 et de la co-culture durant les 4 h d'incubation avec des NPs de 200 nm à différentes concentrations.....	163
Figure 5-26 : Evolution de la TEER des cellules Caco-2 et de la co-culture durant 4 h d'incubation avec des NPs de 400 nm à différentes concentrations.....	165
Figure 5-27: Evolution de la TEER des cellules Caco-2 et de la co-culture durant 24 h d'incubation avec des NPs de 200 nm à différentes concentrations.....	166
Figure 5-28: Evolution de la TEER des cellules Caco-2 et de la co-culture durant 24 h d'incubation avec des NPs de 400 nm à différentes concentrations.....	168
Figure 5-29 : Perméabilité apparente de la lucifer yellow dans des cultures de cellules Caco-2 et des co-cultures après incubation de NPs de 200 et 400 nm pendant 4h.....	169
Figure 5-30 : Perméabilité apparente du FD-20 dans des cultures de cellules Caco-2 et des co-cultures après incubation de NPs de 200 et 400 nm pendant 4h.....	170
Figure 5-31 : Perméabilité apparente de la lucifer yellow dans des cultures de cellules Caco-2 et des co-cultures après incubation de NPs de 200 et 400 nm pendant 24h.....	171
Figure 5-32 : Perméabilité apparente du FD 20 dans des cultures de cellules Caco-2 et des co-cultures après incubation de NPs de 200 et 400 nm pendant 24h.....	172

Figure 5-33 : Vue apicale des co-cultures incubées avec des NPs de 200 et 400 nm à différentes concentrations pendant 4h.....	173
Figure 5-34 : Quantification par ELISA Multiplex de la sécrétion de 5 cytokines après incubation des NPs de 200 ou 400 nm pendant 4h en fonction du type de culture.....	174
Figure 5-35 : Quantification par ELISA Multiplex de la sécrétion de 5 cytokines après 24 h d'incubation avec les NPs de 200 ou 400 nm en fonction des cultures	175
Figure 5-36 : Comparaison des sécrétions d'IL-8 en fonction de la taille des NPs et du temps d'incubation dans les deux types de culture.....	176
Figure 5-37 : Quantification par cytométrie en flux de l'internalisation des NPs après 4 h d'incubation à 4°C ou 37°C avec des cellules Caco-2.....	183
Figure 5-38 : Quantification par cytométrie en flux de l'internalisation des NPs après 4 h d'incubation à 4°C ou 37°C sur la co-culture	184
Figure 5-39 : Quantification par cytométrie en flux de l'internalisation des NPs de 200 nm dans les cellules Caco-2 ou la co-culture traitées ou non avec des inhibiteurs de voies d'internalisation.....	185
Figure 5-40 : Quantification par cytométrie en flux de l'exocytose des NPs de 200 et 400 nm par les cellules Caco-2 après 4 h	186
Figure 5-41 : Quantification par cytométrie en flux de l'exocytose des NPs de 200 et 400 nm par la co-culture après 4 h	186
Figure 5-42 : Observation par microscopie à illumination structurée de l'internalisation des NPs de 200 et 400 nm après 4 h et 24 h d'incubation avec des cellules Caco-2 et la co-culture	188
Figure 5-43 : Evolution de la masse des rats après injection de streptozotocine.....	189
Figure 5-44 : Evolution de la glycémie des rats après injection de streptozotocine	190
Figure 5-45 : Evolution de la C-peptidémie des rats après injection de streptozotocine.....	191
Figure 5-46 : Suivis glycémiques de rats diabétiques après administration intrapéritonéale de NPs de 200 et 400 nm, d'insuline non encapsulée et de sérum physiologique.....	193
Figure 5-47 : Suivis glycémiques de rats diabétiques après administration intraduodénale de NPs de 200 et 400 nm, d'insuline non encapsulée et de sérum physiologique.....	194
Figure 5-48 : Quantification par dosage ELISA de l'insuline plasmatique chez le rat diabétique après administration IP d'insuline non encapsulée ou de NPs	195
Figure 5-49 : Quantification par dosage ELISA de l'insuline plasmatique chez le rat diabétique après administration ID d'insuline non encapsulée ou de NPs	196

Figure 5-50 : Observation au microscope optique de l'épithélium intestinal de rats 12 h après injections intraduodénales 197

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2-1 : Tableau représentant les paramètres cinétiques des différentes insulines	46
Tableau 2-2 : Tableau récapitulatif des différentes insulines commercialisées	49
Tableau 2-3 : Tableau récapitulatif des avantages et inconvénients des différentes voies d'administration d'insuline envisagées	59
Tableau 2-4 : Tableau récapitulatif des différentes stratégies de délivrance de l'insuline par voie orale et leur état d'avancement clinique	69
Tableau 2-5 : Tableau récapitulatif des principaux polymères naturels et leur formule chimique	74
Tableau 2-6 : Tableau récapitulatif des principaux polymères synthétiques, et leur formule chimique	76
Tableau 2-7 : Tableau récapitulatif des mécanismes, avantages et inconvénients du chitosane et du PEG	80
Tableau 4-1 : Tableau récapitulant les conditions d'agitation permettant de synthétiser des NPs de taille croissante	105
Tableau 4-2 : Tableau représentant les différentes voies d'internalisation des NPs et leurs inhibiteurs	119
Tableau 5-1 : Tableau récapitulatif des tailles, indices de polydispersité et potentiel zêta des différentes NPs synthétisées	137

LISTE DES ABREVIATIONS

ADO : Anti-Diabétiques Oraux	GLP-1 : Glucagon-like peptide 1
AG : Acides Gras	HBSS : Hanks' Balanced Salt solution
ALX : Alloxane	HIM2 : Hexyl Insulin Monoconjugate 2
APC : Allophycocyanine	HLA : Human Leukocyte Antigen
ATP : Adenosine Triphosphate	HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance
AUC : Area under the curve	IC : Intra-carotidien
BaCl₂ : Chlorure de baryum	ID : Intraduodéal
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité	IFNγ : Interferon gamma
DDL : Diffusion Dynamique de la Lumière	IGF-1 : Insulin-like Growth Factor 1
DHFR : Dihydrofolate reductase	IL-1β : Interleukine-1 beta
DLS : Dynamic Light Scattering	IL-6 : Interleukine-6
DMA : Dimethyl amiloride	IL-8 : Interleukine-8
DMEM : Milieu essentiel minimum de Eagle modifié par Dulbecco	IP : Intrapéritonéal
DPP-4 : Dipeptidyl Peptidase-4	IR : Insulin Receptor
DT1 : Diabète de type 1	IRS : Insulin Receptor Substrate
DT2 : Diabète de type 2	Lov : Lovastatine
EGTA : Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid	LUV : Large Uni-lamellar Vesicles
EPR : Enhanced Permeability and Retention effect	LY : Lucifer Yellow
FD20 : FITC Dextran 20	MBC : Méthyl- β -cyclodextrine
FDA : Food and Drug Administration	MET : Microscope électronique à transmission
FITC : Fluorescein isothiocyanate	MTX : Méthotrexate
F_R : Biodisponibilité Relative	MW : Molecular weight
FSC : Forward Scatter	NaN₃ : Azide de sodium
Gcgr : Récepteur du glucagon	NFκB : Nuclear factor-kappa B
GIP : Glucose-dependant Insulinotropic Polypeptide	NLC : Nanostructured lipid carriers
Glc : 2-désoxy-D-glucose	NPH : Neutral Protamine Hagedorn
	NPs : Nanoparticules
	NYS : Nystatine
	OMS : Organisation Mondiale de le Santé

ORAIL : Oral Administration of Insulin
PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor 1
PBS : Phosphate buffered Saline
PdI : Polydispersity Index
PET : Polyéthylène Téréphtalate
P-gp : P-glycoprotein
PI : Propidium iodide
PKC : Phosphokinase C
PLGA : Poly (lactic-co-glycolic) acid
PMA : Phorbol-12-myristate-13-acétate
PP : Polypeptide pancréatique
PPAR γ : Peroxisome proliferator-activated receptor γ
PS : Phosphatidyl Sérine
PVA : Polyvinyl Alcohol
Rev : Rev HT29-MTX M6
ROS : Reactive oxygen species
SEM : Erreur Standard Moyenne
SHBG : Sex hormone-binding globulin
SLN : Solid Lipid Nanoparticle
SSC : Side Scatter
STZ : Streptozotocine
SUV : Small Uni-lamellar Vesicles
SVF : Sérum de Veau Fœtal
TCF7L2 : Transcription factor 7-like 2
TNF α : Tumor necrosis factor alpha
UA : Unité arbitraire
ZO-1 : Zonula Occludens-1
ZOT : Toxine Zonula Occludens

1. PROBLEMATIQUE

Le diabète est considéré de nos jours comme une pandémie grandissante. Le nombre de diabétiques est en croissance continue, et devrait atteindre les 550 millions en 2030 à travers le monde. L'insuline est systématiquement prescrite aux personnes atteintes d'un diabète insulino-dépendant, (le diabétique de type 1) et à de nombreux diabétiques de type 2. Le traitement consiste en des injections pluriquotidiennes d'insuline. Malgré l'efficacité des insulines actuelles et l'amélioration des modes d'administration, l'insulinothérapie reste contraignante. Ainsi, afin d'améliorer la qualité de vie du patient diabétique, l'insulinothérapie doit aujourd'hui être simple d'utilisation, avec une efficacité similaire ou améliorée, et une action plus physiologique. L'administration d'insuline par voie orale répond à tous ces critères. Cependant, la nature même de l'insuline et son instabilité dans le tractus digestif sont des limites majeures à la délivrance de l'hormone par voie orale. La protection de l'insuline est donc primordiale. C'est dans ce contexte que se sont développés les vecteurs pharmaceutiques complexes permettant une administration d'insuline simple et physiologique. L'encapsulation de l'insuline sous un format nanoparticulaire est l'une des stratégies adoptées pour une protection de l'hormone au niveau digestif. L'amélioration de l'efficacité de ces nanoparticules est en constant développement, afin de garantir une meilleure biodisponibilité de l'insuline. Cependant, les risques toxicologiques liés aux nano-objets restent à définir et une meilleure maîtrise de l'équilibre entre toxicité et efficacité est devenue indispensable dans les stratégies de conception de nanoparticules à visée thérapeutique. Une étude de la sécurité de ces nanoparticules est ainsi nécessaire pour un développement optimal d'un système de délivrance orale d'insuline.

2. INTRODUCTION

2.1. Le diabète

2.1.1. Définition du diabète et épidémiologie

Le diabète est caractérisé par une hyperglycémie chronique. Cette hyperglycémie est définie par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) comme une glycémie à jeun supérieure à 1,26 g/L (ou 7,0 mmol/L) ou comme une hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO) à 2 g/L (11,1 mmol/L), 120 min après avoir ingéré 75 g de glucose.

Il existe plusieurs types de diabète, dont les deux principaux sont le diabète de type 1 et le diabète de type 2.

Le diabète peut être qualifié de pandémie. En effet, aucun pays au monde n'est épargné par la maladie. De plus, le nombre de patients diabétiques augmente de manière vertigineuse depuis ces dernières années ; il a atteint le record de 347 millions de diabétiques à travers le monde en 2011 (Danaei *et al.*, 2011). La prévalence du diabète augmente parallèlement au vieillissement, à l'urbanisation, à la sédentarité et au développement de l'obésité dans les populations des pays industrialisés. Cette maladie n'épargne pourtant pas les pays en voie de développement où le diabète de type 2 atteint parfois une prévalence de 20 à 30 %, en raison d'une prédisposition génétique couplée à une modification rapide du mode de vie : urbanisation brutale, sédentarisation et alcoolisation des populations.

En 2011 en Europe, 52,6 millions de diabétiques ont été dénombrés, et on estime que ce nombre pourrait atteindre les 64 millions en 2030. En France, on compte environ 3,2 millions de diabétiques, représentant 7,3% de la population totale. D'après les prévisions, La France comptera environ 3,8 millions de diabétiques en 2030 (**Fig. 2-1**) (Whiting *et al.*, 2011).

Aux Etats-Unis, on dénombrait environ 23,7 millions de diabétiques en 2011, avec pour prévision plus de 29 millions de malades en 2030, représentant 11,8% de la population.

Le diabète connaît une expansion jamais égalée, avec un développement dans les pays moins atteints auparavant par la maladie, comme la Chine qui comptait 90 millions de diabétiques en 2011 et qui atteindra le chiffre record de 129,7 millions en 2030, soit 12,1 % de la population. La plus grande progression estimée revient à l'Arabie Saoudite qui en 2030 aura plus de 20% de sa population diabétique (Whiting *et al.*, 2011).

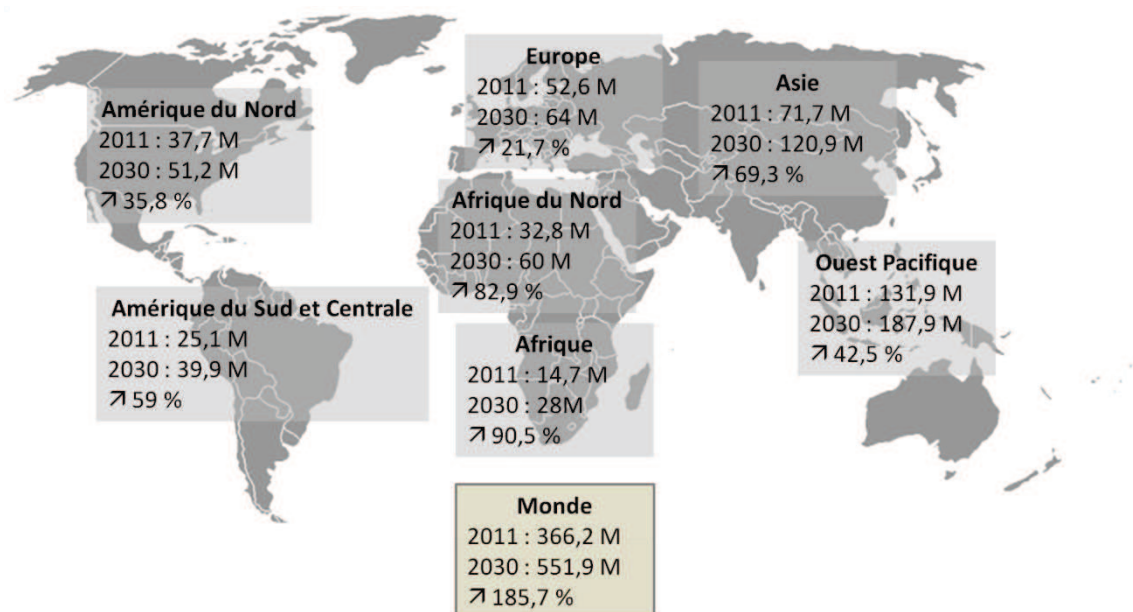


Figure 2-1 : Prévalence du diabète à travers le monde en 2011 et prévisions pour 2030 (20-79 ans), et pourcentage de projection.
(D'après Whithing *et al.*, 2011)

Cependant, ces chiffres ne sont pas entièrement exacts. En effet, et principalement pour les diabétiques de type 2, beaucoup de personnes atteintes par la maladie l'ignorent, notamment dans les pays nouvellement touchés par le diabète (**Fig. 2-2**).

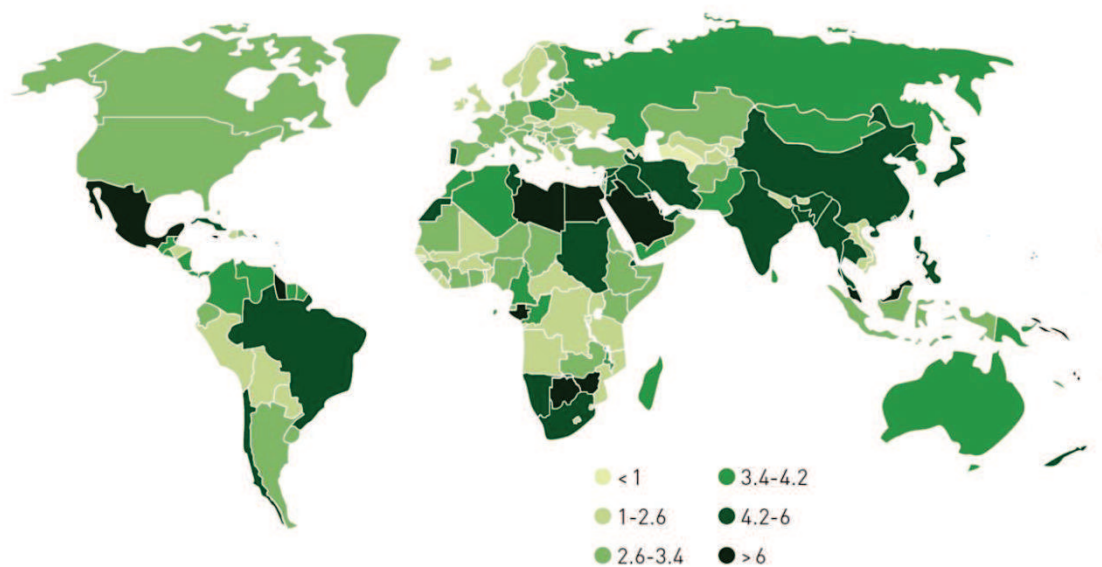


Figure 2-2 : Prévalence des patients non diagnostiqués en 2011 (20-79ans)
(D'après www.idf.org)

Le mode de vie traditionnel et les régimes ancestraux qui ont nourri les peuples pendant des générations sont en train de disparaître. Les réalités socio-économiques forcent les familles à

quitter les espaces ruraux pour les villes, sources d'emplois. Les repas déstructurés, les grignotages et la baisse de l'activité physique expliquent en partie l'explosion du surpoids et de l'obésité actuellement observés dans le monde, toujours suivie quelques années plus tard d'une augmentation importante du nombre de diabétiques. Le diabète de type 2 est d'ailleurs plus fréquent dans les espaces urbains, et dans les milieux socio-économiques défavorisés.

2.1.2. La glycémie et sa régulation

Le taux de sucre dans le sang, ou glycémie, doit être maintenu dans des valeurs comprises entre 0,8 et 1,26 g/L. La régulation de la glycémie fait intervenir plusieurs organes, impliqués dans la sécrétion d'insuline, l'unique hormone hypoglycémiante, dans la sécrétion de glucagon, hormone hyperglycémiante, et dans l'utilisation du glucose.

Cette régulation de la glycémie est fondamentale afin d'éviter les complications aiguës et chroniques liées aux hypoglycémies et hyperglycémies.

2.1.2.1. Régulation de la glycémie par le pancréas et l'intestin

2.1.2.1.1. Par le pancréas

2.1.2.1.1.1. Structure du pancréas

Le pancréas est une glande mixte richement vascularisée et innervée, composée de tissus exocrines et autocrines.

Le pancréas exocrine est composé majoritairement d'acini, regroupement de cellules excrétrices. La fonction principale de ces cellules est la sécrétion d'enzymes tels que les lipases et le trypsinogène qui sont alors transportées dans l'intestin via le réseau de capillaires adjacents.

La partie endocrine est formée par des cellules regroupées en îlots, anciennement appelé îlots de Langerhans. La sécrétion d'hormones et de protéines par ces îlots pancréatiques est assurée par différents types cellulaires : les cellules β , les cellules α , les cellules δ , et les cellules PP (**Fig. 2-3**).

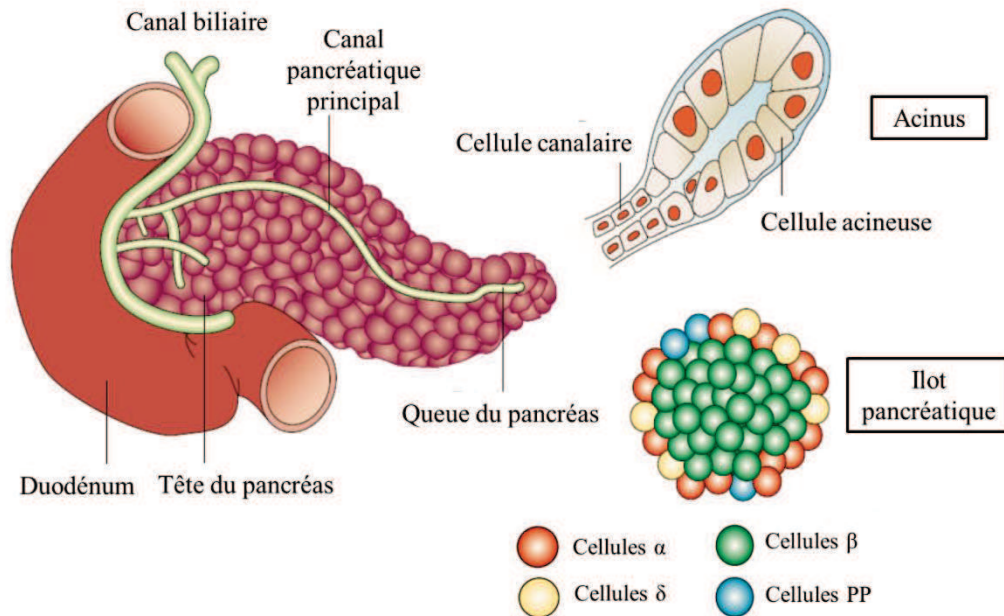


Figure 2-3 : Schématisation de la structure du pancréas
(D'après Edlund, 2002)

Les cellules β , représentant 60 à 80% des cellules des îlots, assurent la synthèse et la sécrétion d'insuline. Les cellules α , représentant 15 à 20 % des cellules des îlots, sécrètent le glucagon, hormone hyperglycémiant, par le biais de l'augmentation de la glycogénolyse et de la néoglucogenèse. Les cellules δ (5 à 10 %) sécrètent la somatostatine qui inhibe la sécrétion de deux hormones ci-dessus. Et enfin, les cellules PP (< 2%) sécrètent le polypeptide pancréatique (PP) permettant aussi l'inhibition de ces deux hormones (Edlund, 2002).

2.1.2.1.1.2. Régulation glycémique impliquant le pancréas

- L'insuline

Le pancréas relargue une quantité d'insuline en fonction de la concentration plasmatique en glucose. L'insuline, dont la structure sera abordée plus tard dans ce manuscrit, est sécrétée afin de contrebalancer l'apport et l'augmentation de glucose sanguin aux différents moments de la journée (**Fig. 2-4**). En effet, le glucose est libéré dans le sang de façon basale, par le foie ou par les muscles. Cette libération est accompagnée d'une sécrétion d'insuline basale, elle aussi. Quelques temps après les repas, le glucose atteint la circulation sanguine provoquant une augmentation de la glycémie. C'est la glycémie postprandiale. L'insuline est alors sécrétée rapidement de manière plus importante afin de contrebalancer l'augmentation rapide de la glycémie. C'est l'insulinémie postprandiale.

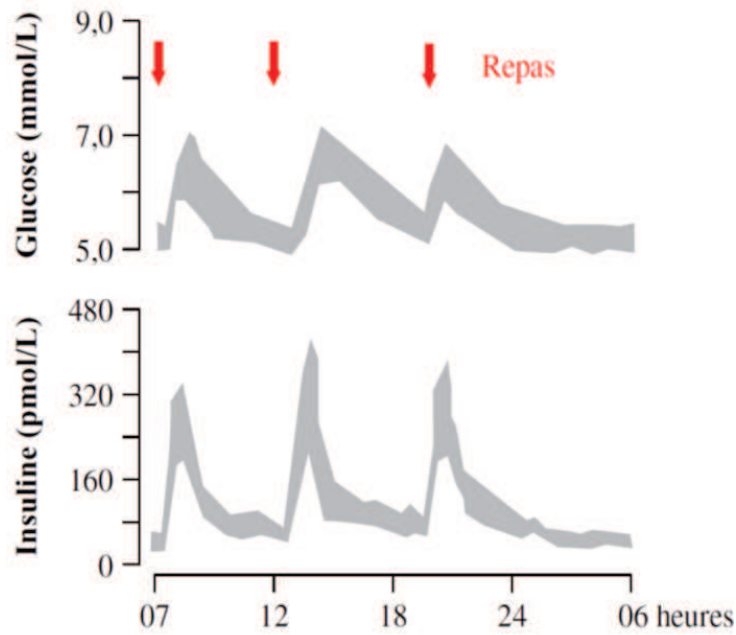


Figure 2-4 : Sécration physiologique d'insuline en fonction des apports en glucose (repas)
(D'après Moreau *et al.*, 2007)

Les cellules β pancréatiques réagissent à l'augmentation de la glycémie en capturant le glucose. Cette capture se fait principalement par les transporteurs GLUT-2 situés à la surface des cellules. Le glucose est internalisé, il y subit le cycle de la glycolyse où il est phosphorylé en glucose-6-phosphate par la glucokinase. Ce glucose phosphorylé est transformé en pyruvate. Les différentes étapes de ce cycle entraînent la libération d'ATP/ADP qui entrera en jeu dans la libération de l'insuline. Le pyruvate formé est pris en charge dans le cycle de Krebs situé au niveau de la mitochondrie. Il en résulte de la formation d'acétyl-CoA et d'ATP/ADP. La présence d'ATP dans le cytoplasme engendre la fermeture des canaux K^+ et favorise la dépolarisation de la membrane. Les canaux Ca^{2+} voltage-dépendants, sensibles à cette dépolarisation, entraînent une augmentation de l'internalisation de Ca^{2+} au niveau du cytoplasme, ce qui stimule alors la sécrétion de l'insuline contenue dans les granules (**Fig. 2-5**) (Fu *et al.*, 2013). Dans les granules, l'insuline est organisée sous forme d'hexamères autour de deux ou quatre atomes de zinc. Cet assemblage lui permet une meilleure stabilité (Culina *et al.*, 2013). Une fois dans la circulation sanguine, ces hexamères se dissocient et forment des monomères biologiquement actifs.

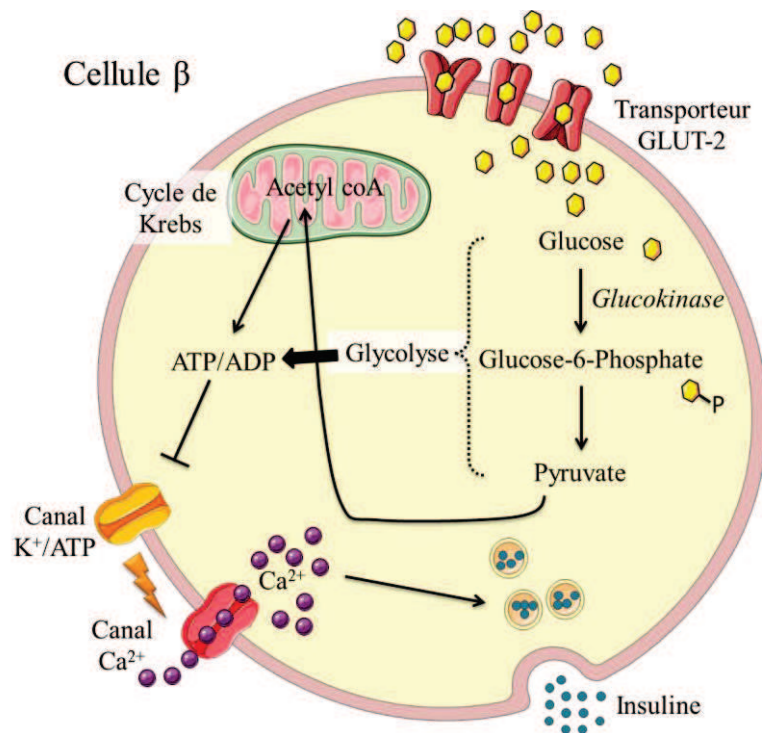


Figure 2-5 : Mécanisme de la sécrétion d'insuline

L'insuline est internalisée par ses récepteurs, qui sont ubiquitaires chez l'homme. Le nombre de ces récepteurs peut varier en fonction du type cellulaire. White (1997) a décrit la présence de 40 récepteurs sur les érythrocytes, et jusqu'à 200 000 sur les adipocytes et les hépatocytes. Le récepteur à l'insuline, ou insulin receptor (IR), est une protéine tétramérique constituée de deux sous-unités α extracellulaires (135 kDa), et de deux sous-unités β transmembranaires (95 kDa). Ces sous-unités sont reliées entre elles par des ponts disulfures (Chiu et Cline, 2010; Yip et Ottensmeyer, 2003) (Fig. 2-6).

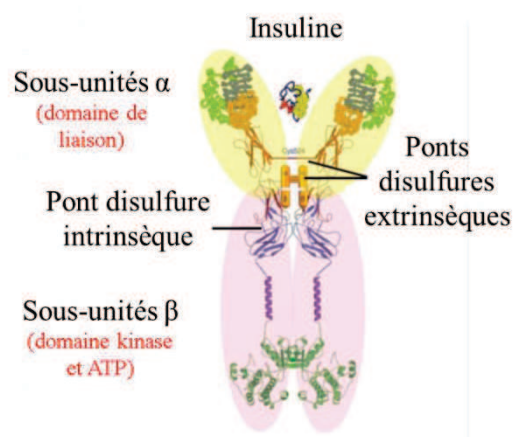


Figure 2-6 : Représentation du récepteur de l'insuline (D'après Chiu et Cline, 2010)

La fixation de l'insuline sur ce récepteur se fait sur les sites de liaison à l'insuline sur les sous-unités α . Les sous-unités β ont un domaine à activité tyrosine kinase permettant l'autophosphorylation de cette sous-unité, ce qui engendre la phosphorylation des protéines substrats du récepteur (IRS). Les substrats majeurs de ce récepteur sont IRS-1 et IRS-2. Cette phosphorylation est responsable alors des différentes actions attribuées à l'insuline (**Fig. 2-7**) (Rhodes et White, 2002).

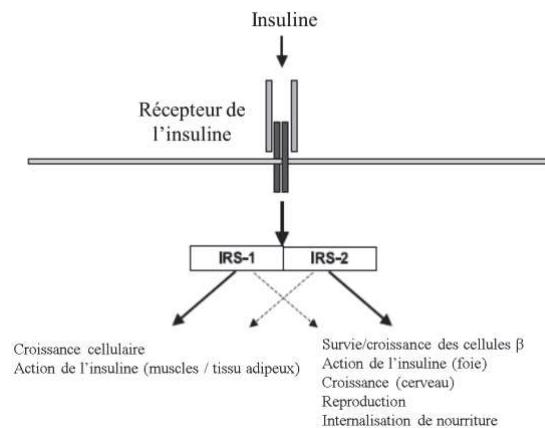


Figure 2-7 : Effet de l'insuline lors de la fixation sur son récepteur et de la phosphorylation d'IRS-1 et IRS-2
(D'après Rhodes et White, 2002)

L'insuline va réguler la glycémie par trois actions : en favorisant l'internalisation du glucose, en activant la glycogénogénèse, et en stimulant l'oxydation du glucose. Elle va aussi favoriser l'internalisation des acides gras (AG) et empêcher la transformation des triglycérides en AG (Saltiel et Kahn, 2001) (**Fig. 2-8**).

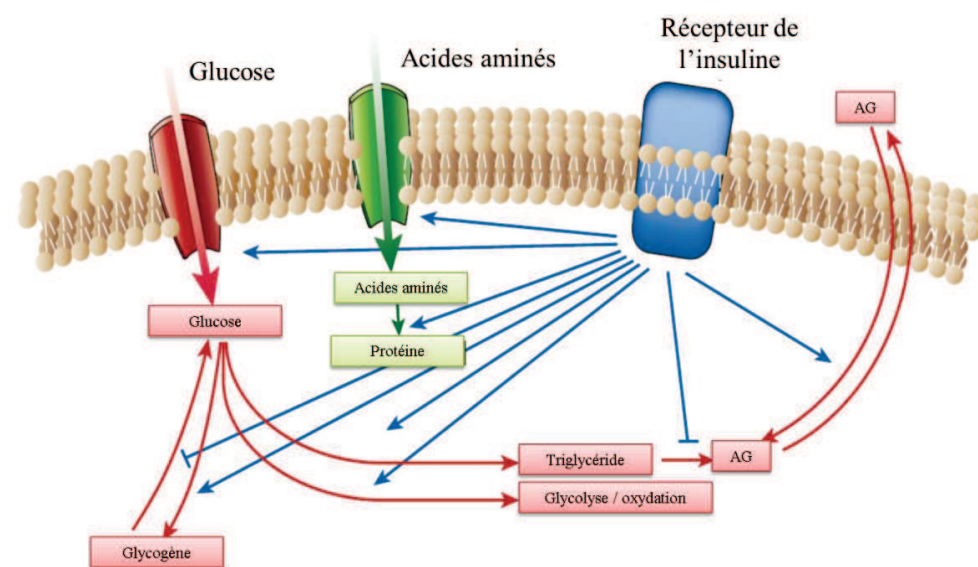


Figure 2-8 : Schématisation de l'effet de l'insuline sur la glycémie
(D'après Saltiel et Khan, 2001)

Le récepteur à l'insuline est ensuite recyclé, et est envoyé à la membrane cellulaire par phénomène de fusion membranaire (Duckworth *et al.*, 1998; Jacobs et Cuatrecasas, 1983).

- Le glucagon

Le glucagon est une hormone hyperglycémisante nécessaire à l'équilibre glycémique. C'est un polypeptide d'un poids moléculaire de 3,5 kDa constitué de 29 acides aminés (Fig. 2-9) (Brubaker et Drucker, 2002).



Figure 2-9 : Structure primaire du glucagon
(D'après Cho *et al.*, 2012)

Le glucagon est d'abord synthétisé à partir d'un précurseur, le pro-glucagon, dans les cellules endocrines α pancréatiques. Les actions de ce polypeptide sont multiples et agissent à plusieurs niveaux périphériques. Une des fonctions principales du glucagon est de favoriser la lipolyse dans les tissus adipeux et la glycogénolyse ainsi que la néoglucogenèse au niveau du foie (Cho *et al.*, 2012) (Fig. 2-10).

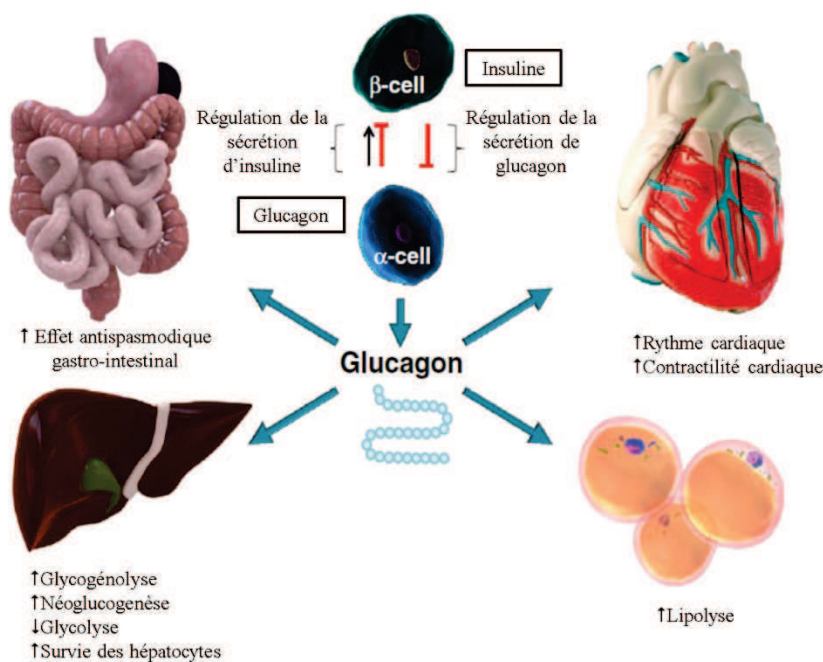


Figure 2-10 : Schématisation des actions périphériques du glucagon
(D'après Cho *et al.*, 2012)

L'action du glucagon est médiée par son récepteur, Gcgr, présent dans de nombreux organes comme le foie, le cerveau, le pancréas, l'intestin, les muscles, le cœur et les reins (Christensen *et al.*, 2011). Ce récepteur, d'une séquence de 485 acides aminés, stimule l'adénylate cyclase et permet l'augmentation du calcium intracellulaire lorsqu'il est activé par son ligand (Sinclair et Drucker, 2005). La sécrétion du glucagon par les cellules α pancréatiques est médiée majoritairement par la liaison du glucose à son récepteur, par la production d'ATP/ADP au niveau de la mitochondrie, par l'entrée de calcium dans la cellule et par la libération du glucagon par exocytose.

2.1.2.1.2. Par l'intestin

L'intestin a un rôle important dans la régulation de la glycémie. Il agit dans cette régulation par l'intermédiaire du GLP-1 ou Glucagon-like peptide-1, formé après la libération du pro-glucagon dans la circulation sanguine, et par le clivage de ce polypeptide par les cellules L intestinales en réponse à l'ingestion d'aliments (Roberge et Brubaker, 1993). Le GLP-1 est un petit peptide de 30 acides aminés ayant différentes actions périphériques (**Fig. 2-11**).



Figure 2-11 : Structure primaire du GLP-1
(D'après Cho *et al.*, 2012)

Ses actions principales se portent sur le pancréas ; elles favorisent la sécrétion d'insuline, et en parallèle, elles diminuent la sécrétion du glucagon (**Fig. 2-12**).

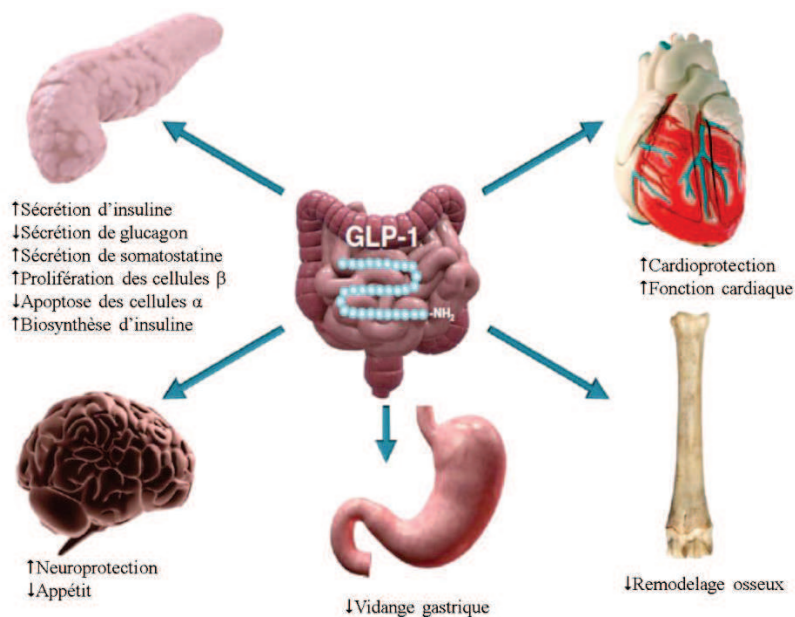


Figure 2-12 : Schématisation des effets du GLP-1
(D'après Cho *et al.*, 2012)

Le GLP-1 agit grâce aux récepteurs GLP-1R, exprimés dans de nombreux types cellulaires tels que ceux des îlots pancréatiques, du cerveau, du cœur, etc. Il est rapidement dégradé par la dipeptidylpeptidase-4 (DPP-4), enzyme ubiquitaire et peu spécifique, présentes dans la plupart des tissus dont ceux des reins, des poumons, du foie, du pancréas.

Le GLP-1 est une incrétine, tout comme son homologue, le glucose-dépendant insulino-tropique polypeptide (GIP). Celui-ci est sécrété par les cellules du duodénum en présence de glucose et d'acides gras libres, et a un rôle insulino-trope en présence d'un taux de glucose égal ou supérieur à la normoglycémie au niveau de l'intestin (Thorens, 2003). Il est aussi dégradé par la DPP-4.

Cinquante pourcent de la sécrétion d'insuline après un repas seraient liés aux actions des incrétines (Virally *et al.*, 2008).

2.1.2.2. Apport et production de glucose

La majorité du glucose est apportée dans l'organisme par l'alimentation sous forme d'amidon et de saccharose (Lecleire, 2008). Ce glucose assimilé au niveau intestinal, passe dans la circulation sanguine afin d'être dirigé vers différents tissus.

Certains organes sont aussi capables de produire du glucose lorsque l'apport exogène par l'alimentation est insuffisant. Ces organes ont un point commun, l'enzyme glucose-6-phosphatase, permettant l'hydrolyse du glucose-6-phosphate en glucose.

Le foie a la capacité de maintenir un équilibre glycémique normal. En effet, il peut capter le glucose, le stocker, mais aussi le libérer par les phénomènes de glycogénolyse et néoglucogenèse. Cette production, appelée l'autorégulation hépatique, est indépendante de la sécrétion de l'insuline. Elle est possible par la présence de glucose-6-phosphatase dans les hépatocytes. Le foie est ainsi responsable de 80% de l'apport du glucose en période post-absorptive (Shrayyef et Gerich, 2010). Les mécanismes impliqués dans cette production sont la glycogénolyse et la néoglucogenèse. Le phénomène de glycogénolyse intervient dans la libération du glucose stocké sous forme de glycogène et dans son hydrolyse. La glycogénolyse est le phénomène majoritairement impliqué dans la production de glucose (50%), alors que la néoglucogenèse n'intervient que lorsque tout le glycogène a été hydrolysé en glucose (30 %) (Shrayyef et Gerich, 2010).

Les reins sont aussi capables de produire du glucose, majoritairement en cas d'acidose ou de jeûne prolongé. Comme les reins ne stockent pas de glucose sous forme de glycogène, ils produisent alors du glucose par des réactions de néoglucogenèse à partir du lactate, du glycérol et de la glutamine. Cette production compte pour 20% de la production totale de glucose.

2.1.2.3. Utilisation et stockage du glucose

Le glucose est utilisé par des organes ou par des tissus étant totalement ou partiellement dépendant du glucose (Fig. 2-13).

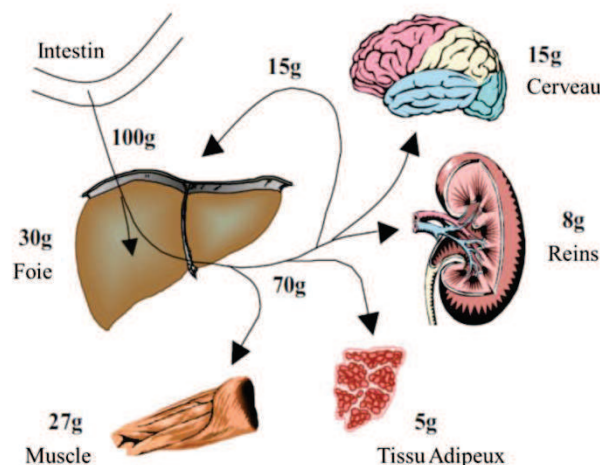


Figure 2-13 : Schématisation de la distribution du glucose aux différents organes après ingestion de 100 g de glucose
(D'après Shrayyef et Gerich, 2010)

Le glucose est majoritairement utilisé par le cerveau. De par ses importants besoins énergétiques, cet organe utilise en effet de 40 à 60 % des besoins totaux en glucose de l'organisme (Shrayyef et Gerich, 2010). Dans le cerveau, le glucose est totalement oxydé.

Les muscles ont aussi un besoin important en glucose, surtout lors d'efforts physiques, c'est pourquoi 15 à 20 % du glucose circulant est absorbé dans les myocytes. Les muscles ont aussi la capacité de stocker le glucose sous la forme de glycogène, afin de subvenir aux besoins énergétiques plus importants dans le cadre d'un effort physique.

Les reins captent 10 à 15% du glucose circulant, car les besoins énergétiques nécessaires pour effectuer ses actions de filtration et réabsorption sont importants.

Quant aux tissus adipeux, ils possèdent des récepteurs GLUT-4 au glucose et ont besoin majoritairement de glucose pour transformer les acides gras en triglycérides. Leur capture est à hauteur de 2 à 4%.

L'action de l'insuline joue un rôle dans l'utilisation et le stockage du glucose, suite à la capture de l'hormone par les différents organes producteurs et/ou utilisateurs de glucose (**Fig. 2-14**).

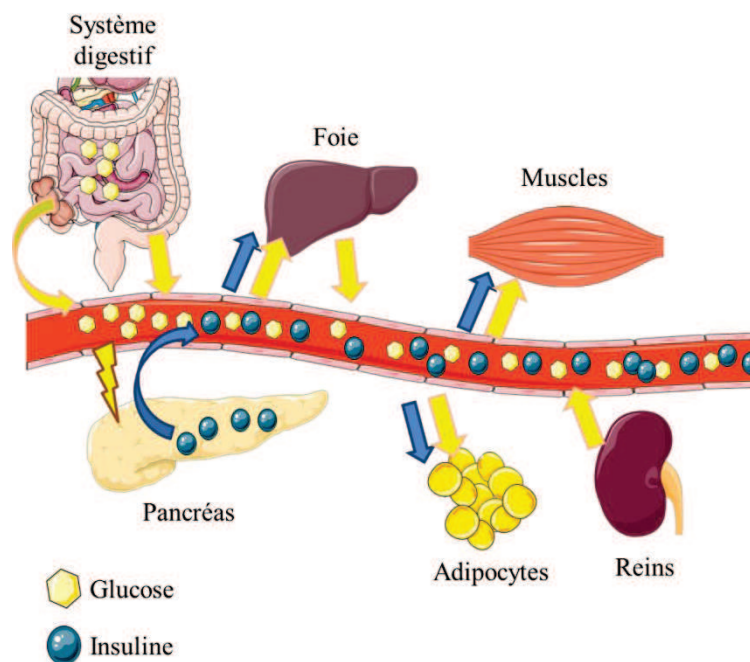


Figure 2-14 : Schématisation de la régulation globale de la glycémie impliquant le stockage, la production et l'utilisation du glucose ainsi que la libération de l'insuline

2.1.3. Le diabète de type 1

Le diabète de type 1 (DT1) est un diabète insulino-dépendant, anciennement appelé diabète juvénile, car il survient chez les patients jeunes, en moyenne âgés de moins de 20 ans

(Daneman, 2006). Ce diabète, qui concerne 5 à 10% des patients diabétiques, a pour conséquence la destruction des cellules β pancréatiques et une insulino-pénie (American Diabetes Association, 2013; Daneman, 2006).

Il s'agit d'une maladie auto-immune, caractérisée par une activation anormale d'une famille de cellules clés du système immunitaire, les lymphocytes T, vis-à-vis de substances ou tissus normalement présents dans l'organisme, en l'occurrence les cellules β pancréatiques. Les lymphocytes B sont également activés ; ils produisent des auto-anticorps capables de se fixer sur les cellules β . La détection des auto-anticorps est un bon test biologique pour diagnostiquer le diabète de type 1 chez les sujets dont la glycémie est élevée. Le diabète de type 1 est engendré par des causes à la fois génétiques et environnementales (Wucherpfennig et Eisenbarth, 2001).

2.1.3.1. Facteurs génétiques

Les modifications génétiques qui contribuent au développement du diabète de type 1 peuvent être multiples et peuvent atteindre une quarantaine de loci (Rewers, 2012). Les sources du développement du diabète sont complexes, et certains gènes sont plus visés que d'autres dans la maladie (Wucherpfennig et Eisenbarth, 2001). Chez les jumeaux monozygotes, si l'un des jumeaux est diabétique de type 1, l'autre le sera dans plus de 30 % des cas. On ne peut retenir l'argument d'un environnement commun aux deux jumeaux qui augmenterait le risque de déclenchement du diabète, puisque chez les jumeaux dizygotés, le risque d'apparition d'un diabète de type 1 dans la fratrie n'est plus que de 5 %.

Le complexe CMH, présent sur le chromosome 6, est incriminé dans le développement du diabète. Il est composé de plusieurs gènes sur le locus HLA (Human leukocyte antigen) encodant pour des molécules HLA de classe I et II. Ces molécules ont pour fonction principale, la présentation de l'antigène des cellules aux lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ (Notkins, 2002). Les haplotypes HLA-DQ et HLA-DR sont en majorité responsables de la maladie (van Lummel *et al.*, 2012).

Le gène de l'insuline est aussi incriminé. En effet, ce gène comporterait des répétitions polymorphiques dans sa région promotrice (van Belle *et al.*, 2011).

2.1.3.2. Facteurs environnementaux

Les impacts environnementaux sur le diabète de type 1 sont beaucoup moins bien documentés (Culina *et al.*, 2013). Les suppositions se tournent dans un premiers temps vers les infections aux entérovirus (Akerblom et Knip, 1998). La rubéole congénitale serait alors l'exemple même du développement du diabète de type 1 induit par infection virale (Menser *et al.*, 1978), bien que cette maladie soit quasiment éradiquée aujourd'hui.

Les suppositions se tournent également vers la sous-espèce des coxsackie virus, qui ont été détectés dans le sérum de patients diabétiques par rapport à des sujets sains (Gamble *et al.*, 1969).

Akerblom et Knip (2002) ont aussi décrit un lien entre les protéines de lait introduites trop précocement dans l'alimentation du nourrisson et le développement de mécanismes auto-immuns. Il semblerait que chez les enfants diabétiques de type 1 nourris avec du lait de vache, il y ait une réactivité croisée entre des protéines du lait et des antigènes des cellules β résultant de l'activation des lymphocytes T (Harrison et Honeyman, 1999).

Les facteurs environnementaux peuvent aussi être de nature bactérienne. En effet, les diabétiques de type 1 voient leur flore intestinale se dégrader, et celle-ci forme de moins en moins une barrière étanche, qui alors, ne sépare plus correctement les bactéries du système immunitaire. La présentation des antigènes bactériens, ainsi que l'augmentation de la perméabilité de l'épithélium intestinal, peuvent engendrer une réaction immunitaire et pourrait déclencher l'auto-immunité diabétique (Vaarala *et al.*, 2008).

2.1.3.3. Pathogénie du diabète de type 1

La destruction des cellules β pancréatiques peut se faire de manière directe ou indirecte. De manière directe, les antigènes présents à la surface des cellules sont reconnus par les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques qui activent une cascade de réactions entraînant l'apoptose des cellules β . De manière indirecte, les antigènes des cellules forment un complexe avec les cellules présentatrices de l'antigène, comme les macrophages ou les cellules dendritiques et sont reconnus par les lymphocytes T helper CD4⁺. Ce complexe entre les cellules présentatrices d'antigène et les lymphocytes engendre la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires qui déclenche l'apoptose des cellules β (**Fig. 2-15**) (Notkins, 2002).

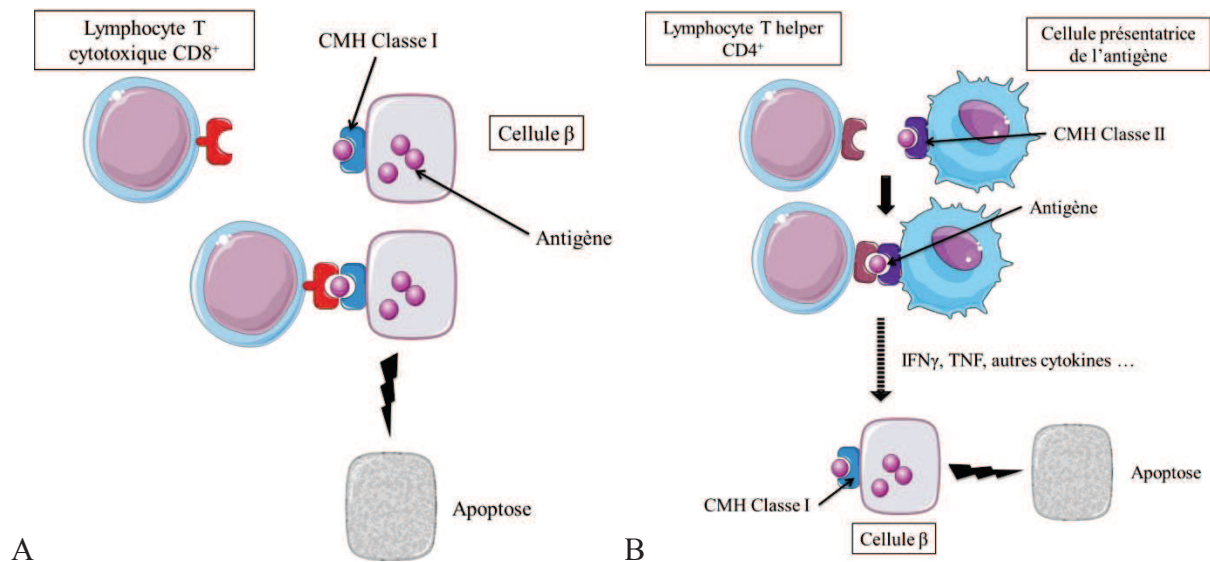


Figure 2-15 : Schématisation des mécanismes immunitaires impliqués dans la destruction des cellules β pancréatiques (A : Mécanismes directs, B : Mécanismes indirects (D'après Notkins, 2002))

L'infiltration des lymphocytes T au sein des îlots pancréatiques se développe petit à petit et stimule les lymphocytes B, responsables de la production d'auto-anticorps.

Dans 85 à 95% des cas de diabète de type 1, la présence d'un ou de plusieurs auto-anticorps contre des antigènes des cellules β est détectée (American Diabetes Association, 2013; Wucherpfennig et Eisenbarth, 2001). Ces auto-anticorps sont principalement les anticorps dirigés contre l'insuline (IAA), la tyrosine phosphatase (IA-2A), la décarboxylase de l'acide glutamique (GADA) et le transporteur du zinc (ZnT8A), antigènes des îlots (Rewers, 2012). La présentation de l'antigène à la surface des cellules β pancréatiques engendre l'activation de l'auto-immunité ainsi que la production d'anticorps par les lymphocytes B. Ces anticorps s'infiltrèrent donc dans les îlots pancréatiques entraînant une insulite. Dès lors qu'un de ces quatre auto-anticorps est retrouvé, le diabète est classé en type 1A. Si l'origine est inconnue, il est dit idiopathique (10% des diabétiques de type 1) et est classé 1B.

Le diabète de type 1 n'entraîne pas immédiatement l'hyperglycémie. C'est au cours de son développement qu'apparaît ce symptôme. La sécrétion d'auto-anticorps engendre la perte massive des cellules β , et apparaissent alors les symptômes et les signes cliniques. Ces symptômes surviennent lorsque plus de 80% des cellules sont détruites (**Fig. 2-16**) (van Belle *et al.*, 2011).

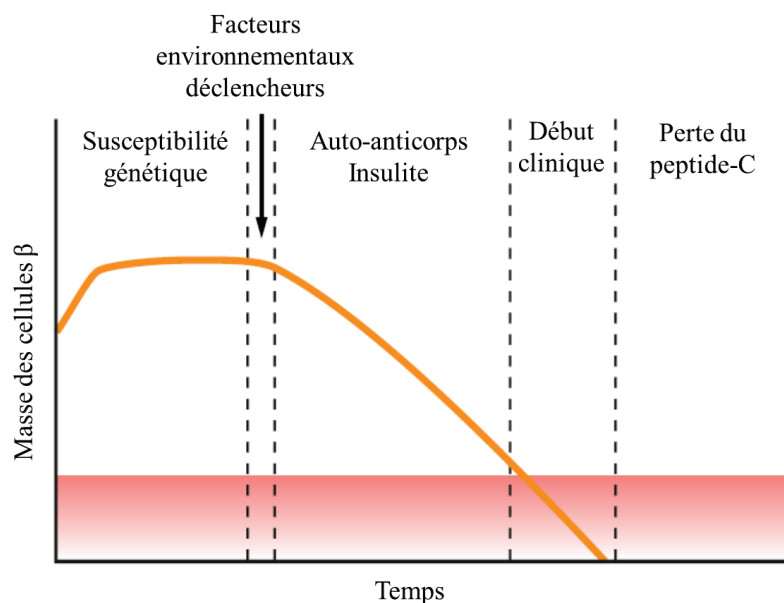


Figure 2-16 : Schématisation du développement de la pathogénie du diabète de type 1 (D'après Van Belle *et al.*, 2011)

La perte quasi-totale de production d'insuline fait que les diabétiques de type 1 ont un besoin vital d'un apport exogène en insuline. Dès le diagnostic de la maladie, les patients sont donc traités par insulinothérapie.

2.1.4. Le diabète de type 2

Le diabète de type 2 (DT2) concerne 90 à 95% des diabétiques (American Diabetes Association, 2013). Il résulte d'un défaut de l'action et/ou de la sécrétion de l'insuline (Bouché *et al.*, 2004; Wolfs *et al.*, 2009). A l'apparition de la maladie, les patients peuvent avoir des taux normaux d'insuline, voire même des taux bien plus élevés que la normale (Stumvoll *et al.*, 2005). Leurs symptômes sont généralement dus à la résistance à l'insuline, et peuvent précéder la détection du diabète de 10 à 20 ans (Fu *et al.*, 2013). Le diabète de type 2 a pour cause différents facteurs, génétiques d'une part, et environnementaux d'autre part. Il semblerait que ces deux types de facteurs soient intimement liés dans le développement de la maladie (Wolfs *et al.*, 2009).

2.1.4.1. Les facteurs génétiques

Certaines mutations génétiques entraîneraient des phénotypes diabétiques, mais la détection de ces derniers reste peu courante et peu reproductible d'un point de vue scientifique. Un lien entre le DT2 et le gène du facteur de transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) a été détecté dans plusieurs populations (Sladek *et al.*, 2007). Il semblerait également que la mutation du gène WFS1, régulant la concentration calcique intracellulaire, entraîne un syndrome de Wolfram, et conduise à des neurodégénérescences ainsi qu'au développement du diabète. La mutation du gène

du canal potassique KCNJ11 serait un phénomène extrêmement rare, et serait impliquée dans le développement du DT2 chez les nourrissons de moins de 6 mois (Wolfs *et al.*, 2009). Les gènes de la leptine et du récepteur de la leptine seraient aussi liés à la maladie (Kahn *et al.*, 2006). Enfin, la mutation du récepteur nucléaire peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) entraînerait une déficience dans l'action de l'insuline et serait la cause de l'insulino-résistance.

2.1.4.2. Les facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux ont été les premiers à être suspectés dans le développement du DT2. Un lien entre sédentarité, alimentation, obésité et DT2 a été clairement établi depuis plusieurs années. En effet, il est avéré que la sédentarité et la mauvaise nutrition des populations engendrent une obésité plus ou moins importante. Il a également été montré que les personnes obèses et non-diabétiques voyaient leur masse de cellules β augmenter alors que les patients diabétiques obèses ou non-obèses avaient une réduction de cette masse de l'ordre de 40% (Butler *et al.*, 2003).

2.1.4.3. La pathogénie du diabète de type 2

L'accumulation d'acides gras circulants est liée au développement des masses graisseuses et à la lipolyse, est aussi en partie responsable du développement de la maladie. En effet, l'exposition des cellules β pancréatiques à l'excès de glucose et aux acides gras circulant engendre une glucotoxicité et une lipotoxicité (Fu *et al.*, 2013). La glucotoxicité conduit à la surproduction de récepteur GLUT-2 à la surface des cellules β à l'origine d'une entrée massive du glucose dans la cellule. Ces réactions affectent alors le métabolisme de l'insuline et favorisent la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). La production de ces ROS ne peut être limitée par les cellules β qui ont de taux faibles en enzymes anti-oxydantes, telles que la superoxide dismutase et la catalase. Les ROS engendrent également la surproduction du nuclear factor-kappa B (NF κ B), responsable en partie de la dysfonction de la cellule β (Stumvoll *et al.*, 2005). Quant à la lipotoxicité, elle débute par l'accumulation d'adipocytes et par la production de cytokines pro-inflammatoires délétères pour la cellule β , comme notamment le TNF α (Kahn *et al.*, 2006). La sécrétion d'insuline est alors diminuée. De plus, les acides gras libérés dans la circulation sanguine par les tissus adipeux affectent non seulement les cellules β , mais aussi les cellules des tissus périphériques. Les acides gras sont libérés par les adipocytes pendant le phénomène de lipolyse lorsque les triglycérides sont hydrolysés. Les acides gras sont captés par les hépatocytes et entraînent la surproduction de glucose. Dans les cellules musculaires, les acides gras circulants sont captés et utilisés préférentiellement par les cellules vis-à-vis du glucose (Arner, 2002). Le glucose reste alors

dans la circulation sanguine, augmentant alors l'hyperglycémie. De plus, le stockage du glucose dans les muscles est fortement diminué.

Ces phénomènes ont pour conséquence directe l'augmentation de la glycémie et sont à l'origine de l'insulino-résistance. Les cellules β réagissent à ces taux élevés de glucose et surproduisent de l'insuline, c'est l'hyperinsulinisme. Au cours de l'évolution de la maladie, le pancréas qui compense la production en insuline pour faire diminuer la glycémie s'épuise. Les cellules β sont peu à peu détruites ce qui engendre une insulino-pénie (**Fig. 2-17**).

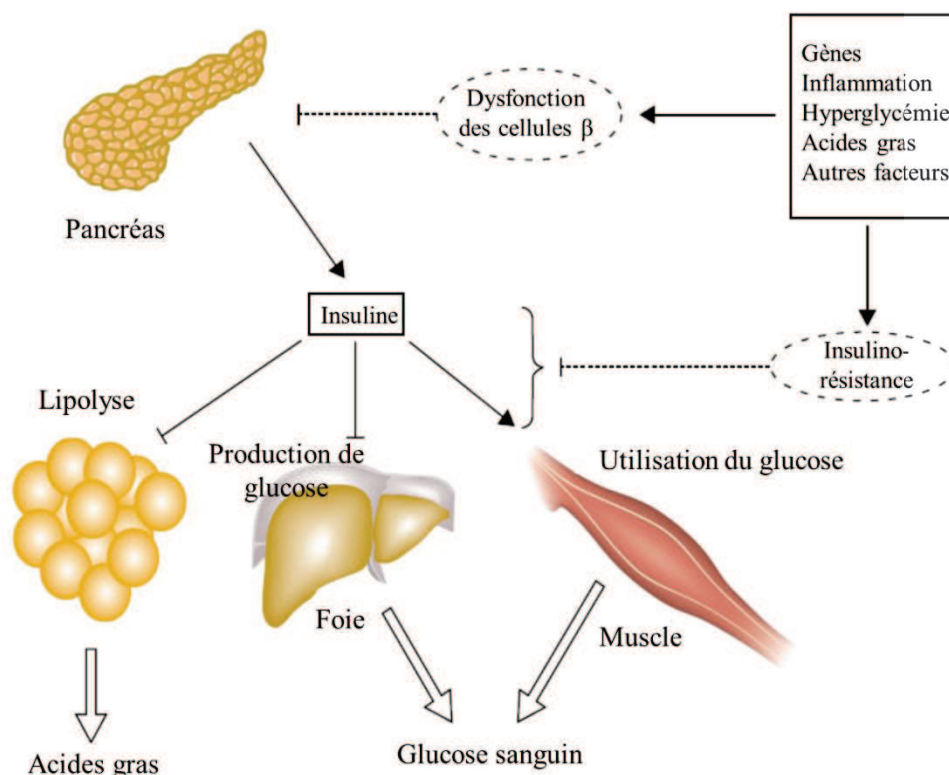


Figure 2-17 : Schématisation des mécanismes impliqués dans l'hyperglycémie du diabète de type 2 (D'après Stumvoll *et al.*, 2005)

Ces phénomènes de compensation effectués par le pancréas pendant plusieurs années rendent difficile le diagnostic de la maladie. En effet, la normoglycémie peut être maintenue et la maladie ne peut se déclarer que des années après le début des dérèglements de l'homéostasie du glucose.

Les réactions impliquées dans le phénomène de sensibilité à l'insuline et d'insulino-résistance sont alors les cibles thérapeutiques pour les diabétiques de type 2. Il existe ainsi aujourd'hui de nombreux anti-diabétiques oraux (ADO) qui agissent à différents niveaux. Les glitazones favorisent la sensibilité à l'insuline alors que les biguanides limitent la production de glucose par le foie. Les sulfamides hypoglycémifiants et les glinides favorisent quant à eux la sécrétion

d'insuline. Enfin, les inhibiteurs de l' α -glucosidase réduisent l'absorption des glucides alimentaires.

Les ADO sont donc prescrits aux patients dans la première phase de la maladie, quand l'insuline est encore sécrétée de manière suffisante pour équilibrer la glycémie. Cependant, plus tardivement, bien après l'apparition du diabète de type 2 les patients devront s'administrer de l'insuline.

2.1.5. Les complications

2.1.5.1. Complications aiguës

2.1.5.1.1. Complications liées à l'hyperglycémie

L'hyperglycémie est caractérisée par une glycémie à jeun supérieure ou égale à 1,26 g/L. Elle résulte d'une carence insulinaire, endogène ou exogène. Cette insuffisance ne permet donc pas au glucose d'être utilisé ou stocké par les tissus périphériques. Les différentes cellules nécessitant un apport glucidique se voient alors privées de leur source énergétique. Pour palier à ce manque, elles utilisent alors les acides aminés et les acides gras, et provoquent ainsi la production de corps cétoniques qui peuvent engendrer une acidocétose. L'acidocétose est la conséquence directe d'une carence insulinaire relative ou absolue et survient le plus fréquemment chez les diabétiques de type 1. Elle est associée à l'hyperglycémie, à la présence de corps cétoniques dans les urines (cétonurie), à un pH sanguin acide et à des faibles taux de bicarbonates plasmatiques. Le pronostic vital du patient atteint d'acidocétose peut être engagé, en fonction de son âge. Cette complication est relativement vite détectée, par son impact important sur l'haleine du patient qui contient une odeur acétonique.

L'excès de glucose sanguin provoque aussi des complications rénales telles que la glycosurie. En effet, la réabsorption du glucose est ralentie par l'hyperglycémie, et l'eau, qui est emportée par le glucose, est alors entraînée dans les urines ce qui provoque une polyurie. Cette polyurie peut engendrer alors un coma hyperosmolaire qui survient lorsque la glycémie est supérieure ou égale à 6 g/L, le pH est supérieur à 7,2 et le bicarbonate plasmatique élevé. Les patients diabétiques ayant ces complications sont assez vite diagnostiqués car leur état est comateux et somnolant. Ce coma peut mettre quelques jours voire quelques semaines à s'installer, par le développement d'une polyurie. Le patient entre donc dans une phase de déshydratation importante.

2.1.5.1.2. Conséquences de l'hypoglycémie

L'hypoglycémie est caractérisée par une glycémie inférieure à 0,6 g/L. Elle peut survenir lorsque les doses insulinales sont mal administrées chez le patient diabétique (surdose, non

prise en compte de l'effort physique, non prise en compte de l'alimentation). L'hypoglycémie peut avoir des conséquences plus ou moins importantes. Pour lutter contre cet état, le corps sécrète des catécholamines qui peuvent entraîner des symptômes de faim, des nausées, de la transpiration et des tremblements. L'hypoglycémie peut donner un état léthargique au patient, voire entraîner une perte de connaissance. Dans ce cas, la glycémie doit être régulée, soit par l'apport de glucide *via* l'alimentation, soit dans des cas moins fréquents, par des injections de glucagon.

2.1.5.2. Complications chroniques

2.1.5.2.1. La macroangiopathie

La macroangiopathie concerne les lésions des vaisseaux de grandes tailles telles que les artères ou les veines (Calcutt *et al.*, 2009). Elle est responsable du développement des maladies cardio-vasculaires. Elle peut engendrer la formation de plaques d'athéromes dans les artères ou durcir la paroi des artères, et conduire à l'obstruction de ces vaisseaux. Les conséquences directes de ces complications sont les infarctus, les accidents vasculaires cérébraux et l'hypertension artérielle. Le risque de développer une maladie cardiovasculaire est intimement lié aux autres complications. Il a été montré qu'un patient diabétique avait le même risque de déclencher une maladie cardiovasculaire qu'un patient non diabétique ayant eu un infarctus du myocarde (Haffner *et al.*, 1998).

2.1.5.2.2. La microangiopathie

La microangiopathie concerne les vaisseaux plus petits, et inférieurs à 30 μm de diamètre. Cette complication est spécifique du diabète, car l'accumulation de glucose sanguin entraîne une coagulation sanguine et engendre l'obstruction des micro-vaisseaux. Ces lésions peuvent avoir plusieurs conséquences comme le développement de néphropathies, de neuropathies, de rétinopathies

- **La néphropathie**

La néphropathie représente la majorité des complications qui peuvent survenir chez les diabétiques (Calcutt *et al.*, 2009). Cette pathologie évolue lentement (10 à 20 ans) et conduit à une protéinurie, avec en parallèle une diminution de la filtration glomérulaire et une augmentation de la taille de ces glomérules (Bernardi *et al.*, 2012; Deshpande *et al.*, 2008). Une fois la néphropathie installée, la pression sanguine est augmentée et paradoxalement la clairance rénale de l'insuline est réduite. L'évolution de ces complications peut entraîner l'apparition d'insuffisance rénale.

- **La neuropathie**

La neuropathie diabétique atteint entre 30 à 50 % des patients (Deshpande *et al.*, 2008). Elle consiste en des lésions des nerfs périphériques, de la moelle épinière et du système nerveux central. La première cause de cette neuropathie provient de la glucotoxicité. Les lésions peuvent conduire à la perte sensorielle et à des douleurs musculaires. L'exemple le plus connu de neuropathie liée à la maladie est le « pied diabétique », qui résulte d'une perte de sensation et peut engendrer des lésions pouvant s'aggraver et aller jusqu'à l'amputation. Pour éviter ces conséquences, il est recommandé aux patients diabétiques de surveiller très fréquemment l'état de leur pied afin de détecter les inflammations le plus vite possible et de les traiter. D'autres pertes de sensation des extrémités sont aussi fréquentes chez ces patients. Des troubles de la fonction érectiles sont aussi imputés à la neuropathie diabétique.

- **La rétinopathie**

La rétinopathie est caractérisée par des lésions de la rétine et des lésions vasculaires engendrées par l'hyperglycémie ; elle est la conséquence directe de la glucotoxicité. Cette complication peut entraîner à long terme la cécité.

2.2. Les traitements actuels du diabète par l'insuline

2.2.1. L'insuline et son historique

L'histoire de l'insuline débute avec la description du pancréas par Paul Langerhans en 1869 qui met en évidence la présence de cellules regroupées en îlots. En 1889, Oscar Minkowski et Josef Von Mering font la découverte de l'augmentation de la glycémie chez le chien après une pancréatectomie et démontrent le lien entre le pancréas et la régulation de la glycémie. L'insuline est isolée chez le chien seulement en 1921 par Frederick Grant Banting et Charles Best, alors encadrés par le Pr. John James Richard MacLeod de l'université de Toronto.

La première utilisation de l'hormone, issue du veau et purifiée par James Collip, a été réalisée chez un patient de 14 ans, Leonard Thompson, souffrant d'hyperglycémie et ayant atteint le stade du coma. La régulation de la glycémie a alors été la preuve de l'efficacité de l'hormone. La réussite de cet essai a engendré la production de l'insuline extraite de pancréas de bœuf et de porc en 1923. Cette année là, le prix Nobel de Médecine est alors attribué à Frederick Banting et John James Richard MacLeod, qui le partagent avec leurs confrères James Collip et Charles Best. En 1935, David Scott et Albert Fisher ont découvert l'effet retardant du zinc, alors qu'en 1936, Hans Christian Hagedorn a mis au point une insuline combinée à la protamine, l'insuline lente Neutral Protamine Hagedorn (NPH). Il faudra attendre 1955 pour connaître la structure de l'insuline découverte par Frederick Sanger qui se verra attribué le

prix Nobel de Médecine en 1958. Ce n'est que dans les années 80 que le laboratoire Eli Lilly réussit à cloner le gène de l'insuline humaine et produit de l'insuline par génie génétique. Dans ces années là, les premières pompes à insuline arrivent sur le marché, et proposent une alternative aux injections, jusqu'alors seul mode d'administration de l'insuline.

Depuis, la recherche sur les formulations d'insuline est en constante évolution, afin de permettre à tous les patients de gérer et réguler au mieux leur glycémie au quotidien.

2.2.2. Structure de l'insuline

L'insuline est un polypeptide de poids moléculaire de 5,8 kDa. Elle est constituée de 2 chaînes polypeptidiques, la chaîne α de 21 acides aminés et la chaîne β de 30 acides aminés, reliées entre-elles par des ponts disulfures (Fu *et al.*, 2013) (**Fig. 2-18**).

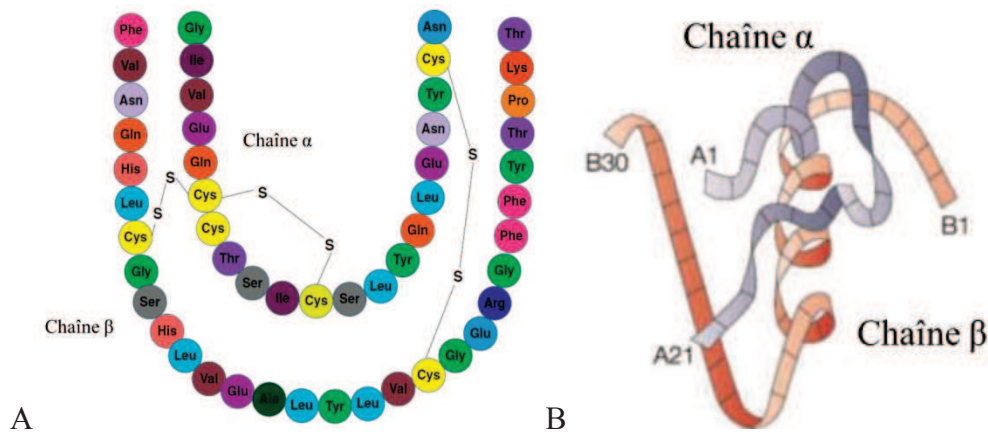


Figure 2-18 : Structure de l'insuline

(A : Structure primaire (D'après Sonia et Sharma, 2012) ; B : Structure tri-dimensionnelle, (D'après Owens, 2002))

Le gène de l'insuline, situé sur le chromosome 11, encode la synthèse d'une séquence de 110 acides aminés correspondant à la pré-pro-insuline. Cette synthèse est réalisée dans le réticulum endoplasmique des cellules β pancréatiques. La séquence signal de la pré-pro-insuline est alors clivée par une peptidase signal et la pro-insuline est obtenue. Cette pro-insuline est transportée dans le *cis*-Golgi, puis dans le *trans*-Golgi où elle va être maturée par clivage, donnant l'insuline et le C-peptide (**Fig. 2-19**).

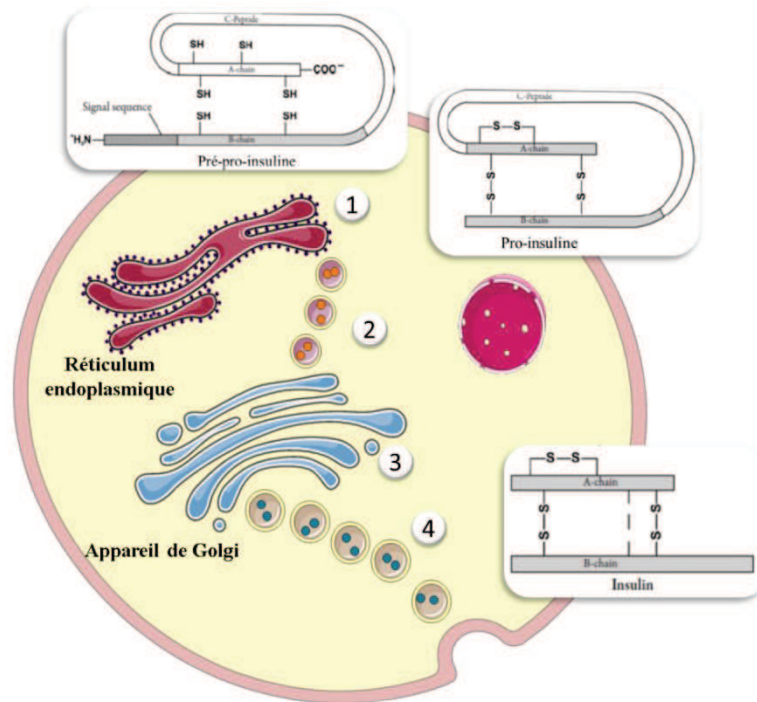


Figure 2-19 : Schématisation de la biosynthèse d'insuline

((1) Synthèse de la pré-pro-insuline dans le réticulum endoplasmique et conversion en pro-insuline, (2) Transport de la pro-insuline vers le *cis*-Golgi, (3) Conversion de la pro-insuline en insuline par le clivage du C-peptide dans les vésicules du *trans*-Golgi, (4) Formation des granules à insuline, (D'après Tibaldi, 2012)

L'insuline mature va alors être stockée dans des granules, dans lesquelles sa concentration peut atteindre 40 mM (Fu *et al.*, 2013; Tibaldi, 2012).

2.2.3. Les différents types d'insuline utilisés dans le traitement du diabète

L'apport d'insuline exogène est essentiel pour la survie des patients atteints de diabète de type 1, et devient une nécessité dans le traitement des diabétiques de type 2 lors de son développement. L'insuline exogène doit mimer les sécrétions physiologiques d'insuline, afin de réguler au mieux la glycémie. Il est donc nécessaire de délivrer de l'insuline de façon lente ou basale, et de délivrer une insuline rapide pour palier à l'augmentation de la glycémie postprandiale (**Fig. 2-4**).

De nos jours, il existe plusieurs types d'insuline, avec différents types d'action, afin d'offrir un panel large, et plusieurs possibilités au patient et au praticien pour réguler au mieux la glycémie. Les changements structuraux de l'insuline modifient les paramètres pharmacocinétiques de l'action de l'insuline (**Tableau 2-1**).

Analogues rapides insuline ordinaire	Délai d'action (min)	Pic d'action (min)	Durée d'action (h)
Insuline ordinaire	30 à 60	60 à 120	8 à 10
Lispro	5 à 15	30 à 90	4 à 5
Aspart	5 à 15	30 à 90	4 à 5
Glulisine	5 à 15	30 à 90	4 à 5
Analogues lents insuline NPH	Délai d'action (min)	Pic d'action (min)	Durée d'action (h)
NPH	2 à 4	4 à 8	12 à 18
Glargine	2 à 4	-	20 à 24
Détémir	2 à 4	-	12 à 23 (dose dépendant)

Tableau 2-1 : Tableau représentant les paramètres cinétiques des différentes insulines (Moreau *et al.*, 2007)

La plupart des analogues de l'insuline sont issus de modifications structurales des chaînes α ou β d'acides aminés (**Fig. 2-20**).

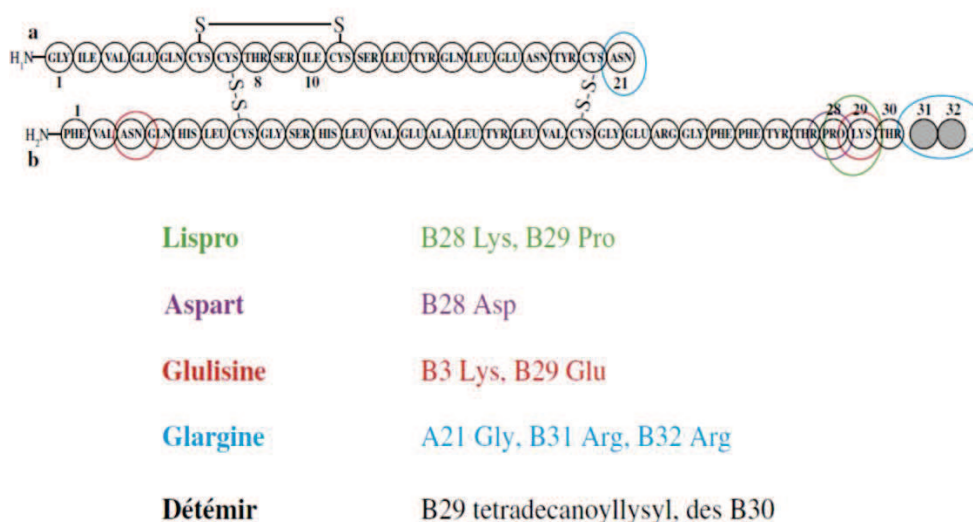


Figure 2-20 : Modifications de la structure de l'insuline native dans le cadre des analogues de l'insuline (Moreau *et al.*, 2007)

2.2.3.1. Les analogues rapides

Les insulines à action rapide sont préférentiellement administrées au patient 30 minutes avant le repas de manière à prévenir l'augmentation post-prandiale de la glycémie (Moreau *et al.*, 2007). Les insulines rapides, comme l'insuline lispro, aspart ou glulisine, proviennent de la modification d'un ou plusieurs acides aminés sur la chaîne β de l'insuline. La rapidité d'action de ces analogues est due à la résorption de l'insuline qui est plus rapide. En effet, l'insuline normale est formée à partir d'hexamères, qui doivent se dissocier en dimères puis

en monomères pour être efficace. Dans le cas des analogues rapides de l'insuline, la dissociation de ces hexamères est plus rapide (Brange et Vølund, 1999) (**Fig. 2-21**).

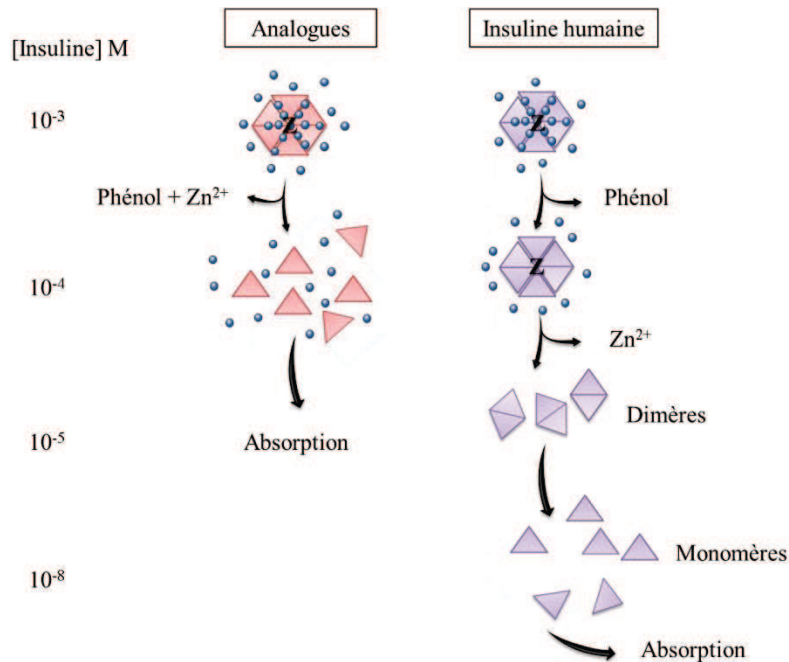


Figure 2-21 : Schématisation de la formation de monomères pour les analogues de l'insuline et l'insuline humaine (D'après Brange et Volund, 1999)

Le changement des chaînes d'acides aminés intervient dans cette dissociation plus rapide. La découverte de la structure de l'insuline a permis de définir les 51 acides aminés la composant et de déterminer les résidus impliqués dans l'auto-association des monomères en hexamères. Le changement d'un ou plusieurs de ces acides aminés peut alors engendrer des modifications dans la cinétique de la formation de monomères, et donc dans la rapidité d'action des analogues. Comme pour toutes les insulines, la stabilisation de cette structure nécessite la présence de zinc et de phénol.

2.2.3.2. Les analogues lents

Ces analogues de l'insuline ont fait leur apparition après la découverte de la structure de l'insuline. Hans Christian Hagedorn a mis au point la première insuline modifiée en la combinant à la protamine et obtenue l'insuline lente Neutral Protamine Hagedorn (NPH). Depuis, des modifications de la structure de l'insuline, par substitution de certains acides aminés, ont permis de créer d'autres analogues lents de l'insuline. Ces analogues ont pour but de mimer la sécrétion basale d'insuline et d'éviter les hyperglycémies nocturnes. Ils sont généralement administrés une fois par jour, et préférentiellement le soir.

Une nouvelle insuline ultra-lente est en voie de commercialisation aux Etats-Unis, et a obtenu une autorisation de mise sur le marché en janvier 2013 par la Commission européenne. Cette insuline nommée Tresiba® (Novo Nordisk, Danemark) est une insuline dégludec, obtenue après assemblage de plusieurs chaînes d'hexamères d'insuline et modification de certains acides aminés (**Fig. 2-22**). Cette modification permet à l'insuline d'avoir une demi-vie de plus de 24h et une action hypoglycémiante au moins égale (Zinman, 2013).

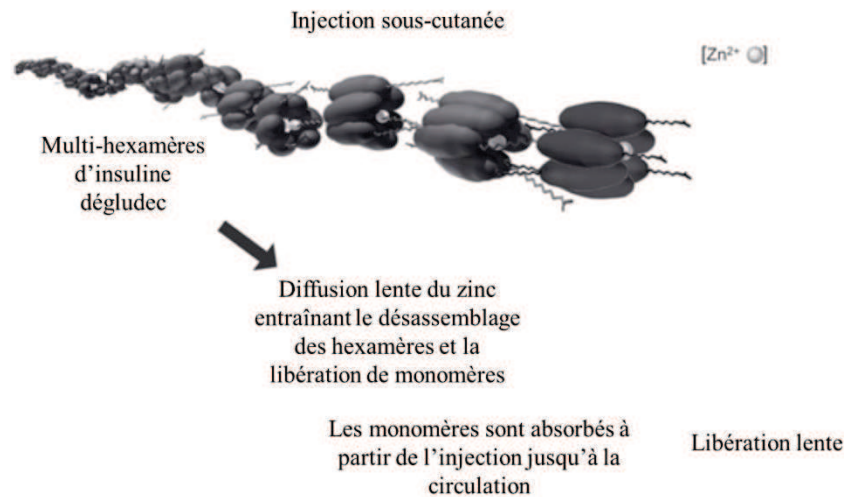


Figure 2-22 : Schématisation de la structure et du mode d'action de l'insuline dégludec (D'après Zinman, 2013)

2.2.3.3. Les analogues intermédiaires et premix

Afin de diminuer au maximum le nombre d'injection d'insuline, des analogues intermédiaires et des premix ont été mis au point. Les analogues intermédiaires sont obtenus après modification de la structure de l'insuline pour obtenir une rapidité d'action entre les analogues rapides et lents. Pour les premix, un simple mélange entre analogues rapides et lents est effectué.

De nos jours, un large choix d'insulines est disponible pour les patients, et permet de couvrir quasiment tous les besoins en insuline nécessaire à un bon équilibre glycémique (**Tableau 2-2**).







	Nom du produit	Fabriquant	Type d'insuline
Analogues à action rapide 	Humalog® KwikPen™	Lilly	Insulin lispro
	Apidra® SoloStar®	Sanofi Aventis	Insulin glulisine
	NovoRapid® FlexPen®	Novo Nordisk	Insulin aspart
Insuline rapide 	Insuman® Rapid OptiSet®	Sanofi Aventis	Human insulin
Action intermédiaire 	Insulatard® FlexPen®	Novo Nordisk	Human Insulin isophane suspension
	Insulatard® InnoLet®	Novo Nordisk	Human Insulin isophane suspension
	Umuline® NPH KwikPen™	Lilly	Human Insulin isophane suspension
	Insuman® Basal OptiSet®	Sanofi Aventis	Human Insulin isophane suspension
Analogues à action lente 	Lantus® OptiSet®	Sanofi Aventis	Insulin glargine
	Lantus® SoloStar®	Sanofi Aventis	Insulin glargine
	Levemir® FlexPen®	Novo Nordisk	Insulin levemir
	Levemir® InnoLet®	Novo Nordisk	Insulin levemir
Analogues Premix 	NovoMix® 30/70 FlexPen®	Novo Nordisk	Insulin aspart and Insulin aspart protamine suspension
	NovoMix® 50/50 FlexPen®	Novo Nordisk	Insulin aspart and Insulin aspart protamine suspension
	NovoMix® 70/30 FlexPen®	Novo Nordisk	Insulin aspart and Insulin aspart protamine suspension
	Humalog® Mix25/75™ KwikPen™	Lilly	Insulin lispro and Insulin lispro protamine suspension
	Humalog® Mix50/50™ KwikPen™	Lilly	Insulin lispro and Insulin lispro protamine suspension
Insuline Premix 	Umuline® Profil 30/70 KwikPen™	Lilly	Human insulin and Human insulin isophane suspension
	Insuman® Comb 15/85 OptiSet®	Sanofi Aventis	Human insulin and Human insulin isophane suspension
	Insuman® Comb 25/75 OptiSet®	Sanofi Aventis	Human insulin and Human insulin isophane suspension
	Insuman® Comb 50/50 OptiSet®	Sanofi Aventis	Human insulin and Human insulin isophane suspension

Tableau 2-2 : Tableau récapitulatif des différentes insulines commercialisées (D'après Reix *et al.*, 2013)

2.2.4. Les modes d'administration

Les modes d'administration de l'insuline sont actuellement de deux sortes : soit par des injections *via* des stylos injecteurs, soit par des pompes à insuline. Dans les deux types de diabète, insulino-dépendant et insulino-requérant, l'administration d'insuline se fait dans les premiers temps par des stylos afin d'adapter les posologies et de faciliter les changements de thérapies. Les patients ayant des difficultés à gérer leurs glycémies ont la possibilité de disposer d'une pompe à insuline.

Les modes d'administration, bien qu'utilisant des techniques de délivrance variées, diffèrent surtout par leur utilisation physiologique ou non de l'insuline. En effet, la différence principale qui concerne les stylos injecteurs et la pompe externe, contrairement à la pompe implantable, est que ces deux premiers modes d'administration ne permettent pas un premier passage hépatique.

Effectivement, lors de la sécrétion physiologique de l'insuline, l'hormone est transportée dans la veine porte et amenée jusqu'au foie. Le foie extrait environ 50 % de l'insuline et peut aller jusqu'à 80% (Duckworth, 1988), afin d'éviter les excès et les carences de l'hormone dans la

circulation périphérique. Cette extraction permet l'inhibition de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse hépatique, ainsi que l'inhibition de la néoglucogénèse des tissus périphériques. Ce premier passage hépatique entraîne aussi la synthèse de protéines comme les lipoprotéines, le facteur de croissance insulin-like growth factor 1 (IGF-1), le plasminogène activator inhibitor 1 (PAI-1), responsable de la coagulation, et la protéine de liaison aux hormones sex hormone-binding globulin (SHBG) (Jeandidier et Boivin, 1999; Reix *et al.*, 2013). L'équipe de Bergman (1990), a montré que l'administration intrapéritonéale d'insuline humaine chez le chien, présentait une absorption portale d'environ 90 %. Cette grande proportion permet alors une arrivée massive de l'insuline dans le foie, et engendre les différentes cascades de réactions citées ci-dessus.

2.2.4.1. Les stylos injecteurs

Le stylo injecteur est le premier moyen que les patients ont pour s'administrer de l'insuline. Ce stylo a remplacé quasiment la totalité des seringues et les aiguilles encore utilisées dans les années 1980. Le premier stylo injecteur a été manufacturé par l'entreprise Novo Nordisk en 1985. Depuis, plusieurs industries pharmaceutiques ont développé leurs propres stylos (Fig. 2-23).

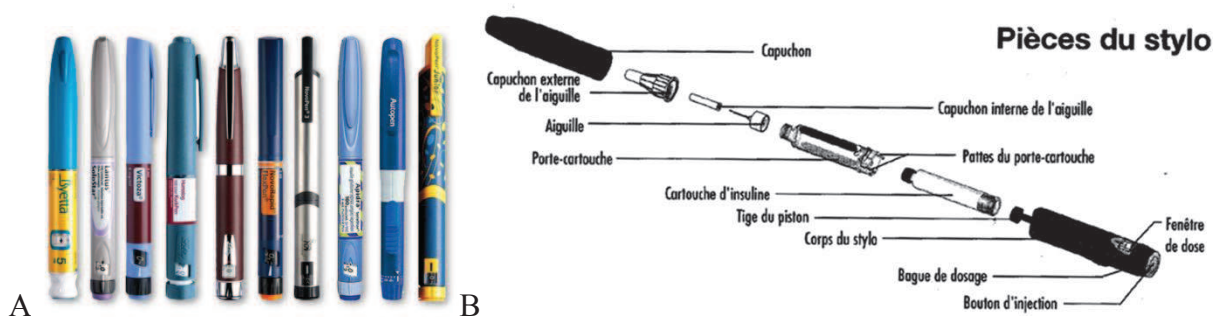


Figure 2-23 : Photographie et schématisation de stylos injecteurs
 (A : Photographie de différents stylos injecteurs commercialisés, www.insulinpens.com; B : Représentation schématique des différentes pièces du stylo injecteur, www.anism.fr)

Ces stylos ont plusieurs avantages que n'avaient pas les seringues. L'avantage le plus important est celui de la taille de l'aiguille. En effet, celle-ci, pouvant atteindre entre 4 et 8 mm de longueur, a été réduite au maximum afin de limiter les douleurs lors des injections (Reix *et al.*, 2013). Cette réduction de taille permet alors au patient de s'injecter l'insuline en sous-cutané, et d'éviter les injections dans les couches musculaires. Les phénomènes d'hypoglycémies sévères sont par conséquent nettement diminués. D'un point de vue fonctionnel, les patients ont gagné en autonomie et en confort. De plus, l'injection devient

rapide et par conséquent plus discrète. Ce paramètre est très important pour le patient, car aujourd'hui encore, certains diabétiques, et notamment les enfants et les adolescents, peinent à s'injecter de l'insuline en public.

2.2.4.2. Les pompes à insuline

Les pompes à insuline ont fait leur apparition dans les années 1980 (Grunberger, 2013). Le développement de ces systèmes d'administration a été motivé par la réelle demande faite par les patients d'un plus grand confort, mais aussi dans le but de réguler au mieux leur glycémie, notamment pour ceux qui ont des difficultés à atteindre la normoglycémie.

2.2.4.2.1. La pompe externe

La pompe externe est composée de deux parties principales : la pompe, avec les réserves en insuline et les mécanismes électriques de délivrance, et un cathéter relié à la pompe et implanté sous la peau abdominale (**Fig. 2-24**).



**Figure 2-24 : Photographie d'une pompe externe
(Reix *et al.*, 2013)**

Le dispositif contient des cartouches d'insuline devant être changées en moyenne tous les 3 jours ainsi qu'un cathéter. L'implantation de ce dispositif ne nécessite pas d'hospitalisation ni de chirurgie lourde. Elle peut s'effectuer en ambulatoire et est relativement rapide. L'utilisation de cette pompe est facile pour les patients, mais nécessite une formation par du personnel habilité.

L'avantage majeur de ce système est qu'il délivre l'insuline en continu. La délivrance de l'insuline est alors plus proche de la sécrétion d'insuline endogène (Valla, 2012). La sécrétion basale est assurée et bien imitée. L'injection d'insuline est aussi modulable *via* ce dispositif. La pompe permet ainsi de mimer la sécrétion d'insuline survenant lors des repas, appelé « bolus ».

2.2.4.2.2. La pompe implantable

La pompe implantable est un dispositif assez proche de la pompe externe, mais avec une différence majeure liée au site de délivrance de l'insuline. A l'heure actuelle, la seule pompe implantable commercialisée est la MiniMed 2007 fabriquée par la société Medtronic. L'implantation de ce dispositif nécessite une chirurgie et une hospitalisation. La pompe doit être remplacée tous les 7 ans (Reix *et al.*, 2013). Le réservoir est rempli d'insuline Insuman[®] environ tous les 2 mois. Cette insuline a pour caractéristique d'être quatre fois plus concentrée qu'une insuline ordinaire, ceci dans le but d'éviter des remplissages de la pompe trop fréquents. Cette pompe est composée d'un réservoir, d'un programmeur externe, et d'un cathéter. Elle est implantée au niveau de l'abdomen, en sous-cutané, pénètre dans le péritoine et permet la délivrance de l'insuline en intrapéritonéal (**Fig. 2-25**). Un programmeur externe, fonctionnant par télé-métrie, permet au patient de programmer les doses d'insuline à libérer de la pompe.

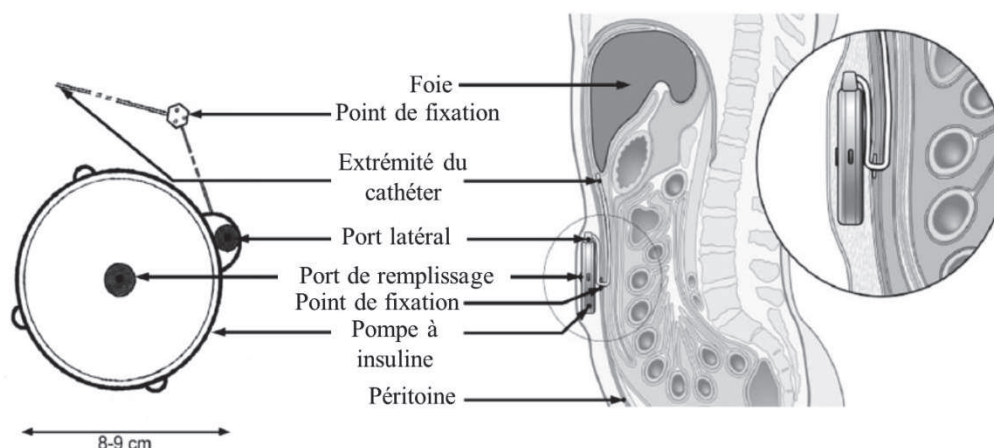


Figure 2-25 : Schématisation d'une pompe implantable et de son implantation au niveau de l'abdomen (D'après Reix *et al.*, 2013)

Ce dispositif est proposé aux patients ayant beaucoup de mal à réguler leur glycémie. En effet, le système de délivrance intrapéritonéal permet à l'insuline d'être amenée au foie *via* la veine porte. Le foie peut alors exercer son effet de premier passage hépatique, et cette prise en charge permet d'ajuster au mieux la disponibilité de l'insuline. Ce phénomène d'extraction hépatique limite alors les hypoglycémies sévères.

2.2.4.3. Les limites des modes d'administrations actuels

Les modes d'administrations actuels offrent aux patients la possibilité de réguler au mieux leur glycémie. Cependant, ils comportent certaines limites, tant au niveau des complications qu'ils engendrent, qu'au niveau de la délivrance de l'insuline qui n'est pas physiologique.

Bien que les stylos injecteurs soient de plus en plus faciles d'utilisation, les douleurs associées aux injections sont encore problématiques. De plus, l'administration d'insuline, si elle est répétée au même site d'injection, peut engendrer des lipodystrophies ou des réactions allergiques. Les hypoglycémies liées aux hyperinsulinismes périphériques sont fréquentes, et sont liées au site d'injection. En effet, le premier passage hépatique n'est pas conservé, et seulement 50% de l'insuline est extraite par le foie. Les effets de l'insuline sont aussi dépendants du site d'injection. L'administration d'insuline par stylo injecteur est aujourd'hui un frein pour les patients et pour les praticiens. Les endocrinologues traitant les diabétiques de types 2 sont réticents à l'idée de débiter une insulinothérapie pour plusieurs raisons : la compliance des patients, les hypoglycémies, et les douleurs associées aux injections et aux mesures de glycémie (**Fig. 2-26**) (Grunberger, 2013).

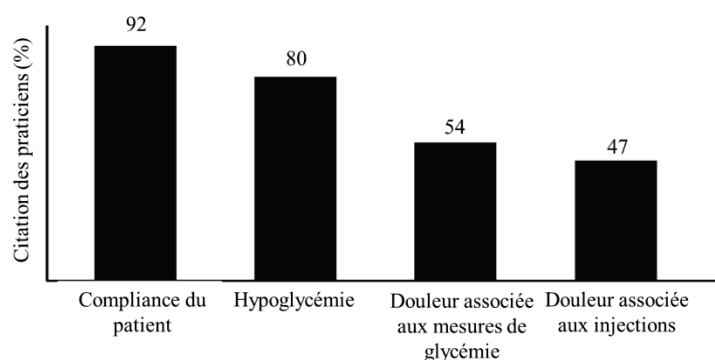


Figure 2-26 : Histogrammes représentant les raisons du refus des praticiens à débiter l'insulinothérapie chez les diabétiques de type 2 (D'après Grunberger, 2013)

Du côté du patient, les raisons qui les poussent à éviter les injections sont similaires. Il s'ajoute le fait que les injections sont contraignantes dans les activités journalières et pour l'alimentation. Les injections peuvent en effet être reproduites plus de 5 fois par jour chez un enfant lors de l'utilisation des stylos, et elles nécessitent un changement de site d'injection tous les trois jours pour la pompe implantable (Grunberger, 2013) (**Fig. 2-27**).

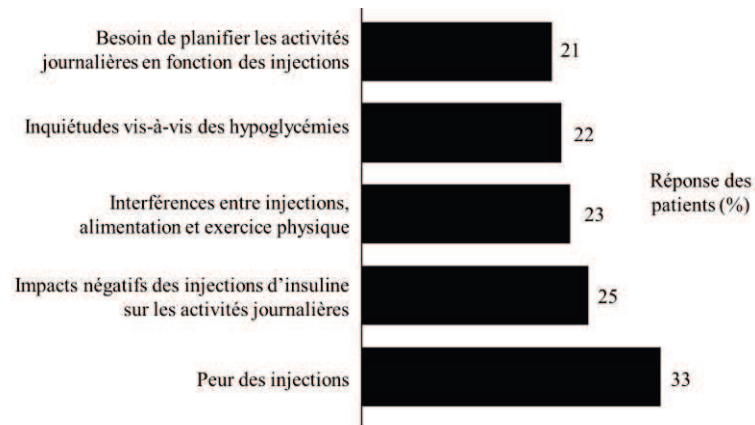


Figure 2-27 : Histogrammes représentant les raisons du refus des patients atteints de diabète de type 2 à l'insulinothérapie (D'après Grunberger, 2013)

D'un point de vue physiologique, l'administration d'insuline par stylos injecteurs et par pompe externe délivre l'hormone en sous-cutané. L'insuline n'est donc pas prise en charge par le foie, n'est donc pas extraite, et est distribuée aux différents organes à des taux très importants. Ceci engendre alors des hypoglycémies sévères nécessitant une ingestion rapide de glucose ou des injections de glucagon. Ces hypoglycémies, si elles s'avèrent répétées, peuvent alors entraîner des complications telles que des changements d'humeur, des confusions, des convulsions, de la fatigue et des maux de tête.

La pompe externe offre une certaine liberté aux patients par rapport aux stylos injecteurs. C'est aujourd'hui le dispositif le plus physiologique par sa délivrance d'insuline dans le péritoine et son passage par le système portal, mais il présente des limitations. Le remplissage du réservoir de la pompe est effectué toutes les 6 semaines, et l'insuline spécifique utilisée pour ce type de pompe est particulièrement coûteuse. Un entretien régulier est nécessaire. En effet, le cathéter peut être obstrué par de l'insuline cristallisée ou par des fibroses, due à la proximité du foie. L'obstruction du cathéter va notamment nécessiter le changement du cathéter tous les trois jours. De plus, des dysfonctions de la télémétrie et de l'envoi de la programmation de l'insuline à délivrer sont récurrentes. La non-délivrance de l'insuline par pompe externe sous-cutanée engendre des phénomènes d'acidocétose dus à une carence en insuline. Enfin, il a été démontré que 40% des patients équipés d'une pompe ont une production accrue d'anticorps anti-insuline (Reix *et al.*, 2013).

2.2.5. La recherche de nouvelles formes d'insulinothérapie

Afin de palier aux différentes complications et de répondre à la forte demande des patients d'obtenir une insulinothérapie simple et non contraignante, des recherches ont été menées sur

de nouveaux modes de délivrance de l'insuline. Les premières pistes étudiées ont été la greffe de pancréas et la transplantation d'îlots pancréatiques. Ces dernières années, des dispositifs ont été mis au point afin de mimer les actions du pancréas, tels que le pancréas artificiel et le pancréas bioartificiel.

2.2.5.1. Greffe de pancréas

La greffe de pancréas entier est aujourd'hui une opération réalisée chez les diabétiques de type 1 les plus critiques en terme de régulation de la glycémie. Cette greffe a pour avantage de restaurer une glycémie et une insulino-sécrétion normales pendant plusieurs années après transplantation. Cependant, cette greffe entraîne une chirurgie lourde, accompagnée d'un traitement immunosuppresseur afin d'éviter tout rejet. Elle est donc uniquement réservée aux patients insuffisants rénaux et est réalisée conjointement à une greffe de rein.

2.2.5.2. Transplantation d'îlots pancréatiques

Cette transplantation vise les patients atteints de diabète de type 1 qui ont une fonction exocrine préservée. La méthode d'isolement d'îlots pancréatiques a été développée en 1967, et améliorée dans les années 1990 par l'introduction d'étapes de purification après l'isolement. Un protocole proposé par une équipe canadienne (Protocole d'Edmonton) a été établi en 2000 et est aujourd'hui la référence dans les procédés d'isolement d'îlots. La transplantation permet aujourd'hui de s'affranchir temporairement d'une insulinothérapie chez les patients transplantés, mais demeure peu commune. Lors de l'isolement et de la transplantation, on observe une perte massive des îlots. Aujourd'hui, il faut entre 2 à 3 pancréas pour pourvoir transplanter un patient. Ces chiffres reflètent la difficulté de développer cette technique à grande échelle.

2.2.5.3. Pancréas artificiel

Le pancréas artificiel se base sur deux dispositifs : un premier mesurant la glycémie, et un deuxième délivrant l'insuline. Deux systèmes sont à l'étude aujourd'hui: un glucomètre associé à une pompe sous-cutanée, et un glucomètre implanté relié à une pompe implantable et délivrant l'insuline en intra-péritonéal. Le principe de ces dispositifs repose sur la mesure en continu de la glycémie par le glucomètre, et la transmission d'information à la pompe sur les quantités d'insuline à délivrer, basée sur des algorithmes (Cobelli *et al.*, 2011; Ricotti *et al.*, 2013) (**Fig. 2-28**).

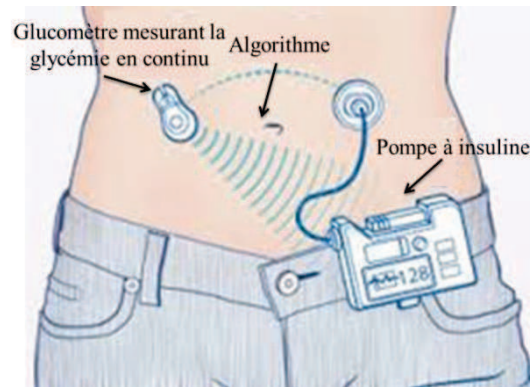


Figure 2-28 : Schématisation du principe du pancréas artificiel externe
(www.mayo.edu)

Ces systèmes offrent au patient une réelle indépendance vis-à-vis des injections. Cependant, les algorithmes utilisés dans les dispositifs ont été la cause de dysfonctionnements dans les quantités d'insuline délivrée et sont toujours un frein au développement du dispositif. Bien que le dispositif soit en étude clinique de phase 1, il reste encore de nombreux problèmes techniques à résoudre.

2.2.5.4. Pancréas bioartificiel

Le pancréas bioartificiel repose sur l'encapsulation de cellules insulino-sécrétrices. L'avantage de ce système est l'ajustement physiologique de la sécrétion d'insuline par rapport à la glycémie. Les cellules insulinosécrétrices peuvent délivrer naturellement la quantité d'insuline nécessaire à la normoglycémie. L'encapsulation des cellules est aujourd'hui un domaine de recherche en plein essor. Plusieurs stratégies sont à l'étude, comme la microencapsulation dans des billes d'alginate, ou la macroencapsulation. La problématique majeure dans le développement de ces systèmes est la perméabilité sélective des parois des dispositifs à l'insuline, ainsi qu'au glucose et aux différentes molécules du système immunitaire (Benhamou *et al.*, 2012) (**Fig. 2-29**).

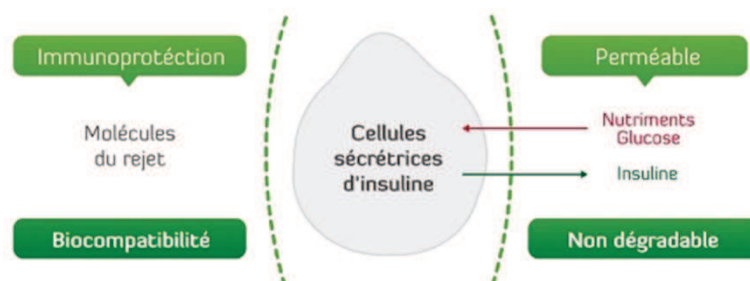


Figure 2-29 : Schématisation de l'encapsulation des cellules sécrétrices d'insuline dans le cadre du pancréas bioartificiel
(www.defymed.com)

Il est évident que ce dispositif doit être vascularisé afin de garantir la survie des cellules qu'il contient. Le remplacement des cellules mortes doit aussi être assuré par un mécanisme simple. Aujourd'hui, plusieurs dispositifs sont en cours de développement et semblent offrir des perspectives prometteuses.

2.2.5.5. Voies alternatives de délivrance de l'insuline

Des recherches visent également à développer des voies de délivrance de l'insuline non-invasives, c'est à dire évitant les injections par des aiguilles. Ces recherches se basent sur l'utilisation de nouvelles voies d'administration et des vecteurs thérapeutiques. Ainsi, les voies pulmonaires, buccales, rectales, transdermiques et orales font l'objet de recherche et de développement.

La voie **pulmonaire** est une solution de choix pour la délivrance systémique non invasive de principes actifs, car elle offre une large surface de contact (environ 140 m²) (Owens, 2002). Par ailleurs, l'épithélium respiratoire est largement vascularisé, fin et perméable aux molécules. Cependant, la biodisponibilité des molécules y est assez faible de par la présence de nombreuses protéases présentes dans les macrophages alvéolaires (Labiris et Dolovich, 2003). De plus, de nombreuses contre-indications sont liées à cette voie d'administration, spécialement pour les fumeurs et les asthmatiques. La recherche sur l'administration par voie pulmonaire est basée sur la délivrance d'insuline sous forme d'aérosol de particules. La taille des particules est alors un facteur important dans le passage de la barrière pulmonaire.

Le laboratoire Pfizer a commercialisé aux Etats-Unis en 2006 un inhalateur appelé Exubera[®] permettant une action rapide de l'insuline. Cependant, le dispositif a été retiré du marché en 2007, suite à des études de pharmacovigilance qui ont révélés des développements de cancers chez certains patients. Aujourd'hui, plusieurs sociétés comme Novo Nordisk et Aerogen développent leurs propres inhalateurs (**Fig. 2-30**).

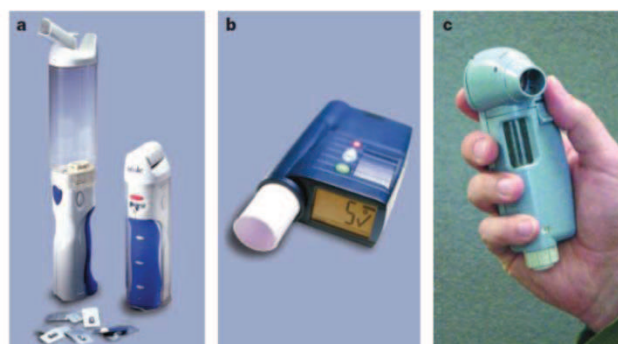


Figure 2-30 : Photographies représentant les inhalateurs développés pour la délivrance d'insuline par voie pulmonaire

(A : Exubera[®], Pfizer ; B : Aradigm[®], Novo Nordisk ; C : The Aerodose[®], Aerogen ; Owens, 2012)

L'administration **buccale** est aussi envisagée comme nouveau mode d'administration d'insuline. Les parois buccales sont en effet fortement vascularisées et l'activité des enzymes protéolytiques y est minime. Cependant, les barrières majeures à cette voie sont le flux constant de salive et la multicouche cellulaire buccale. Pour ces raisons, la biodisponibilité de l'insuline y est alors très faible.

La voie **nasale** semble avoir un net avantage en raison de sa forte vascularisation. En effet, on dénombre dans les parois nasales plus de vaisseaux que dans la muqueuse oculaire ou rectale, ou la peau. De plus, les effets hypoglycémisants de l'insuline y sont très rapides. Cependant, ces muqueuses absorbent très faiblement les molécules lipophiles et les peptides de haut poids moléculaire (O'Hagan et Illum, 1990; Ozsoy *et al.*, 2009). L'administration d'insuline par voie nasale est donc compromise. L'utilisation de promoteurs d'absorption visant à optimiser le passage de l'insuline est en cours d'étude.

La voie **rectale** est aussi étudiée. Elle apporte l'avantage majeur de permettre un premier passage hépatique des principes actifs. En effet, les parois rectales sont richement vascularisées et reliées directement au système porte. Cependant l'absorption de protéines y est très faible (4 à 10%). Pour ailleurs, cette voie d'administration, basée sur l'utilisation de suppositoires, reste toujours contraignante pour les patients.

La voie **transdermique** offre aussi une large surface de contact. Malgré les avantages d'une utilisation simple et discrète, cette voie est peu adaptée aux molécules de haut poids moléculaire comme l'insuline. Le derme est en effet peu perméable. L'insuline seule présente donc une faible disponibilité par voie cutanée. Différents systèmes de perméabilisation du derme ou des vecteurs thérapeutiques sont toutefois à l'étude, comme les ionophorèses, les transférosomes et les agents de perméabilisation.

La voie **orale** est l'une des alternatives les plus étudiées dans les nouvelles voies d'administration de l'insuline. L'avantage qu'elle apporte est en premier lieu physiologique grâce au premier passage hépatique. Cette voie permet donc de limiter les hypoglycémies sévères. Cependant, la limite majeure de cette voie est liée aux nombreuses barrières physiques et chimiques rencontrées jusqu'à la délivrance de l'insuline au foie. En effet, l'insuline est un peptide qui ne résiste pas aux conditions présentes au niveau gastrique et intestinal. De plus, la faible perméabilité de l'intestin à cette molécule limite son absorption.

Aussi, des stratégies de protection et de vectorisation de l'insuline sont nécessaires pour envisager une administration orale de l'insuline.

Les différentes voies d'administration présentées ici offrent toutes une alternative aux injections d'insuline. Elles apportent aussi un avantage certain comme leur facilité d'utilisation. Cependant, des barrières à la délivrance systémique de l'insuline existent par ces voies d'administration. Ces barrières sont à l'origine d'une faible biodisponibilité et d'inconvénients majeurs quant au développement de nouveaux modes d'administration de l'insuline (**Tableau 2-3**).

Caractéristiques Voie	Utilisation simple, rapide et discrète	Pas de piqûre	Pas de matériel	1 ^{er} passage hépatique	Limitation des hypoglycémies sévères
Rectale		✓	✓	✓	✓
Transdermique	✓	✓			
Buccale	✓	✓			
Nasale	✓	✓			
Pulmonaire	✓	✓			
Orale	✓	✓	✓	✓	✓

Tableau 2-3 : Tableau récapitulatif des avantages et inconvénients des différentes voies d'administration d'insuline envisagées

2.3. L'insulinothérapie par voie orale

2.3.1. Intérêts et limites de la voie orale

2.3.1.1. Présentation de la voie orale

Aujourd'hui, en thérapeutique, la voie orale est la voie d'administration la plus répandue. En effet, environ 60 % des petites molécules de synthèse commercialisées visent une administration orale. Ceci n'est pas le cas pour les protéines et peptides, puisque seulement une quarantaine de formulations peptidiques ou protéiques administrables par voie orale sont actuellement commercialisées. Toutefois, 270 peptides sont en essais cliniques, et 400 peptides en études précliniques avancées (Renukuntla *et al.*, 2013).

La voie orale passe par les cavités buccales, l'œsophage, l'estomac puis l'intestin, mais la majorité de l'absorption des nutriments et principes actifs a lieu au niveau de l'intestin. Cette absorption est largement favorisée par la grande surface que présente ce tissu. En effet, l'intestin grêle, d'une longueur d'environ 7 mètres, est constitué de villosités et de microvillosités. Cette structure augmente alors considérablement la surface de contact avec les nutriments, les petites molécules et les peptides. Chez l'homme, la surface moyenne de l'intestin est de 200 à 300 m² (**Fig. 2-31**).

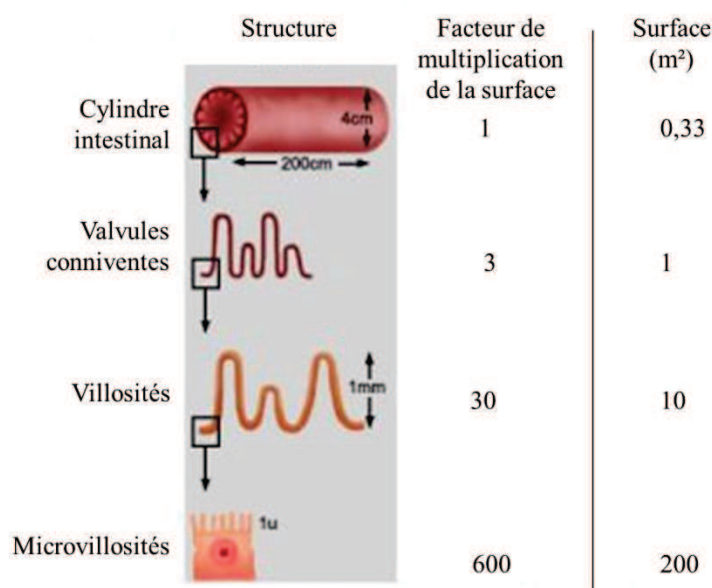
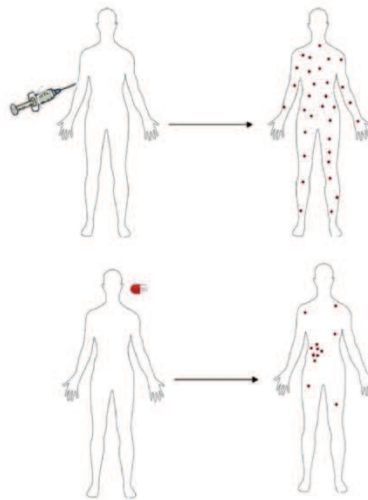


Figure 2-31 : Schématisation de la structure de l'épithélium intestinal et de ses surfaces de contact

Les villosités ressemblent morphologiquement à des dômes et possèdent en leur centre une forte vascularisation. Ces vaisseaux permettent alors de capter les nutriments, les molécules et les peptides et de les amener vers la veine porte, veine reliant l'intestin au foie.

2.3.1.2. Intérêts de la voie orale

La voie orale est une voie de délivrance très commune, non invasive et ne nécessitant pas de formation particulière du patient. Son avantage certain est qu'elle est physiologique. Dans le cas de l'insuline, elle présente l'avantage de permettre un premier passage hépatique. En effet, les autres voies d'administration, excepté la voie rectale, passent par une distribution systémique, et de ce fait, seulement 50 % de l'insuline injectée atteint le foie (Rekha et Sharma, 2013). La voie orale permet également une distribution ajustée d'insuline aux organes nécessiteux (**Fig. 2-32**).



**Figure 2-32 : Schématisation de la diffusion de l'insuline après administration par voie sous-cutanée et orale
(Rekha et Sharma, 2013)**

En récapitulant les différentes stratégies d'administration actuellement étudiées, il apparaît que l'insulinothérapie par voie orale offre le plus grand nombre d'avantages au patient, de par son utilisation simple, rapide, discrète et non stigmatisée, et ne nécessitant pas de piqûre ou de matériel particulier. La conservation du premier passage hépatique et la limitation des hypoglycémies sévères sont aussi de réels avantages pour les patients, mais aussi les praticiens.

2.3.1.3. Limites de la voie orale

La voie orale présente toutefois des limites dans le cas de l'insuline. La biodisponibilité des protéines ou des peptides délivrés par voie orale est très faible ; elle est en général inférieure à 1% (Gowthamarajan et Kulkarni, 2003). Ces données sont liées à plusieurs composantes caractéristiques de la voie orale : l'environnement chimique et enzymatique de l'estomac, de l'intestin hostile aux peptides instables, et la structure même de l'épithélium intestinal faiblement absorbant.

2.3.1.3.1. Barrières chimiques et enzymatiques

Le pH est variable tout le long du tractus gastrointestinal. Le pH de l'estomac varie entre 1 et 3, celui du duodénum entre 6 et 6,5, et enfin celui du gros intestin entre 5,5 et 7 (Van de Graaf, 1986). L'environnement acide peut faciliter les changements de conformation et la dissociation des hexamères d'insuline en engendrant la formation de dimères (Whittingham *et al.*, 2002). Ces dimères d'insuline sont toujours actifs, mais leur stabilité est alors altérée. La

variation de pH survenant lors du passage au niveau de l'intestin conduit à la perte de stabilité de l'insuline et à son inactivité.

Diverses enzymes protéolytiques susceptibles de contribuer à la dégradation de l'insuline sont rencontrées tout le long du tractus gastrointestinal. Les enzymes majoritairement présentes dans l'estomac sont la pepsine, la gélatinase et la lipase ; ces enzymes assurent l'hydrolyse peptidique. La trypsine, la chymotrypsine et les carboxypeptidases sont sécrétées par le pancréas et délivrées dans l'intestin. Ces enzymes sont responsables de 20 % de la dégradation des protéines ingérées dans l'intestin (Carino et Mathiowitz, 1999) et leur activité est maximale dans la lumière de la bordure en brosse de l'intestin grêle (Rekha et Sharma, 2013). La présence des sels biliaires délivrés dans l'intestin est aussi une source de dégradation peptidique.

2.3.1.3.2. Barrières physiques

2.3.1.3.2.1. Barrière structurale

L'intestin grêle, première partie de l'intestin, se décompose en trois parties : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Le duodénum, responsable de l'absorption de plus de 90% des nutriments (Renukuntla *et al.*, 2013), est composé d'entérocytes, représentant plus de 80% des cellules de l'intestin, de cellules à mucus ou cellules caliciformes (15%), de cellules M des plaques de Peyer et de cellules de Paneth (Chen *et al.*, 2011) (Fig. 2-33).

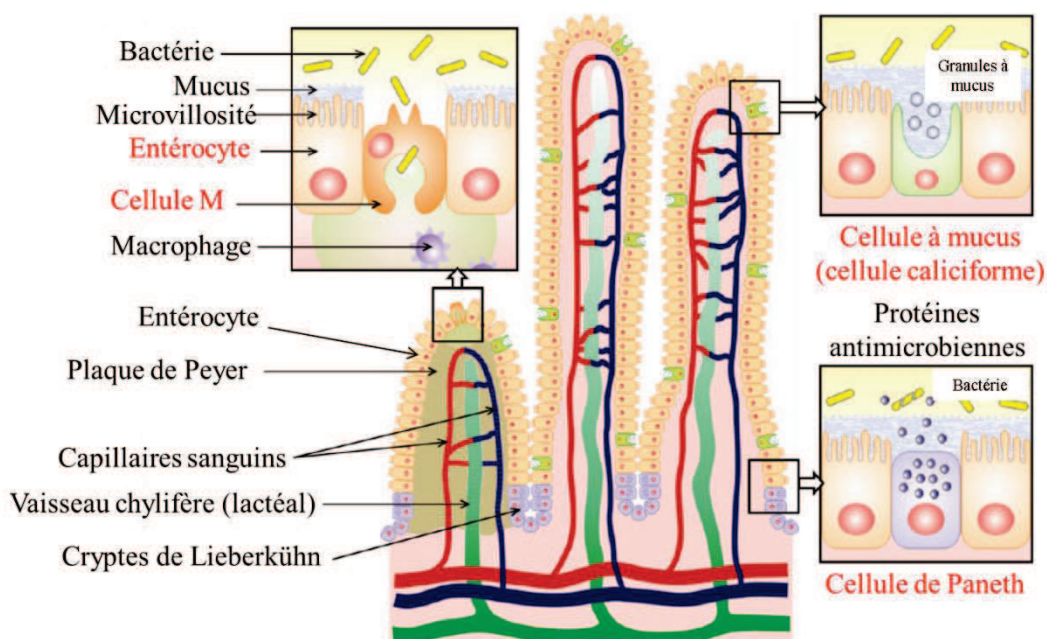


Figure 2-33 : Schématisation de la structure cellulaire de l'épithélium intestinal (D'après Chen *et al.*, 2011)

Les entérocytes ont un phénotype absorbant et sont quasiment les seuls à délivrer les molécules dans la circulation sanguine. Cependant, ces cellules sont uniquement perméables aux composés lipophiles et de petite taille, et sont imperméables aux composés hydrophiles et de grandes tailles telles que les protéines. Les cellules M des plaques de Peyer sont peu absorbantes, et de plus, les molécules qui passent la barrière intestinale *via* ces cellules sont mises en contact directement avec les cellules immunitaires, tels que les lymphocytes et les macrophages résidents. Ainsi, le passage transcellulaire des protéines hydrophile et de grande taille est limité.

Il existe une autre voie pour traverser la barrière intestinale ; c'est la voie paracellulaire (**Fig. 2-34**).

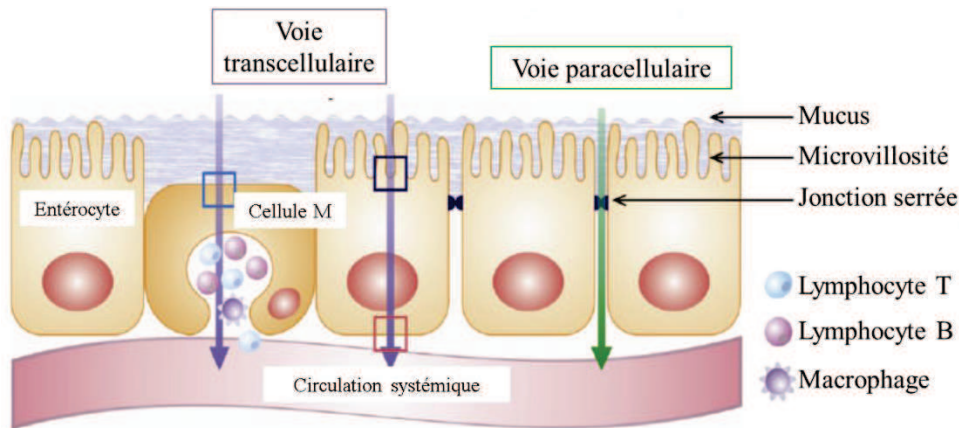


Figure 2-34 : Schématisation des voies de passage de la barrière épithéliale de l'intestin (D'après Chen *et al.*, 2011)

La voie de passage paracellulaire dans la barrière intestinale est aussi sélective. En effet, l'épithélium forme un tapis cellulaire présentant une forte cohésion grâce à l'établissement des jonctions intercellulaires de trois types : les jonctions serrées (ou *zonula occludens* ou tight junctions), les desmosomes (ou jonctions d'adhérence ou *zonula adherens*), et les jonctions de communication (ou GAP junctions) (**Fig. 2-35**).

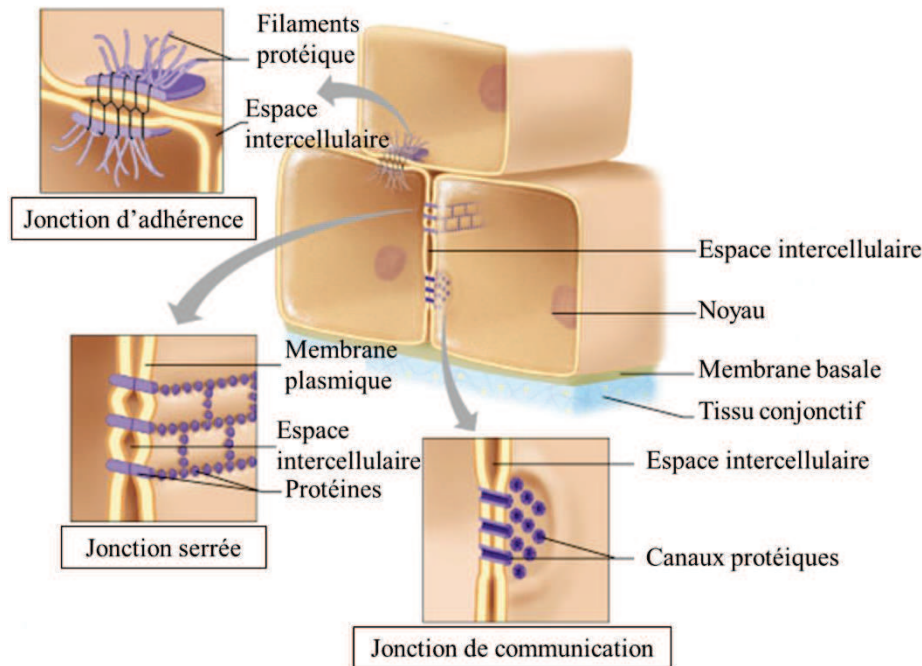


Figure 2-35 : Schématisation des jonctions intercellulaires des entérocytes
(D'après www.bioserv.fiu.edu)

Le passage paracellulaire s'opère uniquement par les jonctions serrées. Cette voie de passage est limitée dans l'épithélium intestinal et représente moins de 1 % des échanges ayant lieu à la surface de l'épithélium (Madara, 1998). Ces jonctions participent au maintien de la structure épithéliale et jouent un rôle important dans les échanges passifs entre le compartiment apical et basolatéral des cellules. Les jonctions serrées sont perméables aux ions, aux petites molécules hydrophiles et permet la diffusion de l'eau. Les jonctions s'ouvrent en général quand les molécules sont cationiques ou anioniques. De plus, ces jonctions sont dépendantes de la présence d'ions bivalents, tels que le Ca^{2+} (Rekha et Sharma, 2013). La perméabilité peptidique par la voie paracellulaire est alors très restreinte.

2.3.1.3.2.2. Barrière sécrétrice

Les cellules caliciformes ont comme principal rôle la défense de l'épithélium intestinal. Pour cela, les cellules sécrètent du mucus. La sécrétion du mucus est continue ainsi que sa clairance (Cone, 2009; McGuckin *et al.*, 2011), ce qui constitue un véritable obstacle au passage de molécule, mais aussi de pathogènes comme les bactéries. Il semblerait que chez le rat, le turnover complet du mucus soit réalisé en 4 à 6 h (Lai *et al.*, 2009).

Le mucus est composé de deux parties : le mucus faiblement adhérent et le mucus fortement adhérent et stérile (McGuckin *et al.*, 2011). Sa sécrétion est variable tout le long du tractus gastrointestinal (Atuma *et al.*, 2001) (**Fig. 2-36**).

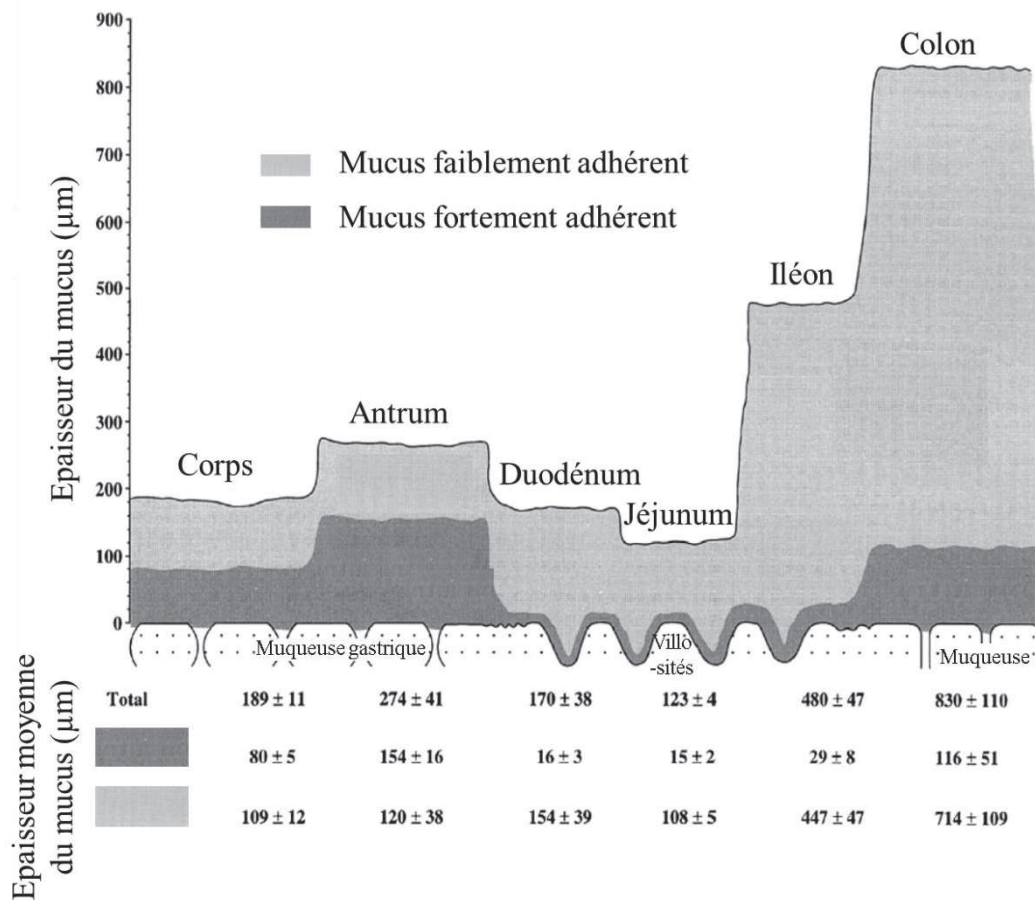


Figure 2-36 : Schématisation de l'épaisseur *in vivo* des couches de mucus chez le rat (D'après Atuma *et al.*, 2001)

Le mucus est un hydrogel complexe composé de mucines, de protéines, de glucides, de lipides, de sels, d'anticorps, de bactéries et de débris cellulaires (Ensign *et al.*, 2012). Les mucines sont fortement majoritaires dans le mucus (Kim et Khan, 2013). Ce sont de larges glycoprotéines constituées de chaînes oligosaccharidiques linéaires ou ramifiées reliées à une protéine centrale. Il existe des mucines ancrées (contenu dans la couche fortement adhérente) et des mucines sécrétées formant un gel (Smirnova *et al.*, 2003). Comme tous les autres peptides, elles sont synthétisées au niveau des ribosomes, puis transportées vers le réticulum endoplasmique où elles sont oligomérisées par des ponts disulfure (Forstner, 1995). Les mucines sont alors transportées vers le *trans* Golgi, où débute la condensation pour finir dans des granules à mucus. La sécrétion de mucine est effectuée par exocytose du côté apical de la cellule après fusion de la granule à la membrane plasmique. Le temps de remplissage complet d'une cellule caliciforme est estimé entre 60 et 120 min (Forstner, 1995).

Différentes mucines sont présentes tout le long du tractus gastrointestinal, avec comme mucine majoritaire MUC5 pour l'estomac et MUC2 pour l'intestin grêle.

Sous les couches de mucus, une autre barrière à l'absorption intestinale est le glycocalix, qui peut être partiellement intégré à la couche de mucus fortement adhérente. Son épaisseur est aussi variable tout au long du tractus gastrointestinal, mais dans l'intestin, elle peut atteindre 0,1 à 0,5 μm (Aoki *et al.*, 2005). Le glycocalix est composé de glycoprotéines, de glycolipides et de protéoglycanes exprimés dans les membranes cellulaires de l'épithélium. Comme le mucus, le glycocalix est renouvelé en permanence, et peut être totalement remplacé en 6 à 12 h dans le jéjunum humain (Moran *et al.*, 2011).

2.3.2. Les différentes stratégies actuelles pour la délivrance orale d'insuline

Les nombreuses barrières biochimiques, enzymatiques et physiques que présentent la voie orale et le tractus gastrointestinal sont un frein à la biodisponibilité de l'insuline. Différentes stratégies de recherche ont été élaborées ces dernières décennies, afin de garantir l'arrivée de l'insuline à ses organes cibles, et donc son efficacité. Afin de contourner les barrières biochimiques et enzymatiques, la protection de l'insuline de la dégradation enzymatique par des agents anti-protéolytiques, et la modification de sa structure pour augmenter sa stabilité, ont été des pistes de recherche. L'augmentation de l'absorption gastrointestinale à l'aide de promoteurs d'absorption, et l'augmentation de l'adhésion avec le mucus sont des voies toujours envisagées à l'heure actuelle. Enfin, la vectorisation de l'insuline *via* des particules est un des axes de recherche en plein essor depuis ces vingt dernières années.

2.3.2.1. Insuline modifiée

La stratégie de modification de l'insuline vise à éviter les dégradations enzymatiques, mais aussi à améliorer l'absorption intestinale. La modification la plus courante est la PEGylation, qui consiste à greffer sur l'insuline un groupement polyéthylène glycol (PEG). La PEGylation permet de limiter les interactions avec les protéines sériques, de diminuer la clairance par la circulation systémique et de masquer les épitopes immunogènes de l'insuline afin d'éviter par ce fait les réactions inflammatoires. La PEGylation peut aussi prévenir des dégradations enzymatiques. La société NOBEX (USA) a mis au point une insuline conjuguée à un oligomère amphiphile simple (PEG7-9 + hexyl) attaché de manière covalente à la lysine 29 de la chaîne β de l'insuline. Cette insuline appelée HIM2, pour hexyl insulin monoconjugate 2, est protégée des hydrolyses enzymatiques par son encombrement stérique et le masquage des sites spécifiques de dégradation (Still, 2002) (**Fig. 2-37**).

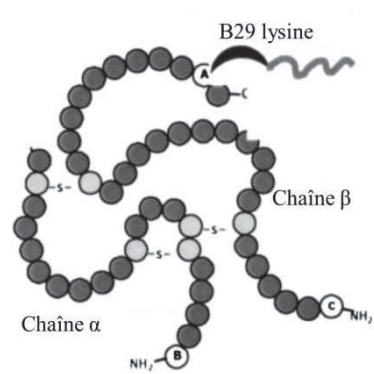


Figure 2-37 : Schématisation de l'insuline HIM2 modifiée par liaison covalente à un oligomère (D'après Still, 2002)

Les modifications de l'insuline peuvent aussi être de nature à lier un ligand qui facilite l'endocytose via un récepteur. Le couplage de la transferrine sur l'insuline par un pont disulfure est une stratégie pour augmenter l'endocytose de l'hormone. En effet, la transferrine est une protéine endogène en charge du transport du fer de l'intestin vers le foie, et permet à l'insuline de résister à la digestion engendrée par la trypsine et la chymotrypsine (Azari et Feeney, 1958; Banerjee *et al.*, 1986; Crichton, 1990).

2.3.2.2. Inhibiteurs de protéases

Les inhibiteurs de protéases sont étudiés dans le but d'éviter la dégradation de l'insuline. Les plus utilisés sont les inhibiteurs de trypsine, chymotrypsine et carboxypeptidases (Rekha et Sharma, 2013). Ils sont le plus souvent co-administrés avec l'hormone et peuvent aussi être associés aux promoteurs d'absorption.

Le sodium glycocholate, ainsi que le mélisate de camostat et la bacitracine ont été étudiés sur des fragments d'intestin de rat (Yamamoto *et al.*, 1994). Si ces inhibiteurs se sont avérés efficaces sur des fragments de gros intestin, ils l'ont été beaucoup moins sur des fragments d'intestin grêle. Ces résultats peuvent s'expliquer par la grande quantité et la multitude d'enzymes protéolytiques présentes dans ces fragments.

De plus, les inhibiteurs de protéases peuvent être la cause de plusieurs effets indésirables tels qu'une hypertrophie du pancréas et des troubles de la digestion. L'administration de ces agents peut alors engendrer à long terme des altérations du métabolisme.

2.3.2.3. Promoteurs d'absorption

Les promoteurs d'absorption sont utilisés afin d'augmenter le passage de l'insuline à travers la barrière intestinale. Il existe plusieurs types de promoteurs d'absorption, avec des actions bien différentes. Certains permettent d'ouvrir les jonctions serrées, d'autres de dégrader localement les membranes cellulaires ou de diminuer la viscosité du mucus.

Les promoteurs d'absorption les plus utilisés sont les sels biliaries, les chélateurs du calcium, les acides gras, et les surfactants (Khafagy *et al.*, 2007). Les sels biliaries sont couramment utilisés pour leur capacité à dissocier les membranes cellulaires et ouvrir les jonctions serrées. Les chélateurs du calcium agissent en capturant les ions bivalents, ce qui engendre la rupture des jonctions intercellulaires dépendantes du calcium. Les acides gras augmentent la fluidité des phospholipides membranaires, permettent la restructuration de l'actine et engendrent alors l'ouverture des jonctions serrées. Enfin, les surfactant perturbent les lipides intercellulaires en modifiant leur orientation et leur fluidité, et permettent alors le passage de l'insuline par la voie paracellulaire.

La Toxine Zonula Occludens (ZOT), provenant de la bactérie *Vibrio cholera* responsable du développement du choléra, est aussi un promoteur d'absorption. Le fragment AT-1002 de cette toxine est à l'origine de l'ouverture des jonctions serrées (Carino et Mathiowitz, 1999). Cette toxine agit sur les filaments d'actine et engendre la réorganisation de la jonction qui devient alors perméable.

Les promoteurs d'absorption sont souvent utilisés en co-administration avec des inhibiteurs de protéases afin de protéger l'insuline.

L'utilisation de promoteurs d'absorption doit être particulièrement minutieuse et encadrée. En effet, l'ouverture de l'épithélium intestinal peut permettre non seulement à l'insuline d'atteindre le foie, mais également aux pathogènes biologiques tels que les toxines et les bactéries d'atteindre la circulation systémique et d'engendrer des complications plus ou moins graves.

2.3.2.4. Vectorisation de l'insuline par des particules

Une autre stratégie adoptée par les chercheurs depuis plusieurs décennies est la vectorisation de l'insuline. Elle repose sur l'encapsulation de l'hormone dans des vecteurs de nature lipidique ou synthétique. Les caractéristiques de ces vectorisations, ainsi que leurs avantages et leurs inconvénients seront traités dans un paragraphe distinct (*Cf. Paragraphe 2.4*).

2.3.3. L'insuline orale : où en sommes-nous ?

L'insuline par voie orale fait actuellement l'objet plusieurs essais cliniques. Les essais cliniques se divisent en quatre phases distinctes. La phase I correspond à l'étude du candidat médicament sur une petite cohorte de volontaires sains (20 à 80 personnes). La phase II est réalisée sur un petit groupe de patients (100 à 300) présentant la pathologie associée au traitement étudié. La phase III est, quant à elle, réalisée sur un grand nombre de patients (1 000 à 3 000) et débouche sur l'autorisation de mise sur le marché. Enfin, la phase IV, d'une

durée illimitée, consiste à enregistrer et évaluer les effets indésirables résultant de l'utilisation du médicament après sa mise sur le marché, afin, si nécessaire, de mettre en place des mesures correctives pouvant aller jusqu'au retrait du médicament.

Aujourd'hui, cinq essais cliniques de phase II ou III concernent l'insuline par voie orale. Basés sur les stratégies de modification ou de vectorisation de l'insuline présentés ci-dessus, ils sont répertoriés dans le tableau suivant (**Tableau 2-4**) :

Système de délivrance (Société)	Date de dernière communication	Technologie	Biodisponibilité	Stade clinique
Eligen® insulín (Emisphere Tech., USA et Novo Nordisk, Danemark)	Dec. 2010	Liaison non covalente et réversible de l'insuline avec un promoteur d'absorption	Faible	Phase II
HIM2 (Nobex Corp., USA et Biocon, Inde)	2009	Modification chimique de l'insuline par liaison à un oligomère amphiphile	Faible	Phase II
Capsulin™ (Diabetology Ltd, Royaume-Unis)	2010	Poudre sèche d'insuline et de stabilisateur encapsulé dans une gélule gastro-résistante	Faible	Phase II
HDV-1 (Diasome Pharm., USA)	2009	Liposomes contenant de l'insuline liée à une molécule ayant pour cible les hépatocytes, et insertion dans une capsule	Elevée	Phase III
ORMD-0801 (Oramed Pharm., Israël)	Oct. 2011	Promoteurs d'absorption ajoutés à l'insuline et insertion dans une capsule	Faible	Phase II

Tableau 2-4 : Tableau récapitulatif des différentes stratégies de délivrance de l'insuline par voie orale et leur état d'avancement clinique (D'après Reix *et al.*, 2013)

Le candidat médicament HDV-1 est à l'heure actuelle, le plus avancé. Basé sur une vectorisation ciblée de l'insuline par des liposomes insérés dans une capsule, il confère à l'insuline une biodisponibilité élevée et serait compatible avec tous les types d'insuline.

Cependant, une question reste encore non résolue vis-à-vis de l'insuline orale, celle d'éventuels effets indésirables. Cette question est légitime compte tenu de la nature de cette protéine. En effet, l'insuline est connue pour être une hormone de croissance. Se pose alors la question d'un effet promoteur sur le développement de cancers ou d'un effet aggravant sur les cancers préexistants. Des études *in vivo* ont été réalisées sur les rats, et aucune propriété procarcinogène n'a été imputée à l'insuline orale (Heinemann et Jacques, 2009).

De plus, l'insuline ne serait pas administrée seule. Les co-administrations avec des agents promoteurs d'absorption, inhibiteurs de protéases ou l'administration des polymères eux-mêmes pourraient être à l'origine de répercussion sur le métabolisme lors d'administrations répétées.

2.4. Les systèmes nanoparticulaires pour la délivrance orale de l'insuline

La vectorisation a pour objectif de contrôler et moduler la distribution d'un principe actif (protéines, ADN, substance chimique de synthèse) dans l'organisme, en associant ce principe actif à un vecteur naturel (virus) ou synthétique. Selon le cas, le vecteur permettra de préserver le principe actif, d'augmenter sa solubilité en cas d'hydrophobie trop marquée, de diminuer sa toxicité, ou de cibler spatialement, temporellement et quantitativement sa distribution dans l'organisme (Malam *et al.*, 2009; Venkatraman *et al.*, 2010).

D'un point de vue physico-chimique, les vecteurs de médicaments se présentent sous la forme de particules pouvant être classées selon leur taille ou leur structure. Ainsi, suivant la taille, on distingue les micro- et les nanoparticules (NPs). Au sens large du terme, les microparticules ont un diamètre de 1 μm ou plus, alors que les NPs sont submicroniques. Au sens strict du terme, les NPs sont des vecteurs colloïdaux inférieurs ou égaux à 100 nm (Wang, Gerlach, et al., 2013). Dans un souci de clarté, nous appellerons « NPs » ou nanovecteurs, les vecteurs de taille inférieure à 1 μm , et « microparticules », les vecteurs présentant un diamètre de l'ordre du micromètre. Suivant la structure, on distingue les sphères à structure « matricielle », des capsules à structure « réservoir ».

A ce jour, quatre groupes de vecteurs synthétiques ont été étudiés dans le cadre de la délivrance orale d'insuline : les liposomes et les nanocapsules lipidiques, et les nanosphères et les nanocapsules polymériques (Wawrezynieck *et al.*, 2008) (**Fig. 2-38**).

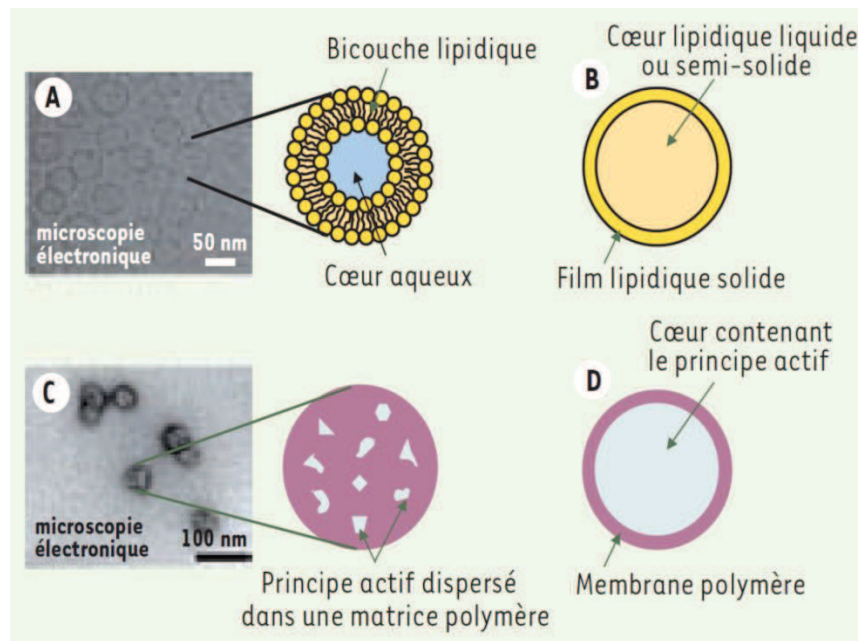


Figure 2-38 : Schématisation des différents vecteurs pour la délivrance d'insuline par voie orale (A : Liposomes, B : Nanocapsules lipidiques, C : Nanosphères de polymère, D : Nanocapsules de polymère (Wawrezinieck *et al.*, 2008)

2.4.1. Les vecteurs de nature lipidique

2.4.1.1. Les liposomes

Les liposomes sont des vésicules composées d'une ou de plusieurs bicouches de phospholipides organisées autour d'un cœur aqueux contenant un principe actif hydrosoluble dans le cas de la vectorisation médicamenteuse (Renkuntla *et al.*, 2013). Ils sont classés en trois groupes selon leur taille et le nombre de bicouches lipidiques qu'ils contiennent : les liposomes de petite taille formés d'une monocouche lipidique ou small unilamellar vesicles (10 à 100 nm, SUV), les liposomes de grande taille formés d'une monocouche lipidique ou large unilamellar vesicles (100 à 300 nm, LUV) et des liposomes multicouches (Lim *et al.*, 2012). Des agents de ciblage, tels que des anticorps ou des ligands de récepteurs, ou des agents de furtivité, tel que le polyéthylène glycol dans le cas de la PEGylation, peuvent être greffés à leur surface, afin de cibler un site d'action spécifique ou d'augmenter leur temps de circulation (Renkuntla *et al.*, 2013; Torchilin, 2005) (**Fig. 2-39**).

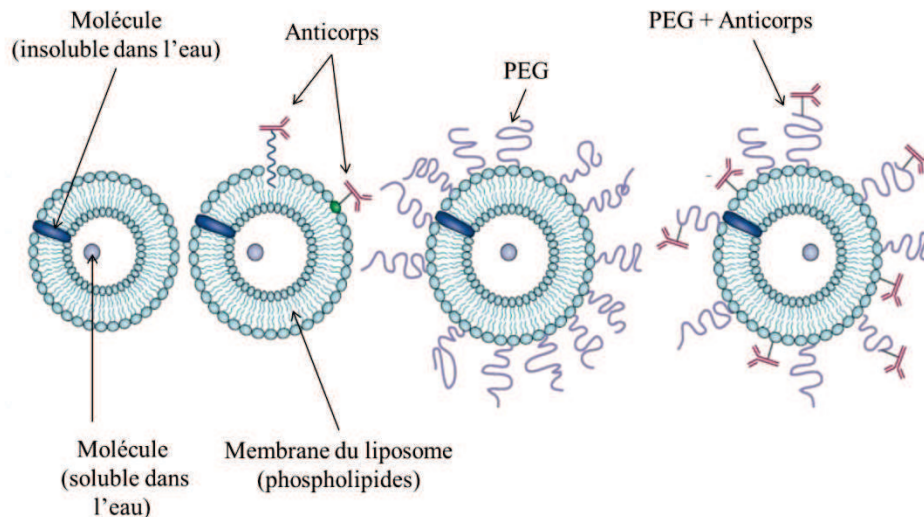


Figure 2-39 : Schématisation des différents types de liposomes monocouches (D'après Torchilin, 2005)

L'avantage des liposomes est lié aux phospholipides utilisés pour leur synthèse. Il s'agit le plus souvent de phospholipides naturels, tels la phosphatidylcholine ou le phosphatidylglycérol, ce qui confère aux liposomes la réputation d'être atoxique (Almeida et Souto, 2007; Torchilin, 2005).

Leur stabilité dépend en grande partie du pH de l'environnement dans lequel ils se trouvent. Ils sont stables à pH physiologique, mais se dégradent à pH acide. La résistance de ces vecteurs est donc compromise dans l'estomac. De plus, la synthèse des liposomes engendre la formation de vésicules présentant une forte hétérogénéité en taille. Enfin, la membrane de phospholipides est perméable à l'eau. L'eau pénètre alors dans la vésicule qui gonfle, et peut se rompre.

2.4.1.2. Les particules et capsules lipidiques

Les particules et les capsules lipidiques sont réalisées à partir de lipides solides à température ambiante. Elles sont le plus souvent synthétisées par émulsion huile / eau. L'avantage qu'elles apportent, tout comme les liposomes, est lié à la nature de leur membrane. Elle est souvent composée de glycérides qui sont biocompatibles. Cependant, la faible stabilité de ces structures nécessite la présence de surfactants dont le choix doit faire l'objet d'une attention particulière, en raison de leur possible toxicité. Bien que les lipides soient de nature biocompatibles, et le plus souvent approuvés par l'agence américaine de sécurité des médicaments (Food and Drug Administration, FDA), une administration excessive de lipides peut engendrer des complications tels que les hyperlipidémies et des troubles gastro-intestinaux (Lim *et al.*, 2012).

De plus, le mode de préparation de ces vecteurs constitue une véritable limite. En effet, afin de synthétiser ces particules, les lipides doivent être à l'état liquide, ce qui n'est possible qu'à forte pression ou forte température, des conditions pas toujours compatibles avec les principes actifs devant être encapsulés.

2.4.2. Les vecteurs à base de polymères

Au cours des dernières décennies, les vecteurs à base de polymères se sont largement développés (Delie et Blanco-Prieto, 2005). Les polymères non-biodégradables, en raison de la toxicité qu'ils engendraient, ont laissé la place aux polymères biodégradables et biocompatibles. Ces vecteurs sont des systèmes colloïdaux basés sur des polymères solides naturels ou synthétiques (Kumari *et al.*, 2010) (**Fig. 2-40**).

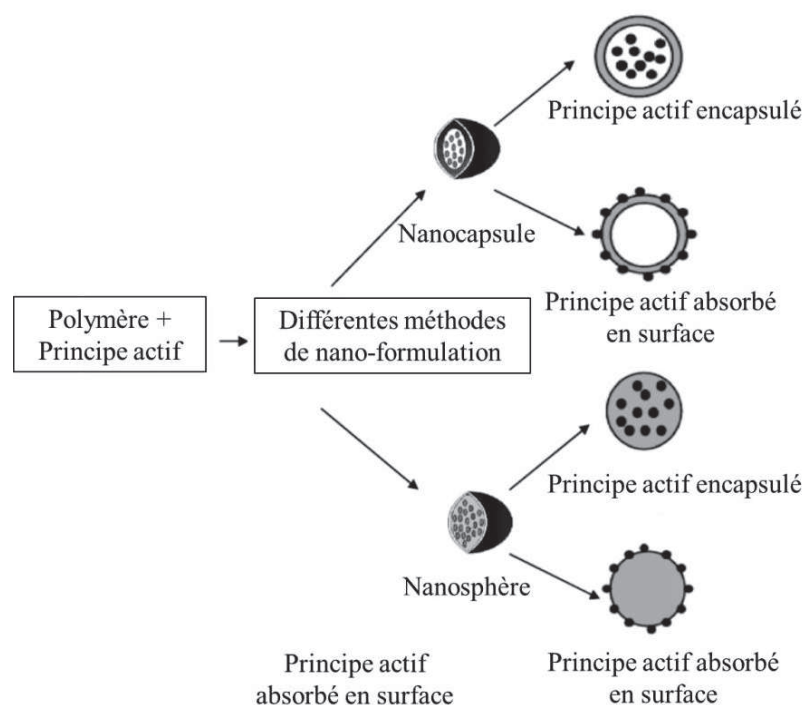


Figure 2-40 : Schématisation des différents types de vecteurs colloïdaux biodégradables (D'après Kumari *et al.*, 2010)

2.4.2.1. Polymères naturels

Les polymères naturels sont considérés comme les moins toxiques, car de source naturelle ; la plupart sont déjà utilisés comme excipient (Sonia et Sharma, 2012). Les trois principaux polymères saccharidiques utilisés aujourd'hui pour la synthèse de vecteurs thérapeutiques sont le chitosane, l'alginate et l'acide hyaluronique (**Tableau 2-5**).

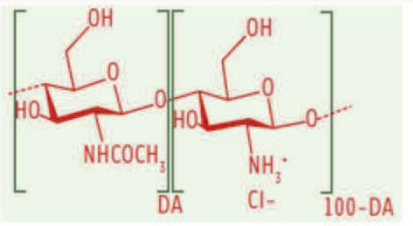
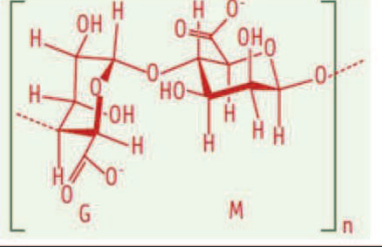
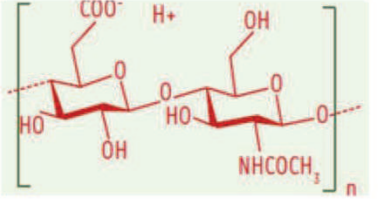
	Polymère	Formule chimique
Polymères naturels	chitosane DA : degré d'acétylation	 The diagram shows the repeating unit of chitosane in its Haworth projection. It consists of two pyranose rings linked by a beta-1,4-glycosidic bond. The left ring is N-acetylglucosamine (GlcNAc), with an acetyl group (NHCOCH3) at the C2 position. The right ring is glucosamine (GlcN), with an amino group (NH3+) at the C2 position. The degree of acetylation (DA) is indicated as the fraction of GlcNAc units, and 100-DA represents the fraction of GlcN units. A chloride ion (Cl-) is shown as the counterion for the positive charge on the amino group.
	acide alginique G : acide glucuronique M : acide mannuronique	 The diagram shows the repeating unit of alginate, a copolymer of D-glucuronic acid (G) and D-mannuronic acid (M). The G unit is a pyranose ring with a carboxylate group (COO-) at the C5 position. The M unit is a pyranose ring with a carboxylate group (COO-) at the C5 position and a hydroxyl group (OH) at the C2 position. The units are linked by alpha-1,3-glycosidic bonds. The subscript 'n' indicates the number of repeating units.
	acide hyaluronique	 The diagram shows the repeating unit of hyaluronic acid, a copolymer of D-glucuronic acid (G) and N-acetylglucosamine-6-sulfate (GlcNAc-6S). The G unit is a pyranose ring with a carboxylate group (COO-) at the C5 position. The GlcNAc-6S unit is a pyranose ring with an acetyl group (NHCOCH3) at the C2 position and a sulfate group (OSO3-) at the C6 position. The units are linked by alpha-1,3-glycosidic bonds. The subscript 'n' indicates the number of repeating units.

Tableau 2-5 : Tableau récapitulatif des principaux polymères naturels et leur formule chimique (D'après Wawrezynieck *et al.*, 2008)

Les saccharides présentent l'avantage d'être stables et facilement modifiable chimiquement et biochimiquement. De plus, ils sont hydrophiles et biodégradables, dégradés par les enzymes et biocompatibles. Les polysaccharides chargés comme le chitosane et l'alginate présentent aussi l'avantage de former des complexes avec les principes actifs chargés eux aussi par interactions électrostatiques.

Le **chitosane** est un copolymère polycationique issu de la chitine composant la paroi cellulaire de nombreux champignons et l'exosquelette des arthropodes (Mahapatro et Singh, 2011). La chitine est composée de chaînes linéaires de N-acétyl-glucosamine reliées par des ponts β -osidiques. Le chitosane est obtenue après déacétylation de la chitine non soluble (Gogev *et al.*, 2003) (**Fig. 2-41**). Le chitosane est métabolisé dans les lysosomes, dégradé peu à peu en sucres aminés et totalement éliminé par l'organisme (Sonia et Sharma, 2012).

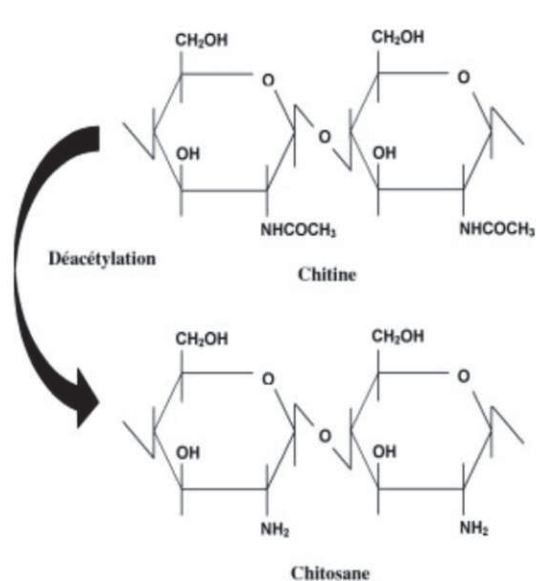


Figure 2-41 : Schématisation de la déacétylation de la chitine
(Gogev *et al.*, 2003)

Le chitosane est mucoadhésif et a également la capacité d'ouvrir transitoirement les jonctions serrées des épithéliums. Cette dernière action est due à l'interaction des charges positives du chitosane avec les protéines de la jonction serrée, comme les occludines et les protéines zonula occludens-1 (ZO-1), interaction engendrant une réorganisation des filaments d'actine et l'ouverture des jonctions (Artursson *et al.*, 1994). Ces deux propriétés font du chitosane un composé intéressant pour la vectorisation de principes actifs aux niveaux des différents épithéliums de l'organisme. Les procédés de synthèse à partir de chitosane sont relativement doux et n'engendrent généralement pas de détérioration du principe actif ; c'est donc un polymère de choix dans la fabrication de vecteurs de médicaments (Loh *et al.*, 2010). Cependant, le chitosane est peu stable, car il est uniquement soluble aux faibles pH.

L'**acide alginique** est très utilisé pour ses propriétés mucoadhésives (Sonia et Sharma, 2012). Ils forment des particules en milieux aqueux en présence d'ions divalents. L'alginate possède des propriétés dépendantes du pH intéressantes pour la délivrance d'insuline par voie orale. En effet, l'alginate se rétracte dans l'environnement acide, et gonfle à pH neutre. Il permettrait donc de protéger le principe actif dans l'estomac et de libérer l'insuline dans l'intestin ou le sang (Sarmiento *et al.*, 2007).

L'**acide hyaluronique**, de la famille des glycosaminoglycanes, est un polysaccharide linéaire hydrosoluble (Nair et Laurencin, 2007). Il possède aussi des propriétés bioadhésives. Ses

produits de dégradation sont aussi pris en charge par le cycle de Krebs, ce qui en fait un composé biodégradable.

2.4.2.2. Polymères synthétiques

Les polymères les plus utilisés pour la synthèse de vecteurs médicamenteux sont le poly(cyanoacrylate d'alkyle), l'acide poly(lactique-co-glycolique) et la poly-ε-caprolactone (Wawrezinieck *et al.*, 2008) (**Tableau 2-6**).

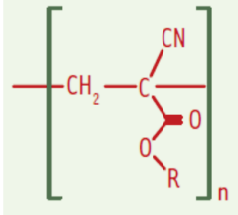
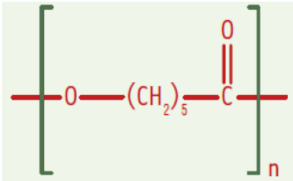
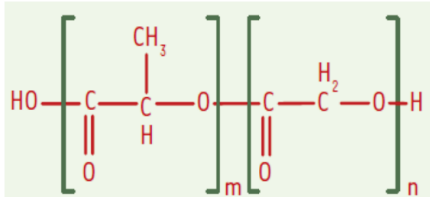
	Polymère	Formule chimique
Polymères synthétiques	Poly (cyanoacrylate d'alkyle)	
	poly-ε-caprolactone	
	Poly (acide lactique-co-acide glycolique) m : fraction d'acide lactique n : fraction d'acide glycolique	

Tableau 2-6 : Tableau récapitulatif des principaux polymères synthétiques, et leur formule chimique (D'après Wawrezinieck *et al.*, 2008)

Le **poly(cyanoacrylate d'alkyle)** de la famille des acrylates est un polymère neutre (Nair et Laurencin, 2007). Il est utilisé pour ses propriétés biodégradables par les enzymes estérases de l'organisme, et plus particulièrement par les reins (Vauthier *et al.*, 2003). Sa vitesse de dégradation dépendante de la longueur des groupements alkyles en fait un polymère intéressant pour la délivrance de principes actifs. Son temps de dégradation peut en effet varier entre plusieurs heures et plusieurs jours (Coelho *et al.*, 2010).

La **poly-ε-caprolactone** de la famille des polyesters est aussi dégradé par hydrolyse des esters (Kumari *et al.*, 2010). Cependant, celle-ci ne génère pas de résidus acides lors de sa dégradation, contrairement à l'acide poly(lactique-co-glycolique) (Coelho *et al.*, 2010). Sa demi-vie sanguine est très courte, et sa dégradation par les enzymes est rapide. Cependant, la

faible stabilité des particules font que ce polymère engendre une faible biodisponibilité du principe actif (Mukerjee *et al.*, 2007).

L'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA) est un des polymères synthétiques les plus utilisés dans la vectorisation de principes actifs, et d'insuline en particulier. Un paragraphe distinct lui est consacré (Cf. Paragraphe 2.5.1.1).

2.5. Les nanoparticules de PLGA pour la délivrance d'insuline

2.5.1. Les systèmes nanoparticulaires à base de PLGA

2.5.1.1. Le PLGA

L'acide poly(lactique-co-glycolique) est un copolymère de la famille des polyesters. Il est largement utilisé, car il est biocompatible, biodégradable et bioassimilable. En effet, le PLGA se dégrade par hydrolyse de l'ester, et forme alors ses deux métabolites monomériques, l'acide lactique et l'acide glycolique, métabolisés par le cycle de Krebs en dioxyde de carbone et en eau (Danhier *et al.*, 2012; Dinarvand *et al.*, 2011) (Fig. 2-42).

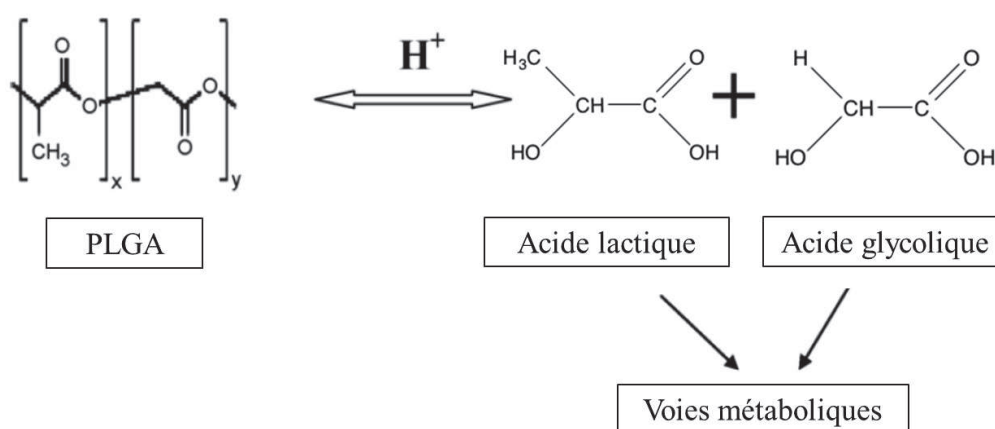


Figure 2-42 : Schématisation de la dégradation du PLGA en acide lactique et acide glycolique métabolisés par le cycle de Krebs (D'après Kumari *et al.*, 2010)

Cette métabolisation engendre donc une faible toxicité, et c'est pourquoi le PLGA est approuvé par la FDA. Il existe plusieurs types de PLGA, caractérisés par leurs ratios en monomère. Le ratio PLGA 50 : 50 (50% d'acide lactique : 50 % d'acide glycolique) est largement utilisé pour ses propriétés de stabilité, et sa vitesse élevée de dégradation (Makadia et Siegel, 2011).

2.5.2. La synthèse des NPs de PLGA

La synthèse des NPs de PLGA peut être réalisée par différents procédés, dont les principaux sont la nanoprécipitation, le salting out et l'émulsion suivie d'une évaporation des solvants (Muthu, 2009).

La **nanoprécipitation** est basée sur l'agitation magnétique, nécessitant peu d'énergie, du mélange entre le polymère dissout dans un solvant organique miscible à l'eau et le principe actif, auquel est ajouté un tensio-actif. Il en résulte la formation instantanée de NPs par diffusion du solvant.

Le **salting out** ou relargage, repose sur une dissolution du polymère et du principe actif dans un solvant comme l'acétone, et par l'émulsion de ce mélange dans un gel aqueux contenant des électrolytes (chlorure de calcium, chlorure de magnésium, etc) et un tensio-actif. Cette émulsion est ensuite transférée dans un grand volume aqueux afin de potentialiser la diffusion du solvant dans cette phase et la formation de NPs (Allémann *et al.*, 1993).

La synthèse des NPs par **émulsion** peut utiliser les méthodes eau/huile (e/h), huile/huile (h/h) et eau/huile/eau (e/h/e), suivies d'une extraction/évaporation du solvant. Les données de la pharmacopée européenne (Pharmacopée européenne 7.0) préconise la dissolution de l'insuline dans de l'acide chlorhydrique, l'insuline est donc en phase aqueuse. Pour la synthèse de NPs contenant de l'insuline, seules les émulsions e/h et e/h/e peuvent donc être utilisées. Le nombre d'émulsion peut varier : il existe les émulsions simples et les émulsions doubles (Yeo *et al.*, 2001) (**Fig. 2-43**).

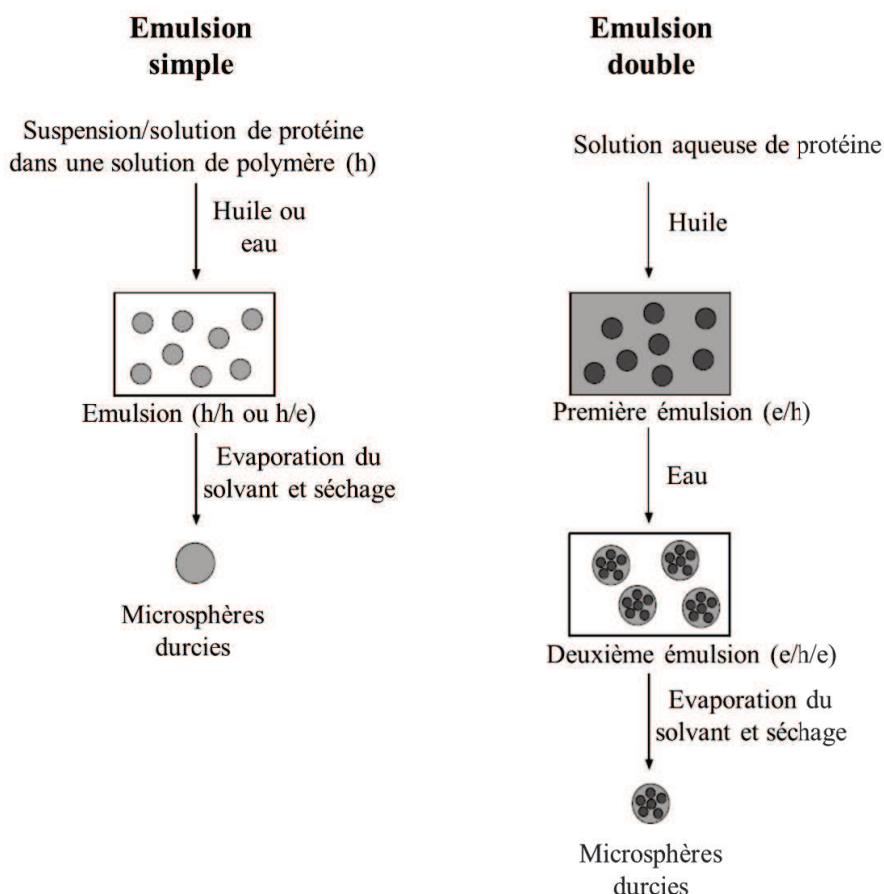


Figure 2-43 : Schématisation des émulsions simples et doubles
(D'après Yeo *et al.*, 2001)

La double émulsion consiste, dans un premier temps, en le mélange d'une solution aqueuse contenant la protéine ou le principe actif à encapsuler avec une phase organique ou huileuse. L'ajout d'une deuxième phase aqueuse suivi d'un nouveau mélange permet la deuxième émulsion. Cette dernière étape est suivie d'un procédé d'évaporation du solvant, le plus souvent sous agitation. L'avantage majeur de cette technique, et qu'elle permet l'encapsulation de diverses protéines ou principes actifs hydrophiles de petites tailles (Bilati *et al.*, 2005). De plus, le choix du PLGA, comme polymère, permet de jouer sur la cinétique de dégradation des NPs. En effet, le PLGA 50:50 se dégrade plus rapidement dans les milieux biologiques que les autres ratios d'acide lactique et d'acide glycolique (Danhier *et al.*, 2012; Makadia et Siegel, 2011). Cependant, ces émulsions nécessitent la présence de solvants qui peuvent s'avérer toxiques. Le choix des solvants doit alors être réfléchi dans le cadre d'une utilisation médicale des NPs. Ces solvants sont classés par la FDA en plusieurs classes qui délimitent leurs domaines d'utilisation chez l'homme. Les quantités de ces solvants sont aussi contrôlées après évaporation, afin de limiter l'administration clinique de ces solutions.

2.5.3. Potentialisation des NPs de PLGA

La potentialisation vise à modifier les propriétés des NPs de PLGA, par la modification de leur surface. La particule n'est alors plus composée uniquement de ses polymères et de ses solvants, mais aussi d'autres molécules jouant alors un rôle sur la charge de surface, les propriétés de mucoadhésion, l'adsorption des protéines, et donc l'absorption de la NPs par la muqueuse intestinale (Martin-Banderas *et al.*, 2013). Cette potentialisation est obtenue grâce à un enrobage ou « coating » de la NPs par différentes molécules. Les deux molécules les plus utilisées dans l'enrobage des NPs, sont le chitosane et le PEG. Ces molécules ont des mécanismes d'action différents et apportent à la NP des propriétés complémentaires (**Tableau 2-7**).

Molécule de coating	Mécanismes	Avantage	Inconvénient
Chitosane	Translocation des protéines des jonctions serrées et de l'actine dans la membrane plasmique	<ul style="list-style-type: none"> Propriétés mucoadhésives Ouverture des jonctions serrées 	Augmentation de la taille des NPs
PEG	Polymère hydrophile formant une couronne stérique stable en surface des NPs	<ul style="list-style-type: none"> Prévient de l'opsonisation Augmente le temps de rétention dans la circulation systémique 	Aucune cible spécifique

Tableau 2-7 : Tableau récapitulatif des mécanismes, avantages et inconvénients du chitosane et du PEG (D'après Martin-Banderas *et al.*, 2013)

2.5.3.1. Le coating par le chitosane

Le chitosane est un biopolymère hydrophile ayant de fortes propriétés mucoadhésives. Il peut être ajouté en surface des NPs par simple interactions électrostatiques (Tahara *et al.*, 2011). En effet, le PLGA est chargé négativement et le chitosane positivement. Celui-ci apporte donc des charges positives à la surface des NPs, qui favorisent les interactions avec les membranes cellulaires.

2.5.3.2. Le coating par le PEG

Le polyéthylène glycol, ou PEG, est un polymère hydrophile non ionique. Il est composé de chaînes de taille variable pouvant moduler la densité des NPs enrobées. Il est ajouté à la surface des NPs par plusieurs types de liaisons, dont les plus courantes sont les liaisons covalentes. Le PEG est connu pour sa compatibilité avec l'organisme, et c'est pourquoi il est approuvé par la FDA. Il a des effets potentialisateurs des NPs, car il permet de réduire l'accumulation des NPs dans les organes tels que le foie et la rate (Knop *et al.*, 2010), et de

diminuer les phénomènes d'opsonisation (Singh et Lillard, 2009). L'enrobage des NPs par le PEG prévient également de l'agrégation des NPs par sa forte stabilité stérique.

La première utilisation du PEG comme agent d'enrobage sur des microsphères de PLGA a été rapportée par Gref *et al.* (1994). Cette équipe a montré que les particules non-enrobées étaient éliminées par le foie à hauteur de 66 %, 5 min après leur injection dans la veine de la queue de la souris, alors que les particules enrobées étaient éliminées à hauteur de 30 %, 2 h seulement après injection.

2.5.4. NPs de PLGA et délivrance de l'insuline

Dans la littérature, plusieurs travaux ont décrit la synthèse de particules de PLGA contenant de l'insuline, et ont étudié leurs propriétés *in vitro* ou/et leur capacité à délivrer l'insuline *in vivo* chez le rat ou la souris.

Plusieurs études ont décrit la synthèse de microsphères de PLGA contenant de l'insuline (Rosa *et al.*, 2000; Takahata *et al.*, 1998). L'essor des NPs et le développement des technologies permettant leur synthèse ont permis de diminuer la taille de ces sphères afin d'augmenter leur efficacité *in vivo*. L'optimisation des méthodes de synthèse, l'utilisation de tensio-actifs, le choix des solvants et les procédures d'homogénéisation ont permis de réduire la taille des NPs, jusqu'à obtenir des tailles inférieures à 100 nm (Dupeyron *et al.*, 2005; Vandervoort *et al.*, 2004).

Liu *et al.* (2007) ont synthétisé une population homogène de NPs de PLGA de 615 nm, avec un rendement d'encapsulation d'insuline de 72,6%. Ces NPs, administrées à des souris diabétiques par injection intrapéritonéale, ont permis de diminuer la glycémie transitoirement, pendant 2 h, mais également de conserver pendant 24 h une glycémie légèrement plus faible que celle de souris n'ayant pas reçu d'insuline.

Les NPs de PLGA sont dégradées en milieu gastrique et doivent être protégées. Toutefois, des études ont réussi à montrer une efficacité de NPs de PLGA contenant de l'insuline après des administrations orales chez le petit animal. En effet, Yang *et al.* (2012) ont synthétisé des NPs de PLGA où l'insuline est libérée en fonction du pH. Les tests *in vitro* ont montré que l'insuline est libérée à hauteur de 90 % en 11 jours à un pH de 1. A pH basique, le relargage de l'insuline était plus rapide, avec une libération atteignant 90 % en 3 jours à pH 7,8. Les NPs ont été administrées par voie orale à des rats diabétiques, et ont permis de diminuer la glycémie et d'augmenter la concentration en insuline plasmatique.

Zhang *et al.* (2012) ont utilisé des NPs de PLGA encapsulant de l'insuline et enrobées de chitosane. Les mesures de tailles des NPs, comparées aux NPs non enrobées, ont montré une faible différence de taille. Seulement 150 nm séparaient les deux types de NPs. Ces NPs ont été administrées oralement à des rats diabétiques, et ont permis de diminuer la glycémie 4 h après administration, et ceci jusqu'à 13 h.

Cui *et al.* (2007) ont synthétisés des NPs de PLGA d'insuline de l'ordre de 150 nm. Ces NPs ont été administrées par voie orale à des rats diabétiques mis à jeun. Cette administration a permis de faire diminuer la glycémie de 35 %, 8 h après administration. La biodisponibilité des ces NPs a été évaluée à environ 3 %.

2.6. La sécurité des systèmes nanoparticulaires

Le développement des nanotechnologies dans différents domaines d'application, dont celui de la vectorisation des médicaments, a abouti à la synthèse d'une multitude de NPs de nature, structure et propriété variables. Aujourd'hui, tout domaine d'application confondu, il y aurait plus de 800 produits de consommation courante (médicaments, cosmétiques, articles de sport, aliments, ...) contenant des NPs (Marquis *et al.*, 2009).

L'essor de ces nouveaux outils pose cependant la question de leur sécurité. On sait en effet que l'inhalation répétée de particules micrométriques (silice, amiante) est toxique pour le poumon, et que cette toxicité est souvent liée à la capacité de ces particules à s'accumuler dans le tractus respiratoire. On suspecte par ailleurs que les particules de taille nanométrique aient une activité biologique plus importante, à masse comparable, que les particules plus grosses. Enfin, d'un point de vue physico-chimique, les nanovecteurs s'apparentent aux particules ultrafines qui composent la pollution atmosphérique urbaine et dont la toxicité respiratoire a été largement étudiée au cours des dernières décennies.

Ainsi, la prise en compte des risques toxicologiques liés aux systèmes nanoparticulaires est désormais un point essentiel dans le développement d'un candidat médicament à base de vecteurs. Cette prise en compte passe par la connaissance et la compréhension de l'internalisation et du devenir cellulaire des NPs, des dommages cellulaires découlant de cette internalisation, ainsi que des facteurs en jeu dans ces phénomènes.

2.6.1. Internalisation et devenir cellulaire des NPs

La membrane plasmique, qui délimite le cytoplasme du milieu extérieur, est constituée d'une bicouche composée de phospholipides, de protéines et de cholestérol. D'une épaisseur

comprise entre 4 et 10 nm, elle constitue une barrière à la pénétration directe des NPs (Alber *et al.*, 2007).

Ainsi, les **voies d'entrée** des NPs dans la cellule sont multiples (**Fig. 2-44**). Elles incluent l'endocytose médiée par la clathrine, l'endocytose médiée par la cavéoline, l'endocytose indépendante de la clathrine et de la cavéoline, la macropinocytose et la phagocytose. Ces voies d'entrée sont principalement liées à la taille des particules.

En effet, seules les NPs extrêmement petites, de l'ordre de quelques nanomètres, seraient capables de pénétrer directement dans la cellule. Les NPs de taille plus importante entreraient dans la cellule par endocytose. Les NPs de 60 à 90 nm pénétreraient par endocytose indépendante de la clathrine et de la cavéoline, ou par une endocytose dépendante de la cavéoline. Les NPs de 120 nm entreraient par une endocytose dépendante de la clathrine, alors que les microparticules pénétreraient par macropinocytose ou phagocytose (Zhu *et al.*, 2013).

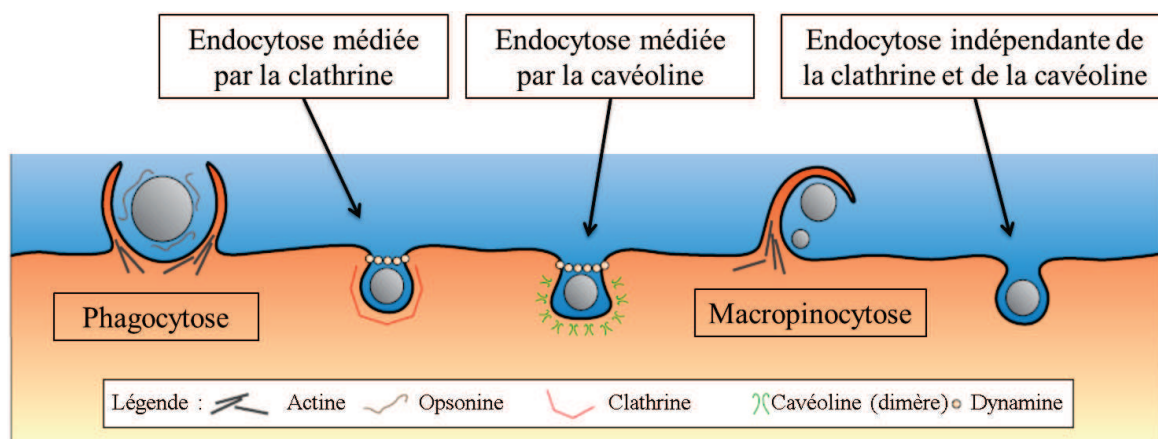


Figure 2-44 : Schématisation des différentes voies d'entrée des NPs dans la cellule (D'après Hillaireau et Couvreur, 2009)

La phagocytose, qui concerne donc les particules de grande taille (souvent supérieures au micromètre) implique des phénomènes d'opsonisation (Nel *et al.*, 2009). Ce phénomène survient dans les cellules spécialisées comme les macrophages et les cellules dendritiques (Aderem et Underhill, 1999). Elle se déroule en plusieurs étapes, avec en premier, la liaison d'opsonines (immunoglobulines, protéines du complément, etc.) à la surface des NPs, puis l'adhésion des NPs opsonisées à la surface cellulaire. En effet, les opsonines fixées à la surface des NPs sont reconnues par des récepteurs membranaires, parmi lesquels les récepteurs pour le Fc des immunoglobulines (Groves *et al.*, 2008). L'interaction des opsonines avec leurs récepteurs engendre une activation de ces derniers, qui se traduit par une

réorganisation des filaments de l'actine, la formation de pseudopodes, et enfin la phagocytose. S'en suit la formation d'un phagosome, puis d'un phagolysosome qui engendre alors la dégradation des NPs par l'acidification de son environnement (Hillaireau et Couvreur, 2009). L'endocytose clathrine-dépendante des NPs peut être médiée par la liaison d'un ligand à son récepteur (Mukherjee *et al.*, 1997), ou peut être aspécifique. Elle est activée par la formation d'une vésicule enrobée de chaînes de clathrine, qui s'invagine au fur et à mesure de son développement, et se détache après fission avec la membrane plasmique grâce à la formation d'un collier de dynamine. Une fois la vésicule de clathrine formée, les chaînes de clathrine enrobant la vésicule sont recyclées. Cette vésicule libère ensuite sa cargaison dans l'endosome précoce qui acidifie son contenu par la présence de pompes à proton (environ pH 6). L'endosome devient mature et est appelé endosome tardif (environ pH 5). Celui-ci peut fusionner avec les lysosomes, qui avec leurs environnements hostiles, peuvent engendrer la dégradation de leur contenu (Bareford et Swaan, 2007; Mukherjee *et al.*, 1997). L'endosome tardif peut aussi faire transiter les NPs vers le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi. Dans ce cas, les NPs contenues dans les vésicules formées à partir de l'appareil de Golgi peuvent être exocytosées de la cellule (Cartiera *et al.*, 2009).

Le mécanisme d'endocytose dépendant de la cavéoline est quasiment similaire à celui de la clathrine, excepté qu'il fait intervenir un enrobage de dimères de cavéoline autour de la vésicule. La vésicule de cavéoles est formée après fission avec la membrane plasmique, par la dynamine. Cette vésicule est dépourvue d'enzymes, et la dégradation des particules et des pathogènes est alors limitée. Le contenu de ces vésicules peut être transféré au réticulum endoplasmique ou à l'appareil de Golgi, et les NPs peuvent alors être exocytosées.

La **distribution cellulaire** et les **voies de dégradation des NPs** sont intimement liées à leur voie d'entrée dans la cellule. La prise en charge des particules est différente selon qu'elles entrent *via* des vésicules ou *via* des mécanismes indépendants de l'endocytose. Les NPs qui entrent dans la cellule par endocytose sont dirigées dans les endosomes précoces, puis les endosomes tardifs. Les NPs peuvent être exocytées de la cellule, mais peuvent aussi atteindre la plupart des organites cellulaires (Chou *et al.*, 2010; Dobrovolskaia et McNeil, 2007) (**Fig. 2-45**).

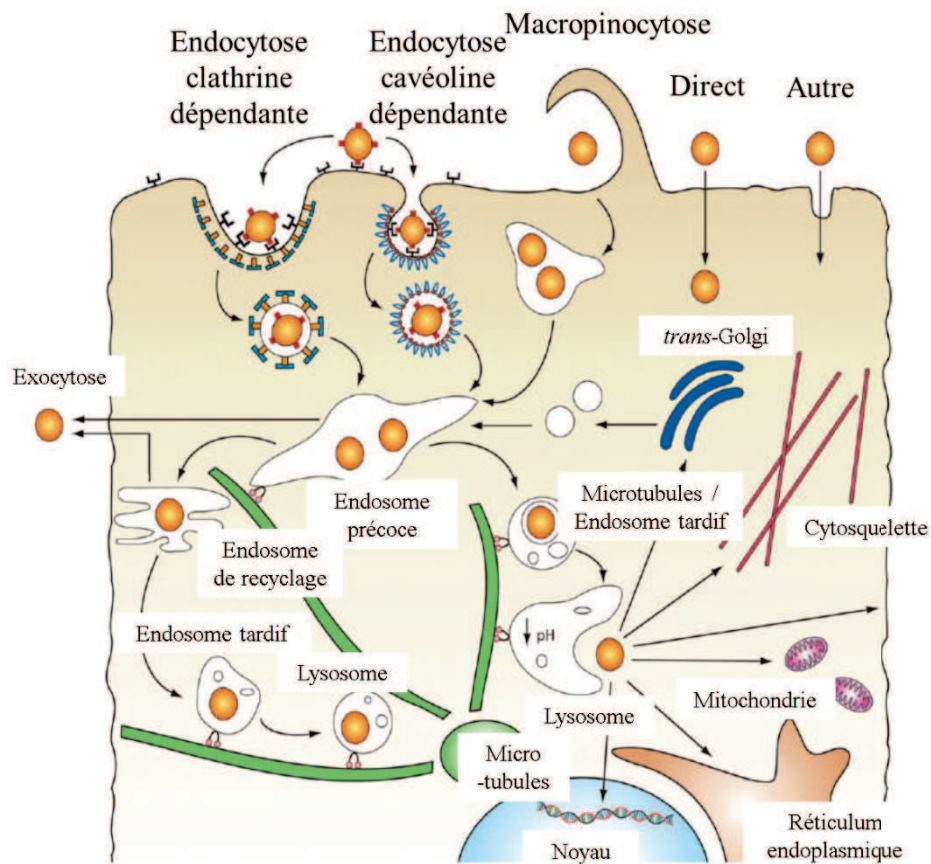


Figure 2-45 : Schématisation de la distribution des NPs dans la cellule (D'après Chou *et al.*, 2011)

La plupart des NPs sont dégradées au niveau des endosomes. Le pH environnemental dans les deux compartiments, précoces et tardifs, n'est pas le même et agit directement sur le devenir des NPs. En effet, les endosomes précoces ont un pH de 6,2 à 6,5 alors que les endosomes tardifs ont un pH de 4,5 à 5,5. Cette internalisation dans les vésicules est accompagnée d'un recrutement enzymatique dans le but de dégrader les NPs (Zhu *et al.*, 2013). La composition chimique de la NP joue alors un rôle essentiel dans sa stabilité. Les NPs de PLGA, composées de polymère biodégradable, sont dégradées par hydrolyse, et cette dégradation est accélérée par le pH acide de l'environnement endosomal (Miao *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011).

2.6.2. Dommages cellulaires engendrés et mécanismes d'action

Après entrée dans la cellule, les NPs peuvent engendrer des dommages qui peuvent, dans le pire des cas, conduire à la mort cellulaire (Buzea *et al.*, 2007).

La production de **ROS** est un mécanisme d'action toxique des NPs largement documenté. Elle est à l'origine de la plupart des dommages causés par les NPs à la cellule (Marano *et al.*,

2011; Nel *et al.*, 2009; Risom *et al.*, 2005). Cette production a été décrite en grande majorité pour les NPs de moins de 100 nm, ou les particules ultrafines issues de la pollution atmosphérique, dont la production n'est pas contrôlée (Oberdörster *et al.*, 2005). Elle résulte de plusieurs mécanismes. En effet, la NP, de par sa composition physicochimique, peut engendrer la production directe de ROS, ou alors elle peut favoriser cette production.

Dans le premier cas, la présence de radicaux libres et oxydants à la surface des NPs peut être une source de ROS. La surface des NPs peut agir comme donneur d'électron et permettre la formation d'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) à partir de molécules d' O_2 (Shvedova *et al.*, 2012). Certaines NPs (NPs métalliques le plus souvent) peuvent être une source de fer, qui est un catalyseur de la réaction de Fenton permettant de former des radicaux hydroxyles (OH^{\bullet}) à partir d'eau oxygénée (H_2O_2). Dans le deuxième cas, la génération de ROS peut provenir de la présence extracellulaire ou intracellulaire de la NP, sans qu'il y ait directement d'échanges d'électrons avec la surface de la NP (Lundqvist *et al.*, 2008; Lynch *et al.*, 2009; Marano *et al.*, 2011) (Fig. 2-46).

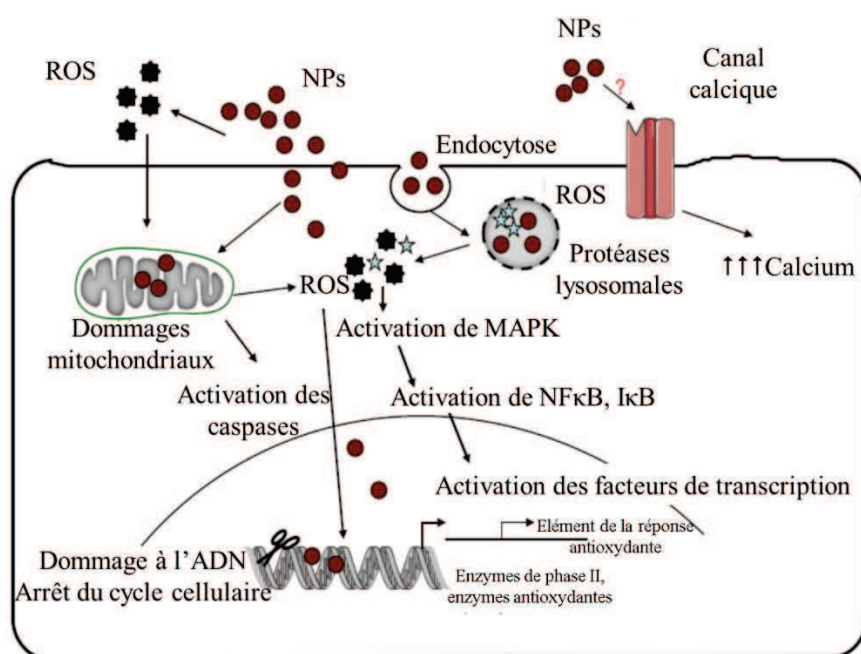


Figure 2-46 : Schématisation des réactions en cascade et du rôle du stress oxydant générés par les NPs (D'après Marano *et al.*, 2011)

Le **stress oxydant** est un phénomène naturel régulé par la cellule. En condition physiologique, une génération de ROS a lieu dans la cellule, en grande partie au niveau de la mitochondrie, et cette génération est contrôlée par des défenses antioxydantes enzymatiques (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase, etc.) et non enzymatiques (glutathion,

vitamines, ..). Dans les cas d'un excès de ROS, apporté par exemple par la présence des NPs, la capacité de ces systèmes antioxydants est dépassée, les ROS s'accumulent et le stress oxydant s'installe (Sharifi *et al.*, 2012). Dans un premier temps, ce stress oxydant est associé à la synthèse accrue d'enzymes antioxydantes, dont des enzymes de phase II du métabolisme des xénobiotiques (NAPDH quinone oxydoreductase-1, glutathion S-transférases) et des enzymes impliquées dans la dégradation des ROS (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase). Cette synthèse accrue est possible grâce à l'activation du facteur de transcription Nrf-2. Dans un deuxième temps, l'accumulation de ROS conduit à l'activation des MAP Kinases et du facteur nucléaire κ B (NF κ B), qui sont impliqués, respectivement, dans la croissance et la prolifération cellulaires, et dans la régulation de l'expression de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires et le contrôle de l'apoptose. Enfin, lorsque le stress oxydant devient trop important la cellule meurt par apoptose ou nécrose. C'est ce que l'on appelle le modèle hiérarchisé du stress oxydant proposé par Nel *et al.* (2006) (Fig. 2-47).

Celui-ci est basé sur le rapport du glutathion sous sa forme réduite (GSH) au glutathion sous sa forme oxydée (GSSG). Le glutathion étant l'anti-oxydant majeur de la cellule, ce rapport représente donc un index du niveau de stress oxydant. Ce paradigme est divisé en trois tiers, dont le premier représente la mise en place de la réponse défense antioxydante, le deuxième correspond à la survenue de l'inflammation, et le troisième tiers se traduit par la cytotoxicité (Nel *et al.*, 2006) (Fig. 2-47).

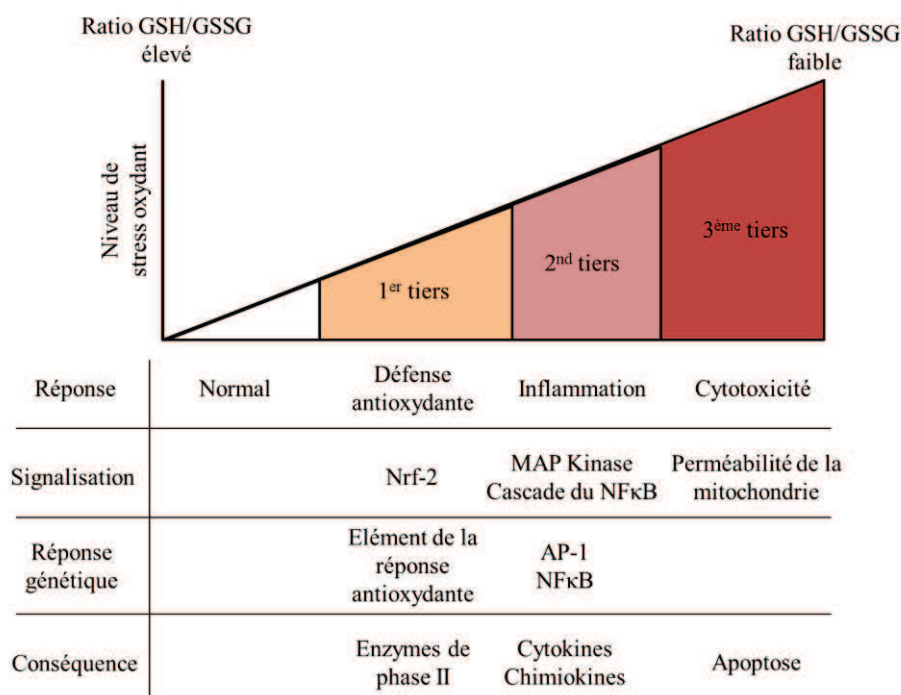


Figure 2-47 : Schématisation du modèle hiérarchisé du stress oxydant (D'après Nel *et al.*, 2006)

L'**inflammation** est une réaction majeure de la cellule en réponse aux NPs. En effet, comme mentionné ci-dessus, le stress oxydant induit par les NPs peut activer des facteurs de transcription sensibles au potentiel redox, dont le facteur NF- κ B aboutissant à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. Les entérocytes ont la capacité de produire les cytokines en présence d'agents exogènes tels que les NPs (Hussain *et al.*, 2011).

Les cytokines sont une superfamille comprenant des interleukines, des chimiokines, le facteur de nécrose tumoral alpha, les interférons, etc. Leurs rôles sont multiples, et incluent, la croissance, la différenciation, mais aussi l'activation cellulaire. Cette activation peut engendrer des réactions, dans le cas des cytokines pro-inflammatoires, visant à activer le système immunitaire inné ou adaptatif. En effet, l'interleukine-1 beta (IL-1 β), et l'interleukine-6 (IL-6) ainsi que le facteur de nécrose tumoral alpha (TNF α) induisent respectivement, l'activation de lymphocytes T, la différenciation des lymphocytes B, et l'activation des neutrophiles ainsi que le chimiotactisme. L'interféron gamma (IFN γ), interféron de type II, est aussi étudié pour ses effets sur l'activation de la phagocytose et par l'accumulation de macrophages. Enfin, l'interleukine-8 (IL-8 ou CXCL8) est l'une des premières chimiokines décelées dans la sécrétion par les entérocytes et étudiée pour son activation du chimiotactisme (Commins *et al.*, 2010; Stadnyk, 2002; Van de Walle *et al.*, 2010). La sécrétion de cytokines est alors le reflet d'une réaction de défense de la cellule face à une agression toxique.

Les **dommages mitochondriaux** sont aussi une conséquence de la présence des NPs dans la cellule. Les NPs de petite taille (inférieures à 100 nm) peuvent en effet entrer dans la mitochondrie et altérer ses fonctions (Li *et al.*, 2003; Xia *et al.*, 2006). Ces dommages se définissent par une perméabilisation de la membrane mitochondriale, qui peut aboutir au relargage du cytochrome c dans le cytosol. La cascade de réaction résultant du relargage du cytochrome c engendre l'activation des caspases, et enfin l'apoptose.

La présence des NPs dans la cellule peut aussi engendrer des **dommages à l'ADN**. La production de ROS en réponse aux NPs peut provoquer des changements de conformation des histones (Donaldson et Stone, 2003). Parmi les ROS, le radical hydroxyle, est connu pour provoquer des oxydations des bases de l'ADN, et notamment de la guanine, conduisant à la formation de mutations, et donc à la génotoxicité (Valko *et al.*, 2007).

L'**effet de perméabilité et de rétention** (ou enhanced permeability and retention effect, EPR) est un phénomène bien connu dans la toxicité des NPs. Celui-ci se caractérise par l'extravasation des NPs présentes dans les capillaires. Ces NPs endommagent les jonctions des cellules endothéliales et peuvent ainsi atteindre les tissus. Dans la recherche de nouvelles thérapeutiques, ce mécanisme est mis à profit pour atteindre les cellules tumorales ou les tissus enflammés à traiter (Dinarvand *et al.*, 2011; Knop *et al.*, 2010) (**Fig. 2-48**).

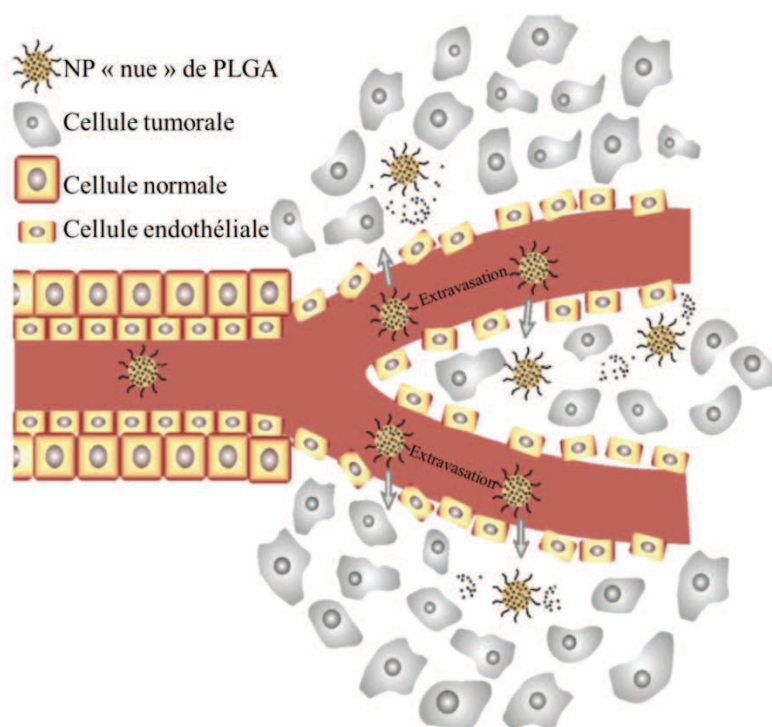


Figure 2-48 : Schématisation de l'effet de perméabilité et de rétention attribué aux NPs (D'après Dinarvand *et al.*, 2011)

La **mort cellulaire**, par apoptose, nécrose ou autophagie, est un phénomène qui peut aussi survenir en réponse aux NPs (Pan *et al.*, 2009; Vamanu *et al.*, 2008).

L'**autophagie** est un phénomène d'autorégulation de la cellule, visant à éliminer les organites endommagés ou présentant des dysfonctionnements. Elle peut être induite par le stress oxydant qui favorise l'accumulation des protéines oxydées et endommagées, mais aussi qui engendre un stress du réticulum endoplasmique et des dommages à la mitochondrie (He et Klionsky, 2009; Li *et al.*, 2008). Elle débute par la formation d'une membrane pour aboutir à la formation d'un autophagosome contenant les protéines ou les organites à dégrader. Cette vésicule fusionne ensuite avec un lysosome, comme les endosomes, et son contenu est détruit par l'environnement lysosomal (**Fig. 2-49**). L'autophagie est un mécanisme contrôlé, qui en cas de dérégulation peut conduire à la mort cellulaire (Andón et Fadeel, 2012). Les NPs peuvent affecter les voies de signalisation de l'autophagie. Elles peuvent favoriser

l'autophagie, mais également dans certains cas la bloquer par la rupture du trafic lysosomal (Stern *et al.*, 2012). Les NPs peuvent subir directement une ubiquitination, ou peuvent être colocalisées avec des protéines ubiquitinilées, et être autophagocytées (Calzolari *et al.*, 2010).

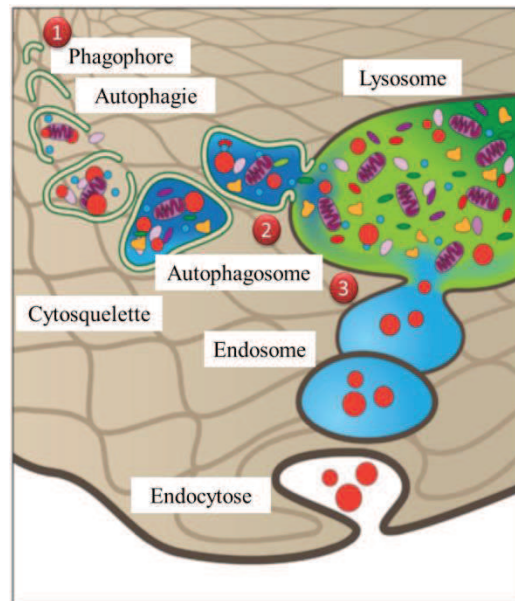


Figure 2-49 : Schématisation de l'autophagie en présence de NPs
 (1 : Formation d'une membrane et de l'autophagosome comportant les organelles et protéines à dégrader ; 2 : Fusion de l'autophagosome et du lysosome ; 3 : Concomitance entre les voies de l'endocytose et l'autophagie ; D'après Stern *et al.*, 2012)

L'apoptose est une forme de suicide cellulaire, qui joue un rôle important dans l'homéostasie tissulaire. L'apoptose est classée en deux catégories : l'apoptose extrinsèque et l'apoptose intrinsèque (De Stefano *et al.*, 2012). La première est stimulée par des signaux extracellulaires médiés par des récepteurs, et elle est dépendante des caspases. L'apoptose intrinsèque peut être engendrée par différents stress intracellulaires, comme les dommages à l'ADN et le stress oxydant. Cette apoptose peut être dépendante ou indépendante de la voie des caspases.

Les NPs peuvent engendrer l'apoptose par ces différentes voies, mais l'apoptose intrinsèque reste la plus documentée. En effet, la production de ROS est à l'origine de différents dommages cellulaires, dont ceux des lysosomes, de la mitochondrie et de l'ADN. Il a été montré que les NPs étaient fréquemment internalisées dans les lysosomes et étaient à l'origine de dysfonctionnements lysosomaux. Ces dysfonctionnements engendrent le relargage de la cathépsine impliquée dans la voie des caspases et des mitochondries, qui favorise alors l'apoptose (Hafner Česen *et al.*, 2012; Repnik *et al.*, 2012; Stern *et al.*, 2012).

Les NPs peuvent également induire **la nécrose** cellulaire. La nécrose se distingue de l'apoptose par sa non-capacité à maintenir l'état structural de la cellule. Ce phénomène se traduit notamment par le gonflement et la destruction des organites, la rupture de la

membrane plasmique et la lyse cellulaire (Zong et Thompson, 2006). La mort par nécrose résulte de causes multifactoriels, également responsables de l'apoptose comme la production des ROS, qui conduit à la peroxydation lipidique, et les dommages à la mitochondrie, qui engendrent une déplétion en ATP (Saraste et Pulkki, 2000). La nécrose cellulaire peut succéder à un phénomène d'apoptose.

2.6.3. Facteurs influençant la toxicité des NPs

La **taille** est un facteur essentiel dans la toxicité des NPs. En effet, comme décrit plus haut, elle régit la voie d'entrée des NPs dans la cellule, et donc leur prise en charge et leur devenir cellulaires. De plus, la taille des NPs est directement corrélée à la surface de contact disponible pour les cellules ou les protéines sériques. En effet, plus la taille des NPs est petite, plus la surface disponible pour une même masse de particule est grande. Le nombre de NPs est aussi affecté dans ce sens (Krug et Wick, 2011) (**Fig. 2-50**).

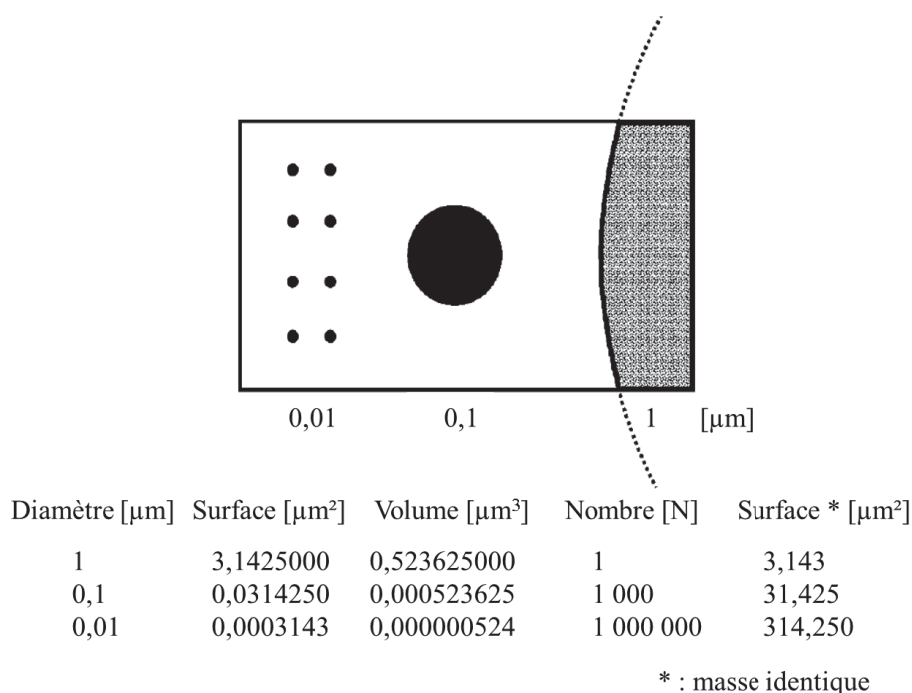


Figure 2-50 : Schématisation de la relation entre taille, surface, volume et nombre des NPs (D'après Krug et Wick, 2011)

La **charge** des NPs est le deuxième facteur directement impliqué dans la toxicité des NPs. Cette charge représente la charge de surface des NPs colloïdales. Elle varie selon la nature de la NPs. Elle est négative dans le cas des NPs de PLGA. La charge de surface va jouer un rôle sur la nature des protéines qui vont s'adsorber sur les NPs et va donc engendrer des paramètres pharmacocinétiques dépendant de ces protéines. Elle va également avoir un

impact sur la toxicité. En général, les NPs cationiques sont plus toxiques via l'induction de l'hémolyse et de l'agrégation plaquettaire, alors que les NPs anioniques ou neutres sont moins toxiques (Goodman *et al.*, 2004; Sharifi *et al.*, 2012).

La membrane cellulaire est chargée négativement en raison des têtes des phospholipides qui la composent. Il résulte que les NPs de charge positive attirées par ces charges négatives, interagissent beaucoup plus avec les cellules et ont donc plus de chance d'être internalisées que les particules neutres ou chargées négativement (Zhu *et al.*, 2013). Par ailleurs, les NPs cationiques peuvent se comporter comme des « éponges à proton » et engendrer la rupture des membranes des lysosomes, un événement potentiellement délétère pour la cellule (Sharifi *et al.*, 2012) (**Fig. 2-51**).

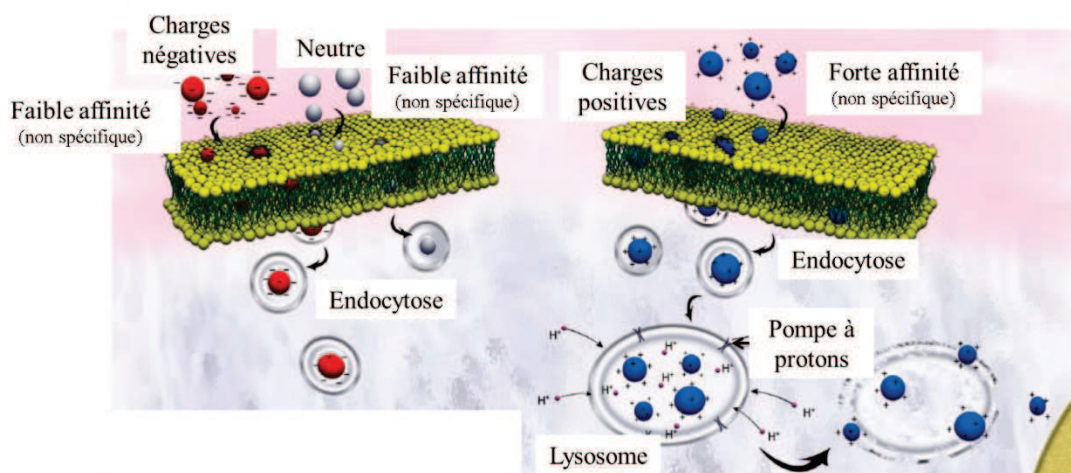


Figure 2-51 : Schématisation de l'influence des charges de surface des NPs sur l'internalisation cellulaire (D'après Sharifi *et al.*, 2012)

La **composition chimique** est aussi à prendre en compte dans la sécurité des NPs. La plupart des composés (polymères, solvants) entrant dans la composition des NPs à visée pharmaceutique ont un grade pharmaceutique, qui garantit l'absence de toxicité des composés en tant que tels, mais ne garantit pas l'absence de toxicité des NPs renfermant ces produits. En effet, le format nanoparticulaire peut engendrer des réactions néfastes que les polymères ou les solvants seuls n'entraînent pas.

L'**état de surface** joue un rôle dans le devenir de la NPs. Cet état de surface peut résulter de modifications intentionnelles de la NP (fonctionnalisation chimique, adsorption de molécules bioadhésives, conjugaison d'anticorps, ...) ou du contact de la particule avec le sang ou tout autre liquide biologique. En effet, bien que la NP synthétisée puisse être « nue », des protéines peuvent s'adsorber et former une couronne protéique après ajout à des cultures cellulaires ou après administration *in vivo* (Kunzmann *et al.*, 2011; Nel *et al.*, 2009). La

formation de cette couronne est d'autant plus importante que la taille des NPs est petite, en raison de l'augmentation de leur surface (Oberdörster *et al.*, 2005) (**Fig. 2-52**).

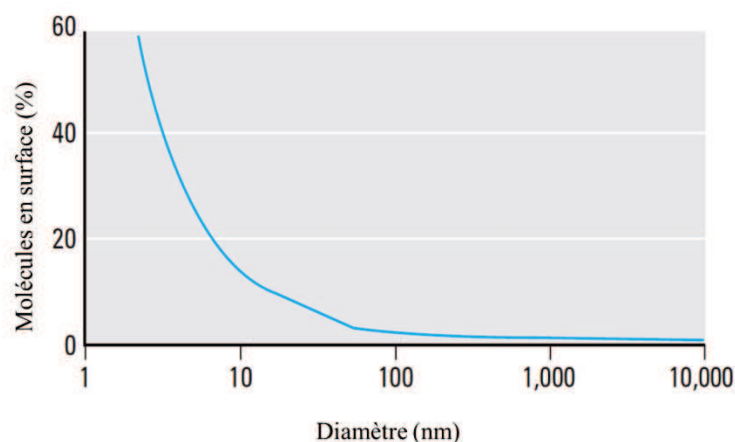


Figure 2-52 : Représentation graphique de la proportion de molécules en surface en fonction du diamètre des NPs (D'après Oberdörster *et al.*, 2005)

Composée d'une multitude de protéines, cette couronne, est formée de deux couches NP : une couche solidement attachée qui présente peu d'échanges avec l'environnement, et une couche extérieure caractérisée par des échanges rapides avec les protéines libres (Cedervall *et al.*, 2007; Elsaesser et Howard, 2011; Mahmoudi *et al.*, 2011) (**Fig. 2-53**).

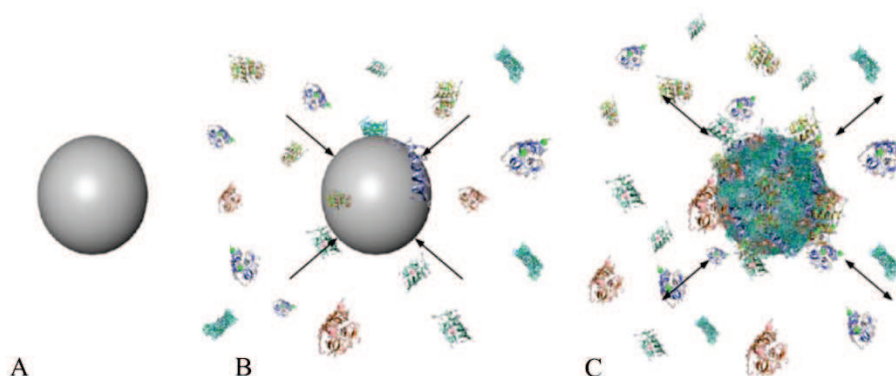


Figure 2-53 : Schématisation de la formation de la couronne protéique autour de la NP (A : NP « nue » ; B : NP en contact avec les protéines ; C : Formation de la couronne protéiques comportant une couche solidement attachée et une couche externe interagissant avec les autres protéines ; D'après Elsaesser et Howard, 2011)

L'adsorption de protéines confère à la NP une véritable identité qui déterminera alors les réponses tissulaires et cellulaires qu'elle engendrera (Sharifi *et al.*, 2012). Des protéines comme le fibrinogène, les immunoglobulines G, ou des facteurs du complément engendrent une phagocytose de la NP médiée par le phénomène d'opsonisation (Owens et Peppas, 2006).

A l'opposé, des protéines telles que l'albumine et les apolipoprotéines permettent d'allonger le temps de circulation des NPs dans le sang (Ishida *et al.*, 2001).

La fonctionnalisation chimique des NPs modifie aussi leur état de surface. Les NPs nues peuvent être chimiquement enrobées afin de potentialiser leurs effets ou de minimiser leur toxicité, c'est ce qu'on appelle le « coating ». Ce coating peut permettre la stabilisation de la NP et/ou éviter les phénomènes d'agrégation. Il peut aussi permettre d'ajouter des charges en surface afin de potentialiser la mucoadhésion et l'endocytose (Moon *et al.*, 2007; Otsuka *et al.*, 2003). Cependant, ces modifications, en modifiant les charges et la composition de surface de la NPs, peuvent engendrer la production de ROS.

L'état d'agrégation des NPs, souvent lié à leur charge, peut influencer leur toxicité. L'agrégation et l'agglomération des NPs sont des phénomènes courants, conduisant à la formation ce qu'on appelle les « particules secondaires » (Horie *et al.*, 2011; Oberdörster, 2010) (Fig. 2-54).

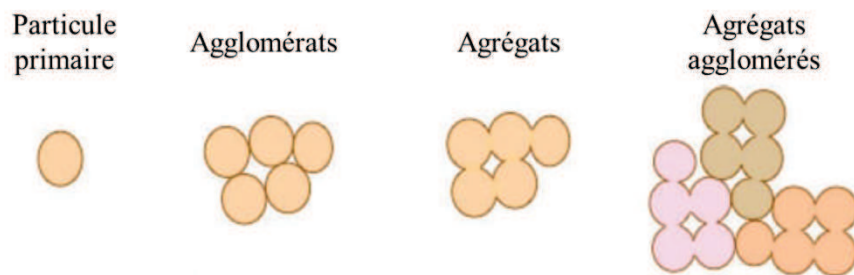


Figure 2-54 : Schématisation de la formation d'agglomérats et d'agrégats particulaires (D'après Oberdörster, 2010)

Ces agrégats seront internalisés par la cellule, le plus souvent par des mécanismes d'endocytoses, ce qui peut potentialiser la toxicité des NPs.

3. CONTEXTE ET OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE

3.1. Le contexte

L'administration d'insuline par voie orale permettrait une délivrance de l'hormone simple, rapide et discrète, ne nécessitant ni injection ni matériel médical particulier, et permettant un premier passage hépatique de l'hormone limitant la survenue d'hypoglycémies sévères. Partant de ce postulat, le Centre européen d'étude du Diabète (CeeD, Strasbourg, France), en collaboration avec l'Institut Charles Sadron (ICS, Strasbourg, France), a déposé un brevet concept (Frère Y., Danicher L., Belcourt A., « Vecteurs pour administration par voie orale » WOFR2004000974) en 2004, basé sur des vecteurs protégeant l'insuline de l'environnement du tractus gastrointestinal et permettant le passage de la barrière intestinale. Ce projet, nommé « Oral Administration of Insulin » (ORAIL) repose sur un système de double encapsulation de l'insuline *via* un vecteur pharmaceutique composé de trois éléments (**Fig. 3-1**):

- des **NPs** contenant l'**insuline**, et dont la surface peut être traitée pour faciliter le contact avec la barrière intestinale,
- un **véhicule**, la gélule, qui protège les NPs contenant l'insuline durant le passage de la cavité orale jusqu'à l'estomac, et qui se dégrade une fois dans l'intestin et permet la libération des NPs,
- un **agent dispersant** lipophile qui permet d'équilibrer les forces osmotiques et empêche ainsi la diffusion du principe actif vers l'extérieur de la NP.

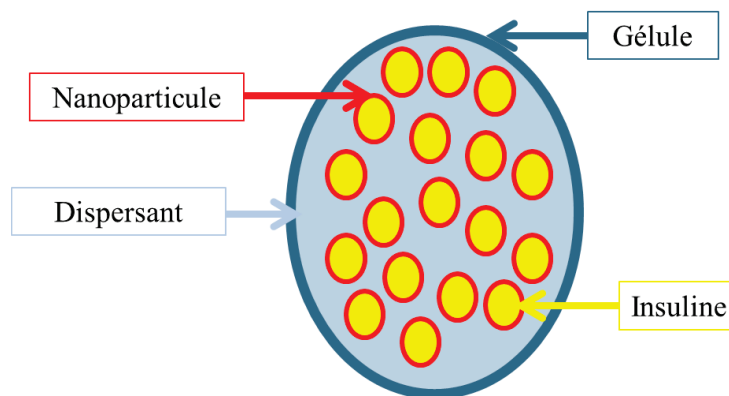


Figure 3-1 : Schématisation du concept du vecteur pharmaceutique pour la délivrance d'insuline par voie orale

(Frère, Danicher, Belcourt, 2003)

Dans ce contexte, le véhicule est une **gélule gastrorésistante**. Celle-ci n'est pas dégradée dans l'environnement de l'estomac grâce à la présence d'un enrobage composé d'Eudragit® L 100-55, précédemment utilisé dans d'autres vecteurs pharmaceutiques. Il s'agit d'un enrobage

par un copolymère insoluble en milieu acide et dans l'eau, qui se dégrade dans l'intestin, à partir d'un pH d'environ 5,5, par phénomène de déprotonation. Cette gélule a été miniaturisée par la société qui la commercialise, afin d'obtenir un vecteur utilisable chez le rat.

La dégradation de la gélule dans l'intestin permet de libérer les **nanoparticules**. Ces NPs sont dites « creuses », ou sont appelées « nanocapsules », parce qu'elles forment une cavité renfermant l'insuline. Elles sont contenues dans la gélule par un milieu dispersif, limitant la diffusion de l'insuline à l'extérieur des NPs. Ces NPs doivent être résistantes dans la lumière intestinale pour éviter la dégradation de l'insuline par les enzymes protéolytiques, et doivent libérer l'insuline pendant ou après absorption par les entérocytes, afin d'assurer son passage dans la veine porte.

L'**insuline** qui est disponible dans la veine porte est prise en charge par le foie et entraîne des effets hypoglycémisants. L'insuline contenue dans les NPs est une insuline déjà commercialisée. La taille de l'insuline n'est pas un facteur limitant pour l'encapsulation. Par conséquent, de l'insuline rapide ou lente peut être encapsulée.

Le schéma général du principe de délivrance de l'insuline basée sur la double encapsulation est récapitulé dans la **figure 3-2**.

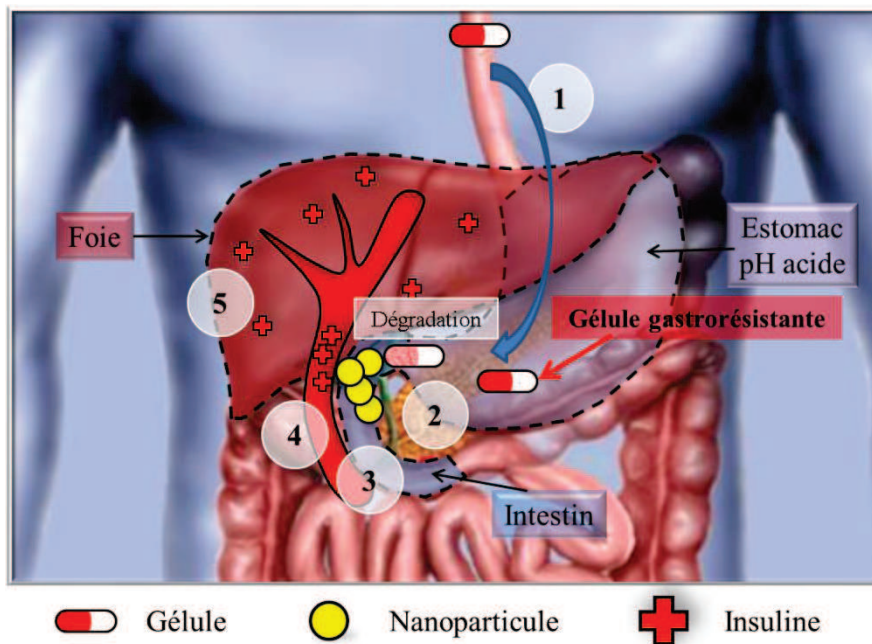


Figure 3-2 : Schématisation du principe de la délivrance de l'insuline par voie orale basée sur le système de la double encapsulation

(1 : Administration orale de la gélule et résistance dans l'estomac ; 2 : Passage de la gélule dans le duodénum, dégradation et libération des NPs ; 3 : Absorption des NPs par la barrière intestinale ; 4 : Dégradation des NPs et libération de l'insuline dans la veine porte ; 5 : Prise en charge de l'insuline par le foie et action physiologique de l'insuline)

Des travaux antérieurs à ceux de ma thèse ont permis d'apporter la preuve de concept de ce système. Le cahier des charges, fixé à l'origine du projet ORAIL, a alors été respecté. Concernant les NPs, celui-ci exigeait que ces nanovecteurs soient synthétisés à partir de matériaux biocompatibles, biodégradables, bioassimilables et de grade pharmaceutique. Pour ces diverses raisons, le PLGA a été utilisé comme polymère, composant la coque de la NP. Par ailleurs, les NPs, ainsi que le polymère, devaient être résistants en conditions intestinales, et induire un effet hypoglycémiant.

La réalisation de ce projet a permis de mettre au point des NPs d'une taille de 200 nm dont l'efficacité à délivrer l'insuline a été étudiée chez le rat diabétique. Les résultats de ces travaux ont montré que l'injection de ces NPs dans l'intestin d'animaux diabétiques permet une restauration de la normoglycémie. Toutefois, l'efficacité de délivrance d'un vecteur peut dépendre de la nature de la nanoparticule, de sa taille ou de sa charge. Depuis plusieurs années, les données bibliographiques tendent à montrer que plus la taille des particules est petite (proche de 100 nm), meilleure est l'efficacité de délivrance, suggérant que l'efficacité de délivrance des NPs développées jusque là pourrait être encore améliorée. Par ailleurs, la

vectorisation des médicaments à l'aide de NPs est un domaine de recherche en plein essor. Cependant, la définition et la compréhension des risques toxicologiques liés aux nano-objets sont désormais devenues indispensables dans les stratégies de conception de NPs à visée thérapeutique. Une étude de la sécurité de ces NPs était donc également nécessaire pour un développement optimal de notre système de délivrance orale d'insuline.

3.2. Les objectifs

Mes travaux de thèse, visant à poursuivre le développement du système de double encapsulation d'insuline proposé, ont porté sur la gélule entérique d'une part, et sur les NPs d'insuline, d'autre part.

Ainsi, le premier objectif de mon travail a été de démontrer, *in vivo* chez le rat, la gastrorésistance du vecteur gastrique choisi pour délivrer les NPs intactes au niveau entérique, la gélule PCcapsTM commercialisée par la société Capsugel. En effet, la propriété de gastrorésistance de cette gélule a été démontrée *in vitro* par la société qui la commercialise, mais ses propriétés *in vivo* chez le rat, notre modèle d'étude du diabète, devait être confirmée.

La deuxième partie du travail de thèse a eu pour objectif de synthétiser des NPs de taille variable, et d'évaluer l'efficacité de délivrance de l'insuline et la sécurité de ces NPs en fonction de leur taille, dans des modèles *in vitro*, afin de tenter d'identifier les vecteurs conduisant à une efficacité optimale en absence de toxicité. L'efficacité de délivrance des systèmes nanoparticulaires de différentes tailles, ainsi que leur toxicité ont également été évaluées dans un modèle de rat diabétique.

4. MATERIELS ET METHODES

4.1. Développement de la gélule entérique gastrorésistante

4.1.1. Présentation de la gélule

Les gélules sont des PCcaps™ (Capsugel®, Pfizer, Colmar, France) de taille adaptée aux rats. Ces gélules ont comme caractéristiques une capacité de 21,8 µL, un diamètre extérieur de 2,64 mm et une longueur de 7,2 mm (Fig. 4-1).

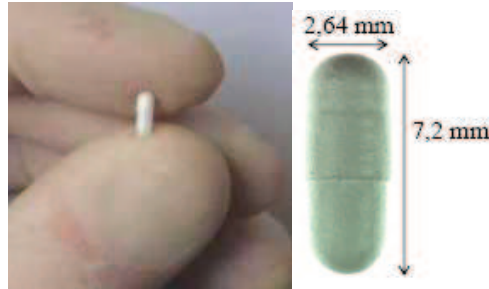


Figure 4-1 : Photographie et caractéristiques de la gélule entérique adaptée au rat

Leur composant principal est la gélatine; c'est pourquoi leur contenant peut être sous forme huileuse ou lyophilisée. La propriété de gastrorésistance de ces gélules est due à la présence d'Acryl-Eze® (Colorcon, UK) utilisé comme agent d'enrobage. Celui-ci est composé d'Eudragit® L 100-55, un copolymère d'acide méthacrylique et d'acrylate d'éthyle de grade pharmaceutique. La gastrorésistance de ces gélules a été démontrée *in vitro* par la société Capsugel® (Cole *et al.*, 2002).

4.1.2. Etude *in vivo* de la gastrorésistance de la gélule entérique

Les rats utilisés pour ces études sont des animaux mâles de souche Wistar (Depré, Saint-Doulchard, France). Ils ont été placés dans un environnement où le cycle jour-nuit était inversé (12h-12h), afin d'optimiser le processus de digestion gastro-intestinal et d'absorption intestinale qui sont plus actifs lors de l'état d'éveil des animaux.

Les animaux avaient accès en permanence à la nourriture (Safe, Augy, France) et la boisson.

4.1.2.1. Evaluation de la gastrorésistance de la gélule par tomodynamométrie aux rayons X

Afin de visualiser le système digestif de l'animal lors de la tomodynamométrie aux rayons X, les rats, d'environ 350 g, ont été gavés avec 700 µL de sulfate de baryum dilué (Micropaque®, Laboratoire Guerbet, Roissy-Charles de Gaulle, France) qui permet de contraster l'estomac, et ont reçu une injection intrapéritonéale de 500 µL d'iode (Iméron® 350, Laboratoires BYK France, Le Mée sur Seine, France) afin de contraster l'intestin. Pour étudier la dégradation des gélules, des gélules enrobées avec de l'Acryl-Eze® et des gélules non enrobées ont été utilisées sur des rats mis à jeun 14 h avant les gavages. Un groupe de 6 rats a été gavé avec

des gélules non enrobées et un groupe de 12 rats a été gavé avec des gélules enrobées. Ces gélules ont été remplies avec du chlorure de baryum (BaCl_2), afin de visualiser leur dégradation par tomodynamométrie aux rayons X. Le chlorure de baryum est un agent de contraste permettant de visualiser le contenu de la gélule, qui apparaît en blanc sur les acquisitions. Après gavage, les rats ont été réalimentés pour faciliter la vidange gastrique, et donc faciliter le passage des gélules dans l'intestin.

Des examens en tomodynamométrie aux rayons X ont été réalisés à l'aide du micro-CT construit par l'Institut de Recherches Subatomique (IN2P3/IPHC) de Strasbourg, à 15 min, 1h, 3h et 5h après gavage. Ces examens ont été réalisés sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane (Baxter, Maurepas, France) à une concentration de 5% dans l'air lors de l'induction de l'anesthésie, puis de 2 % lors de l'examen. Le tomodynamomètre utilisé permet de réaliser 768 acquisitions d'images d'une durée de 500 millisecondes chacune sur 360° . Le logiciel Anatomist/Brain VISA a été utilisé pour l'analyse des images. Les images obtenues permettent de distinguer les viscères de la gélule, grâce à la forte concentration du BaCl_2 dans les gélules.

4.1.2.2. Evaluation de la gastrorésistance de la gélule par mesure de la délivrance de principes actifs

Pour évaluer la gastrorésistance de la gélule entérique *in vivo*, des rats à jeun depuis 12h ont été gavés avec des gélules enrobées et non enrobées avec de l'Acryl-Eze[®] contenant 5 mg d'acétaminophène (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) complété avec 11 mg de lactose (Flowlac[®], Meggel Pharma, Wasserburg, Allemagne) puis réalimentés après gavage. Des rats témoins ont reçu des gélules vides. L'ensemble des rats ont été placés en cycle inversé, avec 12h de jour. Cette condition permet de favoriser la prise alimentaire des rats après gavage, et donc la motilité intestinale, afin de favoriser le transit gastro-intestinal de la gélule. Pour doser l'acétaminophène, du sang a été prélevé chez les rats à intervalles réguliers pendant 4h dans des tubes (BD Microtainer[®], Elvetec) à l'aide d'un cathéter intra-carotidien (IC) placé sous anesthésie générale (*Technique Paragraphe 4.3.2.2.3*). Cette technique de prélèvement permet de préserver la qualité du sang et de réaliser l'expérience sur animal vigile. Les échantillons de sang ont été centrifugés à 10 000 g pendant 1 min afin de récolter le plasma pour le dosage de l'acétaminophène à l'aide d'un kit ELISA spécifique (Immalysis Corp., Pomona, CA, USA). La concentration en acétaminophène a été exprimée en $\mu\text{g/L}$. La biodisponibilité relative (F_R) de l'acétaminophène, exprimée en pourcentage, a été calculée en comparant les aires sous les courbes (Area Under the Curve, AUC, exprimée en $\mu\text{g.h/L}$) de l'acétaminophène obtenues après administration des différentes gélules (**Fig. 4-2**).

$$F_R = \frac{\text{AUC gélule enrobée}}{\text{AUC gélule non enrobée}} \times 100$$

Figure 4-2 : Equation de la biodisponibilité relative
(AUC : Aire sous la courbe)

L'acétaminophène ayant une forte solubilité à pH acide et une faible stabilité, des expériences identiques ont été réalisées avec de l'ibuprofène qui a une faible solubilité à pH acide (Cole *et al.*, 2002). Ainsi, des gélules contenant 3 mg d'ibuprofène (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) et 12 mg de lactose ont été administrées par gavage à des rats dans les mêmes conditions que celles du gavage avec l'acétaminophène. Le dosage de l'ibuprofène a été réalisé à l'aide d'un kit ELISA spécifique (Neogen, Lexington, USA) et les résultats exprimés en ng/mL pour la concentration en ibuprofène.

4.2. Développement des nanoparticules d'insuline

4.2.1. Synthèse des NPs

4.2.1.1. Principe

La synthèse des NPs repose sur le principe de la double émulsion eau/huile/eau suivie d'une évaporation. Cette méthode permet à l'insuline, en phase aqueuse, d'être encapsulée dans des NPs creuses.

La première émulsion permet la formation de gouttelettes d'insuline obtenues après l'ajout et le mélange vigoureux de la phase aqueuse, contenant l'insuline, dans une phase organique, composée d'un polymère et d'un premier tensio-actif. La deuxième émulsion est obtenue lors de l'ajout et du mélange d'un second tensio-actif. Cette double émulsion est ensuite diluée dans un grand volume en présence du second tensio-actif. La solution obtenue est agitée durant 24 h à faible vitesse afin de permettre l'évaporation du solvant.

4.2.1.2. Matériels

Le polymère hydrophobe utilisé pour les synthèses de NPs est l'acide poly (D, L - lactique-co-glycolique) 50:50 non estérifié (MW= 14 000 g/mol, Resomer[®] RG 502 H, Evonik, Darmstadt, Allemagne). Le Pluronic[®] F68 (PE 6800, BTC, Levallois-Perret, France) est le tensio-actif utilisé dans la première émulsion.

L'acétate d'éthyle (CHROMASOLV[®] Plus, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) est le solvant permettant la dissolution de ces deux composés. Le deuxième tensio-actif utilisé est l'alcool polyvinylique 18-88 (PVA) (MW=130 000 g/mol, Fluka, Steinheim, Allemagne).

Selon les besoins des expériences, la phase aqueuse encapsulée peut être composée d'insuline Umuline[®] rapide (100 UI/mL, Eli Lilly, Indianapolis, USA), d'Insuman[®] (400 UI/mL, Sanofi-Aventis Pharma, Frankfurt, Allemagne), d'insuline-FITC (100 UI/mL, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA), ou d'eau MilliQ.

4.2.1.3. Méthode de synthèse des NPs

La synthèse des NPs repose toujours sur la même quantité de polymère, de tensio-actif, de solvant et d'insuline quelle que soit la taille des NPs désirée. Seuls le temps, la vitesse et le système d'agitation (Ultrason ou Ultra-turrax) utilisés pour fabriquer les émulsions varient, afin de permettre la formulation de NPs de tailles variables.

Deux cent milligrammes de PLGA et 100 mg de Pluronic[®] F68 sont dissouts séparément dans 0,5 mL d'acétate d'éthyle puis mélangés pour obtenir la phase dispersante S1. Quatre cents microlitres d'insuline à 3,5 mg/mL sont ajoutés à ce mélange, qui est agité pour obtenir la dispersion D1. Sont ajoutés ensuite 2 mL de PVA 2,5% suivis d'une seconde agitation. La dispersion D2 est obtenue (**Fig. 4-3**). Les conditions des étapes d'agitation varient selon la taille des NPs désirée (**Tableau 4-1**).

Cette double émulsion est ensuite diluée par ajout de 10 mL de PVA 0,15%, et agitée pendant 12h à 130 tours/min afin de permettre l'évaporation de l'acétate d'éthyle, ainsi que la stabilisation de la synthèse. Suite à cette agitation/évaporation, la dispersion D3 est obtenue (**Fig. 4-3**).

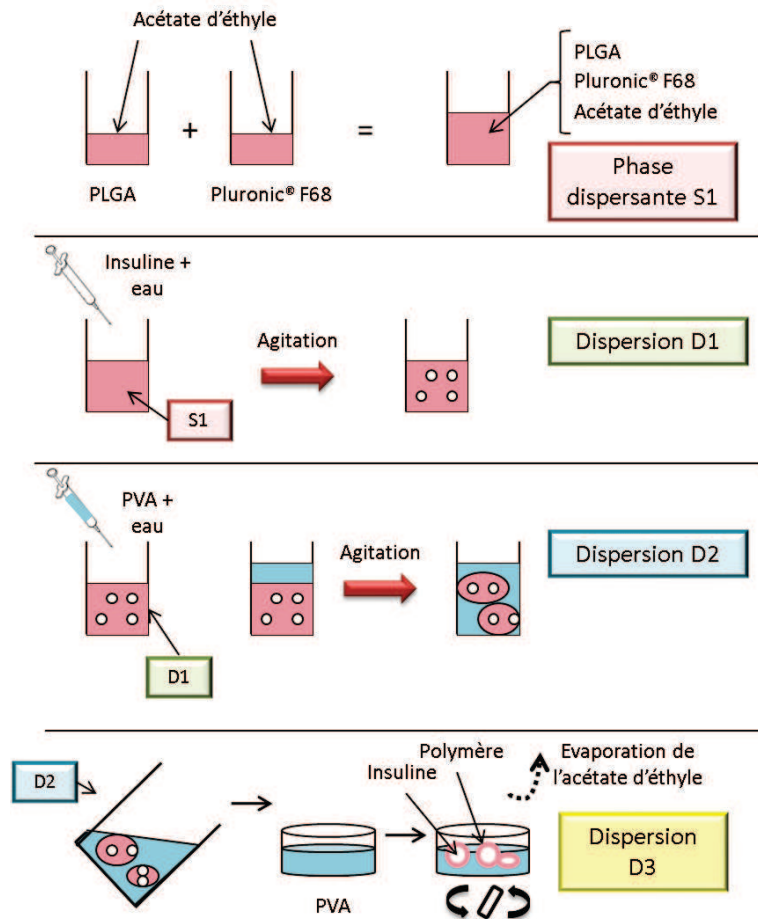


Figure 4-3 : Schéma représentant le procédé de synthèse des NPs

Taille (nm)	Système d'agitation	Vitesse D1	Temps D1 (s)	Vitesse D2	Temps D2 (s)
100	Ultrason	33%	15	33%	40
200	Ultrason	33%	15	33%	10
300	Ultra-Turrax	6 500 rpm	60	9 500 rpm	60
400	Ultra-Turrax	6 500 rpm	20	6 500 rpm	20
500	Ultra-Turrax	8 000 rpm	60	24 000 rpm	90
600	Ultra-Turrax	8 000 rpm	90	24 000 rpm	60
700	Ultra-Turrax	8 000 rpm	60	24 000 rpm	60
800	Ultra-Turrax	8 000 rpm	60	24 000 rpm	60

Tableau 4-1 : Tableau récapitulant les conditions d'agitation permettant de synthétiser des NPs de taille croissante

4.2.2. Purification des NPs

Après évaporation de l'acétate d'éthyle, les NPs sont purifiées. Cette purification va permettre d'éliminer des synthèses le PVA, le Pluronic® F68 en excès et l'insuline non encapsulée.

Elle est réalisée sur des colonnes d'exclusion de taille (Sephadex G-25, PD-10 Desalting Columns, GE Healthcare, Bellefonte, PA, USA). Vingt cinq millilitres d'eau MilliQ sont

déposés sur la colonne dans le but de la rincer. Sont ajoutés ensuite 2,5 mL de solution de synthèse, suivis de 5 mL d'eau MilliQ pour éluer les NPs (**Fig. 4-4**).

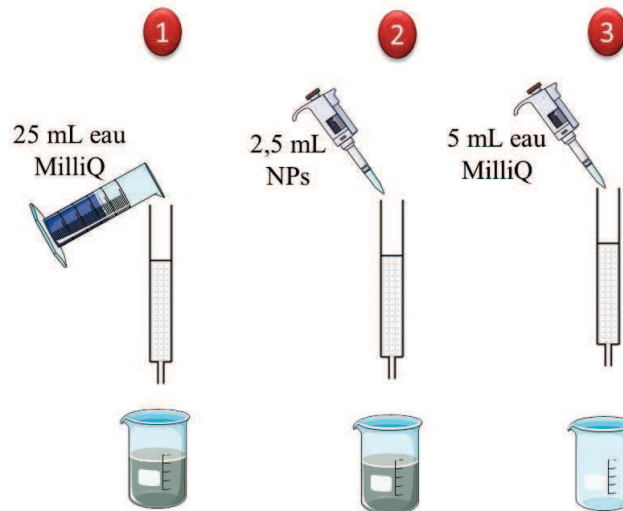


Figure 4-4 : Procédé de purification des NPs

4.2.2.1. Caractérisation des NPs par diffusion dynamique de la lumière

Les NPs synthétisées, après évaporation et purification, sont caractérisées par la méthode de diffusion dynamique de la lumière (DDL), ou dynamic light scattering (DLS), à l'aide d'un Zetasizer[®] Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Orsay, France). Cette technique consiste à mesurer la diffusion des particules sous l'effet du mouvement Brownien, cette donnée étant ensuite convertie en taille et distribution de taille (Brar et Verma, 2011) (**Fig. 4-5**).

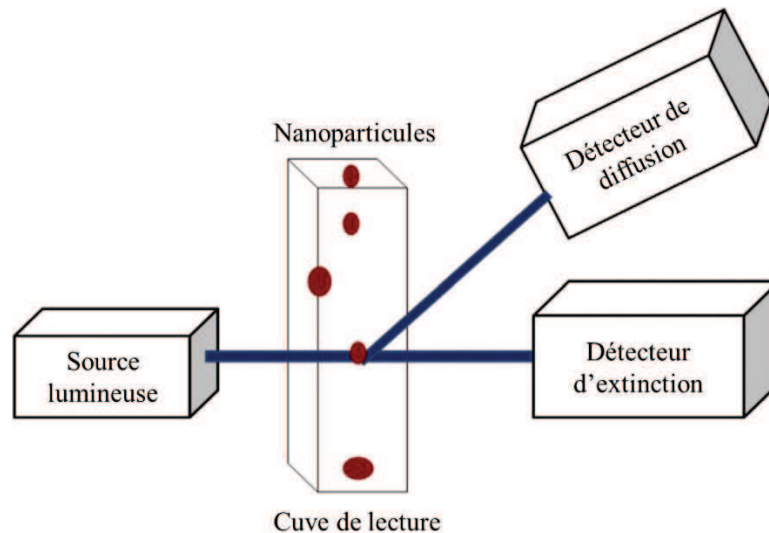


Figure 4-5 : Schématisation de la diffusion de la lumière par les nanoparticules (D'après Brar et Verma, 2011)

Le diamètre hydrodynamique (en nm) des NPs est calculé grâce à la relation de Stokes-Einstein (**Fig. 4-6**).

$$D_h = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_t}$$

Figure 4-6 : Equation de Stockes-Einstein

(D_h : diamètre hydrodynamique, D_t : coefficient de diffusion, k_B : constante de Boltzmann, T : température thermodynamique, η : viscosité)

La mesure permet également d'obtenir l'indice de polydispersité (PdI) de l'échantillon de particules analysé, ce paramètre reflétant la distribution de taille des particules. Pour des raisons de reproductibilité, seules les synthèses ayant un PdI inférieur ou égal à 0,3 sont conservées pour les expériences. L'analyse en DDL permet aussi de déterminer la charge globale de surface des NPs, encore appelée potentiel zêta (en mV).

4.2.2.2. Observation des NPs par microscopie électronique en transmission

Les NPs sont également visualisées par microscopie électronique en transmission (MET). Pour cela, la solution est homogénéisée et diluée au 1/500^{ème} dans de l'eau. Cinq microlitres de la dilution sont ensuite déposés sur une grille de cuivre (grilles Cu 400 Mesh 3 mm de diamètre) recouverte de carbone rendu hydrophile. La grille est séchée et contrastée pendant 1 min avec de l'acétate d'uranyle à 2%. La préparation est à nouveau séchée et observée en MET (Tecnai G2 Sphera, FEI Compagny, Hillsboro, USA).

4.2.3. Détermination du rendement d'encapsulation de l'insuline dans les NPs

Le rendement d'encapsulation est un paramètre permettant de connaître la quantité d'insuline introduite dans les NPs lors de la synthèse. Pour déterminer ce rendement, deux méthodes existent : la méthode directe qui a pour but de quantifier l'insuline encapsulée dans les NPs, et la méthode indirecte qui consiste à quantifier l'insuline présente dans les surnageants de synthèse, et donc non encapsulée. La méthode directe nécessite de détruire la NP, afin de libérer l'insuline en vue de son dosage. Dans notre cas, cette destruction a été obtenue par ajout d'acétonitrile (Roth, Lauterbourg, France) qui permet de dissoudre le PLGA. Ce solvant agit aussi sur l'insuline en la précipitant, ce qui permet la séparation de l'insuline commerciale (Insuman[®]).

Des NPs contenant de l'Insuman[®] ont donc été synthétisées selon les protocoles décrits précédemment. Pour séparer les NPs du milieu de synthèse, les solutions de synthèse ont été centrifugées à 20 000 g pendant 1 h à température ambiante. L'insuline non encapsulée, contenue dans le surnageant, nommé S1, a été diluée dans un ratio 1/10 (v/v) d'acétonitrile

afin de la faire précipiter. Le culot de NPs a été dissout dans 1 mL d'acétonitrile à l'aide d'un vortex durant 30 sec. Le mélange a été incubé pendant 25 h à 37 °C sous agitation, puis centrifugé à 20 000 g pendant 1 h à température ambiante. Le surnageant obtenu, nommé S2, a été écarté, et le culot contenant l'insuline a été remis en suspension dans 1 mL de Phosphate Buffered Saline (PBS) à l'aide d'un vortex durant 30 sec. Ce mélange a été à nouveau centrifugé pendant 1 h à 20 000 g, afin de séparer l'insuline en solution des débris de NPs. Le surnageant S3 alors obtenu a été utilisé pour le dosage de l'insuline. Ce dosage a été réalisé par la mesure de l'absorbance à 220 nm par spectrophotométrie (BioSpectrometer, Eppendorf, Le Pecq, France), et la quantité d'insuline a été exprimée en pourcentage de la valeur théorique de l'insuline présente dans la synthèse.

4.3. Etudes *in vitro* et *in vivo* de l'efficacité et de la sécurité des NPs d'insuline

4.3.1. Etudes *in vitro* de l'efficacité et de la sécurité des NPs

4.3.1.1. Lignées cellulaires

4.3.1.1.1. Lignée Caco-2

La première lignée cellulaire utilisée, appelée « Cancéreuse Colique » ou Caco-2 (ATCC, Mannassas, VA, USA), est issue d'un adénocarcinome colique humain. Les cellules de cette lignée ont un phénotype entérocytaire absorbant et expriment les caractéristiques morphologiques spécifiques à ce type cellulaire. En effet, elles ont la capacité de se différencier spontanément, de se polariser et de former une monocouche cohésive grâce au développement de jonctions serrées (Thompson *et al.*, 2011). Ces cellules sont aussi recouvertes d'une bordure en brosse à leur pôle apical (Grajek et Olejnik, 2004). Elles forment une monocouche à partir de 7 jours de culture, et après 21 jours, la monocouche cellulaire est totalement différenciée (Behrens et Kissel, 2003).

Les cellules Caco-2 expriment les facteurs et enzymes de différenciation communs aux entérocytes : la sucrase-isomaltase, l'amino-peptidase et la phosphatase alcaline (Grajek et Olejnik, 2004; Sambuy *et al.*, 2005). Elles expriment aussi des transporteurs comme ceux de la famille des transporteurs du glucose, GLUT, et des transporteurs d'efflux, comme les P-glycoprotéines (P-gp) (Pang, 2003; Shah *et al.*, 2006).

4.3.1.1.2. Lignée Rev HT29 MTX M6

La deuxième lignée cellulaire est la lignée Rev HT29-MTX M6 (Rev). Fournie gracieusement par le Dr. Lesuffleur (UMR S 938, Paris, France), cette lignée provient d'une lignée souche, la lignée HT29, non différenciée à 95% et très hétérogène, qui renferme une faible proportion de cellules à mucus (Lesuffleur *et al.*, 1990, 1991, 1998). La lignée Rev est obtenue en

traitant les cellules HT29 par des concentrations croissantes de méthotrexate (MTX), analogue de l'acide folique, jusqu'à atteindre la concentration maximale de 1.10^{-6} M. Le MTX, retiré du milieu de culture après plusieurs semaines de traitement, détruit les cellules non différenciées en inhibant l'enzyme dihydrofolate réductase (DHFR) qui assure la conversion de l'acide folique en tétrahydrofolate. Les cascades de synthèse de purine et pyrimidine nécessaires à la synthèse d'ADN et à la croissance cellulaire sont donc bloquées (de Anta *et al.*, 2005; Morales *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2006).

Ce traitement au MTX permet aux cellules résistantes de se différencier par un mécanisme d'amplification du gène *DHFR*, et de développer la capacité à sécréter du mucus (**Fig. 4-7**). Les cellules Rev ont alors un phénotype de cellules caliciformes. Ces cellules, en se différenciant, ont aussi la capacité à former une monocouche cellulaire grâce à l'établissement de jonctions serrées. Ainsi, après 21 jours de culture, 100% des cellules sont polarisées et sont des cellules productrices de mucus (Lesuffleur *et al.*, 1991, 1993).

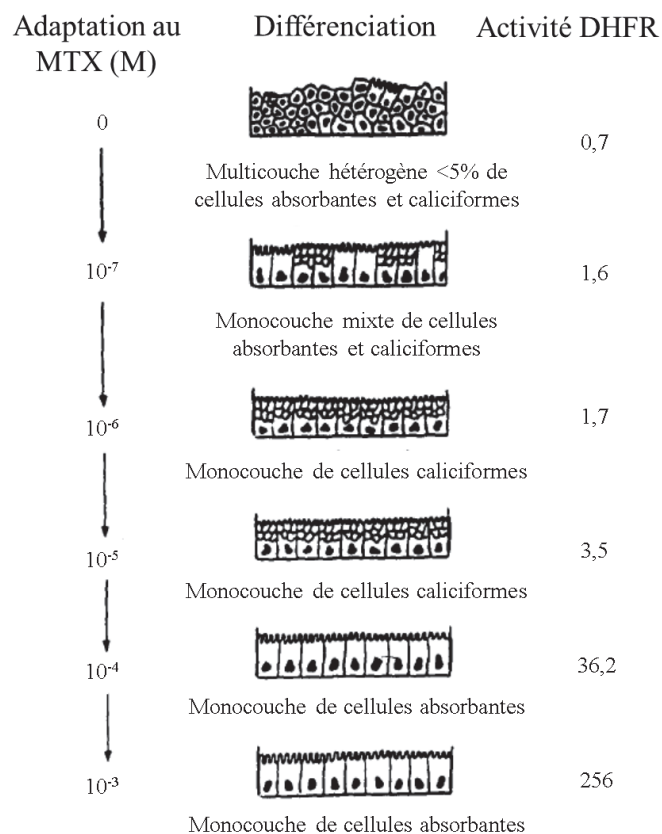


Figure 4-7 : Schématisation de la différenciation des cellules HT29 après traitement au méthotrexate (D'après Lesuffleur *et al.*, 1991)

Les cellules Rev expriment aussi alors les facteurs de différenciation caractéristiques de la barrière intestinale et des cellules caliciformes tels que l'agent carcinoembryonique (CEA), la villine, la sucrase-isomaltase, l'aminopeptidase, la dipeptidylpeptidase IV et la phosphatase

alcaline (Lesuffleur *et al.*, 1990). Selon Pontier *et al.*, (2001), ces cellules n'exprimeraient pas la P-gp.

4.3.1.1.3. Culture cellulaire

Les cellules Caco-2 et Rev utilisées proviennent toutes de souches préalablement traitées contre les mycoplasmes (BM-Cyclin, Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne). Les cellules Caco-2 ont été utilisées du passage p30 à p60, et les cellules Rev du passage p45 à p55.

Les lignées sont cultivées dans des flasques T75 aux surfaces traitées (Corning, Corning, NY, USA) en présence de milieu essentiel minimum de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM, Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) contenant 4,5 g/L de glucose et un mélange d'antibiotique et d'antifongique (10 000 U de pénicilline G, 10 mg de streptomycine, 25 µg d'amphotérine B dans 1mL, Sigma).

Pour les cellules Caco-2, le milieu est supplémenté de 20% de sérum de veau fœtal (SVF, Lonza, St-Beauzine, France) préalablement décomplémenté pendant 30 min à 56°C. Un pourcent d'acides aminés non essentiels d'une solution à 10 mM (Gibco[®], Life technologies, St-Aubin, France) est ajouté dans le milieu de culture ainsi que 1% de GlutaMAX[™] d'une solution à 200mM (dipeptide de L-alanyl-L-glutamine, Gibco[®], Life technologies, St-Aubin, France).

Pour les cellules Rev, 10% de SVF décomplémenté sont ajoutés au milieu de culture.

Le milieu de culture pour les co-cultures est celui utilisé dans la culture des cellules Caco-2.

Pour l'initiation des cultures, les cellules Caco-2 sontensemencées à 6 600 cellules/cm² et les cellules Rev à 13 000 cellules/cm². Les cultures sont ensuite maintenues à 37°C dans une atmosphère enrichie à 5% en CO₂. Le milieu de culture est renouvelé tous les 2 jours.

4.3.1.1.4. Mise en place du modèle de co-culture Caco-2/Rev

La co-culture des lignées Caco-2 et Rev apporte un avantage certain vis-à-vis d'une monoculture de cellules Caco-2 dans le développement d'un modèle de barrière intestinale. Le modèle de monoculture de cellules Caco-2 est en effet parfois critiqué pour son manque de production de mucus (Chen *et al.*, 2010; Hilgendorf *et al.*, 2000) et sa surexpression de P-gp qui sous-estime l'absorption des substrats de ce transporteur (Sambuy *et al.*, 2005; Shah *et al.*, 2006). De plus, le modèle de monoculture de cellules Caco-2 est imperméable aux composés hydrophiles (Behrens et Kissel, 2003; Chen *et al.*, 2010).

Le modèle de monoculture de cellules Rev n'est pas optimal non plus. En effet, les cellules Rev sont peu absorbantes, n'exprimeraient pas la P-gp, et auraient de ce fait une forte perméabilité (Pontier *et al.*, 2001).

Une co-culture est plus représentative de la constitution physiologique de l'intestin. Dans l'épithélium intestinal, les cellules caliciformes et les entérocytes représentent les deux phénotypes majeurs, dans les proportions de 10%/90% (Pontier *et al.*, 2001) respectivement, et plus particulièrement dans l'intestin grêle (Mahler *et al.*, 2009). De plus, la surexpression des P-gp par les cellules Caco-2 et la sous-expression par les cellules Rev peuvent alors se compenser. La formation de jonctions serrées dans chaque monoculture est conservée dans la co-culture (Mahler *et al.*, 2009).

Afin de mettre en place le modèle de co-culture Caco-2/Rev, les deux lignées ont été mises simultanément en culture aux deux ratios pertinents proposés par la littérature, 90%/10% et 75%/25%. Les co-cultures ainsi obtenues ont été caractérisées en évaluant leur résistance électrique trans-épithéliale (TEER) et leur capacité à produire du mucus.

4.3.1.1.4.1. *Evaluation de la résistance électrique trans-épithéliale*

La résistance électrique trans-épithéliale (TEER) est un paramètre qui renseigne sur l'état de différenciation et l'intégrité d'une monocouche de cellules épithéliales. En effet, la valeur de cette résistance est corrélée à l'établissement de jonctions serrées entre les cellules lors de la culture. Plus ces jonctions sont solides, plus les valeurs de TEER sont élevées. De même, si les jonctions serrées d'une monocouche cellulaire sont altérées en réponse à un phénomène toxique, la résistance de la culture, et donc la valeur de TEER diminuent. Lors de la mise en place de nos modèles cellulaires, cette méthode a été utilisée pour mesurer leur capacité à se différencier et à former des jonctions serrées.

La mesure de la TEER nécessite de cultiver les cellules sur des inserts (Fig. 4-8).

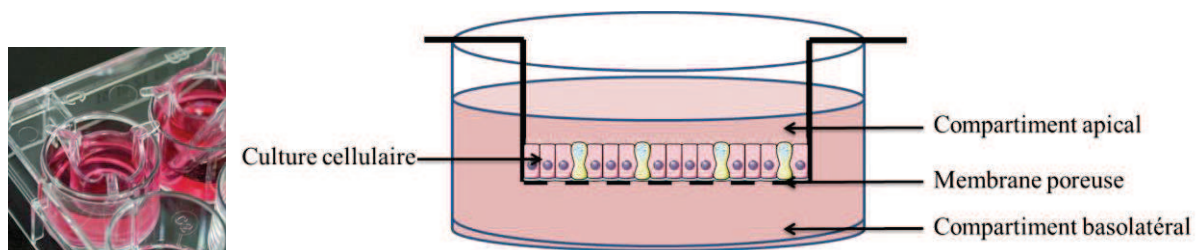


Figure 4-8 : Photographie et schématisation d'une culture sur insert
(Source photo: www.greinerbioone.com)

En effet, cette technique repose sur l'utilisation de deux électrodes, une courte et une longue, reliées à un Ohm-mètre (Millicell[®] ERS-2, Millipore, Molsheim, France). L'électrode courte se place dans le compartiment apical de l'insert, et l'électrode longue, dans le compartiment basolatéral. L'Ohm-mètre affiche alors une valeur de résistance exprimée en Ohm et correspondant à la résistance de la membrane de l'insert et des cellules cultivées (**Fig. 4-9**).

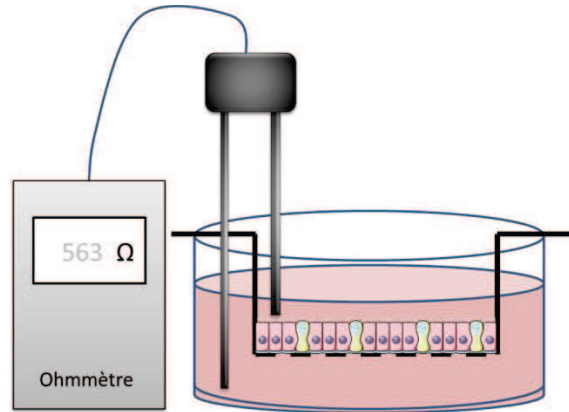


Figure 4-9 : Schématisation de la mesure de TEER

Les inserts que nous avons utilisés étaient des inserts transparents en polyéthylène téréphtalate (PET) (Greiner Bio-one, Brumath, France) de 1 μm de porosité. Les cellules ont été mises en culture sur ces supports à différents ratios. Pour le ratio 10%/90%, les cellules Caco-2 ont étéensemencées à hauteur de 180 000 cellules/insert et les cellules Rev à 20 000 cellules/insert. Pour le ratio 75%/25%, 150 000 cellules Caco-2 et 50 000 cellules Rev ont étéensemencées par insert. Des monocultures de cellules Caco-2 et de cellules Rev ont été utilisées comme témoins. Après ensemencement des inserts, la TEER des cultures a été mesurée de façon régulière jusqu'à obtention d'une valeur maximale de TEER. Les résultats ont été exprimés en Ohm.cm^2 après soustraction des valeurs de résistance de la membrane de l'insert.

4.3.1.1.4.2. Mise en évidence de la production de mucus

Pour déterminer quel ratio de co-culture permet la production de mucus la plus abondante, les lignées ont été cultivées pendant 21 jours sur des lamelles insérées dans des plaques de culture 24 puits à raison de 54 750 cellules Caco-2 et 18 250 cellules Rev par puits, pour le ratio 75%/25%. Pour le ratio 90%/10%, les cellules Caco-2 ont étéensemencées à 65 700 cellules/puits et les cellules Rev à 7 300 cellules. Des conditions témoins ont été réalisées avec l'ensemencement de monocultures de chacune des lignées.

La mise en évidence de la production de mucus par les différentes cultures s'est faite par coloration. Les lamelles ont été transférées dans des plaques de culture de 12 puits, et

incubées avec 400 µL de bleu alcian 8GX acide (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) à 10 mg/mL pendant 1 minute 30. Cette première étape permet la coloration des mucines acides. Les cellules ont été ensuite rincées 3 fois avec de l'eau distillée, puis incubées pendant 3 min avec de l'hématoxyline de Harris (Labonord, Templemars, France) colorant les noyaux. Les cellules ont été à nouveau rincées 3 fois et ont été conservées dans l'eau jusqu'à observation par microscopie optique (Nikon Eclipse 50i Fluo, Nikon, Belmont, CA USA), sans ajout de milieu de montage, ni lamelle, afin de ne pas endommager le mucus présent en surface des cellules. Des photographies ont été prises grâce à une caméra Nikon Digital Sight DS-5Mc (Nikon, Belmont, CA USA) et au logiciel d'acquisition NIS-Elements BR 3.10 (Nikon, Belmont, CA USA).

4.3.1.2. Etude de l'internalisation et de la sécurité des NPs dans les différents modèles cellulaires

L'étude de l'internalisation et de la sécurité des NPs a été réalisée sur des cultures pures de cellules Caco-2 et/ou sur des co-cultures Caco-2/Rev cultivées en plaques 24 puits ou sur inserts (BD Falcon, Le Pont de Claix, France).

Pour les tests nécessitant une culture sur plaque 24 puits (tests d'internalisation, viabilité cellulaire, dosage des cytokines et coloration du mucus), les monocultures de cellules Caco-2 ont étéensemencées à hauteur de 73 000 cellules/puits, et les co-cultures à raison de 18 250 cellules Rev et 54 750 cellules Caco-2 par puits. Les cultures sur inserts (tests de TEER et de perméabilité apparente) ont nécessité pour les mono-cultures, 200 000 cellules Caco-2/insert, et pour les co-cultures, 50 000 cellules Rev et 150 000 cellules Caco-2 par insert. Les différentes cultures, monocultures et/ou co-cultures ont été cultivées pendant 21 jours avant utilisation dans un test d'internalisation ou de toxicité.

Selon l'évaporation des NPs après purification sur colonne, le volume final des synthèses peut différer. Cependant, le volume total incubé sur les cellules, milieu de culture et NPs compris, a été fixé à 1,5 mL pour les cultures en plaques 24 puits et à 450 µL pour les cultures sur inserts. Au vu de l'impossibilité de compter les NPs, les quantités incubées avec les cellules ont été exprimées en mg de polymère, c'est-à-dire en mg de PLGA. Les NPs ont été incubées avec les cellules en présence de milieu ne contenant pas de SVF, afin d'éviter leur dégradation. La quantité de NPs, leurs caractéristiques et le temps d'incubation variaient selon les expériences. Ils sont précisés dans chaque paragraphe.

4.3.1.2.1. Evaluation de l'internalisation des NPs et de la viabilité des cellules

Pour évaluer l'internalisation des NPs dans les différents modèles cellulaires, des NPs ont été synthétisées à partir d'insuline couplée à la fluorescéine (ins-FITC, $\lambda_{exc} = 490$ nm, $\lambda_{em} = 520$ nm, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) selon le protocole décrit précédemment. Ces NPs ont été mises en contact avec les cellules, puis leur internalisation a été, soit quantifiée par cytométrie en flux, soit mise en évidence par microscopie à illumination structurée. Dans les expériences de quantification de l'internalisation des NPs par cytométrie en flux, une mesure de la viabilité cellulaire a également été réalisée.

4.3.1.2.1.1. Quantification de l'internalisation des NPs par cytométrie en flux

L'internalisation des NPs a été quantifiée par la technique de cytométrie en flux. Cette méthode repose sur l'analyse de cellules individualisées, par un laser. Les cellules sont alors excitées à une ou des longueurs d'ondes spécifiques du ou des fluorochromes utilisés pour marquer une ou des macromolécule(s) d'intérêt (ou dans notre cas les NPs) et, en fonction ou non du marquage, émettent une fluorescence (Dhawan et Sharma, 2010) (**Fig. 4-10**).

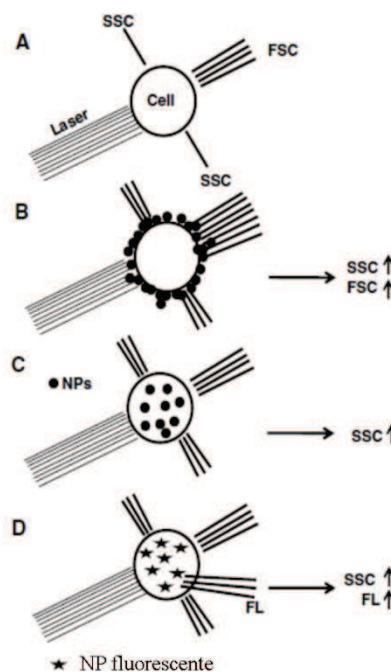


Figure 4-10 : Schématisation du principe de la cytométrie en flux et de la détection des NPs fluorescents (A : Les cellules ne sont pas associées aux NPs ; B : Les NPs adhèrent sur la surface des cellules et engendrent une augmentation du SSC et du FSC ; C : Les NPs sont internalisées par la cellule et engendrent une augmentation de la SSC uniquement ; D : Les NPs fluorescentes sont internalisées par la cellule et engendrent une augmentation de la SSC et de l'intensité de fluorescence ; SSC : Side Scatter (renseigne sur la granularité) ; FSC : Forward Scatter (renseigne sur la taille) ; FL : Intensité de fluorescence, d'après Dhawan et Sharma, 2010)

Le cytomètre utilisé au cours de notre travail était un BD™ LSR II Cell Analyzer équipé d'un échantillonneur pour plaques 96 puits (BD™ High Throughput Sampler, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), d'un logiciel d'acquisition des données (BD FACS DIVA Software 6.1.1) et d'un logiciel d'analyse (FlowJo 8.8.6, Treestar, Ashland, OR, USA). Les cellules ayant internalisées les NPs d'ins-FITC émettent une fluorescence quantifiée en unité arbitraire (UA) par le cytomètre. L'analyse des résultats permet aussi de connaître le pourcentage de cellules FITC+, i.e. émettant une fluorescence (**Fig. 4-11**). Les analyses d'internalisation prennent en compte les deux paramètres. L'internalisation est donc obtenue en multipliant l'intensité d'émission des cellules par le pourcentage de cellules associées à cette fluorescence, les cellules FITC+.

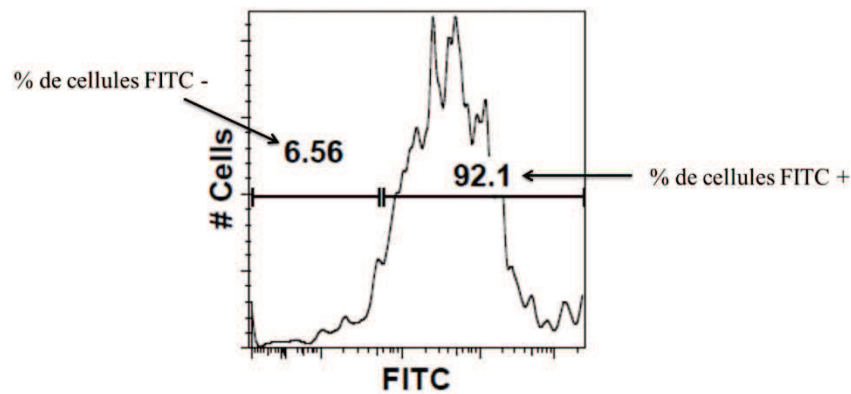


Figure 4-11 : Représentation d'un histogramme de cytométrie en flux montrant des cellules FITC+ et FITC-

Au cours de ces expériences de quantification de l'internalisation des NPs, trois facteurs susceptibles d'influencer l'internalisation cellulaire ont été étudiés : la dose, la taille et le temps d'incubation des NPs. Dans un premier temps, des quantités croissantes (5, 10, 20, 30 et 50 mg de PLGA) de NPs purifiées d'ins-FITC ou des NPs contrôles (NPs préparées en remplaçant l'insuline par de l'eau MilliQ) de 200 nm ont été incubées pendant 4 h avec des cellules Caco-2 ou des co-cultures, afin de déterminer quelle quantité de NPs permet une détection de l'internalisation. Des cellules incubées sans NPs ont été utilisées comme témoins. Dans un deuxième temps, 20 mg (exprimés en PLGA) de NPs d'ins-FITC de taille allant de 100 à 800 nm ont été incubées pendant 4 h avec des cellules Caco-2 ou des co-cultures, afin de déterminer la taille de NPs permettant d'obtenir la meilleure efficacité d'internalisation. Enfin, 20 mg de NPs d'ins-FITC de 200 ou 400 nm ont été incubées pendant 24 h avec des

cellules Caco-2 ou des co-cultures, afin d'évaluer l'impact du temps d'incubation sur l'internalisation.

Après la période d'incubation, les cellules ont été rincées 3 fois avec du Hanks' Balanced Salt solution (HBSS, St-Beauzire, France), afin d'éliminer toutes NPs résiduelles. Elles ont été ensuite incubées avec 100 μ L de trypsine (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) afin de les détacher de leur support, rincées dans l'HBSS, remises en suspension dans 1 mL d'HBSS, puis analysées en cytométrie de flux.

4.3.1.2.1.2. *Evaluation de la viabilité cellulaire au cours des expériences d'internalisation par cytométrie en flux*

Lors des expériences d'internalisation des NPs par cytométrie en flux, la viabilité des cellules a été évaluée par marquage à l'iodure de propidium et l'annexine V-couplée à un fluorophore. L'iodure de propidium est un agent intercalant de l'ADN fluorescent qui ne pénètre dans les cellules que lorsque les membranes cellulaires et nucléaires ont perdu leur intégrité. Ce phénomène n'apparaît qu'en phase tardive de l'apoptose ou lors de la mort des cellules par nécrose. L'annexine-V est une protéine qui a une forte affinité pour la phosphatidylsérine (PS) normalement présente dans le feuillet interne de la bicouche lipidique de la membrane cellulaire. En cas de mort cellulaire par apoptose, la PS subit un phénomène de « flip-flop » (Zwaal *et al.*, 2005), qui la fait passer du feuillet interne au feuillet externe de la membrane. L'annexine-V peut alors se fixer sur la PS (Fig. 4-12).

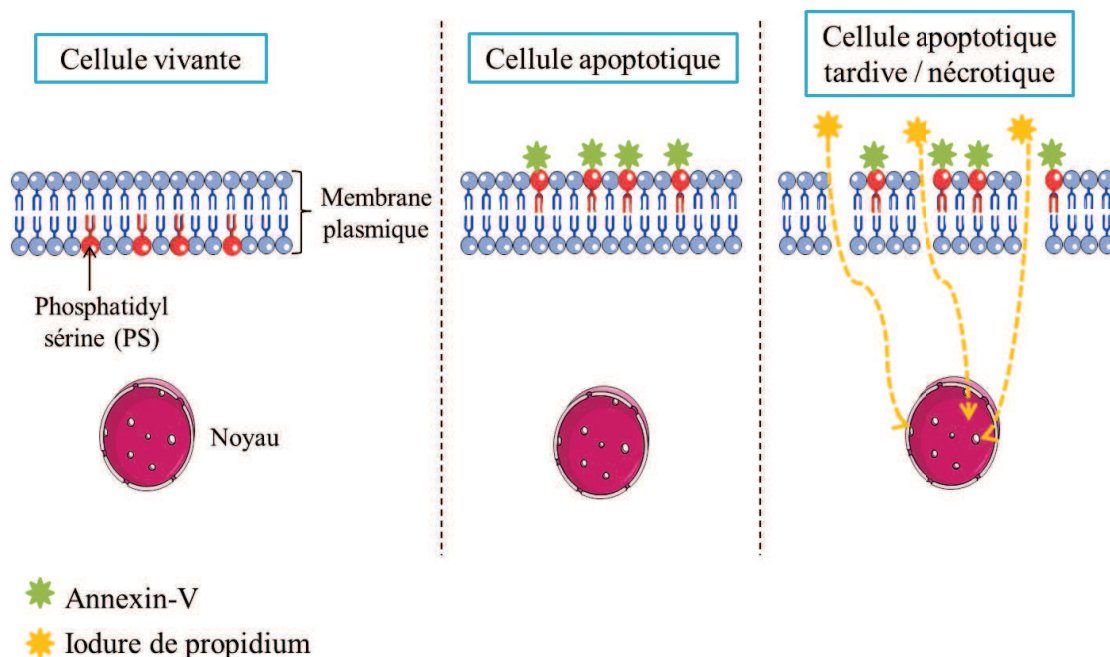


Figure 4-12 : Schématisation du marquage cellulaire par l'iodure de propidium et l'annexine-V

Le double marquage à l'iodure de propidium et à l'annexine V permet ainsi de différencier les cellules vivantes, des apoptotiques précoces ou tardives, ou des cellules nécrotiques. Les résultats du marquage sont exprimés sous la forme d'un cytogramme par le logiciel d'analyse de cytométrie en flux. Ce cytogramme est divisé en quatre parties correspondant au pourcentage de viabilité, nécrose, apoptose précoce et apoptose tardive / nécrose (**Fig. 4-13**).

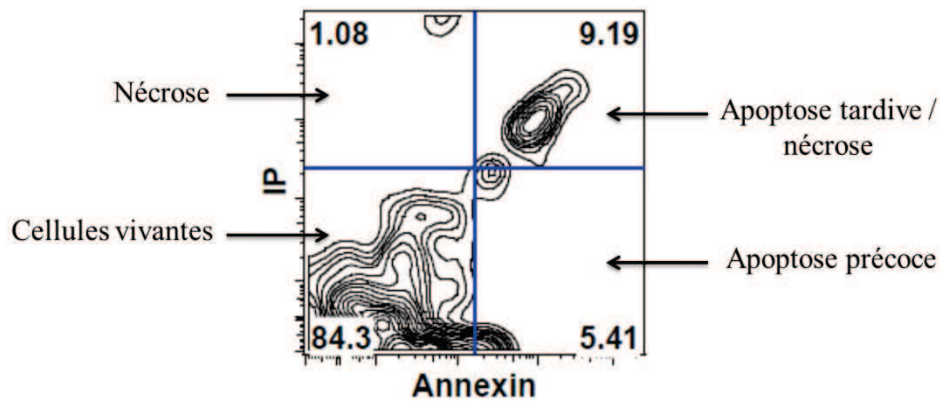


Figure 4-13 : Schématisation des résultats de marquage sous la forme de cytogramme

Pour le marquage, 10 μL d'iodure de propidium (PI, $\lambda_{\text{exc}} = 535 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 617 \text{ nm}$, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) à 63,5 mg/mL et 2 μL d'annexine-V couplée à l'allophycocyanine (APC, $\lambda_{\text{exc}} = 650 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 680 \text{ nm}$, eBioscience, San Diego, CA, USA) ont été ajoutés aux suspensions cellulaires à analyser. La viabilité cellulaire a été exprimée en pourcentage de viabilité par rapport à la condition « contrôle », et est obtenue en soustrayant les valeurs d'apoptose et de nécrose. Ces morts cellulaires ont été illustrées à l'aide des cytogrammes.

4.3.1.2.2. Mise en évidence de l'internalisation des NPs par microscopie à illumination structurée

Pour mettre en évidence l'internalisation des NPs, des NPs d'ins-FITC ont été mises en contact pendant 4 h ou 24 h à raison de 20 mg de PLGA avec les deux modèles cellulaires cultivés sur insert. En fin d'incubation, le milieu de culture a été retiré, et les cellules ont été incubées successivement, avec du Cell Mask Deep Red à 5 $\mu\text{g/mL}$ ($\lambda_{\text{exc}} = 649 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 666 \text{ nm}$, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) pendant 5 min, afin de marquer les membranes cellulaires, puis du Hoechst à 2,5 $\mu\text{g/mL}$ (Hoechst 33 342, $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 450$, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) pendant 5 min afin de marquer les noyaux cellulaires. Après marquage, les cellules ont été fixés avec du paraformaldéhyde (PFA, Sigma-Aldrich,

St-Louis, MO, USA) à 4% pendant 10 min. La membrane des inserts a été ensuite découpée et collée sur une lame d'histologie à l'aide d'Eukitt (Labonord, Templemars, France). Dix microlitres de milieu de montage spécifique à la microscopie confocale (Vectashield[®], Vector, Burlingame, CA, USA), ont été déposés sur la membrane de l'insert, et une lamelle y a été apposée. Le montage a été scellé et les lames ont été conservées à 4°C et dans l'obscurité. La visualisation a été réalisée à l'aide d'un microscope équipé d'un ApoTome (Microscope Zeiss droit Imager Z2, Zeiss, Le Pecq, France) et d'un logiciel d'acquisition (Axiovision).

4.3.1.1. Etude de l'exocytose des NPs

Le devenir des NPs et le passage de l'insuline à travers les cellules font intervenir des mécanismes qui restent méconnus. L'évaluation de l'exocytose des NPs est alors un point essentiel dans le développement de vecteurs pharmaceutiques basés sur les systèmes nanoparticulaires. Cette évaluation a été conduite grâce à l'utilisation de NPs chargées d'insuline-FITC par cytométrie en flux.

Des mono- et co-cultures cultivées sur plaques 24 puits classiques à support lisse ont été incubées en présence 20 mg de NPs d'ins-FITC (exprimé en PLGA) de 200 et 400 nm pendant 4h. Suite à cette incubation, les NPs ont été retirées des puits de culture. La moitié des puits a été immédiatement analysée en cytométrie de flux afin de mesurer l'internalisation des NPs (en UA). Du milieu de culture frais a été ajouté aux puits restants, qui ont été incubés à nouveau pendant 4h, avant d'être eux-mêmes analysés, afin d'évaluer l'exocytose des NPs.

4.3.1.1. Etude des mécanismes impliqués dans l'internalisation des NPs

Des mécanismes actifs ou passifs peuvent être impliqués dans le phénomène d'internalisation des NPs (Fröhlich et Roblegg, 2012). Les NPs de petites tailles traverseraient la barrière intestinale par transport paracellulaire à travers les jonctions serrées ou par un mécanisme de diffusion passive à travers la membrane cellulaire. Les NPs de taille plus importante entreraient dans la cellule par un mécanisme actif, nécessitant de l'ATP (Chen *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2013). Afin d'étudier les mécanismes impliqués dans l'internalisation de nos NPs, deux approches ont été utilisées : la baisse de la température dans le but de bloquer les mécanismes actifs d'endocytose (Reix *et al.*, 2012; dos Santos *et al.*, 2011) et l'utilisation d'inhibiteurs chimiques, afin de valider l'implication d'un mécanisme actif ou passif, et de préciser la voie d'internalisation alors utilisée par les NPs pour entrer dans la cellule.

4.3.1.1.1. Effet de la température

Les cellules, dans les conditions nécessaires à la cytométrie en flux, ont été incubées pendant 4 h à 4°C avec des NPs d'ins-FITC de 200 et 400 nm, à raison de 20 mg de PLGA/puits. Des cultures incubées à 37 °C ont été utilisées comme contrôle d'internalisation. La quantification de l'internalisation a été réalisée par cytométrie en flux (en UA).

4.3.1.1.2. Effets d'inhibiteurs des voies d'endocytose

Dans ces expériences, les cellules ont été pré-incubées à 37°C pendant 30 min avec différents inhibiteurs, puis le milieu de culture a été remplacé par du milieu contenant les NPs d'ins-FITC de 200 nm, à raison de 20 mg de PLGA/puits, et les inhibiteurs aux mêmes concentrations que celles utilisées pendant la pré-incubation.

Un mélange d'azide de sodium (NaN_3 , 0,02%, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) et 2-désoxy-D-glucose (Glc, 50 mM, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) a été utilisé pour inhiber tous les mécanismes actifs d'endocytose par blocage de la synthèse d'ATP (*Vranic et al.*, 2013; *Zödl et al.*, 2007).

D'autres inhibiteurs ont été utilisés afin de déterminer la voie majoritairement impliquée lors de l'internalisation des NPs (**Tableau 4-2**).

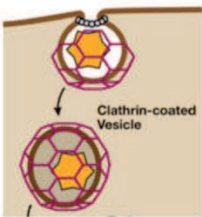
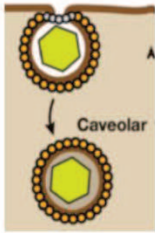
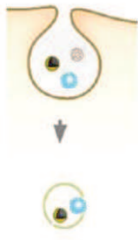
Inhibiteurs	Voie clathrine dépendante	Voie cavéoline dépendante	Voies clathrine et cavéoline indépendantes
			
MBC + Lov	×		×
NYS		×	×
PMA		×	

Tableau 4-2 : Tableau représentant les différentes voies d'internalisation des NPs et leurs inhibiteurs (MBC : Méthyl- β -cyclodextrine, NYS : Nystatine, PMA : Phorbol 12-myristate 13-acétate. Voie clathrine et cavéoline dépendante : *Stern et al.*, 2012, ; Voies clathrine et cavéoline indépendantes : *Zhu et al.*, 2013)

La méthyl- β -cyclodextrine (MBC, 10 mM) et la lovastatine (Lov, 10 mg/mL) ont été employées en mélange afin de bloquer les mécanismes clathrine-dépendants et indépendants en induisant une déplétion en cholestérol et permettant de savoir si l'endocytose est dépendante de l'intégrité des radeaux lipidiques (Song *et al.*, 2013; Vercauteren *et al.*, 2010). L'inhibition de la formation de cavéoles a été réalisée à partir de nystatine (NYS, 25 μ g/mL) (Zhu *et al.*, 2011) et de phorbol-12-myristate-13-acétate (PMA, 10 μ M) (Hutchinson *et al.*, 2012). Tous les inhibiteurs ont été fournis par Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA).

4.3.1.2. Evaluation de la sécurité des NPs

Pour les études de sécurité, des NPs de 200 et 400 nm ont été synthétisées à partir d'insuline rapide commerciale, l'insuline Umuline[®]. Ces NPs ont été incubées pendant 4 h ou 24 h sur des monocultures et sur des co-culturesensemencées sur des inserts poreux. Suite à ces incubations, nous avons évalué l'impact des NPs sur la TEER des cultures cellulaires, leur perméabilité apparente, la production de mucus qui peut varier en fonction du stress subi par les cellules, et enfin la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires.

4.3.1.2.1. Etude de la résistance électrique trans-épithéliale

Comme décrit plus haut, une altération des jonctions serrées d'une monocouche cellulaire se traduit par une baisse de TEER. Ce phénomène peut refléter une action toxique. La TEER a donc été utilisée comme index d'une possible toxicité exercée par les NPs dans nos modèles cellulaires. Des cultures ont été mises en présence de NPs d'insuline et des mesures de TEER ont été réalisées à T=0 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 23 et 24 h. Les valeurs de TEER, en Ohm, ont été rapportées à la surface de culture, converties en Ohm.cm², puis exprimées en pourcentage par rapport aux valeurs initiales. Dans cette étude, des inserts sans cellule, donnant une valeur de résistance basale due à la membrane de l'insert, ont été utilisés comme témoins. Cette valeur basale a été soustraite à toutes les valeurs de TEER mesurées. D'autres conditions témoins ont été réalisées comprenant des cellules auxquelles aucune NPs n'a été ajoutée. L'éthylène glycol-bis(2-aminoéthylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA), un chélateur du calcium, permettant l'ouverture des jonctions serrées, a été utilisé comme témoin positif.

4.3.1.2.2. Etude de la perméabilité apparente

Les cultures de cellules forment une monocouche solide et une véritable barrière pour les composés voulant la traverser. La voie de passage transcellulaire est restreinte aux molécules et composés lipophiles, qui peuvent franchir la membrane cellulaire, elle-même lipophile. Les composés hydrophiles empruntent quant-à-eux la voie paracellulaire, dépendante de l'intégrité des jonctions serrées et des cellules composant la monocouche (Konsoula et Barile,

2005; Silva *et al.*, 2006). Une altération de ces jonctions ou des cellules elles-mêmes sous l'action d'un toxique peut donc se traduire par une augmentation plus ou moins importante de la perméabilité apparente de la monocouche à des molécules hydrophiles.

Le principe de la mesure de la perméabilité apparente repose sur l'ajout, du côté apical d'une monocouche cellulaire cultivée sur insert, de marqueurs paracellulaires hydrophiles, et le suivi au cours du temps de l'apparition éventuelle de ces composés fluorescents dans le compartiment basolatéral des cultures par fluorimétrie, l'apparition des marqueurs reflétant une augmentation de perméabilité de la monocouche cellulaire. Le calcul de la perméabilité apparente (en cm/s) repose sur l'équation décrite en **figure 4-14**.

$$P_{app} = \frac{\Delta C}{\Delta t} \times \frac{1}{A \times C_0}$$

Figure 4-14 : Formule permettant le calcul de la perméabilité apparente
(P_{app} : Perméabilité apparente (cm/s) ; ΔC : concentration de la molécule mesurée dans le compartiment basolatéral (mg/mL), Δt : temps d'incubation de la molécule (s), A : surface de culture cellulaire (cm²), C_0 : concentration théorique de la molécule incubée dans le compartiment apical (mg/mL))

La mesure de la perméabilité apparente peut être réalisée avec des marqueurs de poids moléculaire, permettant de mettre en évidence des augmentations de perméabilité plus au moins importantes. Les marqueurs utilisés au cours de nos études étaient le FITC-Dextran 20 (FD 20, MW 20 000 Da, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA), de haut poids moléculaire, et la lucifer yellow (LY, MW 457 Da, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA), de faible poids moléculaire. Ces composés ont été ajoutés aux cultures à la concentration de 0,01 mg/mL. Dans ces expériences, l'EGTA a été utilisé comme témoin positif de perméabilité.

4.3.1.2.3. Evaluation de la production de mucus

Les cellules, et plus particulièrement les cellules à mucus, peuvent lutter contre une attaque par des agents pathogènes en sécrétant plus de mucus que la sécrétion basale : c'est l'hypersécrétion (Gaudier et Hoebler, 2008; Linden *et al.*, 2008). Ce mécanisme survient en cas de stress subi par la cellule, afin d'éliminer et d'éloigner l'élément pathogène ou externe des membranes cellulaires, ceci dans le but d'empêcher le passage de ces éléments à travers les cellules, et de se répandre dans la circulation sanguine. La sécrétion du mucus est permanente, et celui-ci est totalement renouvelé en quelques heures. *In vitro*, l'épaisseur de ce mucus est de l'ordre de 2 à 10 μm (Mahler *et al.*, 2009).

Des cellules issues de mono et co-cultures ont été cultivées sur lamelles aux mêmes densités que les cellules en plaque 24 puits. Elles ont été mises en contact avec des NPs d'insuline, en

quantités variant de 5 à 50 mg de PLGA pendant 4 h. Les cellules ainsi traitées ont été colorées au bleu alcian et à l'hématoxyline (Cf. Paragraphe 4.3.1.1.4.2).

4.3.1.2.4. Evaluation de la sécrétion de cytokines

Les surnageants cellulaires des monocultures Caco-2 et des co-cultures incubées avec les NPs lors de l'évaluation de l'internalisation par cytométrie en flux ont été utilisés pour cette étude. Parmi les différentes conditions expérimentales testées lors des expériences d'internalisation, celles sélectionnées pour une mesure de la sécrétion de cytokines sont les suivantes : incubation avec des NPs de 200 et 400 mg à la quantité de 20 mg de PLGA, pendant 4 h et 24 h.

Les cytokines IFN γ , IL-1 β , IL-6, IL-8 et TNF α ont été dosées dans les surnageants cellulaires par la méthode ELISA Multiplex (Milliplex[®] Kit, Millipore, Billerica, MA, USA) et exprimées en pg/mL. Cette technique utilise la technologie Luminex[®] basée sur la cytométrie en flux. Elle emploie des microbilles magnétiques fluorescentes qui portent différents réactifs de détection (enzyme, anticorps, acides nucléiques, ...) et servent de phase solide pour la détection d'analytes. La combinaison de différentes microbilles permet, lors d'un test, d'avoir jusqu'à 100 réactions de détection différentes effectuées simultanément dans un très petit volume d'échantillon. Dans le cas des ELISA, ces billes portent un anticorps de capture dirigé contre une cytokine à doser. Lors de l'incubation des billes avec l'échantillon, l'analyte est capturé par l'anticorps couplé à la bille. L'analyte ainsi fixé sur la bille est ensuite détecté grâce à l'ajout d'un anticorps de détection biotinylé, puis de streptavidine couplée à la phycoérythrine, dont la longueur d'onde d'émission diffère de celle émise par le marqueur des microbilles (Fig. 4-15). Les échantillons sont ensuite analysés par un double laser : un premier laser qui excite le marqueur fluorescent de la microbille, et un second laser qui excite la phycoérythrine (Leng *et al.*, 2008).

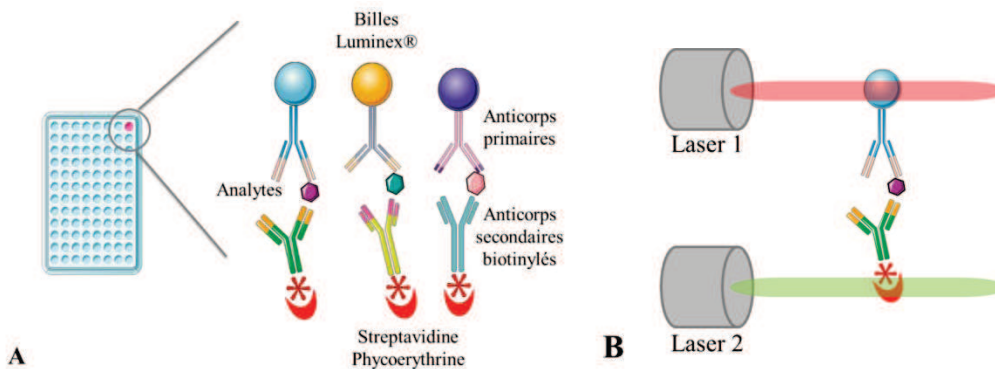


Figure 4-15 : Schématisation du principe de l'ELISA Multiplex

(A : Les billes Luminex[®] couplées à des anticorps primaires spécifiques se lient aux analytes détectées par des anticorps secondaires biotinylés, eux-mêmes révélés par la streptavidine ; B : Les billes Luminex[®] sont détectées par un premier laser, et la streptavidine par un second)

4.3.2. Evaluation de l'efficacité et de la sécurité des NPs *in vivo*

L'efficacité et la sécurité des NPs ont été évaluées chez le rat mâle de souche Wistar (Depré, Saint-Doulchard, France).

L'efficacité des NPs a été évaluée dans un modèle de rats insulino-péniques. Les rats ont été rendus diabétiques par une injection intrapéritonéale (IP) de streptozotocine (STZ, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA). La STZ est une molécule structuralement proche de la molécule de glucose (**Fig. 4-16**). Elle peut ainsi être internalisée par les cellules β pancréatiques via les transporteurs du glucose GLUT 2. Une fois dans la cellule, la STZ induit une alkylation de l'ADN et la formation de radicaux superoxydes, engendrant la destruction des cellules β pancréatiques (Szkudelski, 2001). La sécrétion d'insuline est alors quasi inexistante.

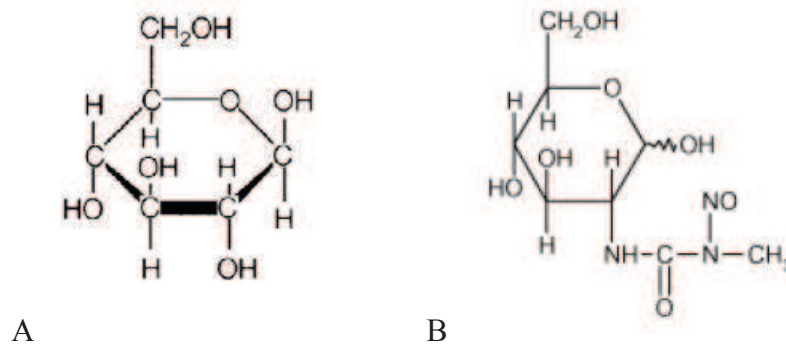


Figure 4-16 : Structure d'une molécule de glucose (A) et d'une molécule de streptozotocine (B)

Toutes les études ont été menées en accord avec les règles d'expérimentation animale de la législation française (décrets 87-848 du 19 octobre 1987 modifié par le décret 2001-464 du 29 mars 2001) et approuvé par le Comité régional d'éthique en matière d'expérimentation animale (CREMEAS) (AL/96/103/02/13).

4.3.2.1. Mise en place du modèle de rats insulino-péniques

Des tests de l'efficacité et de la dose nécessaire pour obtenir des rats insulino-péniques ont été réalisés. Pour cela, la STZ a été administrée par injection IP à raison de 65 et 75 mg/kg. L'évolution de la glycémie (en g/L), de la C-peptidémie (en pmol/L) et de la masse (en g) des animaux a été suivie pendant 7 jours après l'injection de STZ. La glycémie a été mesurée au niveau de la veine de la queue du rat à l'aide d'un lecteur de glycémie Accu-Chek[®] Performa et de bandelettes réactives (Roche diagnostics, Mannheim, Allemagne). La C-peptidémie a été

déterminée sur un prélèvement de sang réalisé à la queue des rats par ELISA (kit ELISA peptide-C rats, Mercodia, Uppsala, Suède).

4.3.2.2. Etude de l'efficacité des NPs à délivrer l'insuline

L'évaluation de l'efficacité des NPs à délivrer de l'insuline *in vivo* repose sur leur administration chez le rat diabétique, le suivi de l'évolution de la glycémie et la détermination de la biodisponibilité de l'insuline suite à cette administration.

Au cours de ce travail, l'administration des NPs aux animaux a été réalisée selon deux manières. Dans un premier temps, les NPs contenant l'insuline ont été administrée par voie intrapéritonéale (IP). Ce mode d'administration présente deux avantages dans le cadre de notre projet. Il permet, en empruntant le système porte, un accès rapide à la circulation sanguine et un premier passage hépatique de l'insuline nécessaire à l'équilibre glycémique, et évite les hypoglycémies sévères. Il nous a permis par ailleurs de vérifier l'intégrité de l'insuline après les différentes étapes de synthèse des NPs, étapes qui peuvent potentiellement la dégrader.

Afin de vérifier la capacité de nos NPs à délivrer l'insuline à travers la barrière intestinale, l'administration des NPs doit mimer leur délivrance par la gélule entérique après une administration orale du système de double encapsulation. Pour cela, les NPs doivent être administrées au niveau de la première partie de l'intestin, le duodénum. Ainsi, dans un second temps, les NPs contenant l'insuline ont été administrées en intraduodéal (ID). Afin d'évaluer la biodisponibilité de l'insuline après administration en IP et en ID, un dosage de l'insuline humaine est nécessaire. Pour cela, une récolte du sang artériel doit être effectuée.

Ces étapes ont nécessité des chirurgies d'implantation de cathéter permettant l'administration des NPs et des prélèvements sanguins sur animal vigile.

4.3.2.2.1. Implantation de cathéters au niveau du péritoine

Pour l'implantation des cathéters en intrapéritonéal, des animaux d'environ 250 g, ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale d'un mélange de xylazine / kétamine, soit 2,7 mL de Rompun[®] 2% (Bayer, Puteaux, France) ajouté à 10 mL d'Imalgène[®] 1000 (Merial, Lyon, France), à raison de 100 µL/100g de masse corporelle.

Une laparotomie a été réalisée au niveau de l'abdomen de l'animal. Les berges intrapéritonéales ont été alors mises en évidence, et un cathéter siliconé a été implanté sous un feuillet du péritoine et fixé à l'aide de sutures. Le cathéter a été ensuite tunnélisé en sous-cutané, et ressorti au niveau des cervicales de l'animal afin de permettre un accès facilité lors

de l'injection sur animal vigile (**Fig. 4-17**). Cette tunnélisation permet également à l'animal d'éviter d'extraire son cathéter.

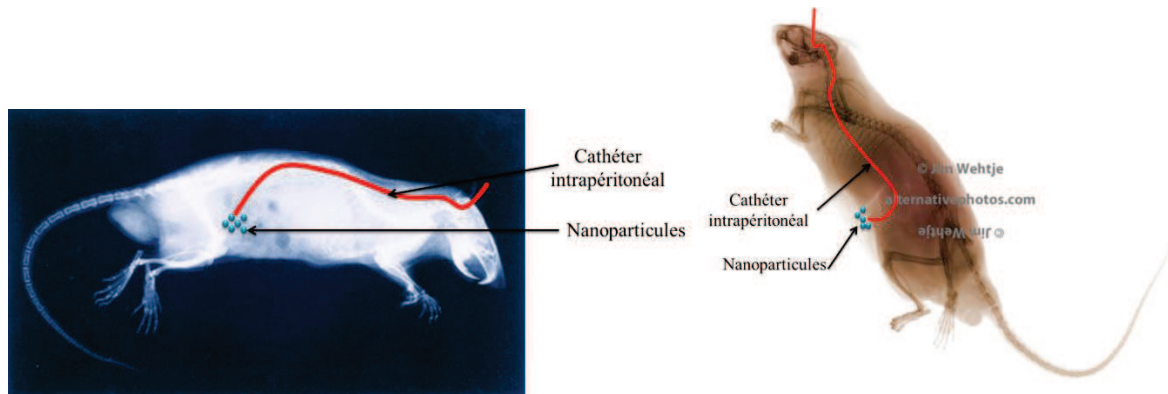


Figure 4-17 : Représentation de l'implantation du cathéter en intrapéritonéal

4.3.2.2.2. Implantation de cathéters au niveau du duodénum

Pour l'implantation des cathéters en intraduodéal, une laparotomie est réalisée au niveau de l'abdomen de l'animal anesthésié comme décrit précédemment. Le cathéter siliconé est inséré dans la partie du duodénum la plus proche de l'estomac, de manière à délivrer les NPs dans le sens de la digestion (**Fig. 4-18 et 4-19**). Celui-ci est fixé à l'aide de points de suture, en prenant soin de ne pas obstruer le passage de l'alimentation. Les berges péritonéales sont également suturées et le cathéter est tunnélisé en sous-cutané afin de ressortir au niveau des cervicales de l'animal.

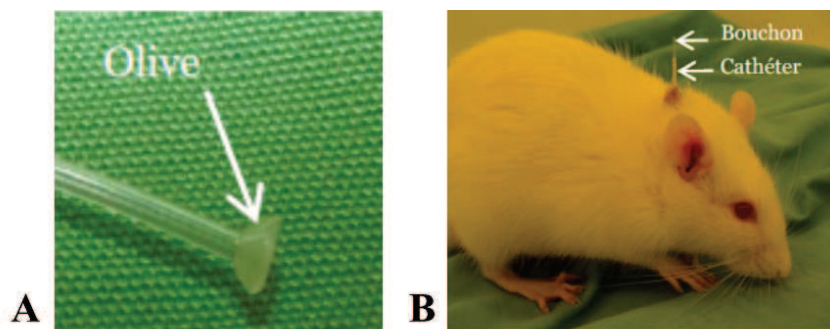


Figure 4-18 : Photographie du cathéter intraduodéal et de l'implantation chez le rat (A : Bout du cathéter formé d'une olive entrant dans le duodénum, B : Tunnélisation du cathéter en sous-cutané, jusqu'à la base du cou)

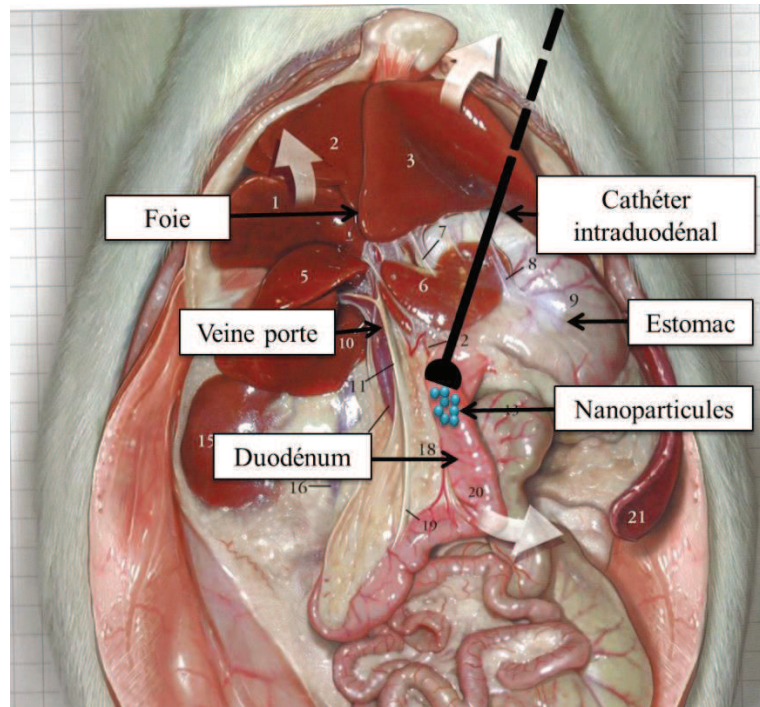


Figure 4-19 : Schématisation de l'implantation du cathéter intraduodénal

4.3.2.2.3. Implantation de cathéters au niveau de la carotide

Dans le cas des études de biodisponibilité de l'insuline, un cathéter a été placé dans la carotide des rats sur lesquels des cathéters ont déjà été posé en IP ou en ID, afin de prélever du sang artériel et doser l'insuline administrée par voie IP ou ID. L'anesthésie des rats et leur prise en charge a été la même que pour les autres chirurgies. L'implantation a été réalisée dans la carotide gauche en raison de la configuration anatomique du système cardiovasculaire (Fig. 4-20). En effet, si l'implantation a lieu dans la carotide droite, l'artère sous-clavière droite sera obstruée et l'irrigation des membres supérieurs droits sera perturbée.

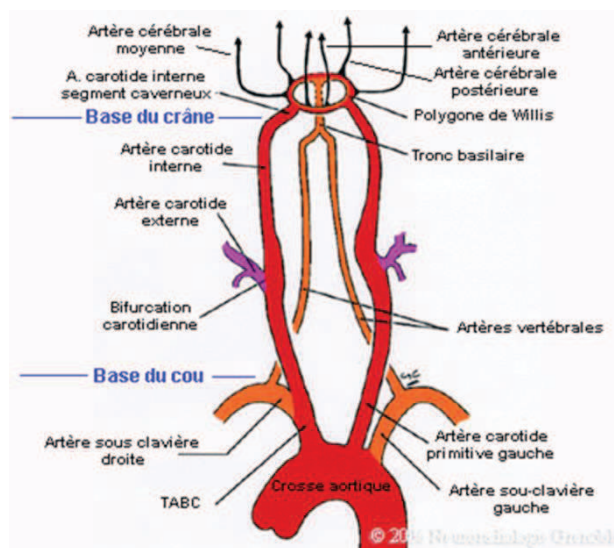


Figure 4-20 : Schématisation du système cardiovasculaire de la région du cou

Au préalable des cathéters sont préparés avec longueur prédéfinie en fonction de leur masse corporelle. Cette distance permet d'implanter le cathéter au niveau de la sortie sanguine du cœur afin d'avoir suffisamment de pression pour que le sang sorte du cathéter au moment du prélèvement.

4.3.2.2.4. Administration des NPs aux animaux et suivi de la glycémie

Les animaux bénéficient de deux jours de récupération entre la pose du cathéter et l'administration de NPs. Le lendemain de la chirurgie, une injection de sérum physiologique hépariné à 1,5% (Héparine Choay[®], 2500 UI/5mL, Sanofi-Aventis, Paris, France) est réalisée afin d'éviter l'encombrement du cathéter par la nourriture ou la coagulation sanguine. Ce même jour, de l'eau de boisson sucrée (5% de glucose poids/volume) est placée dans les biberons afin d'homogénéiser la prise de sucre, et donc la glycémie des rats pour le jour de l'expérience. L'administration de NPs d'insuline est réalisée deux jours après la chirurgie des animaux. Les NPs injectées sont synthétisées à partir d'insuline Insuman[®], afin de permettre une concentration de la dose et éviter l'injection d'un grand volume chez l'animal. Des rats témoins reçoivent respectivement du sérum physiologique, et de l'insuline non encapsulée. Après traitement, les rats ont à nouveau accès à une boisson non sucrée, et sont mis à jeun pendant la durée de l'étude, qui est de 4 h pour les suivis après injection IP et de 8 h pour les injections en ID. Le suivi de la glycémie a été réalisé de manière directe, à l'aide d'un lecteur de glycémie.

L'administration de l'insuline non encapsulée et des NPs d'insuline est réalisée à raison de 2 UI / 200 g pour les injections en IP et 10 UI / 200 g en ID. Des rats témoins opérés ont reçu respectivement du sérum physiologique, et de l'insuline non encapsulée.

4.3.2.2.5. Etude de la biodisponibilité après administration en IP ou ID

Pour la détermination de la biodisponibilité de l'insuline, du sang a été prélevé à la carotide des animaux grâce à un cathéter intra-carotidien préalablement implanté. Le sang a été recueilli durant 4h pour les injections IP (avec des prélèvements à T=0, 30 min, 1h, 1h30, 2h, 3h et 4h) et durant 8h pour les injections ID (avec des prélèvements à T=0, 1h, 2h, 4h, 6h et 8h) dans des tubes recouverts de lithium et d'héparine, puis centrifugé pendant 2 min à 10 000 g. Les échantillons sont ensuite congelés jusqu'au dosage de l'insuline par ELISA à l'aide d'un kit commercial spécifique de l'insuline humaine (Mercodia, Paris, France).

4.3.2.3. Evaluation de la sécurité des NPs in vivo

Afin de visualiser l'impact des NPs dans l'environnement intestinal, une étude histopathologique a été réalisée. Des prélèvements de duodénum ont été réalisés sur des rats auxquels du sérum physiologique, de l'insuline non encapsulée ou des NPs d'insuline ont été administrés en intraduodéal. Ces prélèvements ont été rincés dans du tampon phosphate saline (PBS) à pH 7,4, puis rapidement inclus dans du milieu d'enrobage (OCT, Labonord, Templemars, France) et congelés dans l'azote liquide. Les blocs d'inclusions ont été stockés à -80°C. Des coupes histologiques de ces prélèvements, de 4 µm d'épaisseur, ont été réalisées à l'aide d'un cryostat (Leica CM3050S, Leica, Nanterre, France). Ces coupes ont été fixées au formol rosé (Labonord, Templemars, France) pendant 3 min, puis rincées à l'eau. Elles ont alors été colorées au bleu alcian et à l'acide périodique de Schiff (PAS, Sigma-Aldrich), coloration mettant en évidence les mucines du mucus, puis contre-colorées à l'hématoxyline. Les coupes ont enfin été rincées et montées entre lame et lamelle. Elles ont été observées et photographiées en microscopie optique.

4.4. Analyse statistique des résultats

Les valeurs présentées dans la section « résultats » sont exprimées sous la forme de moyennes \pm Erreur Standard Moyenne (SEM) et représentent un minimum de n=3 expériences. Elles sont comparées par une analyse multifactorielle de la variance, suivies d'un test de Student. Les résultats sont considérés comme significatifs lorsque p est inférieur à 0,05 (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$).

5. RESULTATS ET DISCUSSION

5.1. Développement de la gélule gastrorésistante

La voie orale est l'une des voies les plus utilisées pour l'administration de principes actifs, bien qu'elle présente des limites. Les variations du pH le long du tractus gastro-intestinal rendent difficile la délivrance de principes actifs, et notamment la délivrance de protéines. La faible stabilité de ces protéines dans les environnements gastriques et intestinaux nécessite de développer des stratégies visant à les protéger. Par ailleurs, le rat est l'une des espèces animales recommandées pour le développement pré-clinique des médicaments, tant lors des études de biodisponibilité, de pharmacocinétique et pharmacodynamie, que pour des études de sécurité.

Les données présentées dans cette partie de notre travail concernent l'évaluation *in vivo* de la gastrorésistance d'une gélule entérique de taille adaptée à une administration orale chez le rat. Cette gélule entérique représente la première phase d'encapsulation qui apportera la gastrorésistance au système complet. En effet, dans le cadre du projet ORAIL, la gélule a pour but de garantir l'intégrité des NPs jusqu'à leur site de libération, l'intestin. La validation *in vivo* de la gastrorésistance de cette première phase d'encapsulation, mais également de son entérosolubilité, est donc primordiale, car elle permettra de valider la première partie du brevet concept de la double encapsulation, c'est-à-dire la protection des NPs et leur délivrance dans le milieu intestinal.

Les données obtenues au cours de son travail sont présentées sous la forme d'une publication, qui relate l'évaluation de la gastrorésistance de la gélule par tomodynamométrie et par mesure de la délivrance de l'acétaminophène, et des résultats complémentaires non publiés, qui eux concernent l'évaluation de la gastrorésistance de la gélule par mesure de la délivrance de l'ibuprofène.

5.1.1. Publication : Evaluation de la gastrorésistance de la gélule par tomodynamométrie et mesure de la délivrance d'acétaminophène



Rapid communication

Duodenum-specific drug delivery: In vivo assessment of a pharmaceutically developed enteric-coated capsule for a broad applicability in rat studies

Nathalie Reix^a, Pauline Guhmann^a, William Bietiger^a, Michel Pinget^{a,b}, Nathalie Jeandidier^{a,b}, Séverine Sigrist^{a,*}^a Centre Européen d'étude du Diabète, Bd René Leriche, F-67200 Strasbourg, France^b Université de Strasbourg, 4 rue Blaise Pascal, F-67081 Strasbourg cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 September 2011

Received in revised form 4 October 2011

Accepted 6 October 2011

Available online 13 October 2011

Keywords:

Enteric-coated capsule

Rat

μCT imaging

Pharmacokinetic

ABSTRACT

Targeting new oral drug formulations in the intestine has a broad applicability in animal studies. Enteric-coated capsules are gastroresistant and specific drug delivery systems useful for the evaluation of new pharmaceutical formulations during pre-clinical validations in rats. The purpose of this study was to develop and validate in a large-scale, reliable, reproducible capsules, to offer a safe and standardized duodenum-specific delivery system adapted for studies in rats. The reproducibility of the coating method, the coating layer uniformity and thickness, the external capsules integrity and their enteric properties after in vitro dissolution in simulated gastric and intestinal media were already evaluated and validated. This study presents the in vivo tests of the gastroresistance and of the location of the disintegration. Micro-computerized tomography and a pharmacokinetic study of acetaminophen-filled capsules showed that the enteric-capsules were resistant in the stomach with no apparent leak of the capsules, and were disintegrated in the early duodenum 1–1.5 h after oral administration. A positive impact on the bioavailability of acetaminophen in coated capsules was attested. In conclusion, this work, developed with a rigorous pharmaceutical technology, presents a tool adapted for duodenum-specific delivery of new formulations in rats.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

The oral route remains the most considered way to administer drugs, which can either act locally in the gastro-intestinal (GI) tract or be absorbed at the level of the intestine. However, in some cases the oral drug administration is problematic: for instance when the drug lacks stability in gastric fluid, when it causes irritations of the GI tract or when it has to be targeted at a specific site. Because there are pH variations all along the GI tract, such problems can be solved by incorporating drugs into solid oral dosage forms coated with pH sensitive enteric polymers (Pinto, 2010). Commonly used polymers are polymethacrylates, e.g. Eudragit® (Corá et al., 2006; Cole et al., 2002), cellulose-based polymers, e.g. hydroxypropylmethylcellulose acetate succinate (Ghosh et al., 2011) or polyvinyl derivatives, covering a pH range dissolution from 5.5 to 7, suitable for delivery from the duodenum to the colon.

Such polymers are used by pharmaceutical industries and on a large scale in animal studies for the delivery of acid labile

formulations. Formulations are anti-inflammatory drugs specifically delivered into the colon for the treatment of inflammatory bowel disease (Krishnamachari et al., 2007), chemotherapeutic agents against colorectal cancer (Ji et al., 2009; Zambito et al., 2005), or drugs specifically delivered into the duodenum: vaccines (Uddin et al., 2009; Mercier et al., 2007) or drugs in particles, such as: insulin (Sonaje et al., 2010), immunosuppressants (Dai et al., 2004), enzymes for enzyme replacement therapy for pancreatitis (Naikwade et al., 2009). This non-exhaustive list of applications shows a broad applicability of gastroresistant and specific drug delivery systems for the assessment of new pharmaceutical formulations during a pre-clinical validation in animal models.

Rats are the most widely used and best validated small animal model for basic studies on bioavailability, pharmacokinetics and pharmacodynamics. In this way, publications report gastroresistant capsules filled with freeze-dried compounds and adapted to rats (Saphier et al., 2010; Sonaje et al., 2010; Kremser et al., 2008). Such capsules have several advantages. First, the solid form increases the amount of intact molecules delivered to a specific site of the intestine, and consequently increases the bioavailability. Secondly, the coating process of capsules is independent of the capsule content (Cole et al., 2002). In humans, the formulation of enteric-coated capsules is well defined according to good manufacturing practices for pharmaceutical products. However, in the rat, all previously quoted studies reported capsules formulation in a

* Corresponding author. Current address: Centre Européen d'Etude du Diabète, Bd René Leriche, 67200 Strasbourg, France. Tel.: +33 90 20 10 30; fax: +33 90 20 12 19.

E-mail addresses: nathalie.reix@chru-strasbourg.fr (N. Reix), p.guhmann@ceed-diabete.org (P. Guhmann), w.bietiger@ceed-diabete.org (W. Bietiger), michel.pinget@chru-strasbourg.fr (M. Pinget), Nathalie.JEANDIDIER@chru-strasbourg.fr (N. Jeandidier), ssigrist@ceed-diabete.org (S. Sigrist).

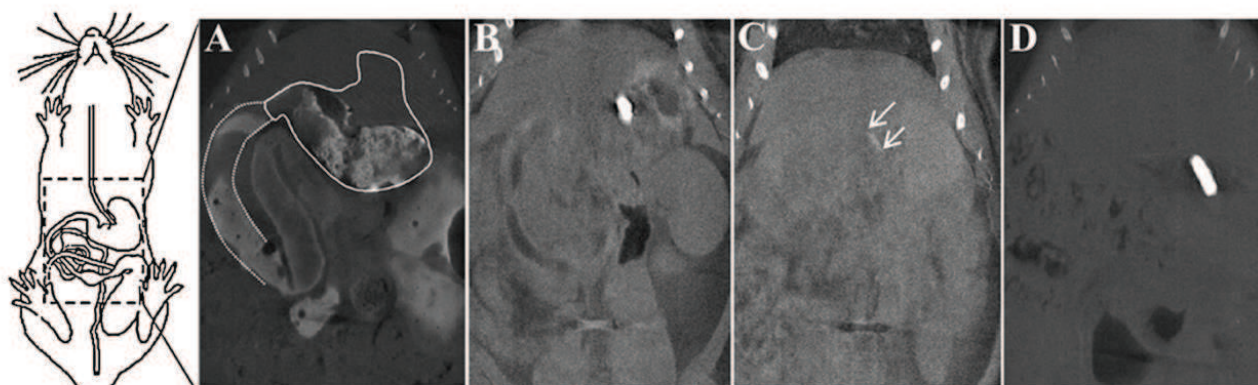


Fig. 1. Micro-computerized tomography (μ CT) visualizations of capsules in rats. (A) Contrast of the stomach and the beginning of the intestine with a solution of BaSO_4 orally administered. Mid coronal sections showing the kinetic of disintegration of an uncoated capsule within the rat stomach 15 min (B) and 1 h (C) after oral administration. (D) Visualization of a coated capsule still intact in the stomach 5 h after administration.

small-scale which did not respond to these criteria. The innovative aspect of our work was to develop and evaluate a pharmaceutical enteric coating process based on a transposition of an industrial technology to small-sized capsules required for rats. The aim was to obtain in a large-scale, reliable, reproducible capsules with commonly used material and moieties for manufacturing with respect to good manufacturing practices for pharmaceutical products, to offer a safe and standardized tool adapted for pre-clinical trials in rats. This development was led in association with Capsugel (Capsugel Division of Pfizer Inc., Colmar, France) which optimized and developed an enteric-coated capsules model. We then evaluated this model *in vivo* in rats.

Capsules were PCcapsTM size 9 (Capsugel), 700 g of capsules were coated with a ready-to-use enteric formula based on Eudragit[®] L 100-55 (Acryl-Eze[®], Colorcon, UK) designed to achieve enteric properties, as it dissolves at pH 5.5 in the duodenum. A homogeneous aqueous dispersion of Acryl-Eze[®] was used for the capsules coating in a fluid bed apparatus equipped with a wurster and a bottom spray nozzle. The coating layer weight was between 6.5 and 7 mg/mm². The reproducibility of the coating method, the coating layer uniformity and thickness, the external capsules integrity and their enteric properties after *in vitro* dissolution in simulated gastric and intestinal media (pH 6.8) were evaluated and validated by Capsugel. Capsugel verified that the capsules coated with Acryl-Eze complied with the European Pharmacopoeia requirements for enteric-coated formulation (less than 10% dissolved in 2 h in simulated gastric medium and not less than 80% dissolved at 45 min in simulated intestinal medium).

The gastroresistance of PCcapsTM was tested *in vivo* to identify the delay and the location of the disintegration site by using micro-computerized tomography (μ CT) and a pharmacokinetic study. Animal studies were performed in accordance with the guidelines of the local authorities and French laws. Male Wistar rats weighing 250 ± 50 g were purchased from Depré (Saint-Doulchard, France), housed under a 12 h light, 12 h dark cycle and fed with a standard laboratory rodent diet (Safe, Augy, France). The oral administration of capsules was performed using a delivery device provided with the capsules.

μ CT imaging was performed with PCcapsTM filled with barium chloride (Sigma-Aldrich, 22 mg/capsule) and coated using conditions described above. To enable a good distinction of the stomach and the intestine, two rats were injected intraperitoneally with 1 mL of iodine (Iomeron[®] 350, BYK, Le Mée sur Seine, France) to contrast the intestine and force-fed with 700 μ L of BaSO_4 (Micropaque[®], Guerbet, Roissy CdG, France) to contrast the

stomach (Fig. 1A). Two groups of rats received coated ($n=12$) or uncoated capsules ($n=6$) of barium chloride. In order to have an early duodenal drug delivery, we tried to limit the gastric retention time. As GI motility can be activated when a meal is ingested, rats were fasted for 14 h with water *ad libitum* before capsules administration, and were refed thereafter. Acquisitions were done 0.25, 1, 2, 3 and 5 h after force-feeding. Imaging was performed by using an X-ray μ CT scanner constructed at the DRS/IPHC, Strasbourg, France. The X-ray tube was operated at 40 kV, 250 μ A and produced 768 views over 360°. Visualization and analysis were performed using Anatomist/BrainVISA software (<http://brainvisa.info>).

Fig. 1B shows that the disintegration of uncoated capsules occurred after 15 min and was complete in less than 1 h, as we can see a clear decrease of the contrast and the size of the mass of barium chloride (Fig. 1C). Enteric capsules were still intact after 5 h in gastric environment (Fig. 1D). The μ CT experiments in rats confirmed the gastroresistance property of the coated capsules until at least 5 h. However, we did not observe the gastric emptying of the capsules. This result was not quite expected because the size of the capsules is adapted to rats, as there is no physical hindrance with the anatomy of the pylorus. We believe that the perturbation of the transit was due to the stress of the experiment. Stress, although difficult to quantify, is also known to slow down GI motility and subsequently delay the gastric emptying (Enck et al., 1989).

To investigate by another way the delay of disintegration of Eudragit[®] L 100-55 coated capsules, a pharmacokinetic study with acetaminophen as drug marker was done. Capsules were filled with 5 mg of acetaminophen (Sigma) and 11 mg of lactose (Meggle). Rats were fasted for 8 h prior to the experiment, and the *per os* administration of a coated ($n=5$) or uncoated ($n=7$) acetaminophen capsule before refeeding was done at the beginning of the dark period. As rats are known to be nocturnal animals, they eat mainly during this period and are more active, which facilitates the gastric emptying. Blood samples were withdrawn in the left carotid *via* a polyethylene tube to the following time schedule: 0 (pre-dose), 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 and 4 h post-dose. Concentrations of acetaminophen in the serum were determined by ELISA assay (Immunoanalysis Corp., Pomona, CA).

Mean plasma concentration curves of acetaminophen are shown in Fig. 2A and corresponding pharmacokinetic parameters in Table 1. The acetaminophen uncoated capsule T_{max} occurred rapidly at 18 ± 6 min post-dose and was delayed at 114 ± 12 min in rats which received a coated capsule. At this time, as shown by the μ CT experiments, there was no apparent leak of the capsules in the stomach which were still intact. Therefore, they were likely

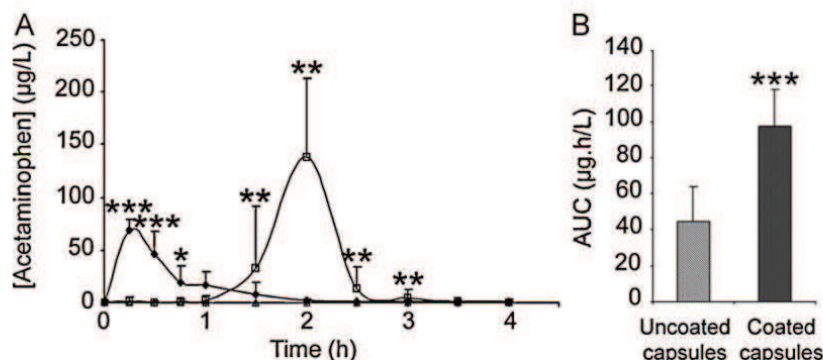


Fig. 2. (A) Mean (\pm sd) plasma acetaminophen concentrations following per os administration of empty capsules (open triangles, $n=4$), acetaminophen-filled uncoated (lozenges, $n=7$) or coated capsules (open squares, $n=5$). (B) Area under the curves (AUC) up to 4 h (Student's T -test * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$).

Table 1

Summary of pharmacokinetic parameters for acetaminophen uncoated and coated capsules in rats following oral administration.

Pharmacokinetic parameters	Acetaminophen capsules		Statistical significance
	Uncoated	Coated	
PCcaps	Uncoated	Coated	
Dose (mg)	5	5	
T_{max} (h)	0.3 ± 0.1	1.9 ± 0.2	$p=0.003$
C_{max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	65 ± 15	163 ± 25	$p<0.001$
AUC ($\mu\text{g h}/\text{mL}$)	44 ± 20	97 ± 20	$p=0.001$

to be disintegrated in the early duodenum. The mean C_{max} value of acetaminophen was 2.5 higher in the coated capsules group than in the uncoated capsules group and the difference between the $AUC_{0 \rightarrow 4h}$ of uncoated and coated capsules groups was statistically significant (Fig. 2B, $p<0.001$). The bioavailability of acetaminophen administered in coated capsules was about 220% compared to acetaminophen administered in uncoated capsules, suggesting an impact of enteric capsules on the rate of drug absorption and an effective gastric protection.

In conclusion, this work, developed with a rigorous pharmaceutical technology, presents a tool adapted for duodenum-specific drug delivery of new formulations in rats. The large-scale production is an undeniable advantage for the screening of new compounds in pre-clinical trials.

Furthermore, the methods used in the present work offer a wide range of possibilities for the development and the assessment of capsules coated with various enteric polymers specific to the distal part of the intestine or the colon for example.

Acknowledgments

This work was supported by Alsace BioValley and by grants from Fonds Unique Interministériel (FUI), Région Alsace and Conseil Général du Haut-Rhin. Authors would like to thank Mr Dominique Cadé from Capsugel for this collaboration and for helpful discussions.

References

Cole, E.T., Scott, R.A., Connor, A.L., Wilding, I.R., Peterleit, H.U., Schminke, C., Beckert, T., Cadé, D., 2002. Enteric coated HPMC capsules designed to achieve intestinal targeting. *Int. J. Pharm.* 231, 83–95.
 Corá, L.A., Romeiro, F.G., Paixão, F.C., Américo, M.F., Oliveira, R.B., Baffá, O., Miranda, J.R.A., 2006. Enteric coated magnetic HPMC capsules evaluated

in human gastrointestinal tract by AC biosusceptometry. *Pharm. Res.* 23, 1809–1816.
 Dai, J., Nagai, T., Wang, X., Zhang, T., Meng, M., Zhang, Q., 2004. pH-sensitive nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporine A. *Int. J. Pharm.* 6, 229–240.
 Enck, P., Merlin, V., Erckenbrecht, J.F., Wienbeck, M., 1989. Stress effects on gastrointestinal transit in the rat. *Gut* 30, 455–459.
 Ghosh, I., Snyder, J., Vippagunta, R., Alvine, M., Vakil, R., Tong, W.Q., Vippagunta, S., 2011. Comparison of HPMC based polymers performance as carriers for manufacture of solid dispersions using the melt extruder. *Int. J. Pharm.* 419, 12–19.
 Ji, C.M., Xu, H.N., Wu, W., 2009. Guar gum as potential film coating material for colon-specific delivery of fluorouracil. *J. Biomater. Appl.* 23, 311–329.
 Kremser, C., Albrecht, K., Greindl, M., Wolf, C., Debbage, P., Bernkop-Schnürch, A., 2008. In vivo determination of the time and location of mucoadhesive drug delivery systems disintegration in the gastrointestinal tract. *Magn. Reson. Imaging* 26, 638–643.
 Krishnamachari, Y., Madan, P., Lin, S., 2007. Development of pH- and time-dependent oral microparticles to optimize budesonide delivery to ileum and colon. *Int. J. Pharm.* 338, 238–247.
 Mercier, G.T., Nehete, P.N., Passeri, M.F., Nehete, B.N., Weaver, E.A., Templeton, N.S., Schluns, K., Buchl, S.S., Sastry, K.J., Barry, M.A., 2007. Oral immunization of rhesus macaques with adenoviral HIV vaccines using enteric-coated capsules. *Vaccine* 25, 8687–8701.
 Naikwade, S.R., Meshram, R.N., Bajaj, A.N., 2009. Preparation and in vivo efficacy study of pancreatin microparticles as an enzyme replacement therapy for pancreatitis. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 35, 417–432.
 Pinto, J.F., 2010. Site-specific drug delivery systems within the gastro-intestinal tract: from the mouth to the colon. *Int. J. Pharm.* 395, 44–52.
 Saphier, S., Rosner, A., Brandeis, R., Karton, Y., 2010. Gastro intestinal tracking and gastric emptying of solid dosage forms in rats using X-ray imaging. *Int. J. Pharm.* 388, 190–195.
 Sonaje, K., Chen, Y.J., Chen, H.L., Wey, S.P., Juang, J.H., Nguyen, H.N., Hsu, C.W., Lin, K.J., Sung, H.W., 2010. Enteric-coated capsules filled with freeze-dried chitosan/poly(g-glutamic acid) nanoparticles for oral insulin delivery. *Biomaterials* 31, 3384–3394.
 Uddin, A.N., Bejugam, N.K., Gayakwad, S.G., Akther, P., D'Souza, M.J., 2009. Oral drug delivery of gastro-resistant microencapsulated typhoid vaccine. *J. Drug Target.* 17, 553–560.
 Zambito, Y., Baggiani, A., Carelli, V., Serafini, M.F., Di Colo, G., 2005. Matrices for site-specific controlled-delivery of 5-fluorouracil to descending colon. *J. Control. Release* 102, 669–677.

5.1.2. Résultats complémentaires : évaluation de la gastrorésistance de la gélule par mesure de la délivrance de l'ibuprofène

Les travaux présentés dans cette publication ont permis de valider la gastrorésistance des gélules entériques. La comparaison des AUC lors de l'évaluation de la délivrance de l'acétaminophène a notamment montré une diminution significative de la biodisponibilité de ce principe actif entre les gélules non enrobées et celles enrobées d'Eudragit® L 100-55. Ces données semblent bien ainsi confirmer la gastrorésistance des gélules enrobées. Cependant, la biodisponibilité de l'acétaminophène obtenue dans le cas des gélules non enrobées s'est révélée relativement faible ; ceci peut s'expliquer par la faible stabilité de ce principe actif à pH acide. Ainsi, une étude de délivrance à l'aide d'un principe actif résistant à pH acide doit être réalisée, afin de consolider notre hypothèse. Pour cela, nous avons choisi l'ibuprofène, principe actif stable en milieu gastrique.

Une étude cinétique de la délivrance de l'ibuprofène chez des rats gavés avec des gélules non enrobées ou enrobées d'Eudragit® L 100-55 a donc été réalisée, afin de compléter les données obtenues avec l'acétaminophène (Fig. 5-1).

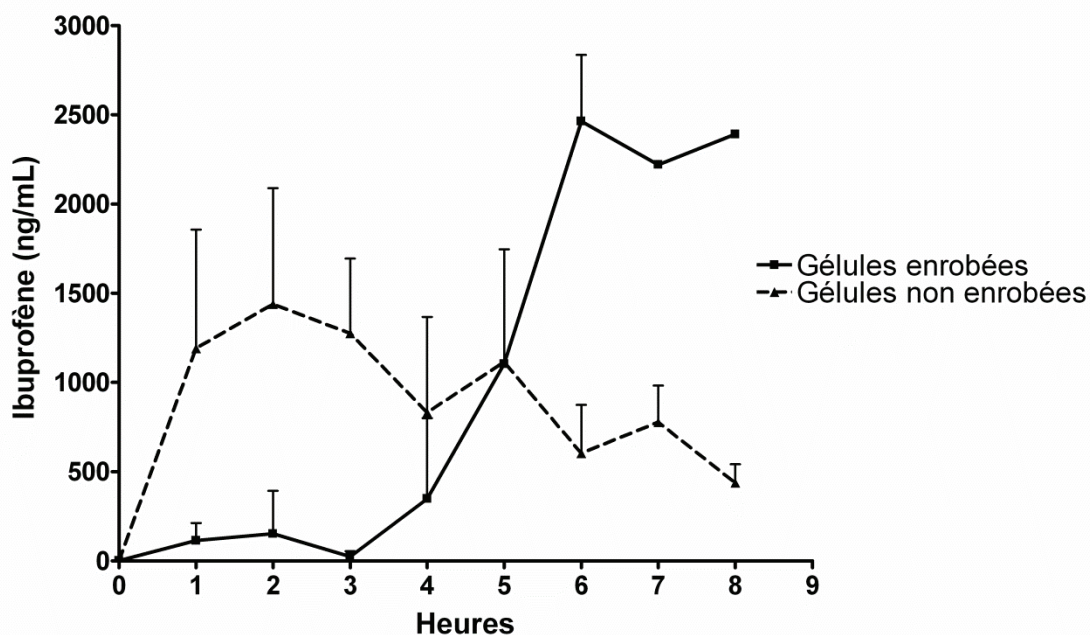


Figure 5-1 : Graphique représentant les cinétiques de délivrance de l'ibuprofène chez le rat après gavage avec des gélules enrobées et non enrobées (Gélules enrobées n=3, Gélules non enrobées n=3)

La concentration plasmatique de l'ibuprofène dans le cas des gélules non enrobées est augmentée dès 1 h, et atteint un plateau à $1439 \pm 649,5$ ng/mL à 2h. Cette concentration diminue ensuite pour atteindre $438 \pm 104,4$ ng/mL à 8h.

Le groupe de rats ayant reçu une gélule enrobée montre une libération de l'ibuprofène plus tardive que celui des gélules non enrobées, avec une différence de 4h entre les plateaux. Le plateau de ce groupe est en effet atteint à 6h, avec une concentration en ibuprofène toutefois égale à 2464 ± 371 ng/mL, i.e. 1,7 fois plus élevée que dans le cas des gélules non enrobées. A 8h, la concentration en ibuprofène reste maximale. La biodisponibilité relative pour cette condition est de $78,35 \pm 39,5$ % bien que ce chiffre reste discutable étant donné que la concentration sanguine en ibuprofène n'est pas nulle à la fin de l'étude pour les deux conditions testées.

5.1.3. Discussion

Les études de biodisponibilité des principes actifs dans les gélules enrobées d'Eudragit® L 100-55 ont démontré la gastrorésistance et l'entérosolubilité de ces gélules. Les expériences réalisées avec l'acétaminophène ont montré que le principe actif était libéré plus tardivement par les gélules enrobées que par les gélules non enrobées. En effet, avec les gélules non enrobées, le principe actif est libéré dans l'estomac alors qu'il n'est libéré que dans le duodénum avec les gélules entériques (Cole *et al.*, 2002).

La gastrorésistance des gélules enrobées a été confirmée visuellement par tomodynamométrie. En effet, les gélules enrobées étaient toujours visibles dans l'estomac 5h après leur administration. Cependant, l'entérosolubilité des gélules dans l'intestin n'a pas pu être observée. Ceci est lié à la limite de la technique de tomodynamométrie, qui dans nos conditions expérimentales, oblige une anesthésie et un stress de l'animal qui diminuerait la vidange gastrique (Enck *et al.*, 1989).

Le dosage de l'acétaminophène a montré que bien que la concentration maximale en acétaminophène soit similaire dans les deux cas, la biodisponibilité est significativement augmentée pour les gélules enrobées. Ces résultats s'expliquent par la dégradation de l'acétaminophène à pH acide. En effet, l'acétaminophène est stable à pH compris entre 4 et 7 (Shaw *et al.*, 2005). Or, lors de sa libération dans l'estomac, son exposition à un pH acide entraîne sa dégradation. Dans les gélules entériques, l'acétaminophène n'est exposé que dans

l'intestin, lorsque la gélule est dégradée. Ainsi, l'augmentation de sa biodisponibilité dans les gélules entériques serait liée à la protection du principe actif du pH acide de l'estomac. A l'opposé, l'ibuprofène, qui n'est pas soluble à pH acide (Cole *et al.*, 2002) n'est pas dégradé dans l'estomac. Lors de l'étude de la biodisponibilité de l'ibuprofène dans les mêmes conditions expérimentales, nous n'avons pas observé de différence de biodisponibilité entre les gélules enrobées et non enrobées. Cependant, ces résultats doivent être nuancés par la durée de l'étude qui n'a pas permis, malgré un suivi de 8h, de revenir à des niveaux d'ibuprofène sanguins nuls dans les deux conditions testées. Un suivi plus long serait donc nécessaire.

Le projet ORAIL repose sur le principe de la double encapsulation de l'insuline. La gélule représente la première encapsulation, permettant de protéger les NPs de l'environnement gastrique. Les résultats obtenus sur l'évaluation de la gastrorésistance de la gélule ont montré la gastrorésistance, mais aussi l'entérosolubilité de la gélule et ont donc permis de valider le cahier des charges.

La deuxième partie du projet de thèse concerne la deuxième encapsulation, ceci grâce à la synthèse de NPs creuses contenant de l'insuline. Les études suivantes seront uniquement focalisées sur cette partie, et devraient, dans un premier temps, préciser l'efficacité d'internalisation des NPs en absence de toute toxicité dans des modèles *in vitro* de barrière intestinale. Dans un deuxième temps, nos travaux de recherche se focaliseront sur l'étude des modalités d'internalisation de ces NPs, et sur leur efficacité *in vivo* chez le rat diabétique.

5.2. Evaluation *in vitro* de l'internalisation et de la sécurité des nanoparticules

La deuxième partie de la thèse avait pour objectif de synthétiser des NPs de taille variable, et d'évaluer l'internalisation et la sécurité de ces NPs dans des modèles *in vitro* de barrière intestinale, un modèle de mono-culture de cellules Caco-2 et un modèle de co-culture Caco-2/Rev. Les résultats de ces travaux sont présentés ci-après. Nous aborderons tout d'abord le développement des outils nécessaires à ces travaux, i.e. les NPs et les modèles cellulaires, puis nous exposerons les données obtenues lors des études d'internalisation et de sécurité.

5.2.1. Développement des outils : nanoparticules et modèles cellulaires

5.2.1.1. Développement des nanoparticules d'insuline

5.2.1.1.1. Caractérisation des NPs par diffusion dynamique de la lumière

Les NPs d'insuline-FITC, synthétisées suivant différents protocoles afin d'obtenir des particules de taille croissante, ont été systématiquement caractérisées avant chaque étude. Des mesures ont été réalisées par diffusion dynamique de la lumière afin de déterminer leur taille, l'indice de polydispersité et leur potentiel zêta (**Tableau 5-1**).

NPs	Taille (nm)		Indice de Polydispersité		Potentiel zêta (mV)	
	Moyenne	SEM	Moyenne	SEM	Moyenne	SEM
100	134,13	4,12	0,107	0,006	-5,99	0,119
200	177,30	2,56	0,102	0,005	-4,35	0,281
300	285,83	7,02	0,133	0,007	-2,08	0,149
400	382,54	6,49	0,159	0,012	-1,50	0,065
500	490,08	15,80	0,230	0,014	-1,20	0,052
600	604,87	12,47	0,249	0,011	-1,14	0,056
700	713,00	14,81	0,300	0,011	-1,20	0,024
800	810,27	21,64	0,269	0,050	-1,22	0,090

Tableau 5-1 : Tableau récapitulatif des tailles, indices de polydispersité et potentiel zêta des différentes NPs synthétisées
(NPs 100 nm n=3, NPs 200 nm n=3, NPs 300 nm n=8, NPs 400 nm n=5, NPs 500 nm n=6, NPs 600 nm n=7, NPs 700 nm n=3, NPs 800 nm n=3)

Le **tableau 5-1** présente les caractéristiques des différentes NPs synthétisées et sélectionnées pour les études *in vitro* et *in vivo*. Les NPs y sont désignées en fonction de leur taille moyenne attendue, i.e. NPs 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 et 800. Les NPs sélectionnées pour les différentes études avaient donc la taille souhaitée à $\pm 10\%$. Par exemple, pour les NPs de 200 nm, la taille de ces particules allait de 180 à 220 nm.

Les indices de polydispersité (Pdl) ont aussi été mesurés, et seules les préparations de NPs pour lesquelles les valeurs de ces indices étaient inférieures ou égales à 0,300 ont été conservées. En effet, cet indice est le reflet de l'homogénéité en taille de la population de NPs. Il est admis qu'une population peut être considérée comme homogène jusqu'à un indice

de polydispersité de 0,300. Au-delà, la population est considérée comme hétérogène. On peut observer que les PDI sont faibles pour les NPs de petite taille, comme celles de 100 nm qui ont un PDI de 0,107, alors que les NPs de grande taille, comme les NPs de 700 nm, ont un PDI de 0,300. Ces résultats sont cohérents et directement liés à la taille des NPs synthétisées.

La mesure de la taille des NPs peut être représentée sous la forme d'un graphique donnant l'intensité du signal en fonction de la taille (Fig. 5-2, 5-3, 5-4, 5-5). Cette représentation permet de visualiser le nombre de populations de particules.

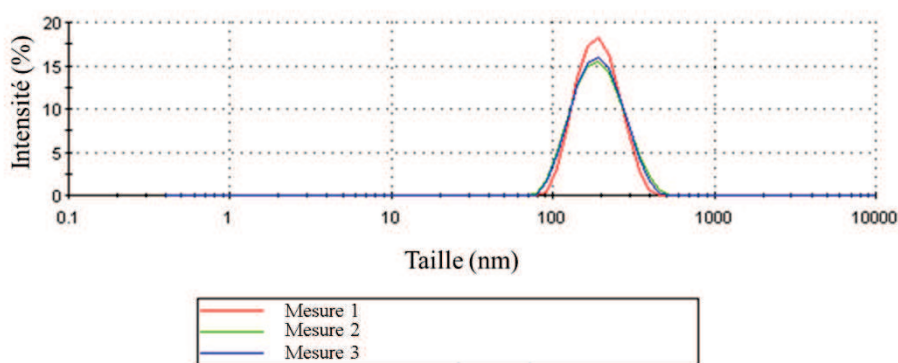


Figure 5-2 : Profil de distribution de l'intensité en fonction de la taille des NPs de 200 nm

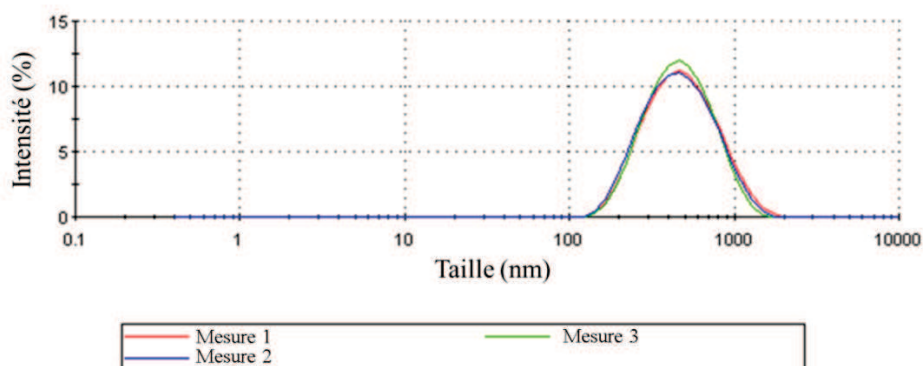


Figure 5-3 : Profil de distribution de l'intensité en fonction de la taille des NPs de 400 nm

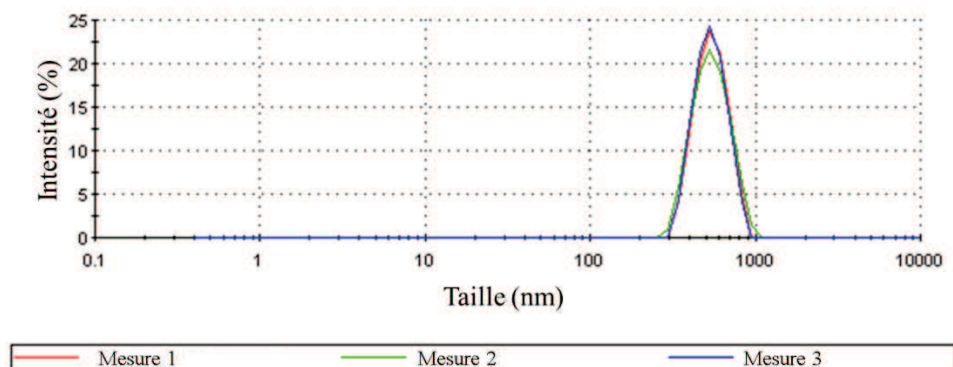


Figure 5-4 : Profil de distribution de l'intensité en fonction de la taille des NPs de 600 nm

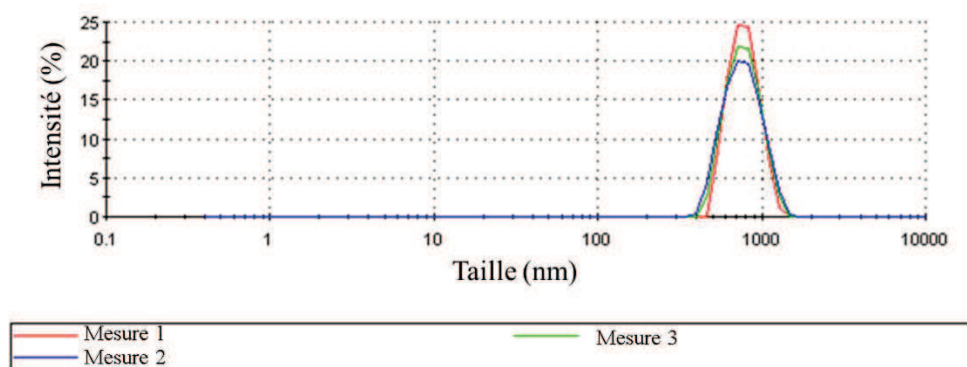


Figure 5-5 : Profil de distribution de l'intensité en fonction de la taille des NPs de 800 nm

Ces profils en intensité ont montré un seul pic, et donc la présence, dans nos préparations, d'une seule population de particules, quelle que soit la taille ciblée. Les trois mesures effectuées sur chaque préparation ont montré une bonne reproductibilité des mesures et des tailles obtenues.

Le potentiel zêta renseigne sur la charge globale de surface des NPs. Les résultats de ces mesures ont montré que toutes les NPs synthétisées sont anioniques. La différence de valeur de charge entre les NPs de 600 nm ($-1,14 \pm 0,056$ mV) et les NPs de 100 nm ($-5,99 \pm 0,119$ mV) peut être considérée comme négligeable.

5.2.1.1.2. Observation des NPs au microscope électronique en transmission

Les synthèses de NPs ont été observées en microscopie électronique en transmission (MET), afin de compléter la caractérisation des NPs. Ces observations ont concerné des NPs de taille allant de 100 à 800 nm (Fig. 5-6).

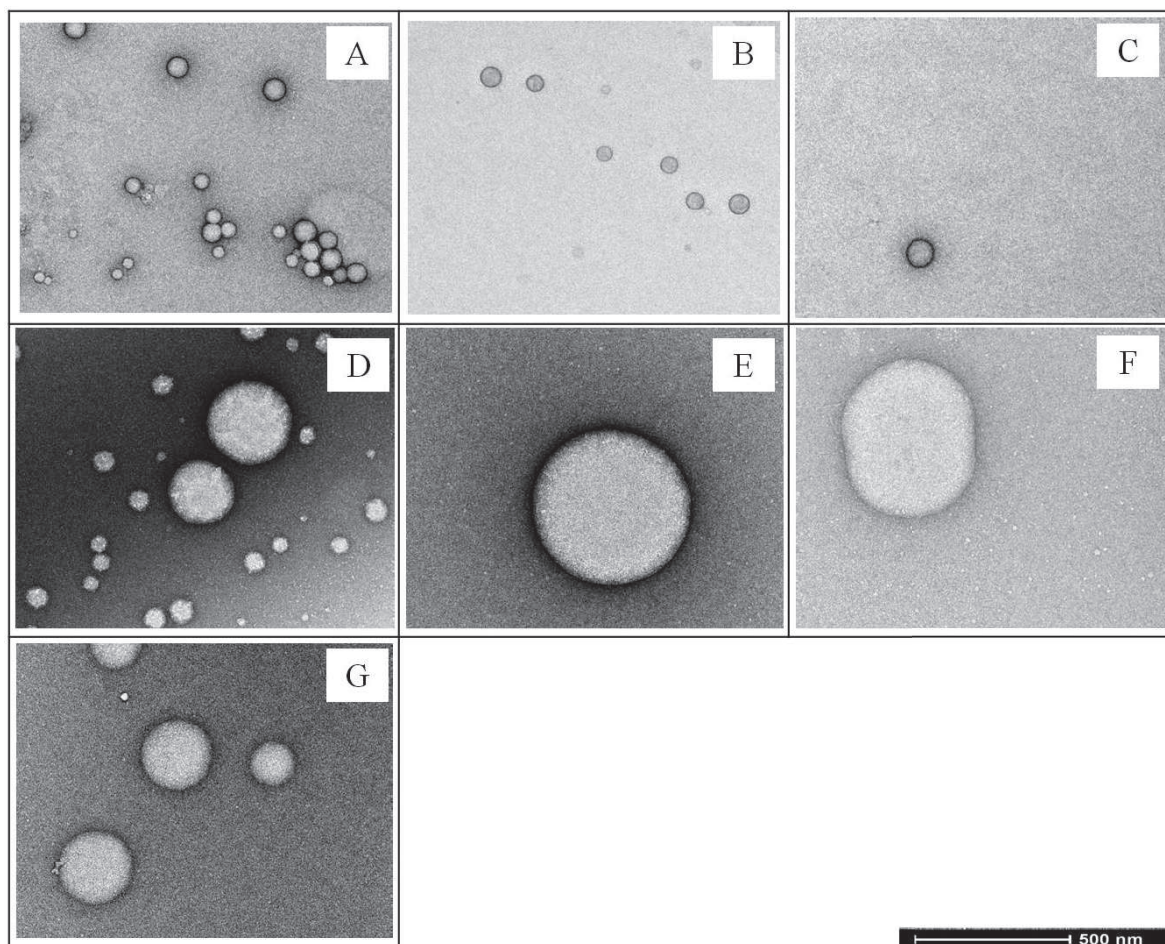


Figure 5-6 : Observation des NPs de différentes tailles en microscopie électronique en transmission (A : 100 nm ; B : 200 nm ; C : 300 nm ; D : 400 nm ; E : 500 nm ; F : 600 nm ; G : 800 nm, Grossissement X 19 000)

La visualisation des NPs a montré que les synthèses permettent l'obtention de particules sphériques, homogènes et ne formant pas d'agrégats. Les NPs ne semblent pas être altérées, bien que l'étape de séchage de la grille sur laquelle elles ont été déposées, modifie leur taille.

5.2.1.1.3. Détermination du rendement d'encapsulation de l'insuline

Le rendement d'encapsulation est un paramètre important dans la caractérisation des NPs. Ce rendement a été déterminé, après dosage de l'insuline par spectrophotométrie UV (220 nm), dans le cas de NPs de 200 nm brutes et purifiées contenant de l'insuline Insuman[®] (**Fig. 5-7**).

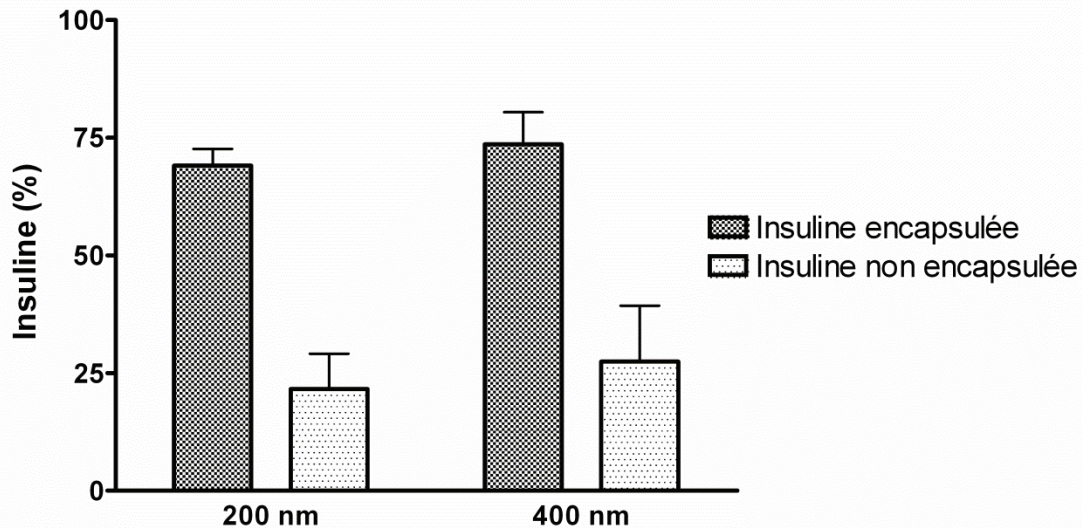


Figure 5-7 : Détermination du rendement d'encapsulation des NPs de 200 et 400 nm (n=3)

Le dosage de l'Insuman[®] dans les NPs de 200 nm a montré un rendement d'encapsulation de $69,1 \pm 3,5$ %, l'insuline non encapsulée représentant $21,6 \pm 7,5$ %.

Pour les NPs de 400 nm, l'insuline non encapsulée représentait $27,4 \pm 11,9$ % de la valeur théorique attendue, et l'insuline encapsulée $73,6 \pm 6,8$ %.

5.2.1.2. Mise en place du modèle de co-culture Caco-2 / Rev

L'efficacité et la sécurité des NPs *in vitro* sont étroitement liées au modèle cellulaire utilisé. Le choix de ce modèle cellulaire est alors essentiel et nécessite une étude à part entière.

La monoculture de cellules Caco-2, cellules au phénotype entérocytaire, est largement utilisée pour étudier et prédire l'absorption orale des principes actifs médicamenteux, mais ce modèle ne sécrétant pas de mucus ne reflète pas totalement la structure intestinale. La co-culture des cellules Caco-2 avec des cellules Rev, cellules caliciformes sécrétant du mucus, a alors une place de choix dans les études d'absorption orale, par la présence apicale d'une couche de mucus modifiant les paramètres d'absorption, et par l'obtention d'un modèle plus représentatif de la physiologie intestinale.

La mise en place du modèle de co-culture repose alors sur le choix des proportions de chaque lignée à utiliser, afin de mimer au mieux la physiologie intestinale *in vivo*. Les proportions suivantes ont alors été évaluées: 100 % Caco-2 ; 90 % Caco-2 / 10 % Rev (appelé 90/10) ; 75 % Caco-2 / 25 % Rev (appelé 75/25) et 100 % Rev. Ces différentes cultures et co-cultures ont été caractérisées par l'évaluation de leur résistance trans-épithéliale et de leur capacité à produire du mucus.

5.2.1.2.1. Evaluation de la résistance électrique trans-épithéliale

Les différents mélanges de cellules ont étéensemencés sur des inserts poreux, et la résistance électrique trans-épithéliale (TEER) des différentes cultures a été mesurée durant les 23 jours de culture après l'ensemencement (Fig. 5-8).

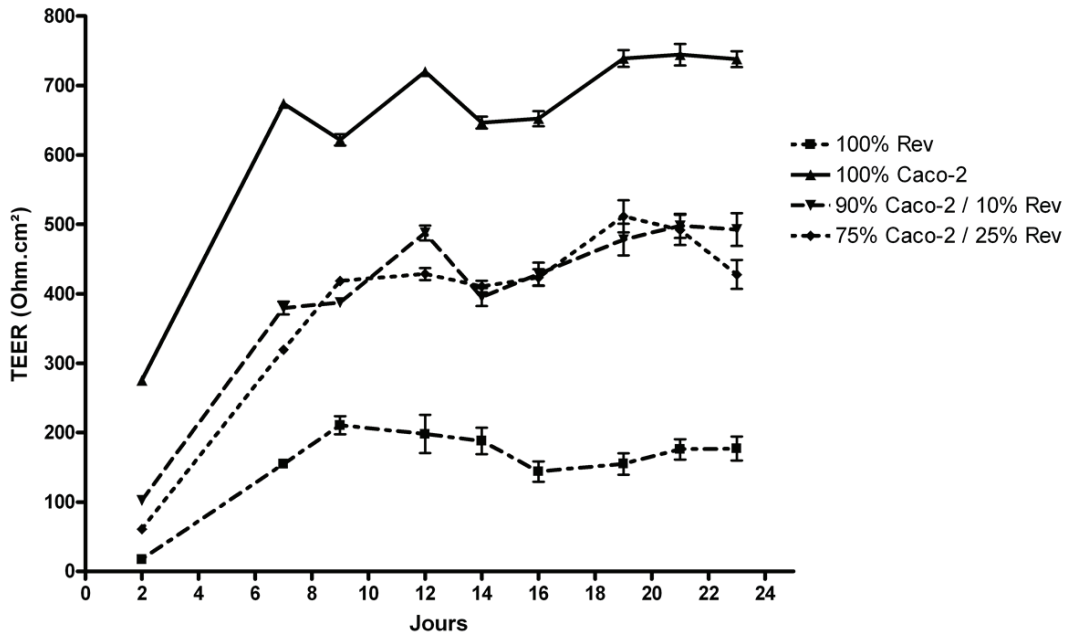


Figure 5-8 : Evolution de la résistance électrique trans-épithéliale des différentes cultures en fonction du temps après ensemencement (100 % Rev n= 5, 100 % Caco-2 n=4, 90/10 n=5, 75/25 n=4)

Deux jours après ensemencement des cellules, les valeurs de TEER étaient de $17,4 \pm 1,36$ Ohm.cm² pour la monoculture de cellules Rev, de $275,3 \pm 5,36$ Ohm.cm² pour la monoculture de cellules Caco-2, de $102,2 \pm 5,67$ Ohm.cm² pour la co-culture 90/10, et enfin de $61,0 \pm 4,916$ Ohm.cm² pour la co-culture 75/25. Par la suite, les valeurs de TEER augmentaient avec le temps de culture, et se stabilisaient pour les 4 cultures testées au jour 21. Les valeurs de TEER étaient alors de $175,8 \pm 14,73$ Ohm.cm² pour la monoculture de cellules Rev et de $744,44 \pm 15,5$ Ohm.cm² pour la monoculture de cellules Caco-2. Des valeurs intermédiaires et relativement équivalentes étaient obtenues pour les co-cultures, avec $498 \pm 17,52$ Ohm.cm² pour le mélange 90/10 et $492 \pm 21,7$ Ohm.cm² pour le mélange 75/25.

5.2.1.2.2. Evaluation de la production de mucus

Les mesures de TEER ont montré que les différentes monocultures et co-cultures étaient intègres, mais n'a pas permis de distinguer les deux co-cultures. La production de mucus par

les différentes cultures a donc été mise en évidence. Pour cela, des colorations au bleu alcian et l'hématoxyline ont été réalisées (Fig. 5-9).

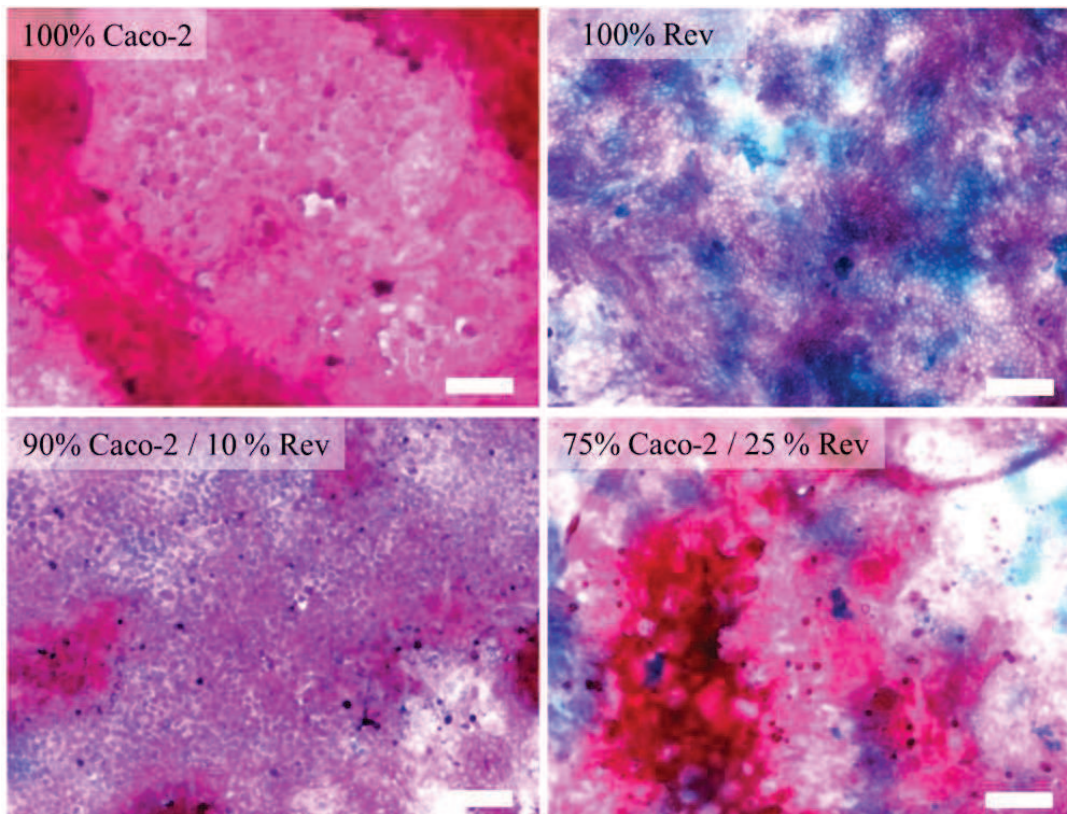


Figure 5-9 : Photographie en microscopie optique des différentes cultures après coloration au bleu alcian et à l'hématoxyline
(La barre blanche représente l'échelle de 100 μm)

Les colorations ont révélé l'absence de mucus dans la monoculture de cellules Caco-2, comme attendu. L'observation de la monoculture de cellules Rev a, quant à elle, montré la présence d'un mucus abondant, comme escompté. Une légère coloration bleue attestant de la présence de mucus a été mise en évidence dans la co-culture 90/10, et une coloration bleue plus intense, reflétant une production plus abondante, a été observée dans la co-culture 75/25. Pour ces raisons, le mélange 75% de cellules Caco-2 et 25 % de cellules Rev a été utilisé pour dans nos études *in vitro* en comparaison de la monoculture de cellules Caco-2.

5.2.1.3. Discussion

Les procédés de synthèse utilisés ont permis d'obtenir des NPs présentant les caractéristiques de taille souhaitées. Les résultats obtenus lors de la caractérisation des synthèses de NPs ont par ailleurs montré que les NPs obtenues formaient des populations homogènes. Si les différentes NPs obtenues sont de taille variable, la charge

de surface est, pour toutes les synthèses, anionique. Ces résultats nous ont permis indirectement de valider les méthodes de synthèse utilisées.

Les résultats obtenus sont conformes à ceux référencés dans la littérature, concernant les NPs de PLGA. La modification des paramètres d'agitation font varier les tailles des NPs obtenues, et garantie généralement l'obtention de population homogènes de NPs sphériques. De Rosa *et al.* (2000) ont synthétisé des microparticules de PLGA contenant de l'insuline, à l'aide de différents surfactants, par la méthode de double émulsion suivie d'une évaporation du solvant. Les particules obtenues avaient une taille comprise entre 7 et 17 μm , et étaient visualisables en microscopie électronique à balayage. Elles étaient sphériques avec une surface lisse. Liu *et al.* (2007) ont également caractérisé leur NPs de PLGA contenant de l'insuline, en fonction de différents tensio-actifs utilisés dans leur double émulsion suivie d'une évaporation. Les NPs, caractérisées par diffusion dynamique de la lumière, présentaient une taille comprise entre 360 et 740 nm, et étaient également sphériques et très homogènes. Yang *et al.* (2012) ont aussi synthétisé des NPs d'insuline, par la méthode de double émulsion, et ont obtenu des tailles de 240 nm. Les NPs formaient une population homogène, mais formant des agrégats. Zhang *et al.* (2012) ont préparés des NPs, par une méthode identique à la nôtre, et ont obtenu des NPs de 120 nm avec le même potentiel zêta (environ -2 mV).

Nous avons observé nos NPs par microscopie électronique en transmission. **Ces travaux ont montré que les NPs synthétisées étaient de forme sphérique, et ne formaient que très peu d'agrégats.** Cependant, les tailles des NPs observées en MET semblaient plus petites celles obtenues en diffusion dynamique de lumière. Ceci pourrait s'expliquer par le séchage des grilles de MET après dépôt des NPs, qui peut engendrer une évaporation de l'eau et des solvants contenus dans les NPs, et donc une diminution de la taille des NPs. En effet, par diffusion dynamique de la lumière, on mesure le diamètre hydrodynamique moyen des NPs, comprenant la particule elle-même, mais aussi une épaisseur variable de molécules adsorbées en surface (polymère, surfactant, etc.) et une épaisseur de contre-ions en mouvement autour de la NPs. Cette composante autour de la particule en suspension, qui contribue au diamètre hydrodynamique, ne peut pas être visualisée en MET (Lin et Haynes, 2009).

La taille et la morphologie sont des renseignements essentiels dans le développement des NPs. Cependant, le rendement d'encapsulation est aussi un paramètre important, déterminant dans un premier temps les doses qui pourront être mises en présence de cellules en culture ou administrées à des animaux lors d'évaluations biologiques. **La détermination du rendement**

d'encapsulation par dosage de l'insuline par spectrophotométrie UV a montré que les NPs d'Insuman[®], quelle que soit leur taille (200 ou 400), ont un rendement d'encapsulation d'environ 70%. Ce rendement d'encapsulation est relativement correct.

La technique de dosage de l'insuline par spectrophotométrie UV reste une approche « qualitative » du rendement d'encapsulation. La pharmacopée européenne préconise l'utilisation de méthodes plus sensibles telles que la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) qui renseigne également sur la conservation de la structure de l'insuline et la génération d'impuretés. Le rendement d'encapsulation peut alors se calculer par cette méthode, de manière indirecte, en dosant l'insuline dans le surnageant de la solution de synthèse, ou de manière directe en dissolvant le PLGA, afin de libérer l'insuline contenue. Des données antérieures obtenues au laboratoire sur des NPs de 200 nm par dosage de l'insuline non encapsulée par HPLC ont permis de calculer un rendement d'encapsulation de $93 \pm 1 \%$ (Reix *et al.*, 2012). Cette méthode d'HPLC doit être désormais appliquée à des NPs de 400 nm. Cependant, les résultats obtenus jusqu'à présent sont conformes au cahier des charges initial du projet, avec un excellent rendement, supérieur à 90%. En effet, même si les rendements d'encapsulation de principes actifs sont relativement élevés dans les synthèses réalisées à partir de double émulsion, certaines données de la littérature ont montré que ces rendements peuvent, dans certains cas, être faibles. Kim *et al.* (2009) ont déterminé le rendement d'encapsulation de l'insuline dans des microcapsules de PLGA par HPLC par la méthode directe, et ont obtenu un rendement de 49 %. Par la méthode indirecte et par HPLC, Fonte *et al.* (2012) ont calculé le rendement d'encapsulation de l'insuline dans des NPs de PLGA synthétisées par double émulsion et ont obtenu une valeur de $87,4 \pm 02 \%$ pour des NPs d'une taille de 446 nm.

Le rendement d'encapsulation est un paramètre important pour l'évaluation de vecteurs de principes actifs dans des systèmes biologiques. Cependant, bien qu'il soit élevé dans notre cas, il n'a d'intérêt que si la NP synthétisée est stable dans les conditions de synthèse, mais également dans les milieux biologiques. Dans l'environnement intestinal, les NPs peuvent être résistantes pendant plusieurs heures ou alors libérer rapidement leur contenu. Ce phénomène est appelé « drug release ». Le relargage massif du principe actif, lorsque les NPs ont une faible stabilité en milieu intestinal, modifiera alors les paramètres de biodisponibilité. L'étude du comportement des NPs en milieu intestinal simulé fait donc partie intégrante de leur caractérisation. Des résultats antérieurs obtenus au laboratoire ont montré un relargage massif de l'insuline marquée à partir de NPs de 200 nm en présence de milieu gastrique

simulé. Ceci confirme bien que les NPs ont besoin d'une protection au niveau gastrique, qui sera apportée par la gélule entérique. Dans un milieu intestinal simulé, le relargage de l'insuline était beaucoup plus faible, suggérant une certaine stabilité des NPs dans l'environnement intestinal (Reix *et al.*, 2012).

Dans cette partie de notre travail sur le développement des outils d'étude de notre système nanoparticulaire, nous avons pu définir des conditions nous permettant d'obtenir un modèle cellulaire de barrière intestinale intègre et capable de produire du mucus, en co-cultivant deux lignées cellulaires, une lignée de phénotype entérocytaire (Caco-2) et une lignée productrice de mucus (Rev).

Les données de TEER ont montré des différences d'intégrité entre les monocultures pures de cellules Caco-2 et de cellules Rev, la monoculture de cellules Caco-2 étant celle donnant les valeurs de TEER les plus élevées. Ceci était un résultat attendu, puisque cette lignée est généralement utilisée pour ces capacités à former des monocouches imperméables. Les co-cultures ont présenté des valeurs de TEER intermédiaires aux monocultures, suggérant une capacité des 2 lignées à s'organiser et interagir en co-culture. De plus, ces valeurs étaient similaires quel que soit le mélange, 90/10 ou 75/25. Hilgendorf *et al.* (2000) ont réalisé des études similaires, mais ont montré que les valeurs de TEER variaient en fonction des proportions des deux lignées. Elles étaient nettement plus élevées pour la co-culture 90/10 comparées à la co-culture 70/30. Ces différences pourraient s'expliquer par des différences dans le nombre de passages cellulaires, les densités d'ensemencement ou la composition du milieu de culture. Walter *et al.* (1996) ont testé d'autres ratios d'ensemencement, et ont montré que le ratio 75/25 permettait d'obtenir des valeurs de TEER supérieures à celles des ratios où la proportion de cellules Rev était plus importante, comme les ratios 50/50 et 25/75. Rocha *et al.* (2012) ont montré que l'ajout de cellules Rev dans une culture de cellules Caco-2 engendrait une diminution de la TEER. Ces résultats sont en accord avec nos données qui ont montré que le mélange de cellules Rev avec les cellules Caco-2 entraînait une diminution de la résistance par rapport à monoculture de cellules Caco-2. En ce qui concerne l'évolution de la TEER en fonction du temps de culture, nos résultats, ainsi que ceux de Hilgendorf *et al.* (2000) ont montré des augmentations de TEER dès le deuxième jour de culture. Ces différences sont dues à la mise en place progressive de la monocouche cellulaire, et aux différences structurales des jonctions serrées présentes dès les premiers jours d'ensemencement.

La coloration des différentes cultures a permis de visualiser le mucus. L'intensité de ces colorations a été proportionnelle à la présence de cellules Rev dans les cultures. Compte-tenu du fait que la production de mucus est plus importante avec le ratio 75/25, nous avons fait le choix d'utiliser ce ratio pour nos études sur les NPs. Cette proportion est d'ailleurs en accord avec les données de la littérature. En effet, Mahler *et al.* (2009) rapportent que le ratio 75/25 est celui qui permet d'obtenir une meilleure sécrétion de mucus, bien que le ratio le plus représentatif de la situation *in vivo* soit le 90/10. Cependant, leurs études montrent également que ce dernier ratio ne permet pas d'obtenir *in vitro* suffisamment de mucus. Nollevaux *et al.* (2006) ont coloré des coupes transversales de co-culture Caco-2/Rev, au ratio 75/25, par le bleu de toluidine, et montré la présence de microvillosités, attestant de la différenciation cellulaire.

La mise en place de ce modèle de co-culture a été motivée par la volonté de travailler dans un meilleur modèle de barrière intestinale, et donc un modèle plus prédictif de l'absorption intestinale, que la monoculture de cellules Caco-2. En effet, la présence de mucus peut être un frein à l'absorption et la perméabilité de composés et de NPs. Wickman *et al.* (1993) ont mis en place une co-culture Caco-2/Rev à un ratio de 50/50 et ont étudié l'influence du retrait du mucus sur la TEER et la perméabilité de la culture. Leurs résultats ont montré que le retrait du mucus n'affecte pas la TEER, mais augmente la perméabilité de la culture à une molécule comme le fluor. La présence du mucus diminue donc les transports du compartiment apical vers le compartiment basolatéral, et reproduit donc plus fidèlement la situation *in vivo*.

Le modèle de co-culture ne s'arrête pas au mélange de deux lignées cellulaires. Des modèles plus complexes, comme ceux de Antunes *et al.* (2013) et de Bazes *et al.* (2011) basés sur une tri-culture de cellules Caco-2, de cellules Rev et de lymphocytes B (les cellules de Raji), ont été établis. Ces modèles ont permis de montrer que les cellules Caco-2, en présence de cellules Raji, ont la capacité d'acquérir un phénotype de cellules M. Ainsi, ces modèles pourraient s'avérer meilleurs pour la prédiction de l'absorption intestinale.

5.2.2. Evaluation *in vitro* de l'internalisation et de la sécurité des NPs

Ce travail a été réalisé sur des monocultures de cellules Caco-2 et sur des co-cultures Caco-2/Rev 75/25. Pour les études d'internalisation, des NPs contenant de l'insuline-FITC ont été utilisées et l'internalisation a été quantifiée par la méthode de cytométrie en flux, en quantifiant la fluorescence intracellulaire. En parallèle, la viabilité cellulaire et le pourcentage de cellules mortes par nécrose ou par apoptose ont été évalués, par marquage des cellules à

l'iodure de propidium et à l'annexine-V, afin d'évaluer la sécurité des NPs. La sécurité des NPs a également été évaluée en déterminant leur impact sur la perméabilité des cultures cellulaires en monocouche, la production de mucus qui peut varier en fonction du stress subi par les cellules, et enfin la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Pour les études de TEER et de Papp, ainsi que de production de mucus, des NPs contenant de l'Umuline® ont été utilisées. Le dosage des cytokines a été réalisé sur les échantillons issus des études d'internalisation. Au cours de ce travail, nous avons évalué l'influence de la dose et de la taille des NPs sur ces différents paramètres. Deux temps d'incubation des NPs avec les cultures cellulaires ont été étudiés, 4 h et 24 h. La durée de 4 h d'incubation a été choisie sur la base d'une étude de la cinétique d'internalisation de NPs de 200 nm réalisée précédemment au laboratoire, et ayant montré que l'internalisation était maximale à ce temps-là (Reix *et al.*, 2012).

5.2.2.1. Internalisation, viabilité et mort cellulaire en fonction de la dose de NPs

Nous avons tout d'abord étudié l'internalisation, la viabilité et la mort cellulaire en fonction de la quantité de NPs. Ce travail a été réalisé avec des NPs de taille de 200 nm. Des quantités de NPs de 5 à 50 mg (quantités exprimées en mg de PLGA) ont été incubées avec les cellules pendant 4 h, et les différents paramètres ont été quantifiés par cytométrie en flux. Des cellules n'ayant pas reçu de NPs ont été utilisées comme contrôle (condition « CTL - »).

La **figure 5-10** montre les résultats d'internalisation des NPs de 200 nm en fonction de la dose dans une monoculture de cellules Caco-2 après 4 h d'incubation. L'internalisation des NPs par les cellules Caco-2 est donc dose-dépendante; elle est de $2,28 \cdot 10^5 \pm 3,15 \cdot 10^4$ à la dose de NPs de 20 mg et de $6,23 \cdot 10^5 \pm 1,49 \cdot 10^5$ à la dose de 50 mg. Les valeurs d'internalisation sont significatives à toutes les doses de NPs par rapport au contrôle. De plus, l'internalisation à 30 et 50 mg de PLGA est significativement augmentée par rapport aux conditions de 5, 10, et 20 mg de PLGA.

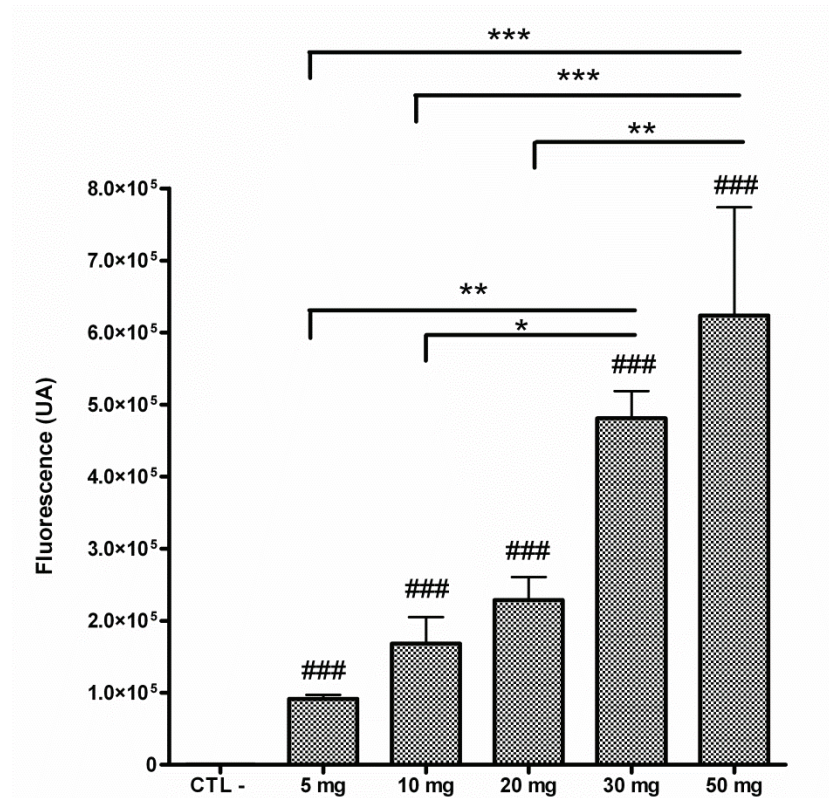


Figure 5-10 : Quantification de l'internalisation par cytométrie en flux des NPs de 200 nm en fonction de la dose après 4 h d'incubation avec une monoculture de cellules Caco-2 (# : vs CTL-, n=3)

La **figure 5-11** montre les résultats d'internalisation des NPs de 200 nm en fonction de la dose par la co-culture Caco-2/Rev. La fluorescence associée aux cellules est aussi dose-dépendante, avec pour valeur $1,5 \cdot 10^5 \pm 3,73 \cdot 10^4$ à la dose de 20 mg et $1,22 \cdot 10^6 \pm 1,57 \cdot 10^5$ à la dose de 50 mg. L'internalisation est significative pour toutes les doses de NPs si on les compare à la condition contrôle. Toutefois, la quantité de 50 mg conduit à une internalisation significativement plus élevée que les autres conditions.

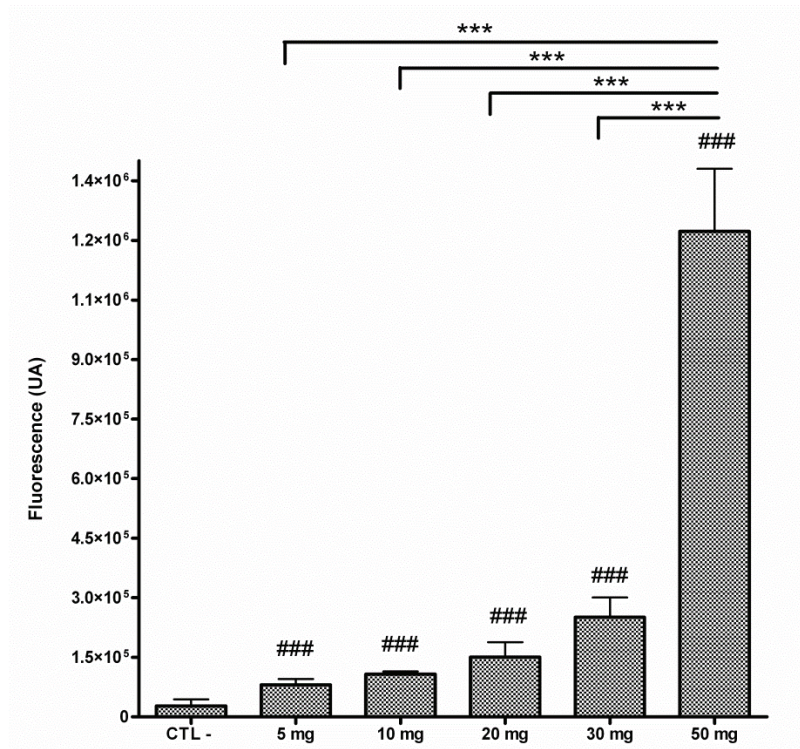


Figure 5-11 : Quantification de l'internalisation par cytométrie en flux des NPs de 200 nm en fonction de la dose après 4 h d'incubation avec la co-culture Caco-2/Rev (# : vs CTL-, n=3)

Les valeurs d'internalisation ont ensuite été comparées entre les deux modèles de culture comme cela est présenté sur la **figure 5-12**. Aucune différence significative n'a été observée entre les deux types de culture jusqu'à la dose de 20 mg. A 30 mg, l'internalisation des NPs était significativement meilleure pour les monocultures de cellules Caco-2, alors que l'inverse a été observé à la dose de 50 mg, avec une meilleure internalisation pour les co-cultures.

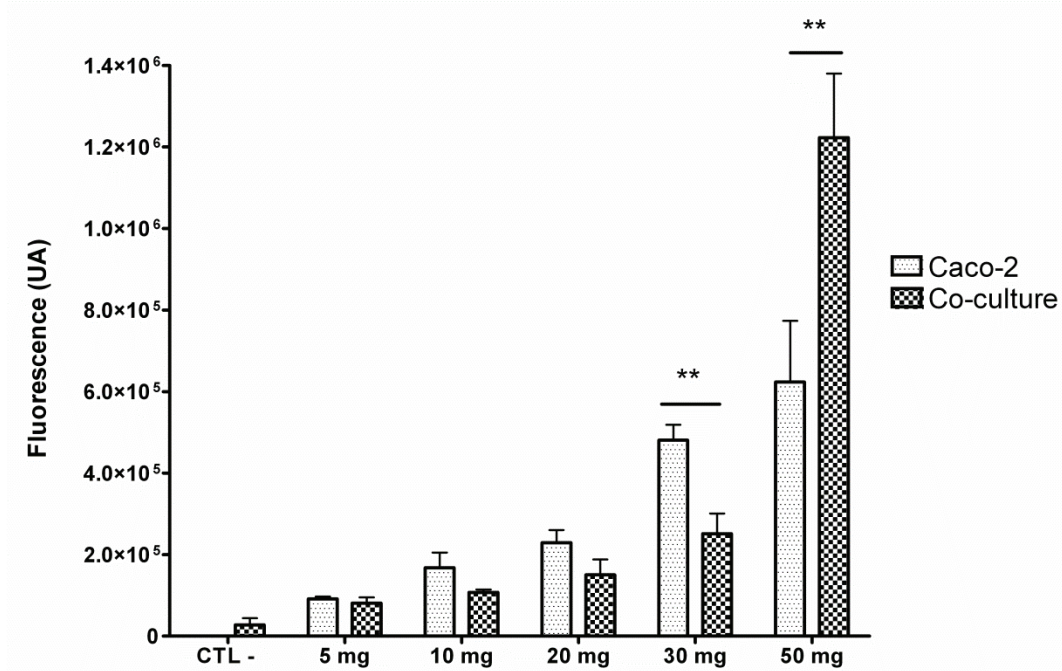


Figure 5-12 : Comparaison de l'internalisation des NPs de 200 nm en fonction de la dose après 4 h d'incubation entre les mono-cultures et les co-cultures (n=3)

Au cours de ces expériences, l'apoptose des cellules a été quantifiée par la méthode de cytométrie en flux par marquage des cellules à l'annexine-V APC, ainsi que la nécrose grâce à l'iodure de propidium. La viabilité a été obtenue en soustrayant les valeurs obtenues pour ces 2 paramètres, et a été exprimée en pourcentage par rapport au contrôle (**Fig. 5-13**). La nécrose, l'apoptose et l'apoptose tardive/nécrose ont été représentées sous la forme de cytogrammes (**Fig. 5-14**).

Comme le montre la **figure 5-13**, la viabilité cellulaire des monocultures de cellules Caco-2 est restée inchangée en présence de NPs, quelle que soit la dose. Aucune différence significative n'a été observée entre les différentes conditions testées. La viabilité était de $100 \pm 3,66$ % pour la condition témoin et de $100,5 \pm 9,09$ % pour la plus forte dose de NPs. Dans les cas des co-cultures, les doses croissantes de NPs n'ont également pas induit de perte de viabilité. A l'opposé, et de manière surprenante, une augmentation significative de la viabilité cellulaire a été observée entre les cellules témoins et les cellules incubées avec 30 mg de NPs ($100 \pm 12,04$ % versus $134,5 \pm 8,57$ %). Les cellules ayant été incubées avec 5 mg de NPs avaient une viabilité supérieure à celle des témoins. Ce gain de viabilité ne s'est pas maintenu à la dose de 50 mg.

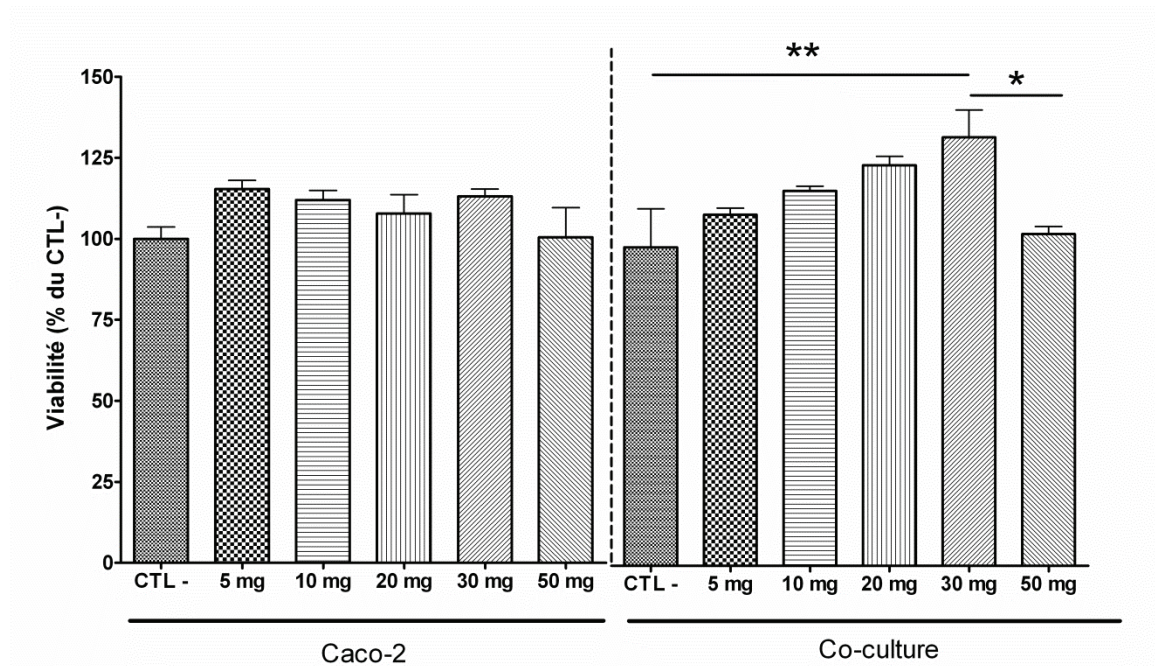


Figure 5-13 : Quantification par cytométrie en flux de la viabilité des cellules Caco-2 et co-cultures après incubation pendant 4 h avec des doses croissantes de NPs de 200 nm (n=3)

La **figure 5-14** montre les cytogrammes moyens analysant la nécrose, l'apoptose et l'apoptose tardive/nécrose dans les monocultures de cellules Caco-2 et les co-cultures pour les conditions contrôles et 20 mg de NPs. Les cytogrammes présentent des profils similaires entre les différentes conditions. Aucune différence n'a été observée pour les différentes conditions testées par rapport au CTL-.

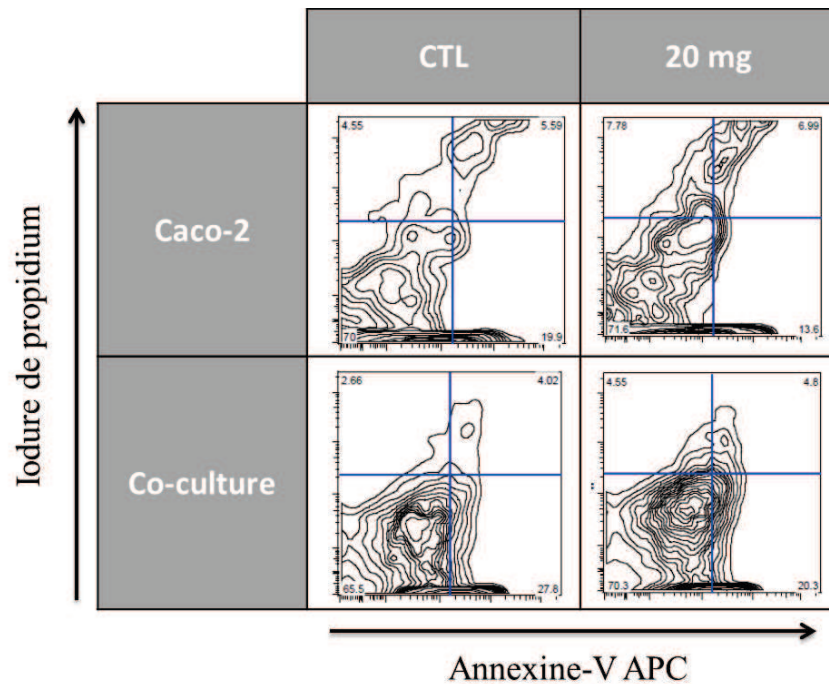


Figure 5-14 : Cytogrammes moyens des cellules incubées avec 20 mg de NPs de 200 nm pendant 4 h et les cellules contrôles, représentant la répartition des cellules en fonction du marquage à l'iodure de propidium et à l'annexine-V APC

Afin de s'affranchir d'une différence de réponse entre les différents types cellulaires, et afin de garantir la détection de l'internalisation par les cellules lors de l'incubation avec des NPs, la dose de 20 mg de PLGA a été sélectionnée pour la suite des études.

5.2.2.2. Internalisation, viabilité et mort cellulaire en fonction de la taille des NPs

La taille des NPs semble jouer un rôle dans l'internalisation cellulaire. Pour vérifier cette hypothèse, des NPs de 100 à 800 nm ont été synthétisées et incubées à la dose de 20 mg, pendant 4 h ou 24 h, avec des monocultures de cellules Caco-2 ou des co-cultures.

5.2.2.2.1.1. 4 h d'incubation

La **figure 5-15** représente les données d'internalisation obtenues après 4h d'incubation des NPs avec les cellules Caco-2.

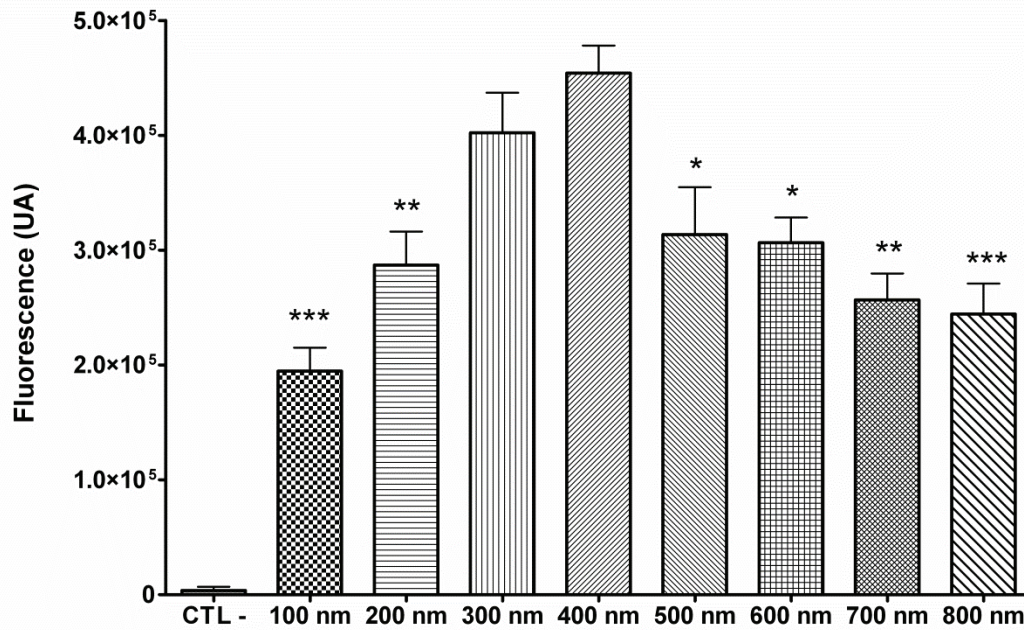


Figure 5-15 : Quantification de l'internalisation par cytométrie en flux des NPs en fonction de leur taille après incubation pendant 4 h avec les cellules Caco-2

(* : vs 400 nm, NPs 100 nm n=3, NPs 200 nm n=3, NPs 300 nm n=8, NPs 400 nm n=5, NPs 500 nm n=6, NPs 600 nm n=7, NPs 700 nm n=3, NPs 800 nm n=3)

Les valeurs de l'internalisation des NPs sont toutes significatives par rapport au CTL-. Elles augmentent avec la taille jusqu'à un maximum de $4,54.10^5 \pm 2,42.10^4$ pour les NPs de 400 nm, puis diminuent. L'internalisation des NPs de 400 nm est significativement plus élevée par rapport à celles des autres NPs, sauf dans le cas des NPs de 300 nm.

La **figure 5-16** représente les données d'internalisation obtenues après 4h d'incubation des NPs avec la co-culture Caco-2/Rev.

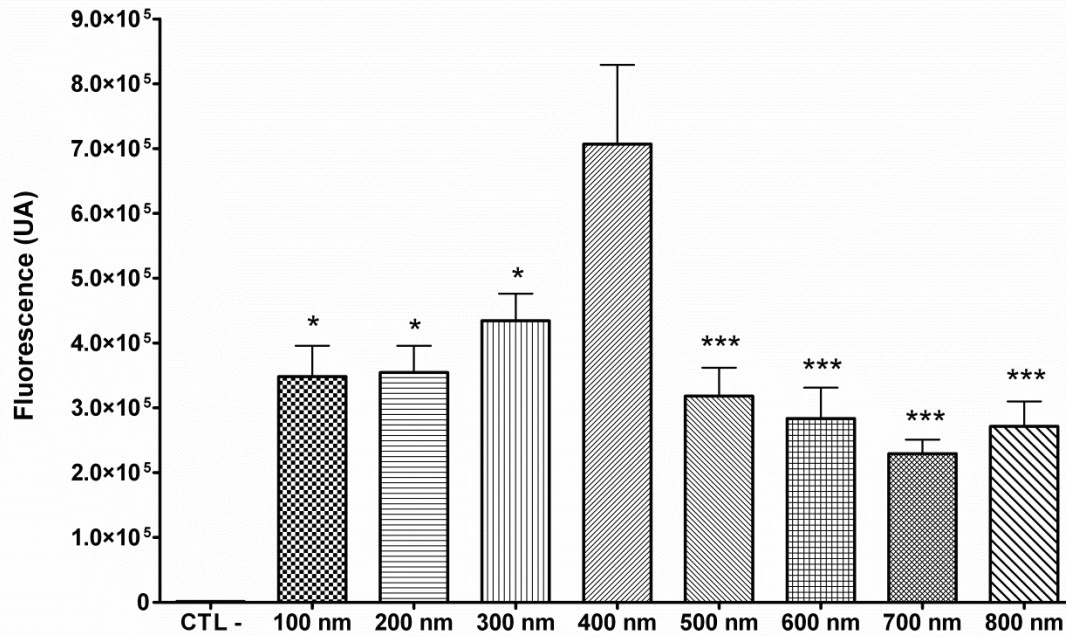


Figure 5-16 : Quantification de l’internalisation par cytométrie en flux des NPs en fonction de leur taille après 4 h d’incubation avec les co-cultures
 (* : vs 400 nm, NPs 100 nm n=3, NPs 200 nm n=3, NPs 300 nm n=8, NPs 400 nm n=5, NPs 500 nm n=6, NPs 600 nm n=7, NPs 700 nm n=3, NPs 800 nm n=3)

L’internalisation des NPs est toujours significative par rapport au témoin négatif, variable selon la taille et maximale pour les NPs de 400 nm. Toutes les valeurs d’internalisation des NPs sont statistiquement plus basses que celles des NPs de 400 nm, qui atteignent un maximum de $7,06.10^5 \pm 1,22.10^5$.

La comparaison de l’internalisation des NPs par les deux systèmes cellulaires (Fig. 5-17) montre des résultats comparables, avec un maximum pour les NPs de 400 nm dans les deux cas, mais avec une tendance plus marquée sur les co-cultures.

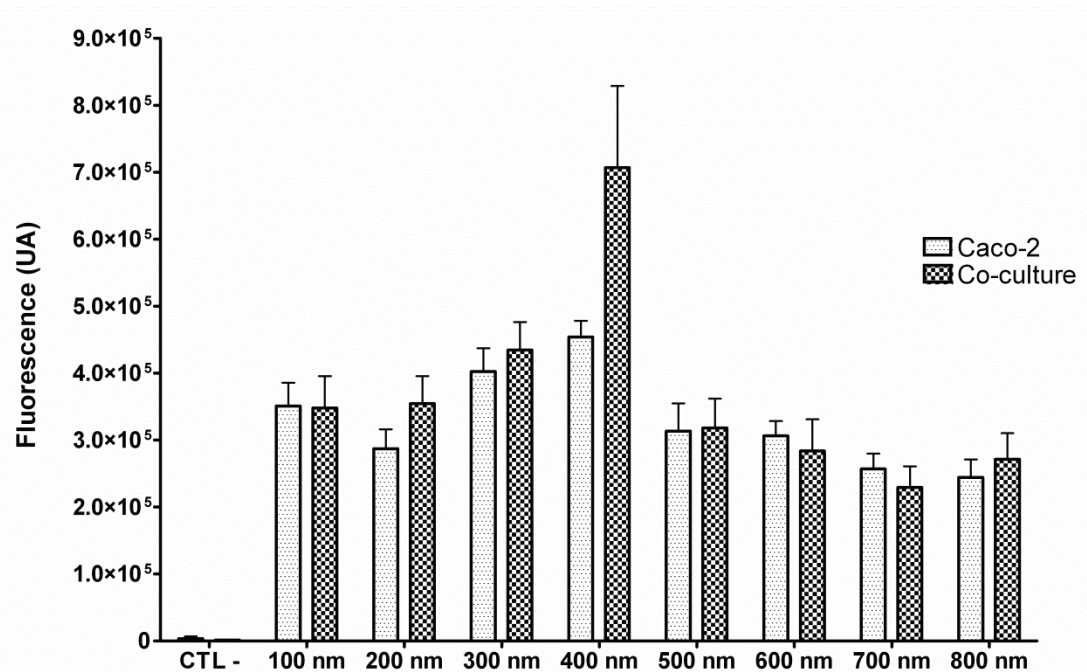


Figure 5-17 : Comparaison des internalisations des NPs de différentes tailles après 4 h d'incubation avec les mono-cultures et les co-cultures (NPs 100 nm n=3, NPs 200 nm n=3, NPs 300 nm n=8, NPs 400 nm n=5, NPs 500 nm n=6, NPs 600 nm n=7, NPs 700 nm n=3, NPs 800 nm n=3)

La **figure 5-18** montre les données de viabilité cellulaire obtenues en parallèle des données d'internalisation. Aucune perte de viabilité n'est observée, quelles que soient les conditions testées.

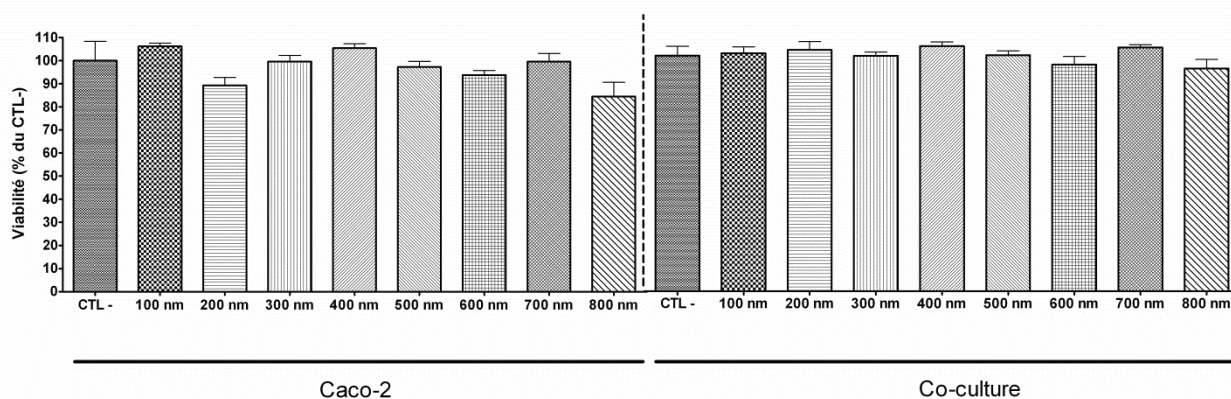


Figure 5-18 : Quantification par cytométrie en flux de la viabilité cellulaire des cellules Caco-2 et co-cultures après 4 h d'incubation avec 20 mg de NPs de différentes tailles (NPs 100 nm n=3, NPs 200 nm n=3, NPs 300 nm n=8, NPs 400 nm n=5, NPs 500 nm n=6, NPs 600 nm n=7, NPs 700 nm n=3, NPs 800 nm n=3)

Les cytogrammes représentant la distribution des cellules marquées à l'iodure de propidium et à l'annexine-V ont aussi été obtenus, afin d'évaluer la nécrose cellulaire, l'apoptose et l'apoptose tardive (**Fig. 5-19**).

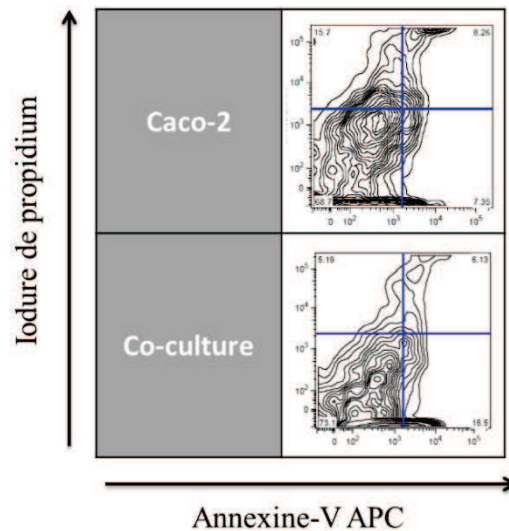


Figure 5-19 : Cytogrammes moyens des cellules incubées avec des NPs de 200 nm pendant 4 h représentant la répartition des cellules en fonction du marquage à l'iodure de propidium et à l'annexine-V

La figure ci-dessus montre une représentation moyenne des cytogrammes obtenus pour les NPs de 200 nm. Les cytogrammes sélectionnés sont donc représentatifs de toutes les autres conditions (400 nm). Ils ne montrent pas de différence entre les différentes conditions, ceci quel que soit le type de culture.

L'ensemble de ces résultats montre une internalisation plus importante des NPs de 400 nm après 4 h d'incubation, quel que soit le type de culture utilisé. **Les études sur l'internalisation et la viabilité cellulaire après 24 h d'incubation n'ont donc été réalisées que sur les NPs 400 nm et comparées aux NPs de référence de 200 nm.**

5.2.2.2.1.2. 24 h d'incubation

Cette étude a eu pour but de déterminer si la présence prolongée des NPs sur les cellules peut augmenter l'internalisation des NPs, tout en préservant la viabilité cellulaire.

La **figure 5-20** montre les données d'internalisation des NPs de 200 et 400 nm après 4 h ou 24 h d'incubation avec des cellules Caco-2.

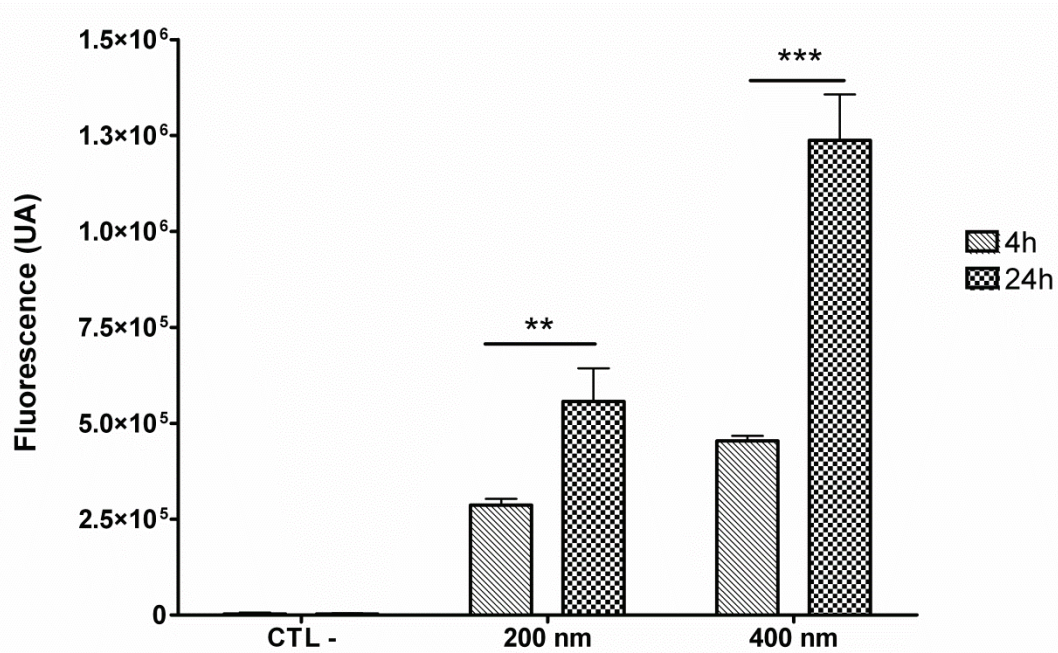


Figure 5-20 : Internalisation, quantifiée par cytométrie en flux, des NPs de 200 et 400 nm par les cellules Caco-2 après 4h ou 24h d'incubation (n=3)

Ces résultats montrent que l'internalisation des NPs de 200 et 400 nm est significativement augmentée après 24h d'incubation par rapport à 4h. Par exemple, pour les NPs de 200 nm incubées pendant 4h, l'internalisation est de $2,87 \cdot 10^5 \pm 1,50 \cdot 10^4$, alors qu'elle est de $5,57 \cdot 10^5 \pm 8,63 \cdot 10^4$ après 24h d'incubation. Des résultats similaires sont obtenus avec les NPs de 400 nm.

L'internalisation des NPs en fonction du temps d'incubation a aussi été quantifiée sur les co-cultures (Fig. 5-21).

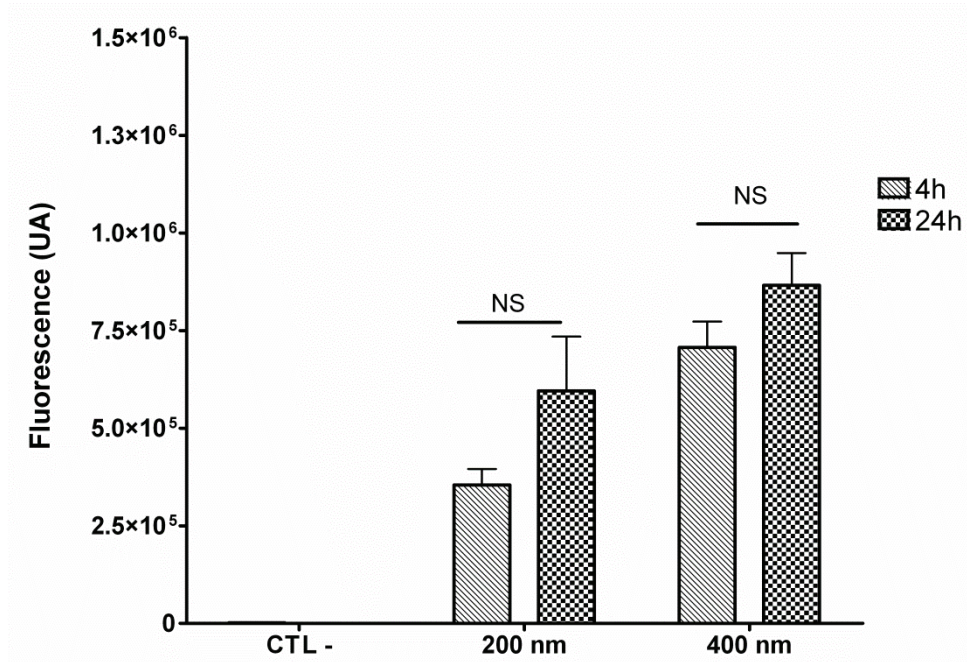


Figure 5-21 : Internalisation, quantifiée par cytométrie en flux, des NPs de 200 et 400 nm par les co-cultures après 4 h et 24 h d'incubation (n=3)

Contrairement aux résultats obtenus sur les cellules Caco-2, le temps d'incubation n'influe pas sur l'internalisation des NPs par les co-cultures. En effet, aucune différence significative de la fluorescence n'a été détectée entre les temps d'incubation de 4 h et 24 h, quelle que soit la taille des NPs. Les NPs de 200 nm sont internalisées à hauteur de $3,55 \cdot 10^5 \pm 4,10 \cdot 10^4$ après 4 h d'incubation, et à hauteur de $5,96 \cdot 10^5 \pm 1,38 \cdot 10^5$ après 24 h.

Une comparaison des valeurs d'internalisation à 24 h a été réalisée entre les deux types de culture (Fig. 5-22).

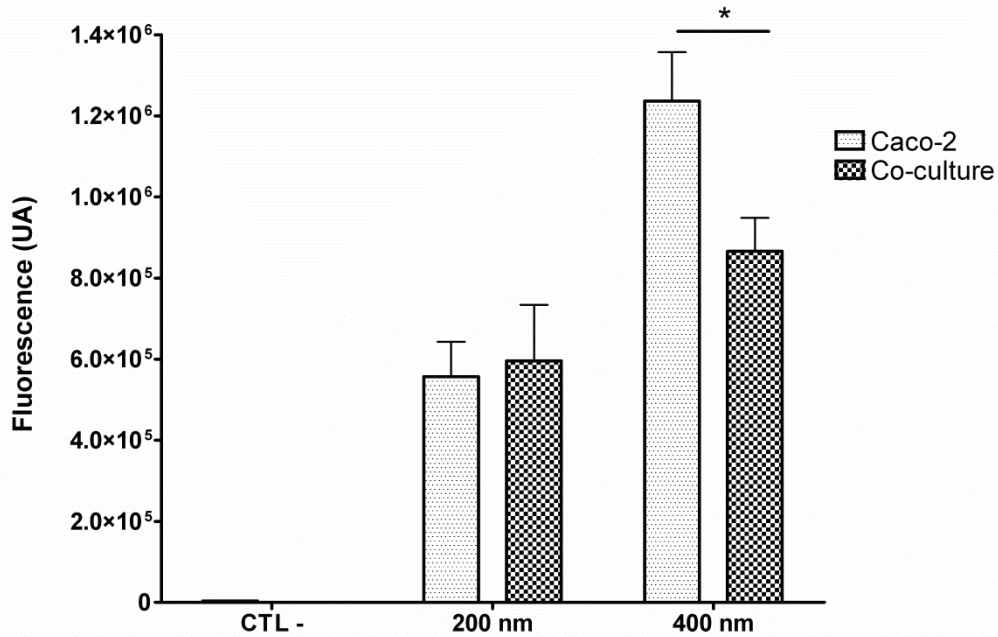


Figure 5-22 : Comparaison de l’internalisation des NPs de 200 et 400 nm par cytométrie en flux après 24 h d’incubation par les cellules Caco-2 et les co-cultures (n=3)

Après 24h d’incubation, on remarque que l’internalisation des NPs est significativement plus élevée dans les cellules Caco-2 pour les NPs de 400 nm. Cette différence n’est pas observée pour les NPs de 200 nm.

La viabilité cellulaire après 24 h d’incubation est un paramètre important. Celle-ci a été évaluée sur les deux types de culture pour les NPs de 200 et 400 m (Fig. 5-23)

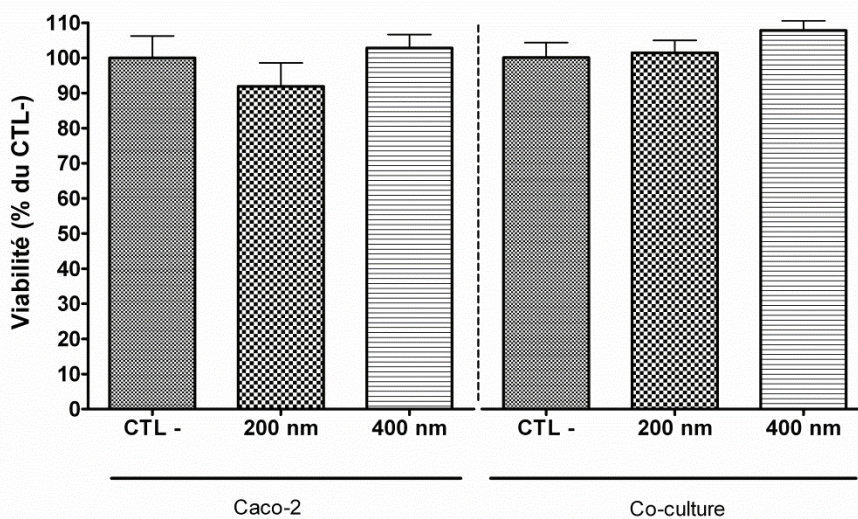


Figure 5-23 : Quantification par cytométrie en flux de la viabilité cellulaire des cellules Caco-2 et des co-cultures après 24 h d’incubation avec 20 mg de NPs de 200 et 400 nm (n=3)

Les résultats n'ont pas montré de différence entre les conditions. Ainsi, aucune perte de viabilité n'a été détectée quel que soit le modèle et quelle que soit la taille des particules.

Les cytogrammes de la répartition des cellules marquées à l'iodure de propidium et à l'annexine-V ont également été étudiés (Fig. 5-24).

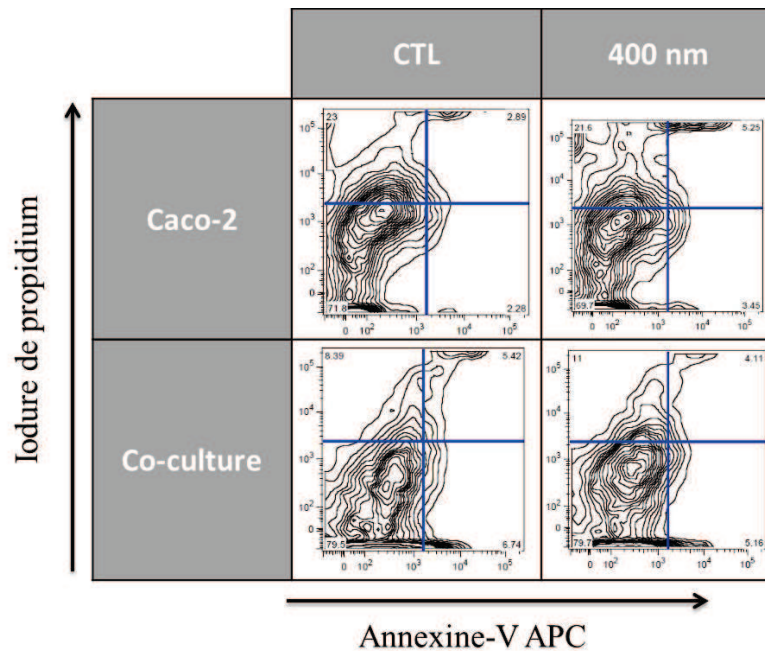


Figure 5-24 : Cytogrammes moyens des cellules incubées avec des NPs de 400 nm pendant 24 h représentant la répartition des cellules en fonction du marquage à l'iodure de propidium et à l'annexine-V

Les cytogrammes représentés dans la **figure 5-24** pour les NPs de 400 nm sont représentatifs de toutes les conditions (200 nm). L'analyse des cytogrammes n'a pas montré de différence entre les différentes conditions testées.

5.2.2.3. Impact des NPs sur la perméabilité des cultures cellulaires, la production du mucus et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires

En complément des études de cytotoxicité, la sécurité des NPs a également été évaluée par détermination de l'impact des NPs sur la résistance trans-épithéliale et la perméabilité apparente des cultures cellulaires (NPs d'Umuline[®]), la production de mucus (NPs d'Umuline[®]) et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (NPs d'insuline-FITC). Ces évaluations ont été réalisées dans les deux modèles cellulaires, avec des NPs de 200 et/ou 400 nm contenant de l'insuline, et pour des temps d'incubation de 4 h ou 24 h.

5.2.2.3.1. Impact des NPs sur la résistance électrique trans-épithéliale

La première étape a consisté en la mesure de la TEER qui permet de renseigner sur l'intégrité de la monocouche épithéliale. Dans ces études, un agent permettant d'ouvrir les jonctions serrées, l'EGTA, a été utilisé comme témoin positif.

5.2.2.3.1.1. 4 h d'incubation

Des NPs de 200 nm ont été incubées à différentes doses (5-50 mg) avec des cellules Caco-2 ou des co-cultures pendant 4 h, et la TEER a été mesurée tout le long de l'incubation (**Fig. 5-25**). Les monocultures de cellules Caco-2 ou les co-cultures contrôles (CTL-) n'ont pas reçu de NPs.

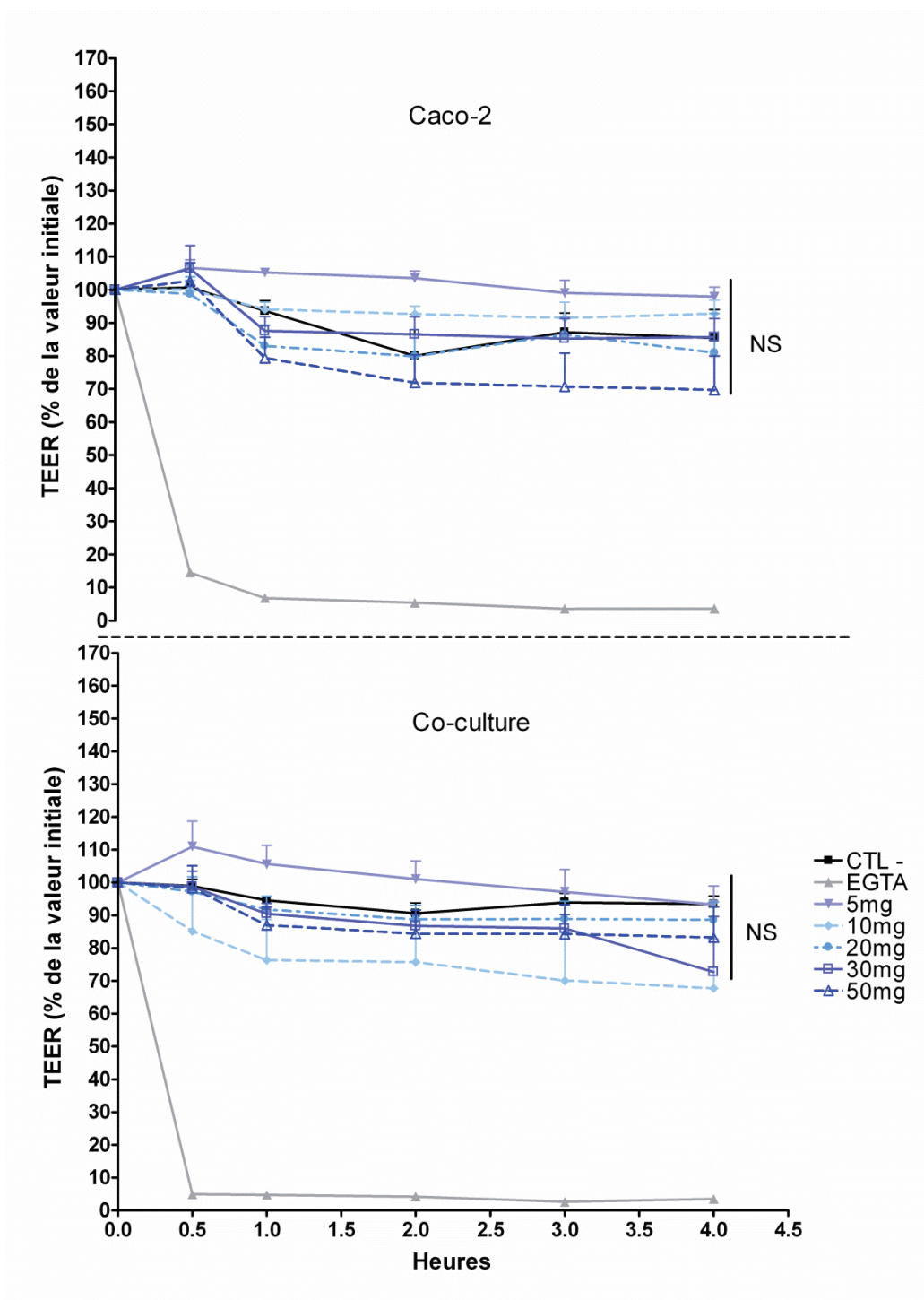


Figure 5-25 : Evolution de la TEER des cellules Caco-2 et de la co-culture durant les 4 h d'incubation avec des NPs de 200 nm à différentes concentrations (Pour toutes les conditions, $p < 0,05$ par rapport à EGTA, $n=3$)

Les résultats des mesures de TEER ont montré que l'EGTA, chélateur de calcium et contrôle positif, induit une diminution drastique et irréversible de la TEER dès 30 min d'incubation. Ainsi, à 4 h, les valeurs de TEER sont minimales, atteignant $3,64 \pm 0,42$ % pour les cellules Caco-2 et $3,42 \pm 0,11$ % pour la co-culture. Les valeurs de TEER des témoins négatifs

(cultures sans NPs) sont, quant à elles, de $85,44 \pm 8,64$ % pour les cellules Caco-2 et de $93,39 \pm 2,44$ % pour la co-culture. Les valeurs obtenues en présence de NPs de 200 nm ne diffèrent pas significativement des valeurs des témoins négatifs, quelle que soit la dose. La plus forte dose de NPs, 50 mg, donne des valeurs de $69,70 \pm 10,30$ % pour les cellules Caco-2 et de $83,16 \pm 9,4$ % pour la co-culture.

La même étude a été réalisée avec des NPs de 400 nm (**Fig. 5-26**).

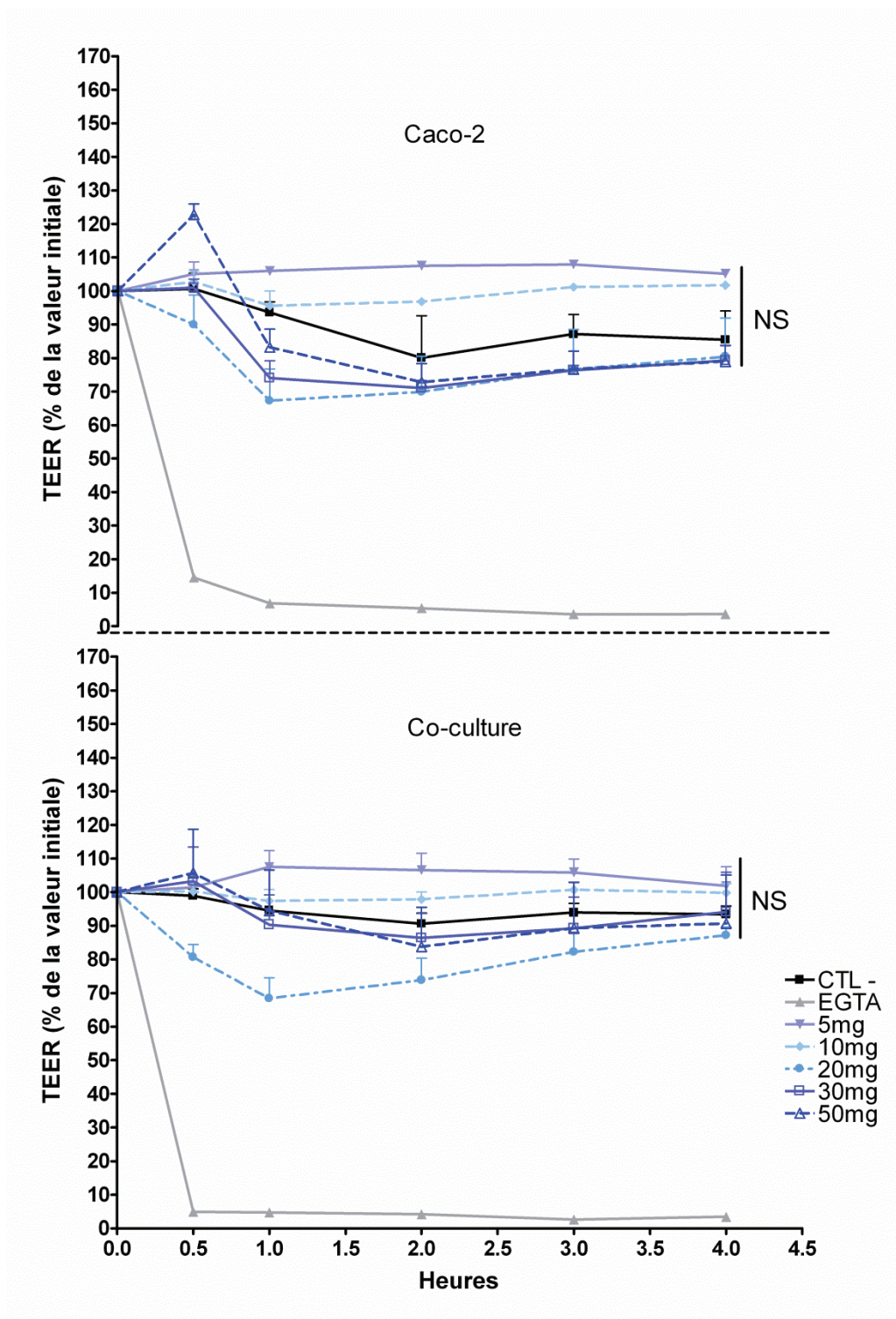


Figure 5-26 : Evolution de la TEER des cellules Caco-2 et de la co-culture durant 4 h d'incubation avec des NPs de 400 nm à différentes concentrations (Pour toutes les conditions, $p < 0,05$ par rapport à EGTA, $n=3$)

Des résultats similaires ont été obtenus. Aucune différence significative n'a été observée pour les différentes doses de NPs comparées aux témoins. De plus, la dose de NP de 50 mg

n'entraînait pas de diminution importante de la TEER, avec des valeurs à 4h de $69,70 \pm 10,30$ % pour les cellules Caco-2 et de $83,16 \pm 9,4$ % pour la co-culture.

5.2.2.3.1.2. 24 h d'incubation

L'impact sur la TEER des NPs de 200 nm a également été évalué suite à une incubation de 24 h à plusieurs doses de NPs (Fig. 5-27).

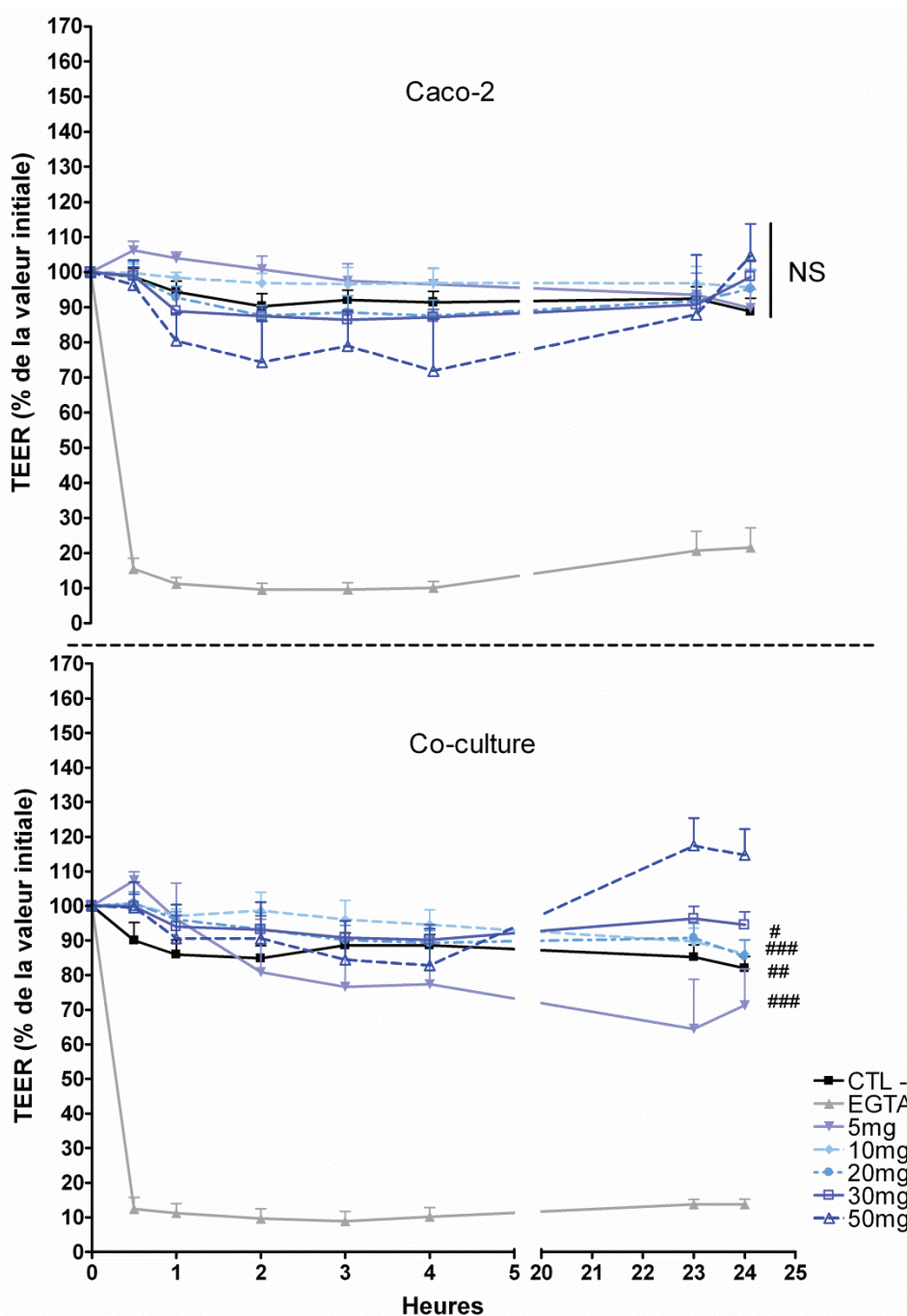


Figure 5-27: Evolution de la TEER des cellules Caco-2 et de la co-culture durant 24 h d'incubation avec des NPs de 200 nm à différentes concentrations (Pour toutes les conditions, $p < 0,05$ par rapport à EGTA, $n=3$)

Les résultats n'ont pas montré de diminution de la TEER pour les cellules Caco-2, attestant l'absence de perte d'intégrité de la monocouche cellulaire. En effet, les valeurs de TEER à 24 h des cellules témoins étaient de $88,82 \pm 3,69$ % contre $104,57 \pm 9,10$ % pour la dose de NPs de 50 mg. Pour la co-culture, aucune diminution significative de la TEER n'a été observée par rapport au témoin. En effet, les cellules témoins présentaient une TEER de $82,02 \pm 3,32$ % à 24h, et les cellules mises en contact avec 5 mg NPs de 200 nm avaient une TEER de $71,28 \pm 10,59$ %. Une légère augmentation de la TEER a été constatée après 23 h d'incubation pour les co-cultures incubées avec 50 mg de PLGA, cette augmentation se stabilisant à $114,69 \pm 7,51$ % au temps 24h

Les valeurs de TEER des cultures incubées avec des NPs de 400 nm à différentes doses ont également été mesurées (**Fig. 5-28**).

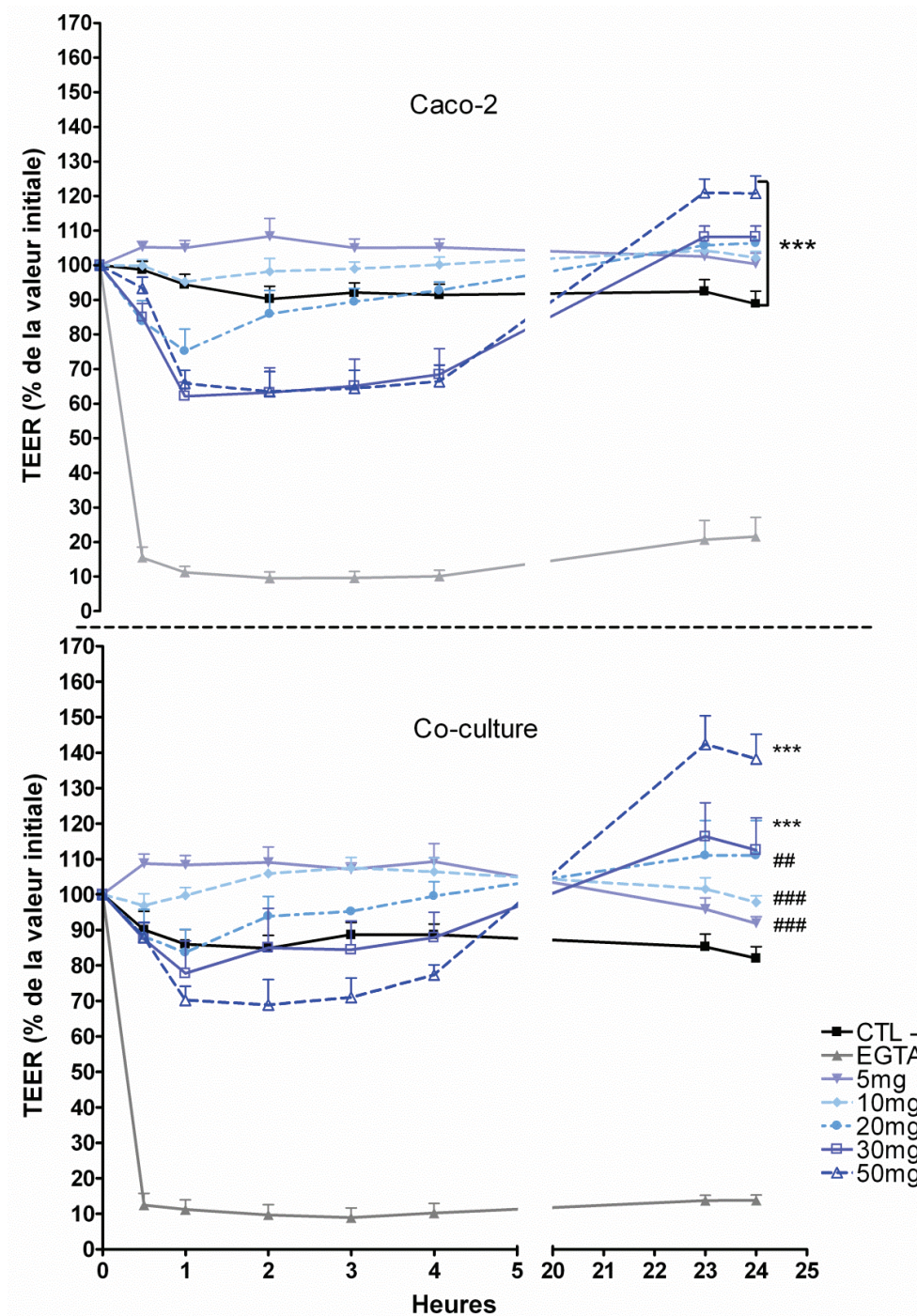


Figure 5-28: Evolution de la TEER des cellules Caco-2 et de la co-culture durant 24 h d'incubation avec des NPs de 400 nm à différentes concentrations
(Pour toutes les conditions, $p < 0,05$ par rapport à EGTA, * : vs CTL- ; # : vs 50 mg, $n=3$)

Les valeurs de TEER, pour les cellules Caco-2, n'ont pas diminué de façon significative en présence de NPs par rapport au témoin. Par contre, l'incubation de 50 mg de NPs de 400 nm a entraîné une augmentation significative de la TEER à 24 h ($120,78 \pm 5,07 \%$).

Pour la co-culture, des résultats similaires ont été obtenus. En effet, on n'observe pas de diminution de la TEER pour les cellules incubées avec les NPs. Par contre, une augmentation

de la TEER pour les fortes concentrations en NPs est mesurée. En effet, des différences significatives ont été trouvées pour les doses de 30 et 50 mg en comparaison au témoin. (TEER = $112,54 \pm 9,05$ pour 30 mg, $138,23 \pm 6,92\%$ pour 50 mg et $82,02 \pm 3,32\%$ pour CTL). Le calcul des AUC pour cette expérience a montré une différence significative entre les aires pour les conditions 5, 10, 20 et 50 mg par rapport au CTL-. En effet, les AUC de ces conditions sont plus importantes que les AUC des CTL-, qui ont les valeurs les plus faibles.

5.2.2.3.2. Impact des NPs sur la perméabilité apparente

La perméabilité apparente (Papp) renseigne sur l'intégrité de la monocouche épithéliale ; elle est complémentaire aux données de TEER. Sa mesure repose sur l'incubation des cellules avec des marqueurs de perméabilité. Dans nos travaux, deux marqueurs ont été utilisés la lucifer yellow (LY) et le Dextran 20 (FD-20), qui se distinguent par leur poids moléculaire.

5.2.2.3.2.1. 4 h d'incubation

La Papp de la lucifer yellow (LY) a été calculée après incubation des deux types de culture cellulaire avec des doses croissantes de NPs de 200 nm et 400 nm, et toujours en présence du témoin positif, l'EGTA (Fig. 5-29).

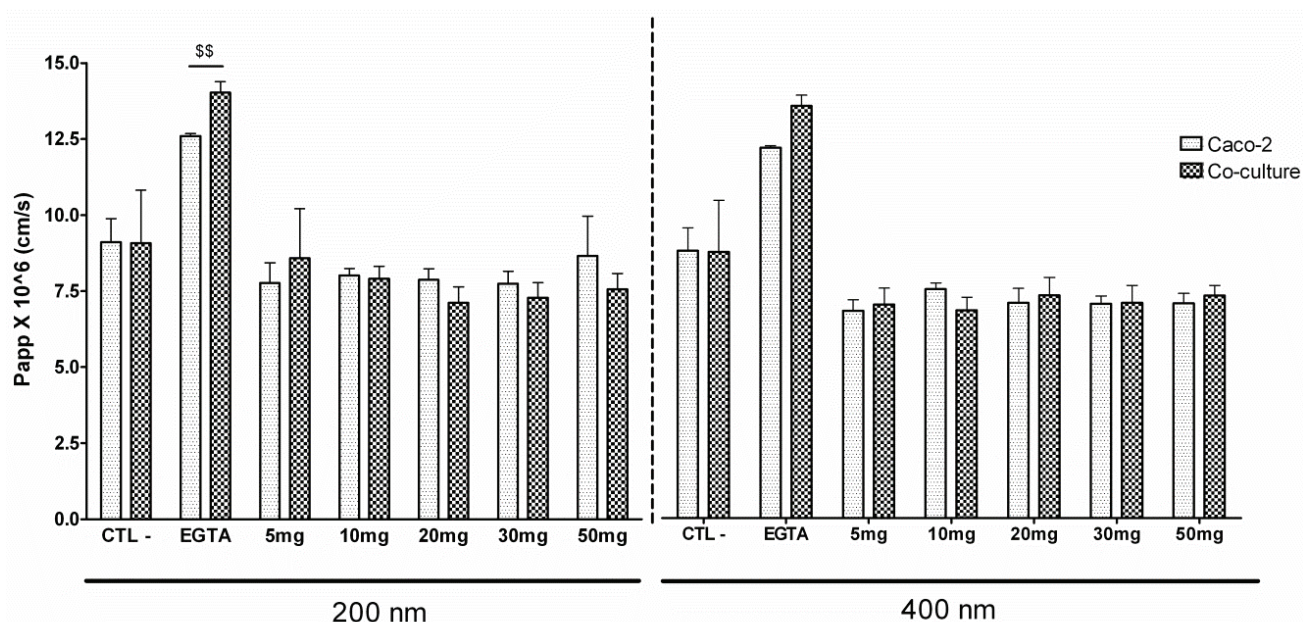


Figure 5-29 : Perméabilité apparente de la lucifer yellow dans des cultures de cellules Caco-2 et des co-cultures après incubation de NPs de 200 et 400 nm pendant 4h (n=3)

Les calculs de la Papp ont montré qu'il n'y a pas de différence de perméabilité quelles que soient les conditions testées (taille des NPs ou type de culture). Les valeurs de Papp des conditions témoins sont de $9,10 \cdot 10^6 \pm 0,77 \cdot 10^6$ cm/s pour les cellules Caco-2 et de $9,07 \cdot 10^6 \pm 1,7 \cdot 10^6$ cm/s pour la co-culture. Pour 50 mg de NPs de 200 nm, la Papp est de $8,65 \cdot 10^6 \pm 1,31 \cdot 10^6$ cm/s pour la monoculture de cellules Caco-2. Pour 50 mg de NPs de 400 nm, la Papp est de $7,31 \cdot 10^6 \pm 0,33 \cdot 10^6$ cm/s pour les cellules Caco-2.

La même étude a été réalisée avec le FITC-Dextran 20 (FD-20), un marqueur de perméabilité de plus haut poids moléculaire que la LY (Fig. 5-30).

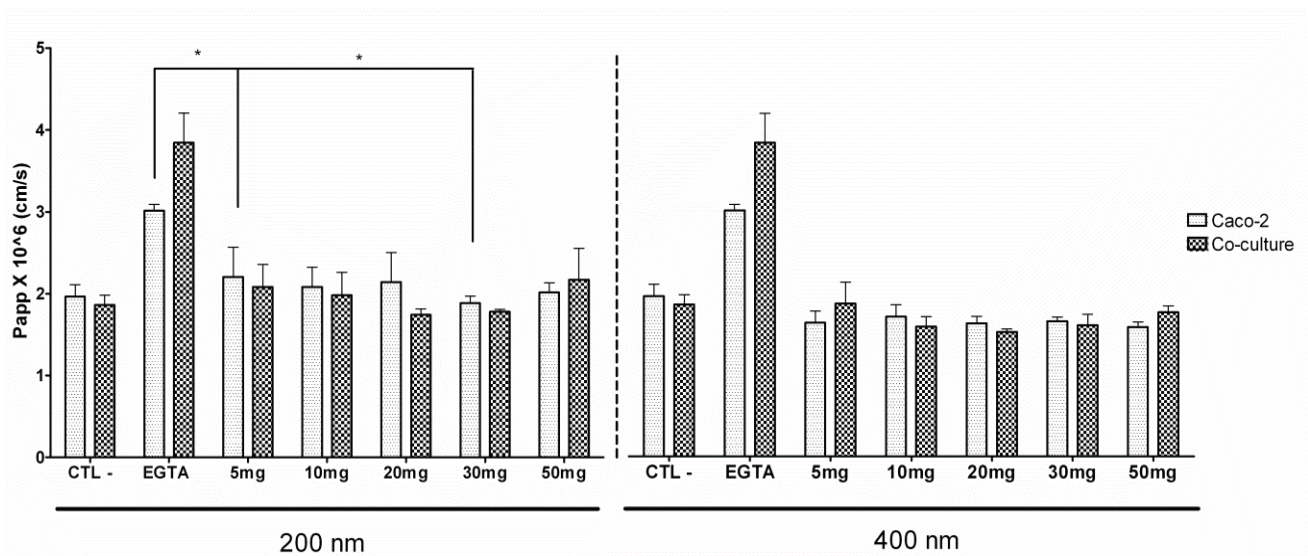


Figure 5-30 : Perméabilité apparente du FD-20 dans des cultures de cellules Caco-2 et des co-cultures après incubation de NPs de 200 et 400 nm pendant 4h (n=3)

Les résultats obtenus avec le marqueur de perméabilité FD20 sont similaires à ceux obtenus avec la LY. En effet, il n'y pas de différence entre les deux types de culture, entre les différentes doses, et entre les deux tailles de NPs. Les valeurs de Papp de base des cellules Caco-2 sont de $1,96 \cdot 10^6 \pm 0,14 \cdot 10^6$ cm/s, et celles des co-cultures sont de $1,86 \cdot 10^6 \pm 0,11 \cdot 10^6$ cm/s. Pour la dose de 50 mg des NPs de 200 nm, la Papp est de $2,17 \cdot 10^6 \pm 0,38 \cdot 10^6$ pour la co-culture, et de $2,02 \cdot 10^6 \pm 0,12 \cdot 10^6$ cm/s avec les cellules Caco-2.

5.2.2.3.2.2. 24 h d'incubation

Afin d'évaluer l'impact des NPs à plus long terme, l'étude a été réitérée avec les deux marqueurs de perméabilité pour une incubation des NPs de 24h. Les valeurs de Papp des cellules incubées avec les NPs et la LY sont représentées sur la **figure 5-31**.

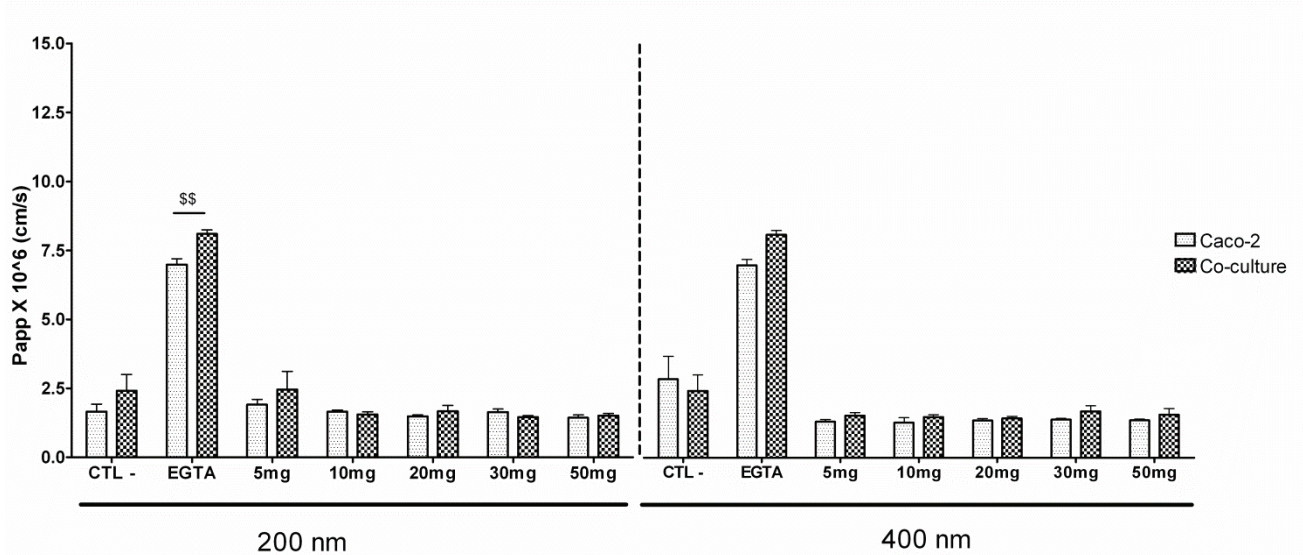


Figure 5-31 : Perméabilité apparente de la lucifer yellow dans des cultures de cellules Caco-2 et des co-cultures après incubation de NPs de 200 et 400 nm pendant 24h (n=3)

L'étude a montré que l'incubation des NPs avec les cellules n'entraîne pas de variation de la perméabilité de la LY. Les valeurs des cellules témoins sont de $1,66 \cdot 10^6 \pm 0,26 \cdot 10^6$ cm/s pour les cellules Caco-2 et de $2,42 \cdot 10^6 \pm 0,59 \cdot 10^6$ cm/s pour la co-culture. En présence de NPs de 400 nm, la Papp de la co-culture est de $1,56 \cdot 10^6 \pm 0,21 \cdot 10^6$

Les Papp déterminées pour le FD20 sont représentées sur la **figure 5-32**.

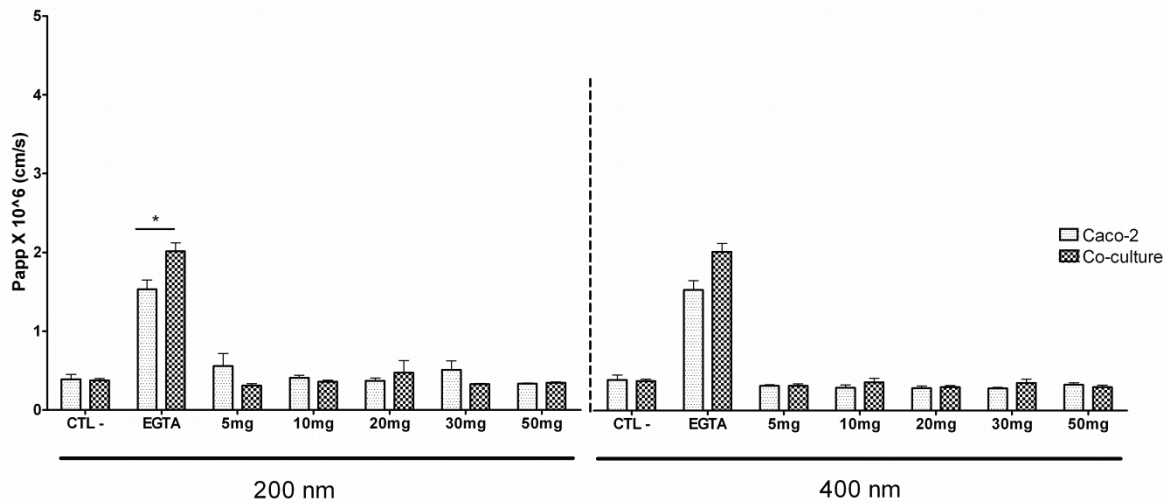


Figure 5-32 : Perméabilité apparente du FD 20 dans des cultures de cellules Caco-2 et des co-cultures après incubation de NPs de 200 et 400 nm pendant 24h (n=3)

Les résultats de ces incubations ont montré qu'à 24 h, en présence de NPs à différentes doses, la perméabilité des monocouches épithéliales reste inchangée. Une perméabilité similaire aux cellules témoins est obtenue sur les co-cultures en présence de NPs de 400 nm, à hauteur de 50 mg: $0,32 \cdot 10^6 \pm 0,03 \cdot 10^6$ cm/s et $0,39 \cdot 10^6 \pm 0,06 \cdot 10^6$ cm/s, respectivement.

5.2.2.3.3. Impact des NPs sur la production de mucus

Dans ces études, des co-cultures Caco-2/Rev ont été incubées avec des NPs de 200 et 400 nm en concentrations croissantes pendant 4 h, puis ont été colorées au bleu alcian et à l'hématoxyline, afin de visualiser le mucus.

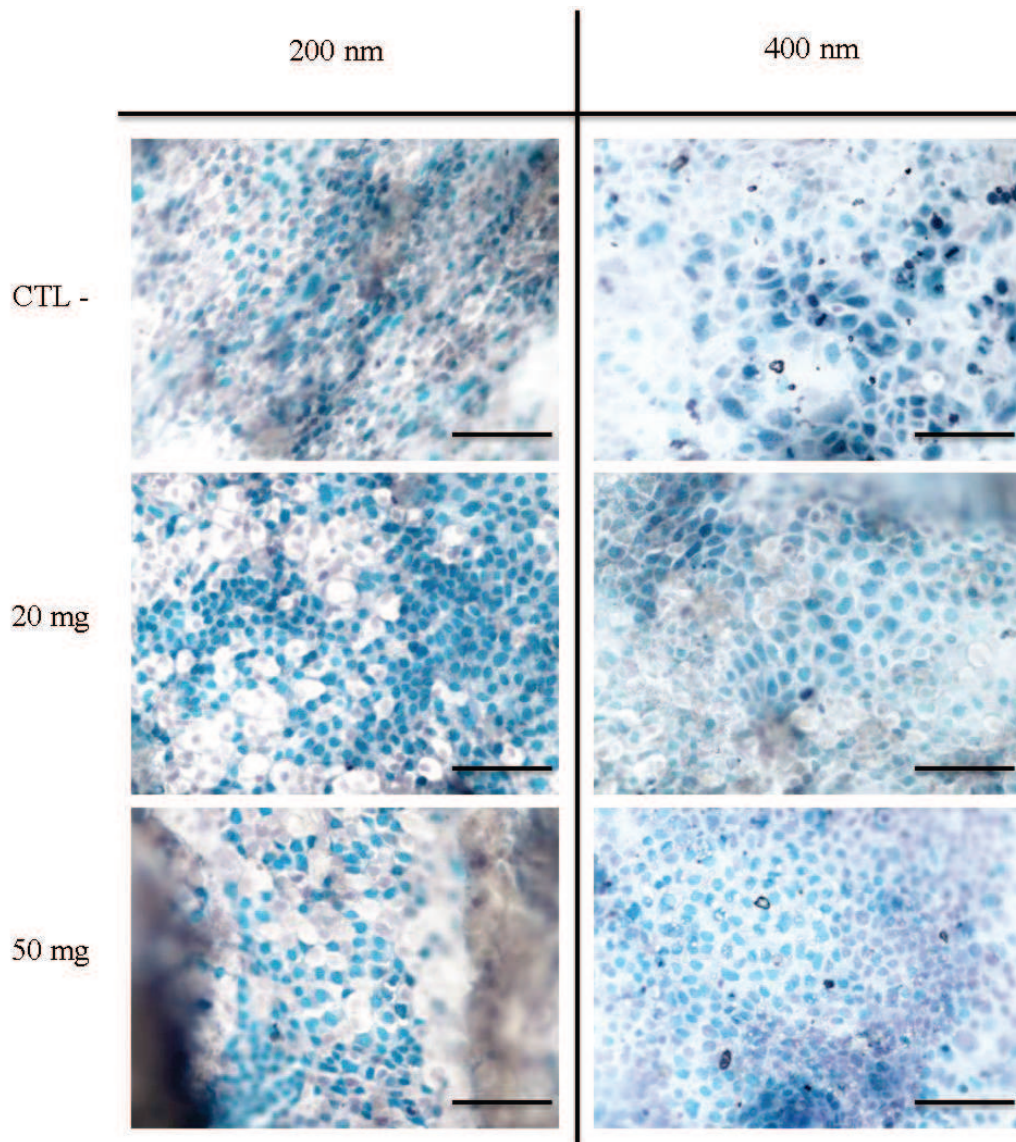


Figure 5-33 : Vue apicale des co-cultures incubées avec des NPs de 200 et 400 nm à différentes concentrations pendant 4h (La barre d'échelle représente 100 μ m)

Les résultats (**Fig. 5-33**) n'ont pas montré de différence de coloration du mucus entre les co-cultures contrôles et les co-cultures exposées à des doses croissantes de NPs, quelle que soit la dose de NPs.

5.2.2.3.4. Impact des NPs sur la sécrétion de cytokines

Cinq cytokines pro-inflammatoires ($\text{IFN}\gamma$, $\text{IL-1-}\beta$, IL-6 et $\text{TNF}\alpha$) ont été dosées dans le surnageant des cultures de cellules Caco-2 et des co-cultures par la méthode d'ELISA Multiplex, après incubation de NPs de 200 et 400 nm, à la dose de 20 mg, pendant 4 h ou 24 h.

- 4 h d'incubation

La **figure 5-34** représente les résultats du dosage des cytokines dans les surnageants cellulaires après 4h d'incubation.

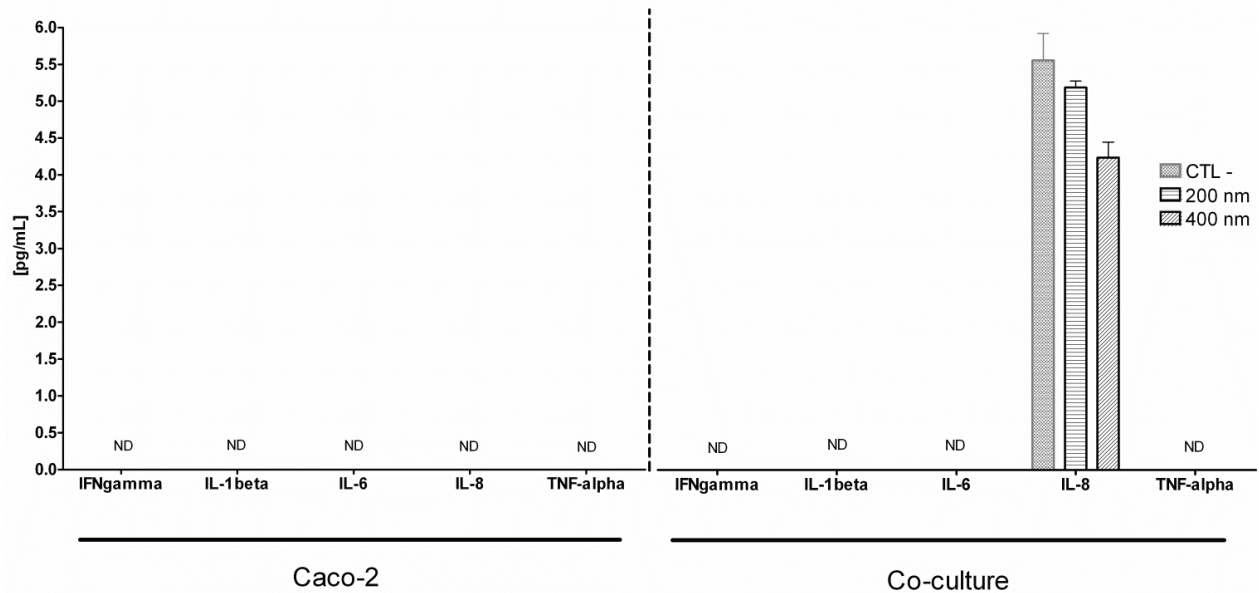


Figure 5-34 : Quantification par ELISA Multiplex de la sécrétion de 5 cytokines après incubation des NPs de 200 ou 400 nm pendant 4h en fonction du type de culture (ND : Non détectable, n=3)

Les résultats des dosages ont montré que les cytokines IFN γ , IL-1- β , IL-6 et TNF α ne sont pas secrétées, que ce soit en absence ou en présence de NPs, quel que soit le type de culture. Seule l'IL-8 est sécrétée par la co-culture. Cette sécrétion ne varie pas que les co-cultures soient exposées ou non aux NPs. En effet, l'IL-8 est sécrétée à hauteur de $5,417 \pm 0,353$ pg/mL par les cellules témoins, de $5,055 \pm 0,036$ pg/mL par les cellules incubées avec les NPs de 200 nm et de $4,130 \pm 0,204$ pg/mL par les cellules incubées avec les NPs de 400 nm.

• 24 h d'incubation

Le dosage des cytokines dans le surnageant des cellules Caco-2 et des co-cultures a également été réalisé après 24 h d'incubation avec des NPs de 200 nm et 400 nm (Fig. 5-35).

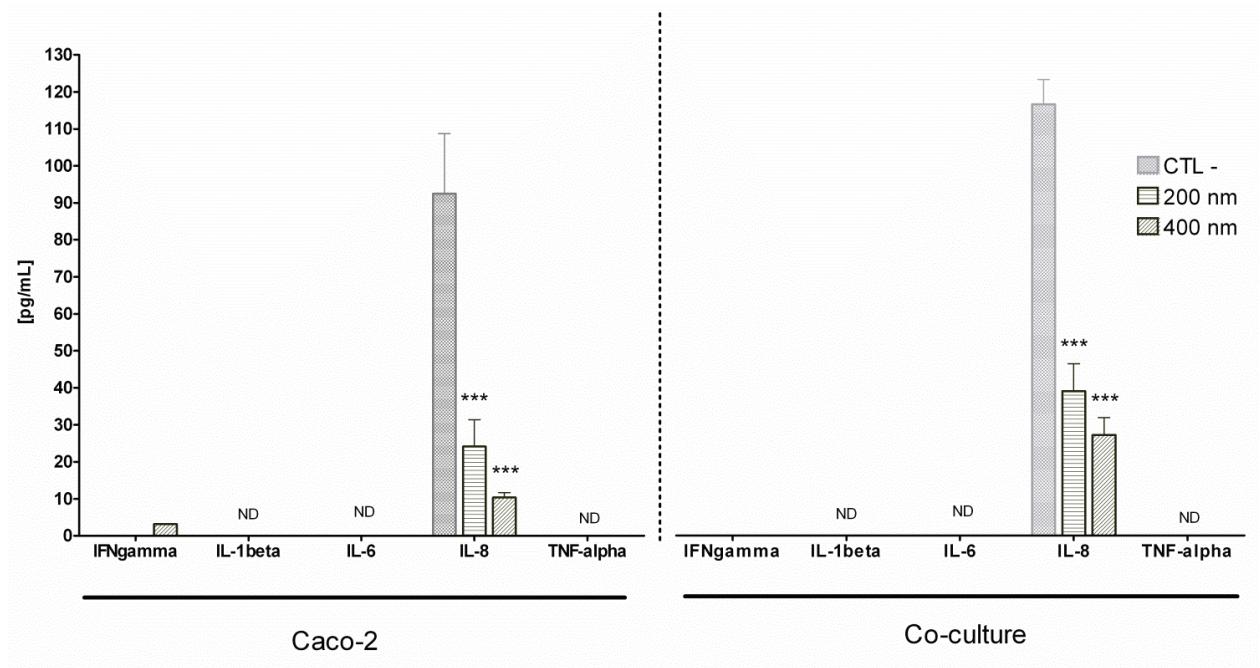


Figure 5-35 : Quantification par ELISA Multiplex de la sécrétion de 5 cytokines après 24 h d'incubation avec les NPs de 200 ou 400 nm en fonction des cultures (n=3)

Comme précédemment, seule l'IL-8 a été détectée à 24 h. Les valeurs de base de cette cytokine étaient de $92,503 \pm 16,202$ pg/mL pour les cellules Caco-2 et de $115,963 \pm 6,591$ pg/mL pour la co-culture. L'incubation des NPs de 200 nm pendant 24h a conduit à une diminution significative de la production d'IL-8 dans les deux types de cultures. Les sécrétions atteignaient alors des valeurs de $24,133 \pm 7,287$ pg/mL pour les cellules Caco-2 et de $38,83 \pm 7,366$ pg/mL pour la co-culture. Une baisse de sécrétion de l'IL-8 a également été mesurée en présence de NPs de 400 nm atteignant $10,397 \pm 1,254$ pg/mL pour les cellules Caco-2 et $27,073 \pm 4,665$ pg/mL pour la co-culture.

• **4h vs 24 h d'incubation**

Une comparaison des sécrétions d'IL-8 a été réalisée entre les Caco-2 et la co-culture, pour les différents temps d'incubation et les deux tailles de NPs (**Fig. 5-36**).

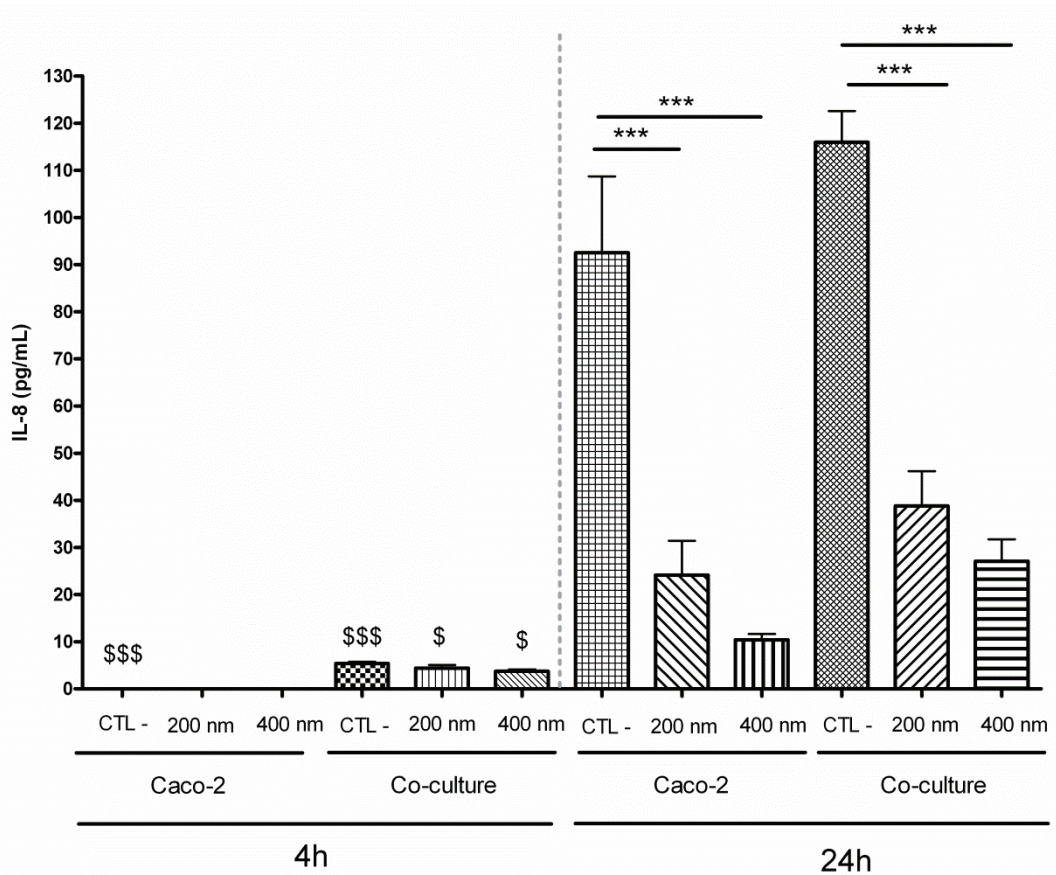


Figure 5-36 : Comparaison des sécrétions d'IL-8 en fonction de la taille des NPs et du temps d'incubation dans les deux types de culture
 (* : Comparaison intra-temps ; \$: Comparaison 4 h vs 24 H ; n=3)

On remarque que les sécrétions d'IL-8 sont plus importantes à 24 h qu'à 4h, quels que soient le type de culture et les conditions de traitement (contrôle ou NPs 200 ou 400 nm).

Après 24 h, l'incubation des NPs de 200 et 400 nm réduit significativement la sécrétion d'IL-8 dans la monoculture de Caco-2. Pour la co-culture, des résultats similaires ont été obtenus.

5.2.3. Discussion

L'incubation de quantités croissantes de NPs de 200 nm avec les deux types de cultures a permis de montrer, par la technique de cytométrie de flux, que la détection de la fluorescence associée aux cellules était proportionnelle à la quantité en NPs. La plus petite dose, 5 mg de PLGA, a permis une détection de l'internalisation. **Ces internalisations,**

dépendantes de la dose, n'ont pas engendré de perte de viabilité. Ces résultats peuvent paraître surprenants, notamment pour la dose de 50 mg qui représente une forte concentration en NPs. En effet, cette dose correspond à environ 10 UI d'insuline. Des données antérieures au laboratoire ont permis d'établir que 10 UI d'insuline permettaient la restauration de la normoglycémie chez le rat diabétique après injection en ID de NPs de 200 nm. Ainsi, la dose de 50 mg utilisée pour une surface de culture sur insert de 0,336 cm² est la dose injectée dans l'intestin d'un animal pour restaurer une normoglycémie. L'exposition de cellules dans des inserts de 0,336 cm² à 50 mg de PLGA mime donc des conditions d'exposition de la barrière intestinale aux NPs bien au-delà de celles qui sont susceptibles de survenir *in vivo*. Cette exposition s'est avérée non toxique lors d'expositions de 4h et 24 h, ce qui suggère une innocuité à court-terme de nos NPs au niveau digestif. La dose de 20 mg a été choisie pour la suite des études *in vitro*, car plus adaptée aux quantités utilisées *in vivo*.

D'autres études se sont intéressées à l'internalisation de NPs de PLGA en fonction de la concentration par des cellules Caco-2. Ainsi, Derakhshandeh *et al.* (2011) ont mesuré l'internalisation de NPs de PLGA de 110 nm contenant de la 9-Nitrocamptothécine, un anticancéreux, dans des cellules Caco-2 suite à une incubation de 3 h. Ils ont également trouvé que l'internalisation était proportionnelle à la dose de NPs (de 12,5 à 250 µg/mL) avec une absence de saturation de l'internalisation aux fortes doses de NPs. Semete *et al.* (2010) ont également évalué la viabilité des cellules Caco-2 suite à une incubation avec des concentrations croissantes de NPs de PLGA. Ces NPs de 374 nm, contenant de la Rhodamine-6G, ont été incubées pendant 48 h à raison de 0,001 à 0,1 mg/mL. Les résultats de ces études ont montré qu'il n'y avait aucune perte significative de viabilité des cellules Caco-2, avec un minimum de 75 % de viabilité pour les plus fortes doses. Enfin, Katsikari *et al.* (2009) ont évalué, en parallèle de l'internalisation, la viabilité de cellules Caco-2 exposées à des NPs. Ces NPs de BSA-FITC, d'une taille de 300 nm, ont été incubées pendant 4 h aux doses de 50 à 500 µg/mL. Les résultats ont montré une diminution de la viabilité cellulaire dans les conditions les plus concentrées en NPs (500 µg/mL). La quantification de la nécrose, réalisée par le dosage de la lactate déshydrogénase, a permis de montrer une cytotoxicité de ces NPs à cette même dose. Enfin, la quantification de l'internalisation a montré une augmentation de l'internalisation en fonction de la dose de NPs incubée. La plupart des études montrent donc que l'internalisation est proportionnelle à la quantité de NPs incubées, et semblent aussi suggérer une innocuité à court-terme des NPs à base de PLGA, même lors d'incubations à de fortes doses. Nos données sont donc en accord avec la littérature bien que nos tests aient été

réalisés sur deux systèmes cellulaires différents, afin de s'approcher au plus près du modèle biologique.

L'internalisation cellulaire des NPs en fonction de leur taille a été évaluée, afin de déterminer s'il était possible, en jouant sur la taille des NPs dans notre système de double encapsulation, d'augmenter l'efficacité d'absorption des NPs, et donc potentiellement la biodisponibilité de l'insuline. **L'évaluation de l'internalisation des NPs en fonction de leur taille, par les cellules Caco-2 et par la co-culture, après 4 h d'incubation, a montré que les NPs de 400 nm étaient les mieux internalisées. La viabilité cellulaire n'était pas affectée, quelle que soit la taille de NPs.** Ces résultats peuvent paraître surprenants par rapport à certaines données de la littérature. En effet, de nombreuses études semblent indiquer que les NPs de petite taille (inférieure à 100 nm) sont souvent mieux internalisées que les plus grosses. Desai *et al.* (1997) ont ainsi réalisé une étude d'internalisation de NPs de PLGA de 100 nm, 1 μm et 10 μm sur des cellules Caco-2. Ils ont ainsi démontré que les NPs de 100 nm étaient mieux internalisées que les NPs de taille supérieure. Cette étude ne va toutefois pas à l'encontre de nos résultats puisqu'elle n'a pas pris en compte les tailles entre 100 nm et 1 μm . Par ailleurs, nous avons montré qu'au-delà de 400 nm, l'internalisation des NPs diminuait. L'étude de Gaumet *et al.* (2009) réalisée avec des NPs de PLGA présentant des écarts de taille plus restreints (100, 300, 600, 1000 et 2000 nm) a toutefois montré, comme Desai *et al.* (1997), que les NPs de 100 nm étaient nettement mieux internalisées par les cellules Caco-2 que les NPs de plus grosse taille (dès 300 nm). Enfin, une étude comparative de l'internalisation de NPs de PLGA de 50, 100, 150, 200 et 300 nm dans des cellules Caco-2 et une monoculture de cellules Rev (Xu *et al.*, 2012) a été publiée récemment. Cette étude a montré une meilleure internalisation des NPs de 100 nm dans les deux types de culture. La monoculture de cellules Rev ne forme pas un tapis cellulaire intègre avec des jonctions serrées solidaires. De plus, les cellules Rev ont un phénotype de cellule caliciforme avec une très faible proportion de cellules absorbantes. L'internalisation des NPs par ces cellules Rev décrite dans cette dernière étude est donc moins représentative de la physiologie et des résultats *in vivo* par rapport à notre étude. Cependant, les résultats obtenus avec les cellules Caco-2 sont différents des nôtres. Les auteurs ont utilisé des NPs de PLGA de différentes tailles, dont seulement une taille (environ 240 nm) a été synthétisée avec du PVA. Les autres tailles de NPs ont été synthétisées avec du bromure de diméthyl ammonium, un surfactant cationique, qui rend la charge de surface des NPs positive (environ 50 mV, contre -1,4 mV pour les NPs non enrobées). Cette différence de charge de surface modifie alors les paramètres d'absorption, et

peut expliquer les différences observées entre nos résultats et ceux de Xu *et al.* (2012). Nos résultats diffèrent aussi de ceux de Gaumet *et al.* (2009). Un paramètre de la formulation des NPs peut être l'explication de cette différence. En effet, pour obtenir les tailles de NPs souhaitées, les auteurs ont fait varier le pourcentage de PVA lors de la synthèse des NPs. Notre approche à l'inverse a été de toujours utiliser les mêmes quantités de polymères et de tensio-actifs. Le PVA, comme le montre la publication de Xu *et al.* (2012), peut modifier la charge de surface des NPs. Toutefois, Gaumet *et al.* (2009) ont mesuré le potentiel zêta de leur NPs, et montré qu'il restait stable quelle que soit la concentration en PVA utilisée (de 1 à 5%). Un autre facteur que la charge, serait donc en cause dans la différence constatée entre nos résultats et ceux de Gaumet *et al.* (2009). Dans ces deux études, les auteurs ont quantifié l'internalisation des NPs après 4 h d'incubation par mesure de la fluorescence par spectroscopie après lyse des cellules. Dans notre cas, la mesure de la fluorescence des cellules a été quantifiée par cytométrie en flux, méthode plus spécifique.

L'étude de l'internalisation des NPs a ensuite été réalisée sur un temps d'incubation plus long, afin de confirmer les données obtenues à 4h. Ces travaux ont montré que l'internalisation des NPs par les cellules Caco-2 était potentialisée après 24 h d'incubation, ceci pour les NPs de 200 et 400 nm. De plus, à 24 h, les NPs de 400 nm étaient mieux internalisées par la culture de cellules Caco-2 que par la co-culture. Par ailleurs, comme lors des incubations de 4 h, aucune perte de viabilité cellulaire n'a été observée suite aux incubations de 24 h quelle que soit la taille des NPs.

Les premières études d'internalisation ont été réalisées après 4 h d'incubation, car des travaux antérieurs du laboratoire avaient montré que ce temps était optimum pour l'internalisation des NPs de 200 nm. De plus, les données de la littérature étaient en accord avec ce temps (Desai *et al.*, 1997; Gaumet *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2012). L'étude de l'internalisation après 24 h d'incubation a été réalisée, afin de savoir si les NPs pouvaient être internalisées de manière continue durant une période plus longue, comme dans les conditions physiologiques, et si la présence des NPs sur un temps prolongé engendrait une toxicité (Nafee *et al.*, 2009). Les données obtenues sur les cellules Caco-2 ont montré une augmentation de l'internalisation des NPs après 24 h d'incubation, comparée à 4 h d'incubation. Une internalisation supérieure de NPs n'a pas été mise en évidence sur les cellules de la co-culture après 24 h d'incubation. La comparaison des internalisations entre les deux types de culture a montré aussi une différence pour les NPs de 400 nm, avec pour résultats, une meilleure internalisation par les cellules Caco-2. Ces différences peuvent s'expliquer par l'absence de mucus dans la monoculture de

cellules Caco-2. En effet, la présence de mucus, continuellement renouvelé (Lai *et al.*, 2009), dans la co-culture, peut éloigner les NPs des membranes cellulaires ou les piéger, et ainsi affecter l'internalisation (Ensign *et al.*, 2012; des Rieux *et al.*, 2006). Lehr *et al.* (1991) ont déterminé la clairance et le renouvellement total du mucus dans le tractus gastrointestinal du rat. Le renouvellement total est assuré toutes les 4 à 6 h. Les NPs de 400 nm, plus grandes que les NPs de 200 nm, peuvent alors être retenue dans le mucus, qui une fois renouvelé, éloigne les NPs de la surface apicale des cellules.

L'étude de l'apoptose et de la nécrose a montré que l'incubation des NPs durant 24 h n'engendrait pas de perte de viabilité. Les études précédemment mentionnées de Semete *et al.* (2010) ont rapporté des résultats similaires aux nôtres, montrant une absence de perte de viabilité des cellules Caco-2, et ceci après 48 h d'incubation avec des concentrations croissantes en NPs de PLGA.

Les mesures de TEER et de Papp ont confirmé l'absence de cytotoxicité de nos NPs, comme suggéré par la mesure de l'apoptose et de la nécrose au cours des expériences d'internalisation. En effet, aucune perte d'intégrité des monocouches cellulaires n'a été observée, que ce soit après 4 h ou 24 h d'incubation avec les NPs. En effet, les mesures de TEER n'ont pas montré de diminution de la résistance membranaire, que ce soit en présence de quantités croissantes de NPs, pour des tailles 200 et 400 nm, ou à différents temps d'incubation. De nombreuses études se sont également intéressées à la conservation de l'intégrité membranaire lors de l'incubation de NPs PLGA sur des cellules Caco-2. Ainsi, Derakhshandeh *et al.* (2011) et Cartiera *et al.* (2009) confirment l'absence de modification de la TEER après 3 h d'incubation. A l'opposé, Roger *et al.* (2010) qui ont réalisé l'étude durant 6 h avec des NPs de PLGA contenant du paclitaxel, ont montré une légère diminution de la TEER de 20%. Ces données confortent nos travaux puisque, dans notre étude, des diminutions non significatives de TEER ont été observées. Ainsi, nous pouvons conclure que la TEER n'étant pas notablement modifiée, les NPs n'entraînent certainement pas d'ouverture des jonctions serrées. Cette hypothèse est en accord avec l'absence de modification de la perméabilité des marqueurs LY et Dextran-20.

En accord avec ces données de viabilité cellulaire et d'intégrité membranaire, l'étude de visualisation du mucus sur les co-cultures a montré que la présence des NPs n'entraîne pas de modification de ce mucus. En effet, la synthèse et la sécrétion du mucus sont des phénomènes physiologiques, mais peuvent être amplifiés en cas de stress subi par la

cellule caliciforme (Smirnova *et al.*, 2003). La synthèse et la sécrétion de mucus sont ainsi régulées par différentes voies ou stimuli, comme l'innervation et les médiateurs inflammatoires (Branka *et al.*, 1997; Plaisancié *et al.*, 1998). Des travaux ont d'ailleurs montré (Jeong *et al.*, 2010) que l'administration par voie orale de NPs d'argent de 60 nm chez des rats entraînait une décharge du mucus par les cellules caliciformes au niveau intestinal. En effet, les auteurs de ces travaux ont observé une absence de mucus dans les granules des cellules caliciformes intestinales des rats traités par les NPs par rapport aux témoins et en ont déduit qu'une hypersécrétion du mucus s'était produite en réponse à l'agression cellulaire. Bien que les auteurs aient interprété ces résultats comme un rôle bénéfique des NPs, cette hyperproduction de mucus doit être considérée comme une réponse cellulaire à une agression. Il est essentiel de rappeler que le mucus constitue une barrière physique entre le tissu sous-jacent et les micro-organismes, les toxines qu'ils produisent et les autres substances potentiellement nocives présentes dans la lumière intestinale. Dans l'intestin normal, l'érosion de la couche de mucus du côté de la lumière est due à l'action d'enzymes et au frottement des matières en cours de la digestion; cette érosion doit être compensée par une production et une sécrétion en provenance de la muqueuse pour garantir l'intégrité de la barrière. Ainsi, la déplétion de mucus induite par les NPs pourrait non seulement limiter l'action protectrice de ce mucus, mais aussi, en cas d'hypersécrétion, bloquer le passage de ces NPs à travers la barrière intestinale pour atteindre le sang. Dans nos conditions opératoires, aucune perte de mucus n'a été observée dans notre modèle de culture suite à l'incubation des NPs, suggérant qu'un tel effet délétère ne serait pas à craindre *in vivo* à court-terme.

L'analyse de la réponse cytotoxique par la quantification des cytokines pro-inflammatoires n'a pas montré d'augmentation de sécrétion de ces cytokines en réponse aux NPs dans nos deux modèles cellulaires. En outre, seule l'IL-8 était sécrétée de manière basale dans les deux modèles et l'ajout de NPs a entraîné une diminution de cette sécrétion. Des études ont montré la sécrétion d'IL-8 par ces mêmes modèles cellulaires (Van de Walle *et al.*, 2010). Cependant, au cours de notre étude, aucune autre cytokine n'a été détectée parmi les cytokines sélectionnées. La diminution d'IL-8 obtenue lors de l'incubation des cellules avec les NPs pourrait s'expliquer par l'internalisation des NPs qui libèreraient alors l'insuline dans la cellule. En effet, les propriétés anti-inflammatoires largement démontrées de l'insuline pourraient expliquer cette diminution (Dandona *et al.*, 2009; Vos *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012). De plus, cette hypothèse est confortée par les résultats obtenus

avec les NPs de 400 nm. En effet, ces NPs qui étaient les mieux internalisées dans notre étude, étaient aussi celles qui ont induit une diminution plus marquée de la sécrétion d'IL-8.

Les NPs de 200 et 400 nm doivent maintenant faire l'objet d'études plus approfondies sur leurs modalités de passage de la barrière intestinale. En effet, la taille des NPs joue un rôle important sur les mécanismes d'internalisation (passage actif ou passif). De plus, l'exocytose des NPs, ou de l'insuline doit être confirmée afin de valider la fonctionnalité du système avant les études *in vivo*. Enfin, la visualisation de cette internalisation est un paramètre tout aussi important. Une fois ces informations obtenues, l'étude *in vivo* de la biofonctionnalité des systèmes nanoparticulaires doit être réalisée afin de conclure sur la taille des NPs qui répond le plus au cahier des charges fixé en termes de sécurité et de fonctionnalité.

5.3. Evaluation des modalités de passage des nanoparticules

5.3.1. Etude des mécanismes impliqués dans l'internalisation des NPs

Les mécanismes d'internalisation des NPs peuvent différer selon la taille, la charge ou la nature de la NP. Afin de déterminer les mécanismes d'internalisation des NPs, deux approches ont été testées. La première a consisté en l'inhibition des mécanismes actifs d'internalisation par la température, et la deuxième en l'inhibition des différentes voies d'internalisation par des agents chimiques. Ces travaux ont été réalisés sur des monocultures de cellules Caco-2 et sur des co-cultures.

5.3.1.1. Effet de la température sur l'internalisation des NPs

Des expériences d'internalisation ont été réalisées à 37°C et 4°C, afin d'étudier l'implication des mécanismes actifs dans l'internalisation de nos NPs. Dans ces expériences, des NPs de 200 ou 400 nm, contenant de l'insuline-FITC, ont été incubées pendant 4h avant mesure de l'internalisation en cytométrie en flux.

La **figure 5-37** représente les résultats obtenus avec les monocultures de cellules Caco-2.

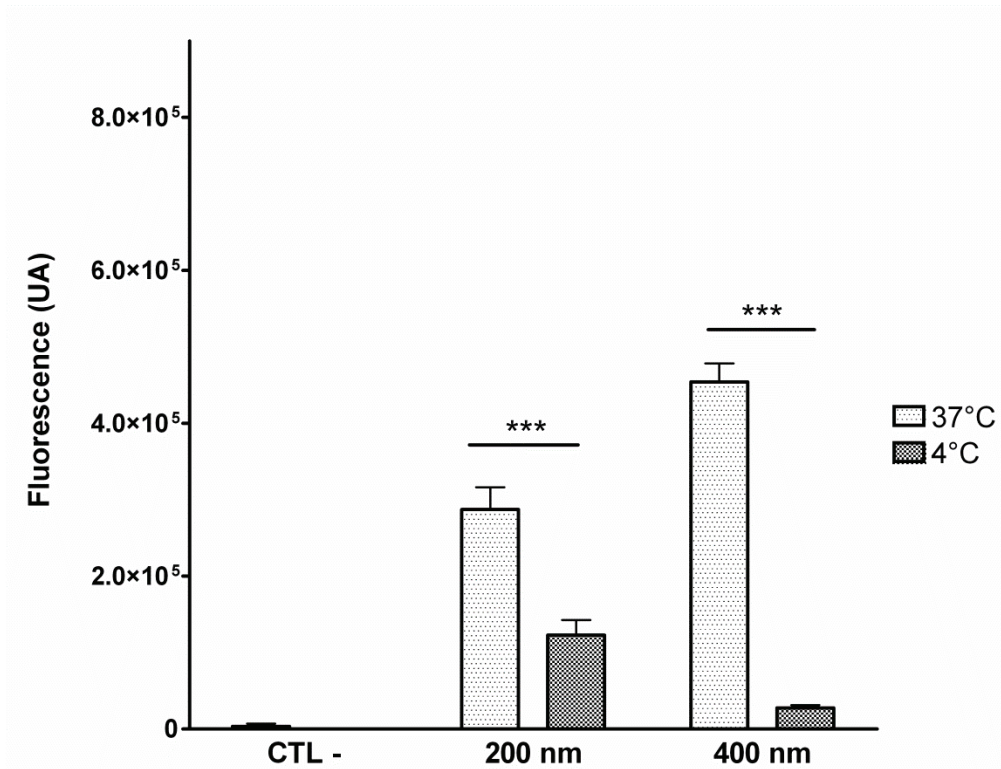


Figure 5-37 : Quantification par cytométrie en flux de l'internalisation des NPs après 4 h d'incubation à 4°C ou 37°C avec des cellules Caco-2 (n=3)

Les résultats ont montré que l'internalisation des NPs de 200 nm est significativement diminuée à 4°C ($1,22 \cdot 10^5 \pm 2,00 \cdot 10^4$ pour une incubation 4°C versus $2,87 \cdot 10^5 \pm 2,9 \cdot 10^4$ pour une incubation à 37°C). Des résultats similaires ont été obtenus pour les NPs de 400 ($2,74 \cdot 10^5 \pm 3,8 \cdot 10^4$ versus $4,54 \cdot 10^5 \pm 2,24 \cdot 10^4$).

L'étude a également été réalisée sur la co-culture (Fig. 5-38).

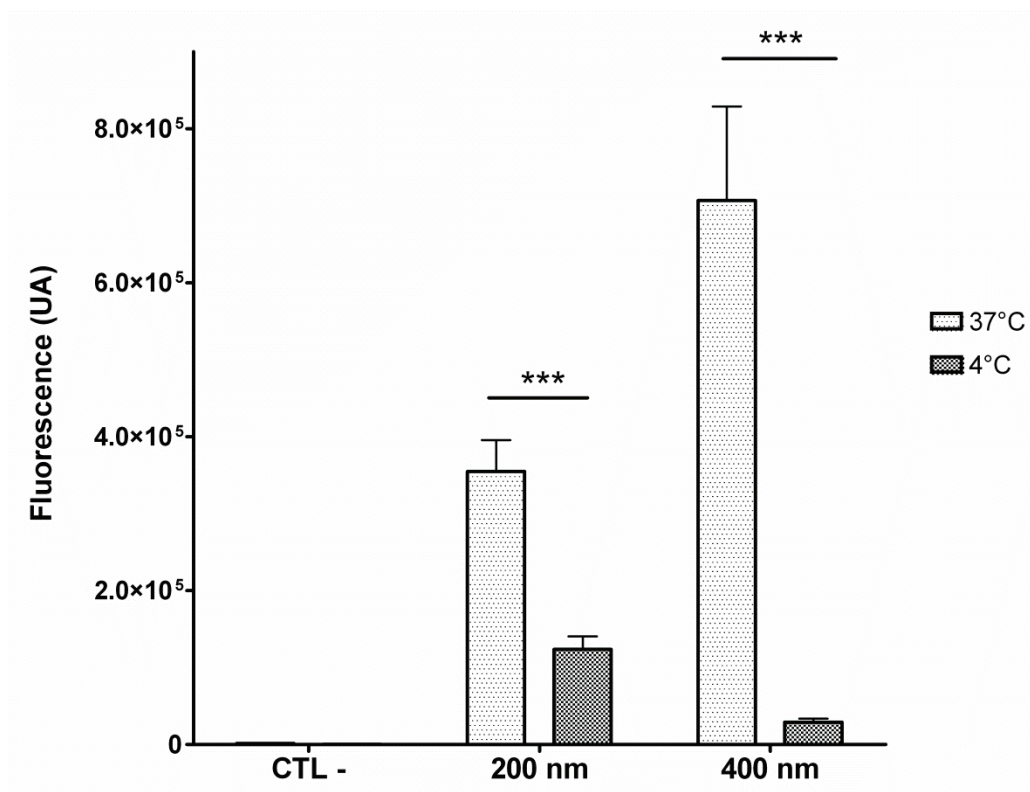


Figure 5-38 : Quantification par cytométrie en flux de l'internalisation des NPs après 4 h d'incubation à 4°C ou 37°C sur la co-culture (n=3)

Comme pour les cellules Caco-2, nous avons observé une diminution significative de l'internalisation des NPs de 200 et 400 nm à 4°C.

5.3.1.2. Effet d'inhibiteurs des voies d'internalisation

Afin déterminer la voie impliquée dans l'internalisation des NPs, des inhibiteurs des différentes voies d'internalisation ont été ajoutés aux cultures (Fig. 5-39). Ce travail a été réalisé sur des NPs de 200 nm, uniquement.

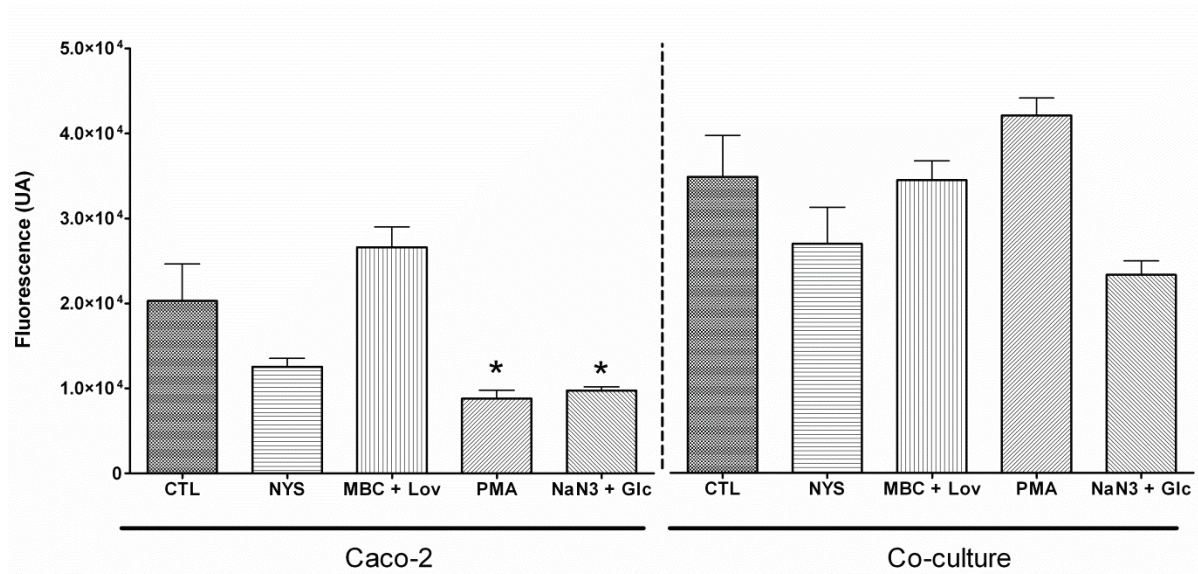


Figure 5-39 : Quantification par cytométrie en flux de l'internalisation des NPs de 200 nm dans les cellules Caco-2 ou la co-culture traitées ou non avec des inhibiteurs de voies d'internalisation (MBC : Méthyl- β -cyclodextrine, Lov : Lovastatine, NYS : Nystatine, PMA : Phorbol 12-myristate 13-acétate, NaN₃ : Azide de sodium, Glc : 2-désoxy-D-glucose, n=3, * vs CTL)

L'internalisation des NPs de 200 nm dans les conditions « témoin » était de $2,08.10^4 \pm 6,16.10^3$ pour les cellules Caco-2 et de $3,48.10^4 \pm 6,9.10^3$ pour la co-culture. L'ajout des inhibiteurs n'a entraîné aucune variation significative de l'internalisation des NPs dans le cas de la co-culture. Pour les cellules Caco-2, le PMA et l'association NaN₃ + Glc ont entraîné une diminution significative de cette internalisation ($8,82.10^3 \pm 1,38.10^3$ et $9,77.10^3 \pm 5,95.10^2$ respectivement).

5.3.2. Etude de l'exocytose des NPs

Afin d'évaluer l'exocytose des NPs, des monocultures de cellules Caco-2 et des co-cultures ont été incubées pendant 4 h avec des NPs contenant de l'insuline-FITC. Après ces 4 h d'incubation, le surnageant de culture a été retiré, afin d'éliminer les particules non internalisées, et remplacé par du milieu de culture sans NPs. Les cellules ont été incubées dans ce nouveau milieu de culture pendant 4 h supplémentaires afin de permettre leur exocytose. Au bout de ces 4h supplémentaires, les cellules ont été analysées en cytométrie en flux. Dans ces expériences, les conditions contrôles correspondaient à des cellules qui ont été analysées sans réaliser la période d'exocytose, i.e. dès la fin de la période d'internalisation. Ce travail a été réalisé sur des NPs de 200 et 400 nm.

La **figure 5-40** représente les résultats obtenus avec les cellules Caco-2.

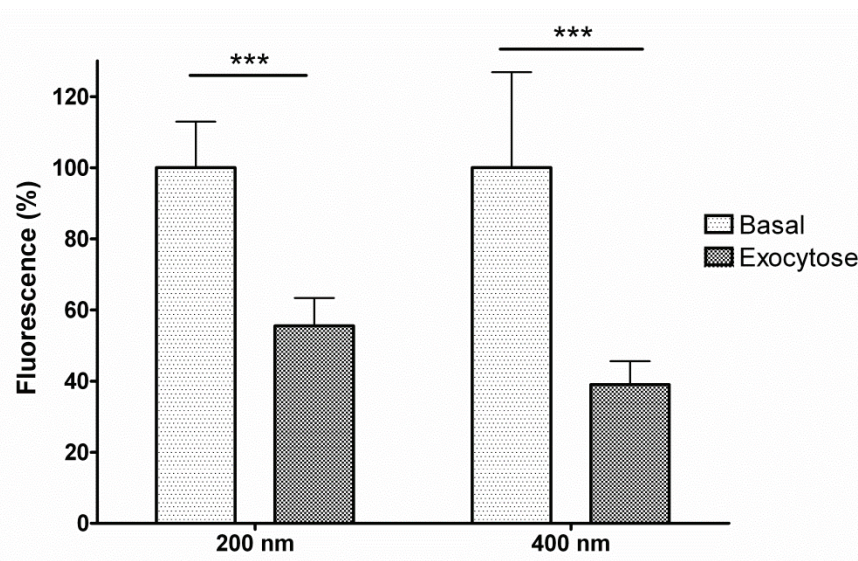


Figure 5-40 : Quantification par cytométrie en flux de l'exocytose des NPs de 200 et 400 nm par les cellules Caco-2 après 4 h (n=3)

Sur les cellules Caco-2, l'étude a montré qu'après retrait des NPs, une diminution significative des NPs internalisées est observée. Pour les NPs de 200 nm, la valeur d'internalisation est de $55,53 \pm 7,79$ % par rapport à l'internalisation contrôle, et pour les NPs de 400 nm elle n'est plus que de $39,00 \pm 6,54$ %.

La **figure 5-41** représente les résultats obtenus avec la co-culture.

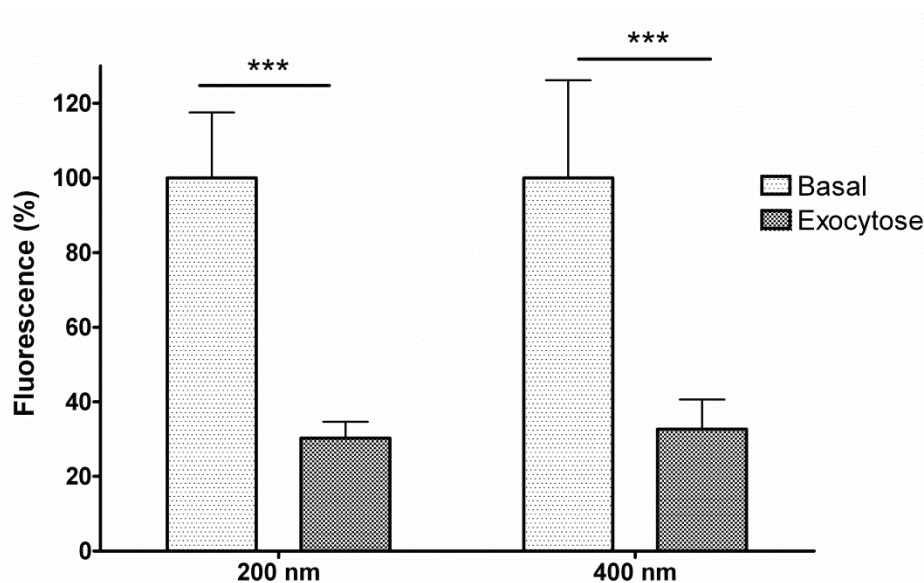


Figure 5-41 : Quantification par cytométrie en flux de l'exocytose des NPs de 200 et 400 nm par la co-culture après 4 h (n=3)

Avec la co-culture, des résultats similaires ont été obtenus. En effet, une diminution significative de l'internalisation a été mesurée avec les deux types de NPs ($30,23 \pm 4,37$ % pour les NPs de 200 nm par rapport à l'internalisation de base, et $32,68 \pm 7,89$ % pour les NPs de 400 nm).

5.3.3. Visualisation de l'internalisation par microscopie à illumination structurée

L'internalisation des NPs a été visualisée par microscopie à illumination structurée. Cette étude avait pour objectif de confirmer les études de cytométrie en flux.

Dans ces expériences, des cellules Caco-2 et des co-cultures ont été incubées avec des NPs d'insuline-FITC de 200 nm et 400 nm durant 4 h et 24 h. Les membranes cellulaires ainsi que le noyau ont été marqués, afin de délimiter les contours des cellules et de s'assurer de l'internalisation des NPs (**Fig. 5-42**).

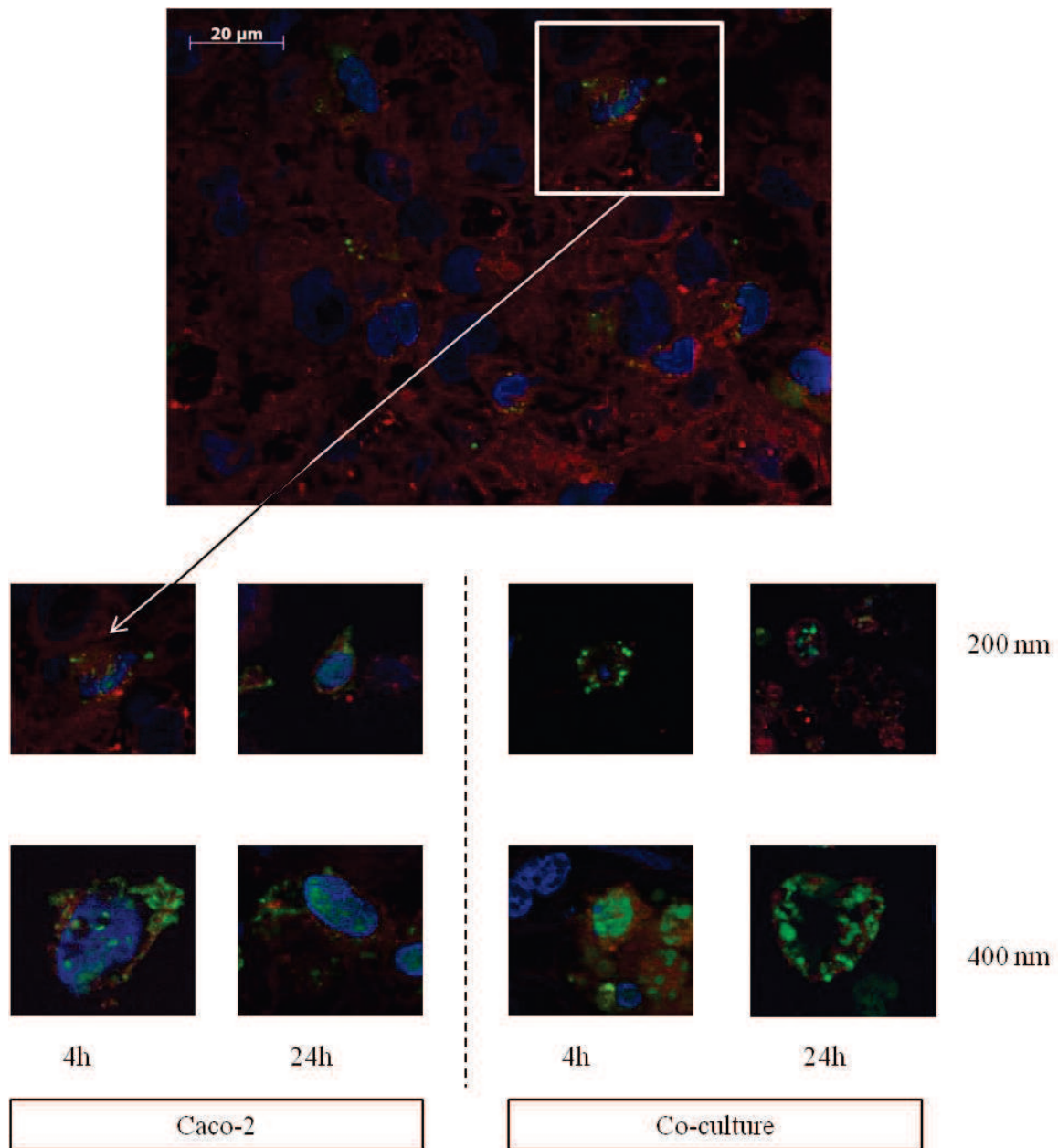


Figure 5-42 : Observation par microscopie à illumination structurée de l'internalisation des NPs de 200 et 400 nm après 4 h et 24 h d'incubation avec des cellules Caco-2 et la co-culture

Les résultats ont montré la présence d'un marquage fluorescent dû à l'insuline-FITC suite à une incubation de 4 h ou de 24 h avec des NPs de 200 ou 400 nm dans les deux types de culture. Aucune différence de marquage n'était visible entre les cellules Caco-2 et la co-culture. Pour toutes les conditions, le signal fluorescent a été visualisé dans le cytoplasme des cellules, mais aussi co-localisé avec le noyau.

5.4. Evaluation de l'efficacité et de la sécurité des NPs *in vivo*

L'évaluation de l'efficacité *in vitro* a montré que les NPs de 200 et 400 nm pénétraient dans les cellules sans engendrer de toxicité. Dans une suite logique, l'efficacité et la sécurité de ces NPs doivent être confirmées *in vivo* chez le petit animal de laboratoire. Afin réaliser ce travail, nous avons tout d'abord mis en place un modèle de rats insulinopéniques. Dans ce modèle, nous avons ensuite évalué l'efficacité de nos NPs à délivrer l'insuline suite à une administration intrapéritonéale (IP) ou intraduodénale (ID), grâce au suivi de l'évolution de la glycémie des animaux et à la détermination de la biodisponibilité de l'insuline. Ces évaluations ont été suivies d'une étude histopathologique du tissu intestinal, afin de vérifier la sécurité des NPs.

5.4.1. Mise en place du modèle de rats insulinopéniques

L'insulinopénie induite par la streptozotocine (STZ) a été utilisée comme modèle de diabète chez le rat. La mise en place du modèle a consisté à déterminer la dose de STZ nécessaire à l'obtention d'une insulinopénie significative et reproductible. Pour cela, deux doses différentes de STZ (65 ou 75 mg/kg) ont été injectées en intrapéritonéal à des rats et des suivis de la masse corporelle, de la glycémie et de la C-peptidémie ont été réalisés.

La **figure 5-43** représente le suivi de la masse corporelle des animaux dans les jours suivant l'administration de STZ.

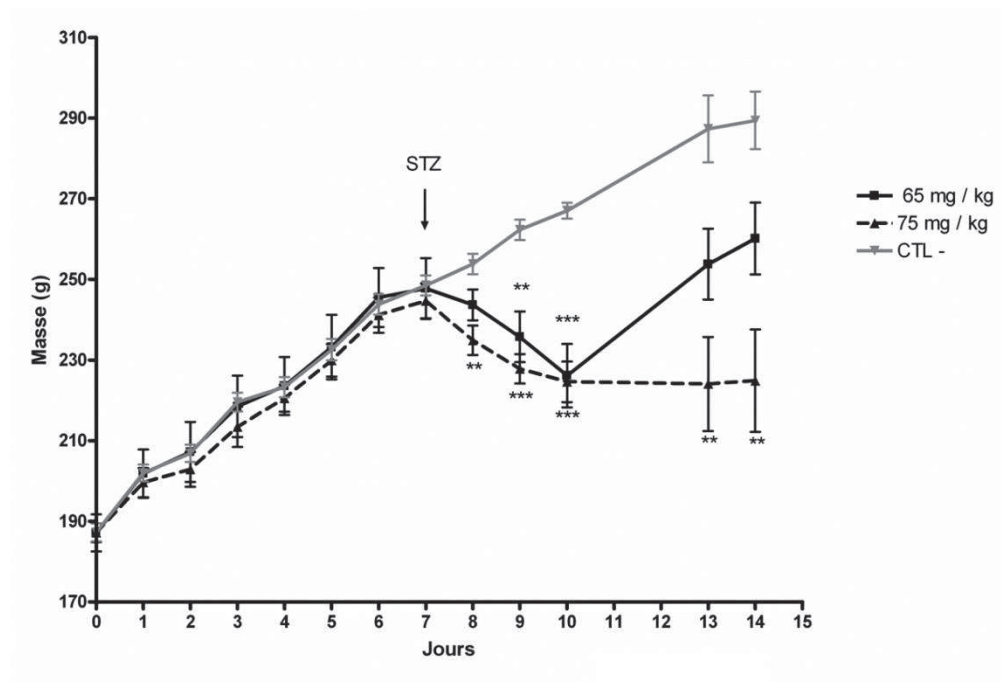


Figure 5-43 : Evolution de la masse des rats après injection de streptozotocine (* : vs CTL -, 65 mg / kg n=4, 75 mg/kg n=10, CTL - n=4)

Durant les 7 premiers jours précédant l'administration de STZ, la masse corporelle des animaux a augmenté dans les différents lots d'animaux. Le jour de l'injection, elle était alors de $246,45 \pm 2,63$ g en moyenne pour tous les rats. Dès le jour suivant l'injection de STZ, la masse des rats se distingue entre les groupes. En effet, les rats ayant reçu 65 et 75 mg / kg de STZ ont un poids plus faible que les rats témoins. La masse de ces deux groupes de rats diminue jusqu'au 3^{ème} jour après injection. Elle est alors de $226,13 \pm 7,89$ g pour le groupe à 65 mg/kg et de $224,6 \pm 5,04$ g pour le groupe à 75 mg/kg, alors que les rats témoins pèsent $267,05 \pm 1,99$ g. Sept jours après les injections de STZ, les rats ayant reçu une dose de 65 mg/kg ont une masse de $260,15 \pm 8,91$ g, qui n'est plus statistiquement différente de celle des rats témoins ($298,43 \pm 7,14$ g). En revanche, les rats ayant reçu la dose de 75 mg/ kg ont une masse moyenne de $224,85 \pm 12,69$, qui est significativement plus faible que celle des rats témoins.

La glycémie des rats a été mesurée pendant les 7 jours suivant l'administration de STZ (Fig. 5-44).

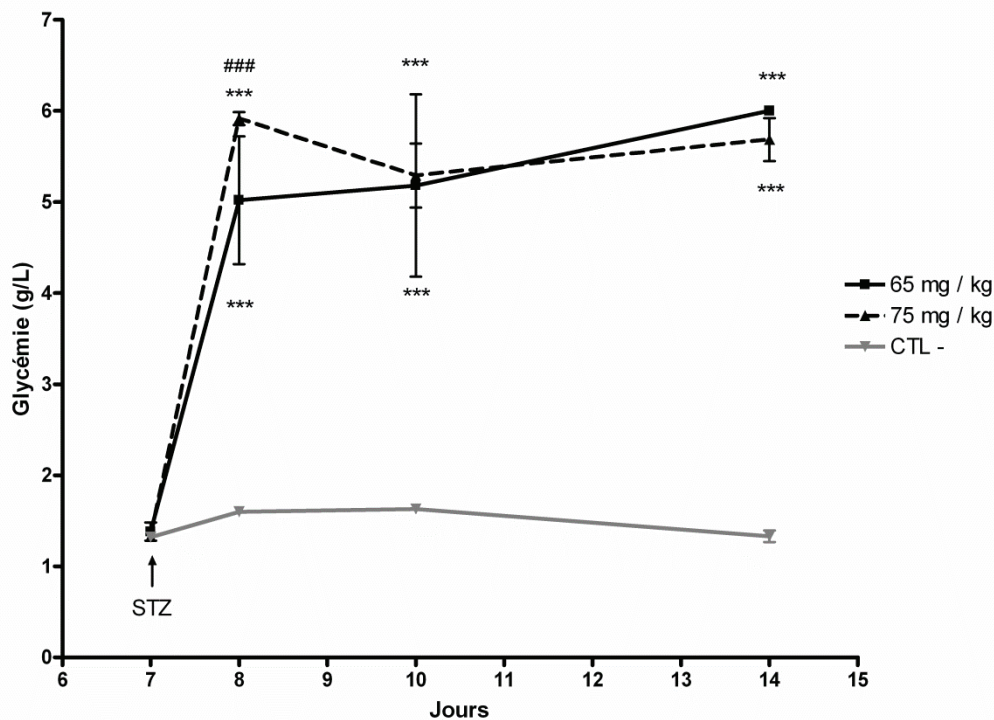


Figure 5-44 : Evolution de la glycémie des rats après injection de streptozotocine
 (* : vs CTL -, # vs 65 mg/kg, 65 mg/ kg n=4, 75 mg/kg n=10, CTL - n=4)

La moyenne de la glycémie des rats avant l'injection de la STZ, tous groupes confondus, était de $1,34 \pm 0,002$ g/L. Dès le jour suivant l'injection, les glycémies des rats STZ étaient significativement plus élevées que celle des rats témoins. Sept jours après l'injection, la glycémie moyenne des rats STZ restait significativement plus élevée que celle des rats témoins (STZ 65 mg/kg : 6 g/L ; STZ 75 mg/kg : $5,68 \pm 0,236$ g/L ; témoins : $1,33 \pm 0,063$ g/L).

La C-peptidémie, reflet de la production d'insuline, a aussi été mesurée tout le long de l'étude (Fig. 5-45).

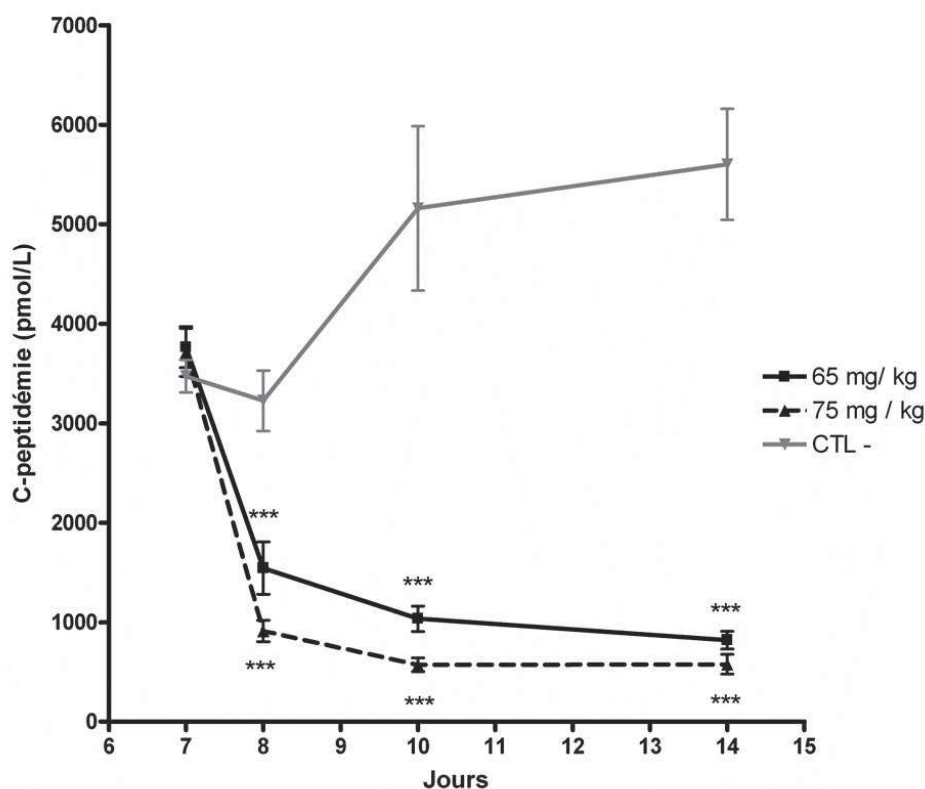


Figure 5-45 : Evolution de la C-peptidémie des rats après injection de streptozotocine (* : vs CTL -, 65 mg/ kg n=4, 75 mg/kg n=10, CTL - n=4)

Au moment de l'injection de STZ, la C-peptidémie moyenne des rats, tous groupes confondus, était de $3652 \pm 135,17$ pmol/L. Un jour après injection, les C-peptidémies des rats ayant reçu 65 ou 75 mg/kg de STZ étaient diminuées significativement par rapport aux rats témoins, et ce, jusqu'au 7^{ème} jour de suivi. A 14 jours, la C-peptidémie des rats témoins était de $5602,5 \pm 558,12$ pmol/L, alors que celle des rats ayant reçu 65 mg/kg de STZ était de $820,25 \pm 89,52$ pmol/L et celle des rats ayant reçu 75 mg/kg de STZ était de $577,9 \pm 101,02$ pmol/L.

Ces résultats ont permis de mettre au point notre modèle de rats insulino-péniques. Compte-tenu des résultats, la dose de 75 mg/kg de STZ a été définie comme la plus adaptée à ce modèle. En effet, cette dose entraîne une perte de poids continue, une hyperglycémie homogène, associée à une C-peptidémie basse. L'efficacité des NPs a donc été évaluée sur des rats insulino-péniques ayant reçu une injection intrapéritonéale de 75 mg/kg de STZ au moins une semaine avant administration des NPs.

5.4.2. Efficacité des NPs

Afin de vérifier l'efficacité biologique des NPs de 200 et 400 nm sur le petit animal, des NPs ont été injectées à des rats diabétiques, puis la glycémie et la biodisponibilité de l'insuline ont été étudiées.

5.4.2.1. Evaluation de la glycémie

Dans ces expériences, des NPs de 200 et 400 nm ont été injectées par voie intrapéritonéale ou par voie intraduodénale à des rats diabétiques à hauteur de 2 UI / 200 g de masse corporelle. Des rats contrôles ont reçu du sérum physiologique ou de l'insuline non encapsulée. La glycémie des rats a été mesurée durant 4 h après l'administration des NPs.

La **figure 5-46** présente les données obtenues après injection intrapéritonéale des NPs.

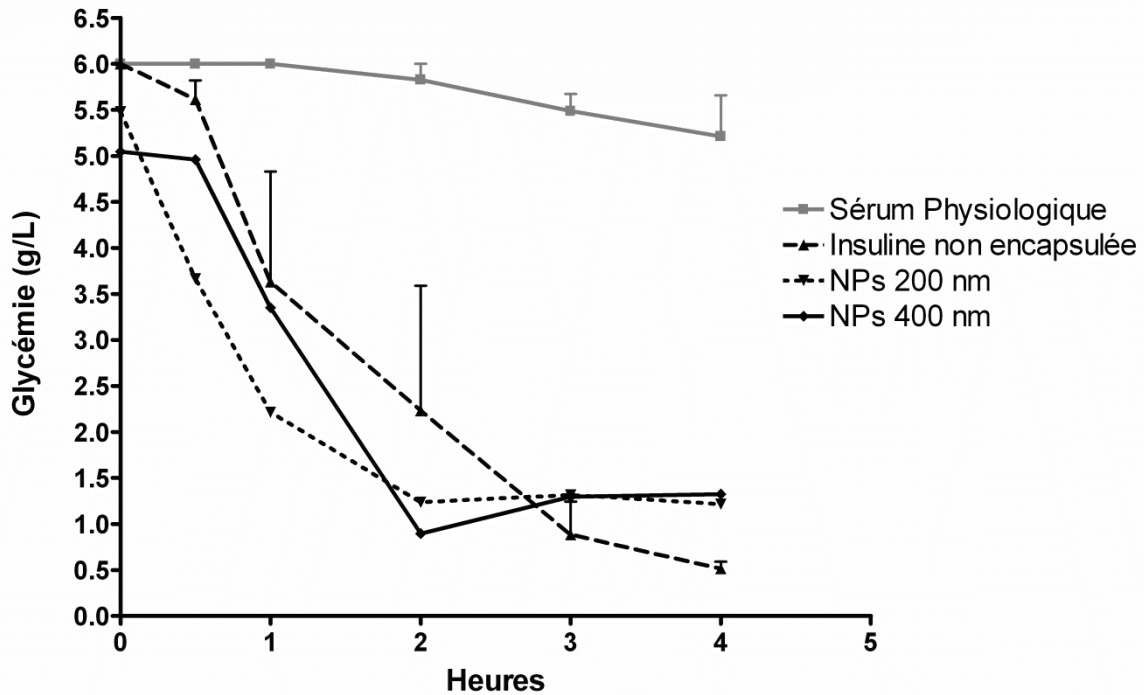


Figure 5-46 : Suivis glycémiques de rats diabétiques après administration intrapéritonéale de NPs de 200 et 400 nm, d'insuline non encapsulée et de sérum physiologique (NPs 200 nm n=2, NPs 400 nm n=2, Insuline non encapsulée n=3, Sérum physiologique n=3)

La glycémie des rats à T=0 variait entre 5,045 et 6 g/L. Les rats ayant reçu du sérum physiologique (n=3) ont eu une glycémie stable durant les 4 h de suivi, leur glycémie finale étant de $5,49 \pm 0,19$ g/L. Les rats ayant reçu de l'insuline non encapsulée, qui représente notre témoin positif, ont présenté une diminution de glycémie dès 1 h de suivi, et ont atteint l'hypoglycémie avec une valeur de $0,51 \pm 0,08$ g/L après 4 h de suivi. Les rats ayant reçu des NPs de 200 nm (n=2) ont vu leur glycémie diminuer plus rapidement que les rats ayant reçu de l'insuline non encapsulée ou des NPs de 400 nm (n=2). Les rats ayant reçu des NPs de 400 nm ont atteint la normoglycémie à 2 h, avec une glycémie de 0,90 g/L. Après 4 h, leur glycémie était de 1,33 g/L. Les rats ayant reçu des NPs de 200 nm avaient une glycémie à 4 h de 1,22 g/L.

Le système de double encapsulation prévoit une délivrance des NPs par la gélule dans l'intestin. L'efficacité des NPs a donc été également évaluée après administration intraduodénale à des rats diabétiques *via* un cathéter. Des lots d'animaux témoins ayant reçu de l'insuline non encapsulée ou du sérum physiologique ont été également inclus dans cette étude. Les mesures de la glycémie ont été réalisées à intervalles réguliers durant 8 h (Fig. 5-47).

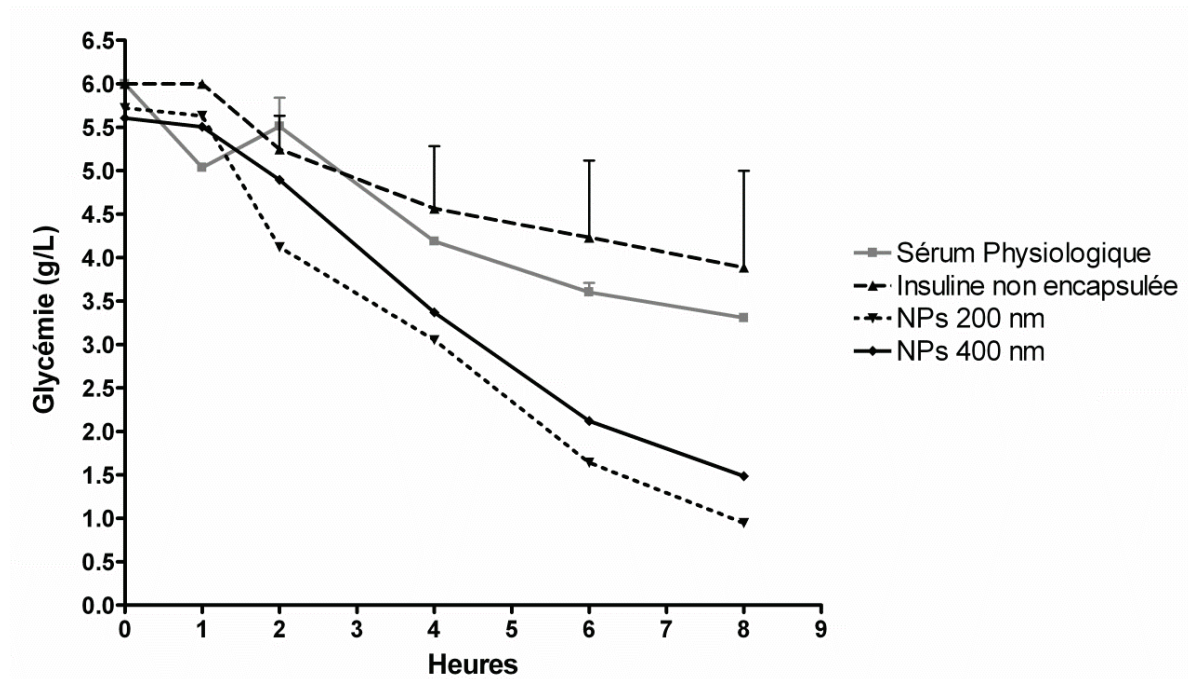


Figure 5-47 : Suivis glycémiques de rats diabétiques après administration intraduodénale de NPs de 200 et 400 nm, d'insuline non encapsulée et de sérum physiologique (NPs 200 nm n=2, NPs 400 nm n=2, Insuline non encapsulée n=3, Sérum physiologique n=3)

Durant le suivi, la glycémie a diminué progressivement dans tous les groupes d'animaux. Par contre, les valeurs de glycémie atteintes à 8h variaient fortement entre les groupes. Alors qu'elles étaient de $3,30 \pm 0,04$ g/L pour les animaux ayant reçu du sérum physiologique et de $3,88 \pm 1,11$ g/L pour ceux traités par l'insuline non encapsulée, elles ont atteint 0,94 g/L chez les rats ayant reçu les NPs de 200 nm et 1,48 g/L pour ceux ayant reçu des NPs de 400 nm (n=2).

5.4.2.2. Evaluation de la biodisponibilité de l'insuline

La biodisponibilité de l'insuline a été évaluée en dosant l'insuline plasmatique chez des rats portant à la fois un cathéter en IP ou ID pour l'administration des NPs et un cathéter en IC pour le prélèvement d'échantillons de sang en vue du dosage de l'insuline.

La biodisponibilité de l'insuline a tout d'abord été évaluée chez des rats ayant reçu de l'insuline non encapsulée, ou des NPs de 200 ou 400 nm en IP (n=1) (Fig. 5-48).

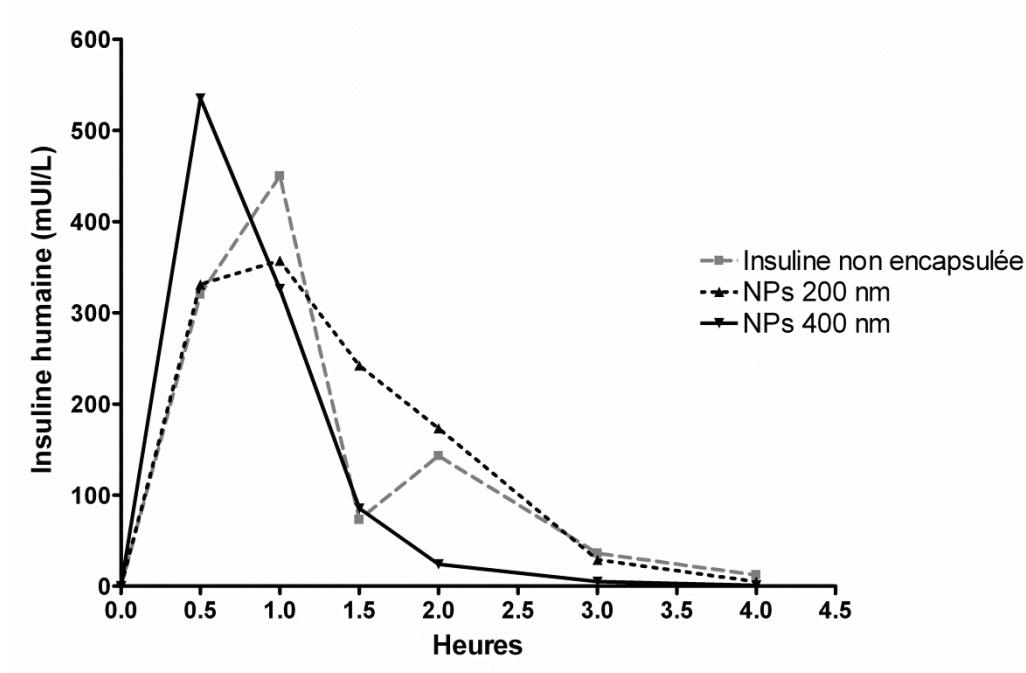


Figure 5-48 : Quantification par dosage ELISA de l'insuline plasmatique chez le rat diabétique après administration IP d'insuline non encapsulée ou de NPs (n=1)

Le dosage de l'insuline, par la méthode ELISA, a montré un pic d'insuline plasmatique 1 h après administration en IP de l'insuline non encapsulée, avec une valeur de 450 mUI/L. Ce pic a été atteint dès 30 min pour le rat ayant reçu 2 UI/200g de NPs de 400 nm, avec une valeur de 535,1 mUI/L. L'insuline était maximale à 1 h, avec une valeur de 357 mUI/L, pour le rat ayant reçu des NPs de 200 nm. L'aire sous la courbe de l'insuline non encapsulée a été de 570,9, celle de l'insuline contenue dans des NPs de 200 nm de 626,2, et celle de l'insuline véhiculée par des NPs de 400 nm de 496,9.

La biodisponibilité de l'insuline a aussi été évaluée chez des rats ayant reçu des NPs ou de l'insuline non encapsulée par injection ID (n=1) (Fig. 5-49).

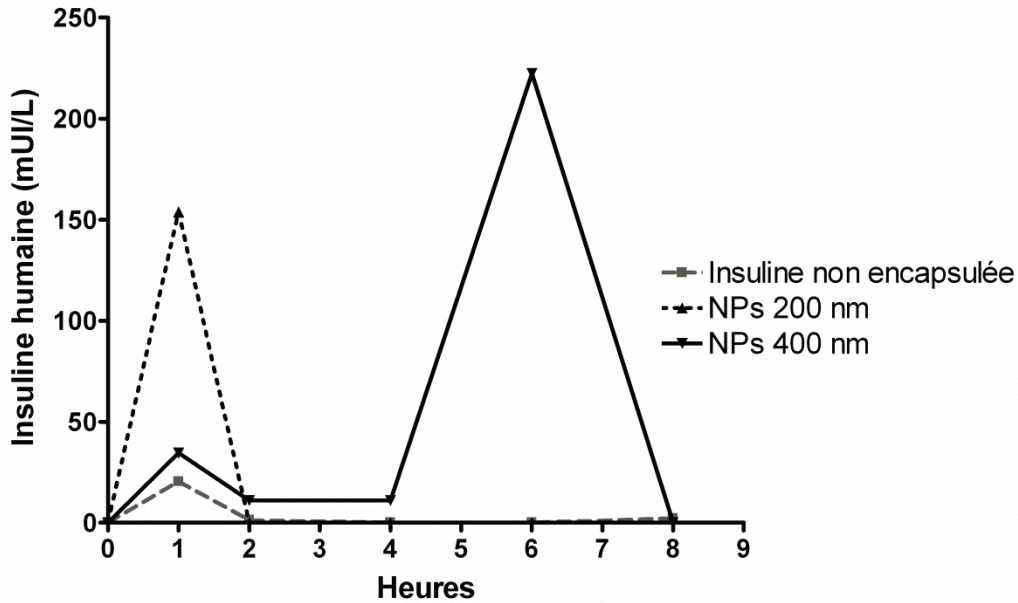


Figure 5-49 : Quantification par dosage ELISA de l'insuline plasmatique chez le rat diabétique après administration ID d'insuline non encapsulée ou de NPs (n=1)

La quantification de l'insuline plasmatique a montré la présence de plusieurs pics de biodisponibilité. Un premier pic a été quantifié pour les NPs de 200 nm, 1 h après administration, avec une valeur de 153,9 mUI/L. Pour l'insuline non encapsulée et pour les NPs de 400 nm, ce pic à 1 h était négligeable, avec une valeur de 20,4 mUI/L et 34,6 mUI/L, respectivement. L'insuline a ensuite diminué à 2 h et est restée nulle le reste du suivi, chez les rats traités par l'insuline non encapsulée et les NPs de 200 nm. Par contre, chez le rat ayant reçu les NPs de 400 nm un pic d'insuline avec une valeur de 222,4 mUI/L a été mesuré à 6 h, l'insulinémie redevenant nulle à 8h. L'aire sous la courbe de l'insuline non encapsulée a été de 24,55, alors que celle des NPs était de 153,9, et celle des NPs de 400 m de 518,3.

5.4.3. Evaluation de la sécurité des NPs *in vivo* par l'étude histopathologique de l'intestin

Les intestins des rats ayant reçu une injection intraduodénale de NPs, d'insuline non encapsulée ou de sérum physiologique ont été prélevés 8 heures après les administrations. Des coupes histologiques de 4 μm d'épaisseur ont été réalisées et colorées à l'hématoxyline et à l'acide périodique de Schiff, afin de réaliser une étude morphologique et de visualiser le mucus (Fig. 5-50).

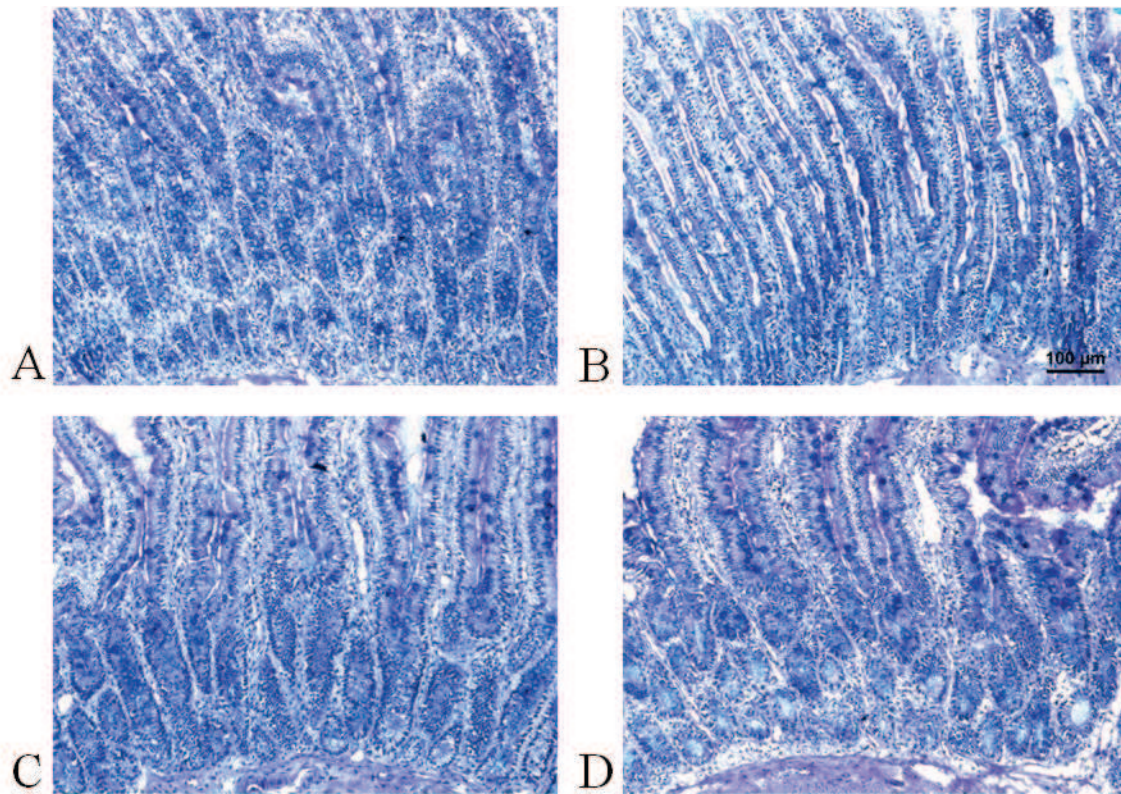


Figure 5-50 : Observation au microscope optique de l'épithélium intestinal de rats 8 h après injections intraduodénales (A : Sérum physiologique ; B : Insuman non encapsulé ; C : NPs de 200 nm ; D : NPs de 400 nm)

L'observation de ces coupes n'a montré aucune modification morphologique de la structure de l'intestin des rats ayant reçu de l'insuline non encapsulée, par rapport aux rats témoins. De plus, aucune différence de coloration du mucus n'a été observée entre les différents groupes. Des résultats similaires ont été obtenus pour les duodénums de rats auxquels une injection de NPs de 200 et de 400 nm a été réalisée.

5.4.4. Discussion

L'étude des mécanismes impliqués dans l'internalisation des NPs par les cellules Caco-2 ou la co-culture a montré que les NPs de 200 et 400 nm sont internalisées par des mécanismes actifs dépendants de l'ATP, par inhibition thermique ou chimique. De plus, les cellules Caco-2 ont internalisé les NPs de 200 nm selon des mécanismes cavéoline-dépendant.

Le passage transcellulaire suggéré par notre étude est connu pour les NPs (Damgé *et al.*, 1996), et a déjà démontré pour les NPs de PLGA (Cartiera *et al.*, 2009). En effet, le passage paracellulaire ne concerne qu'une faible proportion de particules, et concerne principalement les NPs de très petite taille, car les jonctions serrées, lorsqu'elles sont ouvertes, ne laissent

qu'un espace de 7 à 20 nm (Hussain *et al.*, 2001). Le passage des NPs de PLGA réalisées au laboratoire, est alors très limité.

Les résultats obtenus pour les NPs de 200 nm dans les cellules Caco-2 suggèrent que l'internalisation de ces NPs est cavéoline-dépendante. Cependant, certaines données de la littérature (Hillaireau et Couvreur, 2009; Zhu *et al.*, 2013) ont démontré que ce mécanisme concernait généralement les NPs de 120 nm environ. Au-delà de cette taille, les mécanismes de macropinocytose et de phagocytose entreraient en jeu. Cependant, plusieurs études ont montré que les NPs de PLGA (environ 100 nm) étaient endocytées de manière clathrine-dépendante (Harush-Frenkel *et al.*, 2007; Panyam et Labhasetwar, 2003a, 2003b). Une autre étude, de Wang *et al.* (2013), a été réalisée sur des NPs de PLGA de 274 nm. Ces NPs ont été incubées avec des cellules rénales de chien, et une évaluation des mécanismes d'internalisation a été réalisée. Les auteurs ont montré que les NPs étaient endocytées de manière cavéoline-dépendante, conformément à nos résultats. Ces données doivent encore être confirmées pour les NPs de 400 nm.

L'évaluation des mécanismes impliqués dans l'internalisation des NPs de 200 nm sur la co-culture n'a pas permis de mettre en évidence une voie d'internalisation particulière. L'inhibition par la température des mécanismes dépendant de l'énergie a été démontré dans la co-culture pour les NPs de 200 nm, alors que pour l'inhibition chimique, seule une tendance a été décelable ($p=0,074$). Cette différence peut provenir de l'hétérogénéité de la co-culture. En effet, après 21 j de culture, les cellules Caco-2 ont un phénotype entérocytaire alors que les cellules Rev ont un phénotype de cellule caliciforme. Les cellules Caco-2 sont absorbantes et les cellules Rev le sont très peu. L'inhibition des mécanismes actifs d'internalisation est alors diminuée au vue de la proportion de Caco-2 (75%).

L'étude de l'exocytose des NPs a suggéré que les NPs, ou l'insuline, internalisées par les cellules étaient également externalisées. En effet, nous avons montré une diminution significative de la fluorescence des cellules après avoir retiré les NPs non internalisées des cultures. Cette diminution de l'internalisation est bien associée à une exocytose et non à la dégradation du signal de fluorescence car l'évaluation de l'internalisation des NPs sur les cellules après 24 h d'incubation a bien montré une augmentation de ce signal. Cette technique ne permet cependant pas de renseigner sur le devenir de la NP. La diminution de l'intensité de fluorescence peut en effet être due à une exocytose des NPs elles-mêmes ou à une exocytose de l'insuline. Panyam et Labhasetwar (2003) ont étudié l'exocytose de NPs de PLGA (100 nm) par des cellules musculaires. Ils ont quantifié cette exocytose et ont montré que 63 % des

NPs de PLGA était exocytées au bout de 30 min après retrait des NPs non internalisées. De plus, ces auteurs ont utilisé des agents chimiques afin de bloquer tous les mécanismes dépendant de l'énergie, et ont ainsi pu mettre en évidence que l'exocytose de leur NPs dépendait de l'énergie. Reix *et al.* (2012) ont aussi montré une diminution du signal fluorescent imputé à des NPs de PLGA contenant de l'insuline-FITC (200 nm) dans des cellules Caco-2, suite au retrait des NPs des cultures. Dans cette étude, la diminution de l'intensité de fluorescence a été très rapide, pour atteindre une valeur nulle 4 h après retrait des NPs.

L'étude de l'internalisation des NPs par microscopie à illumination structurée a montré la présence du signal de l'insuline FITC dans les cellules, ceci après 4 h et 24 h d'incubation avec des NPs de 200 et 400 nm, quel que soit le type de culture cellulaire.

Le signal fluorescent a été détecté dans le cytoplasme, mais aussi a été co-localisé avec le noyau cellulaire sans différence entre les NPs de 200 et 400 nm. Des résultats similaires ont été décrits dans la littérature. D'autres études (Gaumet *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2012; Win et Feng, 2005) ont confirmé l'internalisation cellulaire des NPs PLGA par microscopie confocale. Gaumet *et al.* (2010) ont démontré que cette internalisation était dépendante de la taille avec une co-localisation avec le noyau plus importante pour les NPs de 100 nm que pour les NPs de 300 nm. Ces auteurs suggèrent d'ailleurs que les NPs de petites tailles peuvent être utilisées pour cibler le noyau. La distribution nucléaire est largement décrite pour les NPs de petite taille (<100 nm). Cependant, pour les NPs de taille plus importante, comme les NPs de 400 nm, la co-localisation avec le noyau est moins répandue. Aujourd'hui, les mécanismes de passage des NPs à travers la membrane nucléaire restent méconnus (Gaumet *et al.*, 2009; Lorenz *et al.*, 2006; Neumeyer *et al.*, 2011). A l'opposé, Liu *et al.* (2013) ont montré une absence d'internalisation des NPs de PLGA non fonctionnalisées. Ces résultats sont très probablement liés au temps d'incubation réalisés au cours de cette étude (1 h contre 4h pour notre étude). Dans notre étude, l'encapsulation de l'insuline-FITC dans les NPs ne nous renseigne pas sur les modalités de passage de ces NPs. En effet, l'insuline fluorescente peut être libérée après dégradation du PLGA dans la cellule, et l'insuline peut alors migrer dans le noyau ou dans différentes organelles. Un double marquage de l'insuline et du PLGA pourrait permettre de distinguer le passage de l'insuline du passage de la NP intègre.

La mise en place du modèle de rat « diabétique » a permis d'obtenir des rats insulinopéniques, en hyperglycémie chronique et ayant une prise de poids stabilisée. Ce

modèle a été mis en place à l'aide de deux doses de streptozotocine injectées par voie IP. Classiquement, deux molécules sont utilisées pour induire un diabète chez le rat : l'alloxane (ALX) et la streptozotocine (STZ) (Rees et Alcolado, 2005; Szkudelski, 2001). Ces agents pharmacologiques permettent une induction rapide du diabète sans acte chirurgical. Ils agissent comme des cytotoxiques, induisant la production de ROS et la destruction massive des cellules β pancréatiques. Dans cette mise au point du modèle diabétique, le choix de l'agent cytotoxique s'est porté sur la STZ, car cette molécule est plus stable que l'ALX avant et après injection (Lenzen, 2008). En effet, la STZ est aujourd'hui plus utilisée que l'ALX, car elle a une demi-vie plus longue et maintient l'hyperglycémie plus longtemps. De plus, l'ALX entraîne une acidocétose et entraîne une forte mortalité (Srinivasan et Ramarao, 2007). Les injections de 75 mg/kg de STZ ont permis de stabiliser le poids des rats par rapport aux rats non diabétiques, alors que les injections à 65 mg/kg ont entraîné une prise de poids quelques jours après l'injection. Ces résultats diffèrent de l'étude de Akbarzadeh *et al.* (2007), qui ont injecté une dose de 60 mg/kg de STZ à des rats du même poids (environ 250 g) et de la même espèce (mâles Wistar) que les nôtres. Cette étude a montré une perte de poids jusqu'à 40 j après l'injection suivie d'une phase de stabilisation. Des résultats similaires ont été obtenus dans l'étude de Wei *et al.* (2003), où le poids des animaux injectés à hauteur de 65 mg/kg de STZ a diminué, puis s'est stabilisé durant 24 j. Akbarzadeh *et al.* (2007) ont également étudié la C-peptidémie qui est statistiquement diminuée durant 80 j par rapport aux rats non diabétiques. L'étude de la glycémie des rats diabétiques a montré une hyperglycémie chronique, conforme à nos résultats.

L'administration intrapéritonéale des NPs de 200 et 400 nm a permis de diminuer la glycémie de nos animaux diabétiques et a donc montré l'efficacité des systèmes nanoparticulaires. L'administration intraduodénale des NPs de 200 et 400 nm a permis de diminuer la glycémie des animaux diabétiques démontrant l'efficacité de la protection de l'insuline par les NPs de PLGA. Les études préliminaires de biodisponibilité de l'insuline confirment ces résultats avec des cinétiques de libération de l'insuline qui diffèrent entre les NPs de 200 et 400 nm.

Les doses de NPs, en UI d'insuline, ont déjà été testées dans les travaux antérieurs du laboratoire. Ces résultats avaient montré que les doses de 2 UI / 200 g en IP et de 10 UI / 200 g en ID de NPs de 200 nm étaient suffisantes pour obtenir une normoglycémie chez le rat diabétique (Reix *et al.*, 2012). De plus, le choix des injections par cathéter a été fait afin de ne pas altérer la motilité intestinale. Ces injections permettent en effet d'administrer les NPs sur

des rats vigiles et dont la motilité intestinale n'est pas diminuée par l'anesthésie (Yuasa *et al.*, 1993).

L'administration IP a été réalisée afin de s'assurer que les modes de synthèse des NPs n'altéraient pas l'insuline et son efficacité. Les résultats ont montré une efficacité similaire des NPs par rapport à l'insuline non encapsulée. L'insuline n'est donc pas dénaturée. Ils confirment également que les NPs sont rapidement biodégradables et permettent *in vivo* la libération de l'insuline encapsulée.

Ces résultats sont confirmés par d'autres données de la littérature. Ainsi, Liu *et al.* (2007) ont encapsulé de l'insuline dans des NPs de PLGA et ont obtenu, après injection IP de ces NPs à des rats diabétiques, des profils similaires aux nôtres, avec une efficacité des NPs de PLGA semblable à l'insuline non encapsulée. A l'opposé, Yang *et al.* (2012) ont administré des NPs comparables par voie intraveineuse et ont démontré, de manière surprenante que l'insuline libre (insuline rapide) permettait une diminution de la glycémie jusqu'à 8 h, alors que les NPs permettaient une glycémie proche de la normoglycémie durant 54 h. La proportion entre acide lactique et acide glycolique que les auteurs ont utilisé pour la synthèse de leurs NPs est similaire à la nôtre, avec un ratio de 50 : 50. Cette délivrance prolongée de l'insuline ne s'explique alors pas par la proportion entre ces deux acides, qui modifie les paramètres de dégradation de la NP et la cinétique de libération de l'insuline.

L'administration en ID des NPs de PLGA de 200 et 400 nm a montré une efficacité des systèmes. L'administration de ces NPs a permis d'atteindre la normoglycémie au bout de 8 h pour les NPs de 200 nm. Pour les NPs de 400 nm, la normoglycémie n'a pas été atteinte, mais ces résultats doivent être confirmés par un effectif plus important (n=2). Le dosage de l'insuline plasmatique a montré que la cinétique de libération de l'insuline entre les NPs de 200 nm (1h) et 400 nm (6h) était différente, ce qui pourrait expliquer les différences de cinétiques obtenues sur les glycémies. De plus, les AUC ont montré des différences entre les NPs de 200 et 400 nm, avec une valeur plus importante pour les NPs de 400 nm. Ces résultats semblent différer des données antérieures obtenues au laboratoire pour les NPs de 200 nm. En effet, ces résultats antérieurs avaient montré une biodisponibilité de l'insuline de 6,3%. Les calculs de la biodisponibilité relative (résultats non montrés) ont montré une biodisponibilité de 4,9% pour les NPs de 200 nm et de 20 % pour les NPs de 400 nm. Ces résultats ne sont toutefois que préliminaires, aux vues du nombre insuffisant d'animaux utilisés. Cui *et al.* (2007) ont administré des NPs de PLGA de 150 nm par voie orale à des rats diabétiques à hauteur de 4 UI/200g. Ils ont obtenu une diminution de la glycémie des rats de 35 % au bout de 8 h de suivi, avec un pic d'insulinémie de 30 μ UI/mL à 4 h. La biodisponibilité de

l'insuline était de 3,6 %. Cependant, l'expression des résultats, en % de la glycémie initiale ne permet pas de savoir si les rats ont atteint la normoglycémie.

Yang *et al.* (2012) ont administré des NPs de PLGA de 246 nm par voie orale (6 UI/200g) à des rats diabétiques et ont obtenu des diminutions de glycémie durant les 24h suivant une administration unique. Ces résultats semblent discutables, quant à la résistance des NPs en milieu gastrique. En effet, les auteurs ont le même procédé de synthèse des NPs que le nôtre et utilisent les mêmes solvants (excepté dichlorométhane versus acétate d'éthyle) ainsi que les mêmes polymères.

L'étude histopathologique du duodénum des rats ayant reçu des injections ID de NPs de 200 et 400 nm a montré l'absence de réarrangement morphologique et l'absence de changements structuraux des tissus. L'administration ID de NPs de PLGA n'a pas générée de modification de l'intestin et des villosités. La coloration à l'acide périodique de Schiff n'a pas montré de granules à mucus vides, attestant de l'hypersécrétion de mucus en cas de stress subi par les cellules caliciformes (Jeong *et al.*, 2010). Cependant, cette étude représente une administration unique de NPs. Semete *et al.* (2010) ont administré par voie orale des NPs de PLGA de 100 à 250 nm contenant du PBS à des souris. Ils ont effectué des administrations répétées, avec une administration à J1, J5 et J10. Les auteurs ont réalisé une étude histopathologique sur différents tissus, mais aussi sur l'intestin. Aucune lésion pathologique n'a été détectée après administration orale des NPs, quelle que soit leur taille.

6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'administration d'insuline par voie orale est aujourd'hui un challenge. Les nombreuses barrières que rencontre l'insuline dans le tractus gastro-intestinal, qu'elles soient physiques ou chimiques, rendent ce mode d'administration quasiment impossible en l'état. Des stratégies de recherche, visant à contourner ces barrières ou à les limiter, sont à l'heure actuelle en voie de développement ou en étude clinique.

L'encapsulation de l'insuline dans des NPs est une stratégie visant à protéger l'hormone des milieux environnants rencontrés tout le long du tractus gastro-intestinal. L'utilisation de matériaux biodégradables et bioassimilables dans la conception des NPs encapsulant l'insuline fait que la stabilité de ces NPs dans l'estomac est très faible. Une deuxième encapsulation est alors nécessaire. Pour cela, une gélule gastrorésistante est utilisée, permettant de protéger les NPs dans l'estomac, puis de les libérer dans l'intestin, sans affecter leur intégrité.

Les NPs sont issues d'une technologie récente, et dont les mécanismes sont à l'heure actuelle toujours méconnus. La toxicité de ces particules fait aussi l'objet de craintes, notamment en raison de leur taille, qui permettrait l'infiltration de ces petits objets dans les organes et tissus.

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse, qui s'insère dans le projet ORAIL, a été articulé en quatre axes :

1. L'évaluation *in vivo* des propriétés de gastrorésistance et d'entérosolubilité de la gélule,
2. La synthèse de NPs d'insuline à base de PLGA, polymère biodégradable et bioassimilable, dans une gamme de taille allant de 100 à 800 nm,
3. L'évaluation de l'internalisation de ces NPs en fonction de leur dose et leur taille, ainsi que l'étude de leur sécurité *in vitro* dans des modèles d'épithélium intestinal,
4. L'évaluation des mécanismes impliqués dans l'internalisation des NPs et l'étude de leur efficacité *in vivo*.

Les résultats obtenus lors de l'évaluation *in vivo* de la gélule entérique ont montré la gastrorésistance de cette gélule. Celle-ci est alors à même de protéger les NPs de l'environnement gastrique.

Les synthèses de NPs d'insuline, quel que soit le mode d'agitation utilisé, ont permis d'obtenir des particules de différentes tailles avec une bonne reproductibilité. Ces NPs sont conformes au cahier des charges ; elles sont sphériques et anioniques. Les rendements

d'encapsulation de l'insuline dans le cas de NPs de 200 et 400 nm sont d'environ 70%. Ces rendements restent toutefois à confirmer par le dosage de l'insuline par HPLC, plus fiable, et indiquant des taux d'encapsulation de plus de 90%. Ainsi, nos protocoles de synthèse des NPs permettent l'incorporation d'une grande quantité d'insuline pour une faible quantité de polymère, et ceci, sans modification des propriétés physico-chimiques des NPs. La formulation de NPs avec de l'insuline Insuman[®], insuline 4 fois plus concentrée (400 UI/mL) en vue des études *in vivo*, a montré que les caractéristiques des NPs ainsi obtenues n'étaient pas modifiées (taux d'encapsulation de l'insuline, taille, charge de surface des NPs ...). L'utilisation de cette insuline concentrée dans nos NPs de PLGA pourrait alors permettre une administration élevée en insuline, sans augmentation de la quantité de NPs et donc de polymère.

Les études d'internalisation cellulaire des NPs d'insuline dans des modèles d'épithélium intestinal ont montré que cette internalisation est dépendante de la dose, mais également de la taille des NPs, les NPs de 400 nm semblant mieux internalisées, et ceci en absence de toute cytotoxicité. La visualisation des NPs par microscopie à illumination structurée a permis de confirmer cette internalisation. La présence du mucus dans les cultures n'a pas semblé être une barrière à l'internalisation des NPs. L'évaluation des modalités de passage transmembranaire des NPs d'insuline lors des études d'internalisation *in vitro* a montré que les NPs de 200 nm pénètrent dans la cellule grâce à des mécanismes actifs, et ceci de manière cavéoline-dépendante. Enfin, nous avons pu montrer qu'après internalisation, les NPs sont exocytées par le pôle basal des cellules. L'originalité de notre étude repose sur l'étude de plusieurs facteurs susceptibles d'affecter l'internalisation cellulaire et cytotoxicité des particules. En effet, les facteurs « dose » et « taille » des NPs ont été étudiés, et ceci dans des modèles cellulaires différents, permettant de mettre en évidence l'impact de la production de mucus. De même, l'évaluation de la sécurité des NPs s'est faite à travers plusieurs paramètres (viabilité cellulaire, perméabilité, production de mucus et de cytokines pro-inflammatoire), permettant une approche plus complète de l'étude de nos NPs. La différence majeure obtenue au cours de ce travail, par rapport aux données de la littérature, est que, en dessous de 400 nm, la taille des NPs ne semble pas influencer leur internalisation cellulaire. Cette donnée peut être considérée comme un double avantage. Le fait de pouvoir utiliser des particules de plus grande taille permettrait de diminuer les risques toxicologiques, les particules de taille nanométrique ayant une activité biologique, et donc toxicologique, plus importante, à masse

égale, que les particules de plus grande taille. Par ailleurs, le changement d'échelle de production des particules, nécessaire pour leur industrialisation, serait facilité.

L'administration intraduodénale des NPs d'insuline à des rats diabétiques a permis de diminuer progressivement la glycémie de ces animaux, démontrant la capacité de nos NPs de PLGA à délivrer l'hormone *in vivo* et suggérant que ces systèmes ont une action similaire à une insuline lente. L'administration orale de ces NPs pourrait donc peut-être permettre de remplacer les injections d'insuline lente, et concernerait, non seulement les diabétiques de type 1, mais également les diabétiques de type 2. L'étude histopathologique menée chez les animaux n'a pas montré d'altération morphologique de leur paroi intestinale. L'administration aiguë des NPs ne semble donc pas engendrer de toxicité locale.

Les résultats obtenus doivent cependant être encore approfondis. Tout d'abord, le rendement d'encapsulation de l'insuline dans nos NPs doit être confirmé par une méthode de dosage de l'insuline reconnue par la pharmacopée européenne, la méthode HPLC. Les résultats préliminaires obtenus au laboratoire par cette méthode ont montré des rendements d'encapsulation élevés (supérieurs à 90%) pour les NPs de 200 nm. Cette forte charge limitera les pertes en insuline non encapsulée lors des procédés de fabrication industrielle. Ceci apporte un avantage certain, quant à la diminution de la quantité de NPs à produire et à introduire dans la gélule. Le rendement d'encapsulation étant important, il sera possible, lors du changement d'échelle vers une production industrielle, de passer de quelques millilitres de synthèse, à l'échelle du laboratoire, à plusieurs litres de synthèse à l'échelle industrielle, sans qu'il y ait de fortes pertes en principe actif.

La synthèse des NPs de 200 nm se fait à l'heure actuelle à l'aide d'ultrasons, ce qui est une limite à la fabrication industrielle. Des procédés de synthèse alternatifs doivent alors être mis en place afin de permettre le transfert d'échelle, si cette taille de NPs est au final sélectionnée. Les procédés industriels engendreront certainement une augmentation de la taille des NPs. Cependant, nos résultats ont montré que l'augmentation de taille n'était pas une limite à l'efficacité de nos NPs (jusqu'à 400 nm). Des modes d'agitation standard utilisés dans l'industrie pharmaceutique pourront alors convenir à la synthèse des NPs. Les NPs de 400 nm sont aujourd'hui synthétisées à l'aide d'une tige rotative plongée dans les solutions de polymère et d'insuline. Cette méthode de synthèse n'est pas courante dans le cadre des productions industrielles. En effet, les agitations utilisées sont plutôt intégrées aux cuves de

synthèse (système à pales). Ces systèmes d'agitation devront alors produire des NPs ayant les mêmes caractéristiques que les nôtres.

L'efficacité *in vitro*, mais aussi *in vivo*, de nos NPs pourrait être encore potentialisée en optimisant leur formulation. En effet, les NPs sont « nues » et leur charge de surface est anionique. On sait que les NPs possédant une surface cationique interagissent de manière plus importante avec la surface des cellules. Une stratégie pour augmenter l'efficacité de nos NPs serait donc de modifier leur charge de surface. Plusieurs possibilités s'offrent à nous pour modifier la surface des NPs de PLGA. En effet, ces NPs peuvent être notamment enrobées par des composés cationiques, tels que le chitosane ou le PEG, permettant d'augmenter leur mucoadhésion et de favoriser leur interaction avec les membranes cellulaires. La limite de cette approche est son impact sur la taille des NPs. L'enrobage ne doit pas augmenter la taille des NPs de manière significative. La longueur des chaînes de PEG ajoutées à la surface des particules peut être variable et choisie en fonction des propriétés à apporter à la particule et des limites de taille imposées (Otsuka *et al.*, 2003). Dans notre cas, une marge est tolérée, car les NPs de 400 nm sont les mieux internalisées ; donc si la mucoadhésion des NPs de 200 nm est potentialisée, une augmentation de la taille de ces particules ne devrait pas diminuer leur efficacité. L'enrobage des NPs change la plupart de leurs caractéristiques propres. De nouvelles études de l'efficacité d'internalisation et de sécurité devront alors être menées.

Des études du devenir de l'insuline ou des NPs après internalisation par l'épithélium intestinal doivent également encore être menées. En effet, à l'heure actuelle, il est impossible de se prononcer sur les mécanismes de dégradation des NPs et sur le mode passage de l'insuline vers la circulation sanguine. L'étude de l'exocytose des NPs a montré une diminution du signal fluorescent attribué à l'insuline, mais ne nous renseigne pas sur l'intégrité des NPs. Pour savoir si les NPs traversent la barrière intestinale de manière intègre, ou si le PLGA est dégradé au niveau de la cellule et l'insuline traverse seule, deux stratégies peuvent être mises en place. La première consiste à cultiver des cellules Caco-2 ou des co-cultures sur une membrane poreuse, comme par exemple les inserts, à ajouter des NPs dans le compartiment apical de ces inserts, et à doser l'insuline dans le compartiment basolatéral après un temps défini d'incubation. La deuxième repose sur une étude *ex vivo*, utilisant des chambres de Ussing. Ce dispositif est composé de deux demi-chambres, séparées par un fragment d'intestin. Les deux chambres communiquant entre-elles par ce fragment, le passage des NPs ou de l'insuline doit impérativement se faire à travers cette barrière intestinale (Clarke, 2009).

Dans ce cas, pour savoir si les NPs passent de manière intègre ou non, celles-ci seraient incubées dans le compartiment muqueux de la demi-chambre de Ussing et l'insuline serait dosée dans le compartiment receveur. Dans ces deux modèles, il est toutefois nécessaire de s'assurer que l'insuline dosée dans le compartiment receveur résulte bien du passage de NPs chargées en insuline, et non du passage de l'insuline non encapsulée. Pour cela, un contrôle expérimental avec des NPs dégradées doit être réalisé. Le passage des NPs elles-mêmes peut être quantifié dans ces systèmes, par ajout de NPs fluorescentes dans le compartiment donneur. Ces NPs ayant traversé la barrière intestinale et étant intègre, peuvent alors être récupérées et quantifiées par la méthode de cytométrie en flux.

Des études de toxicité plus approfondies doivent être également menées sur les NPs, notamment pour évaluer les risques dans le cadre d'administrations répétées. Ces travaux seront réalisés chez le rat et impliqueront différentes analyses, comme l'analyse anatomopathologique de l'intestin, mais également des principaux organes internes (foie, rein, etc.), des analyses sanguines afin de vérifier le caractère non immunogène des NPs mais également leur potentielle toxicité sur les organes, ou encore des analyses de la flore intestinale. Ces analyses étant spécifiques, elles seront réalisées par des organismes certifiés.

Enfin, une étape essentielle doit encore être menée : il s'agit de l'évaluation de l'efficacité du système de délivrance complet (gélule + NPs d'insuline) qui n'a pas encore pu être réalisée. Pour cela les NPs doivent être insérées dans la gélule. Deux alternatives sont alors possibles : les NPs peuvent être insérées sous un format lyophilisé dans une capsule dure, ou elles peuvent être insérées sous la forme d'une dispersion dans un milieu huileux dans une gélule molle. La galénique finale du produit (capsule dure ou gélule molle) sera choisie une fois que les deux formats de formulation des NPs (lyophilisées ou dispersées dans un milieu huileux) auront été testés. L'évaluation du système entier reposera sur des administrations orales par gavage à des rats diabétiques et le suivi de la diminution de la glycémie. La prise alimentaire sera aussi un paramètre à étudier chez les rats à traiter, afin de déterminer le nombre de gélules à administrer. En effet, l'alimentation peut interférer avec l'efficacité des NPs, en limitant les contacts de ces NPs avec la muqueuse intestinale.

L'administration par voie orale est aujourd'hui une des stratégies thérapeutiques d'avenir privilégiée pour une meilleure délivrance de l'insuline chez le patient diabétique. La multitude de barrières à la délivrance de l'insuline rencontrées par voie orale rend difficile le

développement d'un système de délivrance efficace et sûr. Ce développement nécessitera du temps pour aboutir, mais présente aujourd'hui un très fort potentiel pour le traitement par insulinothérapie des personnes diabétiques.

BIBLIOGRAPHIE

Aderem A. et Underhill D.M. (1999), « Mechanisms of phagocytosis in macrophages », *Annual review of immunology*, vol. 17, pp. 593-623.

Akbarzadeh A., Norouzi D., Mehrabi M.R., Jamshidi S., Farhangi A., Verdi A.A., Mofidian S.M.A. et Rad B.L. (2007), « Induction of diabetes by Streptozotocin in rats », *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, vol. 22, n°2, pp. 60-64.

Akerblom H.K. et Knip M. (1998), « Putative environmental factors in Type 1 diabetes », *Diabetes/metabolism reviews*, vol. 14, n°1, pp. 31-67.

Alber F., Dokudovskaya S., Veenhoff L.M., Zhang W., Kipper J., Devos D., Suprpto A., Karni-Schmidt O., Williams R., Chait B.T., Sali A. et Rout M.P. (2007), « The molecular architecture of the nuclear pore complex », *Nature*, vol. 450, n°7170, pp. 695-701.

Allémann E., Leroux J.C., Gurny R. et Doelker E. (1993), « In vitro extended-release properties of drug-loaded poly(DL-lactic acid) nanoparticles produced by a salting-out procedure », *Pharmaceutical research*, vol. 10, n°12, pp. 1732-1737.

Almeida A.J. et Souto E. (2007), « Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 59, n°6, pp. 478-490.

American Diabetes Association (2013), « Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus », *Diabetes Care*, vol. 36, n°Supplement_1, pp. S67-S74.

Andón F.T. et Fadeel B. (2012), « Programmed Cell Death: Molecular Mechanisms and Implications for Safety Assessment of Nanomaterials », *Acc. Chem. Res.*

Anta J.M. de, Real F.X. et Mayol X. (2005), « Low tumor cell density environment yields survival advantage of tumor cells exposed to MTX in vitro », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1721, n°1-3, pp. 98-106.

Antunes F., Andrade F., Araújo F., Ferreira D. et Sarmiento B. (2013), « Establishment of a triple co-culture in vitro cell models to study intestinal absorption of peptide drugs », *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 83, n°3, pp. 427-435.

Aoki Y., Morishita M., Asai K., Akikusa B., Hosoda S. et Takayama K. (2005), « Region-Dependent Role of the Mucous/Glycocalyx Layers in Insulin Permeation Across Rat Small Intestinal Membrane », *Pharmaceutical Research*, vol. 22, n°11, pp. 1854-1862.

Arner P. (2002), « Insulin resistance in type 2 diabetes: role of fatty acids », *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, vol. 18, n°S2, pp. S5-S9.

Artursson P., Lindmark T., Davis S.S. et Illum L. (1994), « Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2) », *Pharmaceutical Research*, vol. 11, n°9, pp. 1358-1361.

Atuma C., Strugala V., Allen A. et Holm L. (2001), « The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo », *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, vol. 280, n°5, pp. G922-929.

Azari P.R. et Feeney R.E. (1958), « Resistance of metal complexes of conalbumin and transferrin to proteolysis and to thermal denaturation », *The Journal of biological chemistry*, vol. 232, n°1, pp. 293-302.

Banerjee D., Flanagan P.R., Cluett J. et Valberg L.S. (1986), « Transferrin receptors in the human gastrointestinal tract. Relationship to body iron stores », *Gastroenterology*, vol. 91, n°4, pp. 861-869.

Bareford L.M. et Swaan P.W. (2007), « Endocytic mechanisms for targeted drug delivery », *Advanced drug delivery reviews*, vol. 59, n°8, pp. 748-758.

Bazes A., Nollevaux G., Coco R., Joly A., Sergent T. et Schneider Y.-J. (2011), « Development of a triculture based system for improved benefit/risk assessment in pharmacology and human food », *BMC Proceedings*, vol. 5, n°Suppl 8, pp. P67.

Behrens I. et Kissel T. (2003), « Do cell culture conditions influence the carrier-mediated transport of peptides in Caco-2 cell monolayers? », *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 19, n°5, pp. 433-442.

Belle T.L. van, Coppieters K.T. et Herrath M.G.V. (2011), « Type 1 Diabetes: Etiology, Immunology, and Therapeutic Strategies », *Physiological Reviews*, vol. 91, n°1, pp. 79-118.

Benhamou P.-Y., Lablanche S., Dalle P., Rivera F., Richard M.-J. et Halimi S. (2012), « Thérapie cellulaire du diabète de type 1 : un pancréas bio-artificiel, sinon rien ? », *Médecine des Maladies Métaboliques*, vol. 6, n°5, pp. 397-402.

Bernardi S., Severini G.M., Zauli G. et Secchiero P. (2012), « Cell-Based Therapies for Diabetic Complications », *Experimental Diabetes Research*, vol. 2012, pp. 1-10.

Bilati U., Allémann E. et Doelker E. (2005), « Nanoprecipitation versus emulsion-based techniques for the encapsulation of proteins into biodegradable nanoparticles and process-related stability issues », *AAPS PharmSciTech*, vol. 6, n°4, pp. E594-E604.

Bouché C., Serdy S., Kahn C.R. et Goldfine A.B. (2004), « The Cellular Fate of Glucose and Its Relevance in Type 2 Diabetes », *Endocrine Reviews*, vol. 25, n°5, pp. 807-830.

Brange J. et Vølund A. (1999), « Insulin analogs with improved pharmacokinetic profiles », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 35, n°2-3, pp. 307-335.

Branka J.-E., Vallette G., Jarry A. et Laboisse C.L. (1997), « Stimulation of mucin exocytosis from human epithelial cells by nitric oxide: evidence for a cGMP-dependent and a cGMP-independent pathway. », *Biochemical Journal*, vol. 323, n°Pt 2, pp. 521-524.

Brar S.K. et Verma M. (2011), « Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques », *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 30, n°1, pp. 4-17.

Brubaker P.L. et Drucker D.J. (2002), « Structure-function of the glucagon receptor family of G protein-coupled receptors: the glucagon, GIP, GLP-1, and GLP-2 receptors », *Receptors & channels*, vol. 8, n°3-4, pp. 179-188.

Butler A.E., Janson J., Bonner-Weir S., Ritzel R., Rizza R.A. et Butler P.C. (2003), « Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes », *Diabetes*, vol. 52, n°1, pp. 102-110.

Buzea C., Pacheco I.I. et Robbie K. (2007), « Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity », *Biointerphases*, vol. 2, n°4, pp. MR17-71.

Calcutt N.A., Cooper M.E., Kern T.S. et Schmidt A.M. (2009), « Therapies for hyperglycaemia-induced diabetic complications: from animal models to clinical trials », *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 8, n°5, pp. 417-430.

Calzolari L., Franchini F., Gilliland D. et Rossi F. (2010), « Protein--nanoparticle interaction: identification of the ubiquitin--gold nanoparticle interaction site », *Nano letters*, vol. 10, n°8, pp. 3101-3105.

Carino G.P. et Mathiowitz E. (1999), « Oral insulin delivery », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 35, n°2-3, pp. 249-257.

Cartiera M.S., Johnson K.M., Rajendran V., Caplan M.J. et Saltzman W.M. (2009), « The uptake and intracellular fate of PLGA nanoparticles in epithelial cells », *Biomaterials*, vol. 30, n°14, pp. 2790-2798.

Cedervall T., Lynch I., Lindman S., Berggård T., Thulin E., Nilsson H., Dawson K.A. et Linse S. (2007), « Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, n°7, pp. 2050 -2055.

Chen M.-C., Sonaje K., Chen K.-J. et Sung H.-W. (2011), « A review of the prospects for polymeric nanoparticle platforms in oral insulin delivery », *Biomaterials*, vol. 32, n°36, pp. 9826-9838.

Chen X.-M., Elisia I. et Kitts D.D. (2010), « Defining conditions for the co-culture of Caco-2 and HT29-MTX cells using Taguchi design », *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, vol. 61, n°3, pp. 334-342.

Chiu S.-L. et Cline H.T. (2010), « Insulin receptor signaling in the development of neuronal structure and function », *Neural Development*, vol. 5, n°1, pp. 7.

Cho Y.M., Merchant C.E. et Kieffer T.J. (2012), « Targeting the glucagon receptor family for diabetes and obesity therapy », *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 135, n°3, pp. 247-278.

Chou L.Y.T., Ming K. et Chan W.C.W. (2010), « Strategies for the intracellular delivery of nanoparticles », *Chemical Society Reviews*, vol. 40, n°1, pp. 233-245.

Christensen M., Bagger J.I., Vilsboll T. et Knop F.K. (2011), « The Alpha-Cell as Target for Type 2 Diabetes Therapy », *The Review of Diabetic Studies*, vol. 8, n°3, pp. 369-381.

Clarke L.L. (2009), « A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine », *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 296, n°6, pp. G1151-G1166.

Cobelli C., Renard E. et Kovatchev B. (2011), « Artificial Pancreas: Past, Present, Future », *Diabetes*, vol. 60, n°11, pp. 2672-2682.

Coelho J.F., Ferreira P.C., Alves P., Cordeiro R., Fonseca A.C., Góis J.R. et Gil M.H. (2010), « Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments », *The EPMA Journal*, vol. 1, n°1, pp. 164-209.

Cole E.T., Scott R.A., Connor A.L., Wilding I.R., Petereit H.U., Schminke C., Beckert T. et Cadé D. (2002), « Enteric coated HPMC capsules designed to achieve intestinal targeting », *International journal of pharmaceutics*, vol. 231, n°1, pp. 83-95.

Commins S.P., Borish L. et Steinke J.W. (2010), « Immunologic messenger molecules: Cytokines, interferons, and chemokines », *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 125, n°2, Supplement 2, pp. S53-S72.

Cone R. (2009), « Barrier properties of mucus », *Advanced Drug Delivery Reviews*, 27 février 2009, pp. 75-85.

Crichton R.R. (1990), « Proteins of iron storage and transport », *Advances in protein chemistry*, vol. 40, pp. 281-363.

Cui F., Tao A., Cun D., Zhang L. et Shi K. (2007), « Preparation of insulin loaded PLGA-Hp55 nanoparticles for oral delivery », *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 96, n°2, pp. 421-427.

Culina S., Brezar V. et Mallone R. (2013), « Mechanisms in endocrinology: Insulin and type 1 diabetes: immune connections », *European Journal of Endocrinology*, vol. 168, n°2, pp. R19-R31.

Damgé C., Aprahamian M., Marchais H., Benoit J.P. et Pinget M. (1996), « Intestinal absorption of PLGA microspheres in the rat. », *Journal of Anatomy*, vol. 189, n°Pt 3, pp. 491.

Danaei G., Finucane M.M., Lu Y., Singh G.M., Cowan M.J., Paciorek C.J., Lin J.K., Farzadfar F., Khang Y.-H., Stevens G.A., Rao M., Ali M.K., Riley L.M., Robinson C.A. et Ezzati M. (2011), « National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants », *The Lancet*, vol. 378, n°9785, pp. 31-40.

Dandona P., Chaudhuri A., Ghanim H. et Mohanty P. (2009), « Insulin as an Anti-Inflammatory and Antiatherogenic Modulator », *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 53, n°5, Supplement, pp. S14-S20.

- Daneman D. (2006)**, « Type 1 diabetes », *The Lancet*, vol. 367, n°9513, pp. 847-858.
- Danhier F., Ansorena E., Silva J.M., Coco R., Breton A. Le et Pr at V. (2012)**, « PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications », *Journal of Controlled Release*, n°0.
- Delie F. et Blanco-Pr eto M.J. (2005)**, « Polymeric Particulates to Improve Oral Bioavailability of Peptide Drugs », *Molecules*, vol. 10, n°1, pp. 65-80.
- Derakhshandeh K., Hochhaus G. et Dadashzadeh S. (2011)**, « In-vitro cellular uptake and transport study of 9-nitrocamptothecin PLGA nanoparticles across Caco-2 cell monolayer model », *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 10, n°3, pp. 425-434.
- Desai M.P., Labhassetwar V., Walter E., Levy R.J. et Amidon G.L. (1997)**, « The Mechanism of Uptake of Biodegradable Microparticles in Caco-2 Cells Is Size Dependent », *Pharmaceutical Research*, vol. 14, n°11, pp. 1568-1573.
- Deshpande A.D., Harris-Hayes M. et Schootman M. (2008)**, « Epidemiology of Diabetes and Diabetes-Related Complications », *Physical Therapy*, vol. 88, n°11, pp. 1254-1264.
- Dhawan A. et Sharma V. (2010)**, « Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 398, n°2, pp. 589-605.
- Dinarvand R., Sepehri nima, Manouchehri, Rouhani et Atyabi F. (2011)**, « Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents », *International Journal of Nanomedicine*, pp. 877.
- Dobrovolskaia M.A. et McNeil S.E. (2007)**, « Immunological properties of engineered nanomaterials », *Nature nanotechnology*, vol. 2, n°8, pp. 469-478.
- Donaldson K. et Stone V. (2003)**, « Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles », *Annali dell'Istituto superiore di sanit *, vol. 39, n°3, pp. 405-410.
- Duckworth W.C. (1988)**, « Insulin degradation: mechanisms, products, and significance », *Endocrine reviews*, vol. 9, n°3, pp. 319-345.
- Duckworth W.C., Bennett R.G. et Hamel F.G. (1998)**, « Insulin Degradation: Progress and Potential », *Endocrine Reviews*, vol. 19, n°5, pp. 608 -624.
- Dupeyr n D., Gonz lez M., S ez V., Ram n J. et Rieumont J. (2005)**, « Nano-encapsulation of protein using an enteric polymer as carrier », *IEE proceedings. Nanobiotechnology*, vol. 152, n°5, pp. 165-168.
- Edlund H. (2002)**, « Pancreatic organogenesis — developmental mechanisms and implications for therapy », *Nature Reviews Genetics*, vol. 3, n°7, pp. 524-532.
- Elsaesser A. et Howard C.V. (2011)**, « Toxicology of nanoparticles », *Advanced Drug Delivery Reviews*, n°0.
- Enck P., Merlin V., Erckenbrecht J.F. et Wienbeck M. (1989)**, « Stress effects on gastrointestinal transit in the rat. », *Gut*, vol. 30, n°4, pp. 455-459.

- Ensign L.M., Cone R. et Hanes J. (2012)**, « Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: the gastrointestinal mucus barriers », *Advanced drug delivery reviews*, vol. 64, n°6, pp. 557-570.
- Fonte P., Soares S., Costa A., Andrade J.C., Seabra V., Reis S. et Sarmiento B. (2012)**, « Effect of cryoprotectants on the porosity and stability of insulin-loaded PLGA nanoparticles after freeze-drying », *Biomatter*, vol. 2, n°4, pp. 329-339.
- Forstner G. (1995)**, « Signal Transduction Packaging and Secretion of Mucins », *Annual Review of Physiology*, vol. 57, n°1, pp. 585-605.
- Fröhlich E. et Roblegg E. (2012)**, « Models for oral uptake of nanoparticles in consumer products », *Toxicology*, vol. 291, n°1-3, pp. 10-17.
- Fu Z., R. Gilbert E. et Liu D. (2013)**, « Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes », *Current Diabetes Reviews*, vol. 9, n°1, pp. 25-53.
- Gamble D.R., Kinsley M.L., FitzGerald M.G., Bolton R. et Taylor K.W. (1969)**, « Viral antibodies in diabetes mellitus », *British medical journal*, vol. 3, n°5671, pp. 627-630.
- Gaudier E. et Hoebler C. (2008)**, « Rôles physiologiques des mucines dans la barrière colique », </data/revues/03998320/003008-9/965/>.
- Gaumet M., Gurny R. et Delie F. (2009)**, « Localization and quantification of biodegradable particles in an intestinal cell model: The influence of particle size », *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 36, n°4-5, pp. 465-473.
- Gaumet M., Gurny R. et Delie F. (2010)**, « Interaction of biodegradable nanoparticles with intestinal cells: The effect of surface hydrophilicity », *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 390, n°1, pp. 45-52.
- Gogev S., Versali M.-F. et Thiry E. (2003)**, « Les chitosanes – nouveaux adjuvants pour la vaccination par voie muqueuse chez les animaux »,.
- Goodman C.M., McCusker C.D., Yilmaz T. et Rotello V.M. (2004)**, « Toxicity of Gold Nanoparticles Functionalized with Cationic and Anionic Side Chains », *Bioconjugate Chemistry*, vol. 15, n°4, pp. 897-900.
- Gowthamarajan K. et Kulkarni G.T. (2003)**, « Oral Insulin—Fact or Fiction? », *Resonance*, vol. 8, n°5, pp. 38-46.
- Graaf K. Van de (1986)**, « Anatomy and physiology of the gastrointestinal tract: The Pediatric Infectious Disease Journal »,.
- Grajek W. et Olejnik A. (2004)**, « Epithelial cell cultures in vitro as a model to study functional properties of food », *Polish journal of food and nutrition sciences*, vol. 13, pp. 5-24.

Gref R., Minamitake Y., Peracchia M.T., Trubetskoy V., Torchilin V. et Langer R. (1994), « Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres », *Science*, vol. 263, n°5153, pp. 1600-1603.

Groves E., Dart A.E., Covarelli V. et Caron E. (2008), « Molecular mechanisms of phagocytic uptake in mammalian cells », *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, vol. 65, n°13, pp. 1957-1976.

Grunberger G. (2013), « The need for better insulin therapy », *Diabetes, obesity & metabolism*, vol. 15 Suppl 1, pp. 1-5.

Haffner S.M., Lehto S., Rönnemaa T., Pyörälä K. et Laakso M. (1998), « Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction », *The New England journal of medicine*, vol. 339, n°4, pp. 229-234.

Hafner Česen M., Pegan K., Špes A. et Turk B. (2012), « Lysosomal pathways to cell death and their therapeutic applications », *Experimental Cell Research*, vol. 318, n°11, pp. 1245-1251.

Harrison L.C. et Honeyman M.C. (1999), « Cow's milk and type 1 diabetes: the real debate is about mucosal immune function », *Diabetes*, vol. 48, n°8, pp. 1501-1507.

Harush-Frenkel O., Debotton N., Benita S. et Altschuler Y. (2007), « Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway », *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 353, n°1, pp. 26-32.

He C. et Klionsky D.J. (2009), « Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy », *Annual review of genetics*, vol. 43, pp. 67-93.

Heinemann L. et Jacques Y. (2009), « Oral insulin and buccal insulin: a critical reappraisal », *Journal of diabetes science and technology*, vol. 3, n°3, pp. 568-584.

Hilgendorf C., Spahn-Langguth H., Regardh C.G., Lipka E., Amidon G.L. et Langguth P. (2000), « Caco-2 versus caco-2/HT29-MTX co-cultured cell lines: Permeabilities via diffusion, inside- and outside-directed carrier-mediated transport », *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 89, n°1, pp. 63-75.

Hillaireau H. et Couvreur P. (2009), « Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery », *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, vol. 66, n°17, pp. 2873-2896.

Horie M., Kato H., Fujita K., Endoh S. et Iwahashi H. (2011), « In Vitro Evaluation of Cellular Response Induced by Manufactured Nanoparticles », *Chem. Res. Toxicol.*

Hussain N., Jaitley V. et Florence A.T. (2001), « Recent advances in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 50, n°1-2, pp. 107-142.

Hussain S., Vanoirbeek J.A.J. et Hoet P.H.M. (2011), « Interactions of nanomaterials with the immune system », *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*.

Hutchinson T.E., Zhang J., Xia S.-L., Kuchibhotla S., Block E.R. et Patel J.M. (2012), « Enhanced phosphorylation of caveolar PKC- α limits peptide internalization in lung endothelial cells », *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 360, n°1-2, pp. 309-320.

Ishida T., Harashima H. et Kiwada H. (2001), « Interactions of Liposomes with Cells In Vitro and In Vivo: Oponins and Receptors », *Current Drug Metabolism*, vol. 2, n°4, pp. 397-409.

Jacobs S. et Cuatrecasas P. (1983), « Insulin Receptors », *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 23, n°1, pp. 461-479.

Jeandidier N. et Boivin S. (1999), « Current status and future prospects of parenteral insulin regimens, strategies and delivery systems for diabetes treatment », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 35, n°2-3, pp. 179-198.

Jeong G.N., Jo U.B., Ryu H.Y., Kim Y.S., Song K.S. et Yu I.J. (2010), « Histochemical study of intestinal mucins after administration of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats », *Archives of Toxicology*, vol. 84, n°1, pp. 63-69.

Kahn S.E., Hull R.L. et Utzschneider K.M. (2006), « Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes », *Nature*, vol. 444, n°7121, pp. 840-846.

Katsikari A., Patronidou C., Kiparissides C. et Arsenakis M. (2009), « Uptake and cytotoxicity of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles in human colon adenocarcinoma cells », *Materials science & engineering. B, Solid-state materials for advanced technology*, vol. 165, n°3, pp. 160-164.

Khafagy E.-S., Morishita M., Onuki Y. et Takayama K. (2007), « Current challenges in non-invasive insulin delivery systems: A comparative review », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 59, n°15, pp. 1521-1546.

Kim B.S., Oh J.M., Hyun H., Kim K.S., Lee S.H., Kim Y.H., Park K., Lee H.B. et Kim M.S. (2009), « Insulin-loaded microcapsules for in vivo delivery », *Molecular pharmaceutics*, vol. 6, n°2, pp. 353-365.

Kim J. et Khan W. (2013), « Goblet Cells and Mucins: Role in Innate Defense in Enteric Infections », *Pathogens*, vol. 2, n°1, pp. 55-70.

Knop K., Hoogenboom R., Fischer D. et Schubert U.S. (2010), « Poly(ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives », *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 49, n°36, pp. 6288-6308.

Konsoula R. et Barile F.A. (2005), « Correlation of in vitro cytotoxicity with paracellular permeability in Caco-2 cells », *Toxicology in Vitro*, vol. 19, n°5, pp. 675-684.

Krug H.F. et Wick P. (2011), « Nanotoxicology: An Interdisciplinary Challenge », *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 50, n°6, pp. 1260-1278.

Kumari A., Yadav S.K. et Yadav S.C. (2010), « Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems », *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 75, n°1, pp. 1-18.

Kunzmann A., Andersson B., Thurnherr T., Krug H., Scheynius A. et Fadeel B. (2011), « Toxicology of engineered nanomaterials: Focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1810, n°3, pp. 361-373.

Labiris N.R. et Dolovich M.B. (2003), « Pulmonary drug delivery. Part I: Physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications », *British Journal of Clinical Pharmacology*, vol. 56, n°6, pp. 588-599.

Lai S.K., Wang Y.-Y. et Hanes J. (2009), « Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 61, n°2, pp. 158-171.

Lecleire S. (2008), « Digestion et absorption des nutriments », *Cahiers de nutrition et de diététique*, vol. 43, n°1, pp. 45-50.

Lehr C.-M., Bouwstra J.A., Schacht E.H. et Junginger H.E. (1992), « In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers », *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 78, n°1-3, pp. 43-48.

Lehr C.-M., Bouwstra J.A., Spies F., Onderwater J., Noordeinde J. van het, Vermeij-Keers C., Munsteren C.J. van et Junginger H.E. (1992), « Visualization studies of the mucoadhesive interface », *Journal of Controlled Release*, vol. 18, n°3, pp. 249-260.

Leng S.X., McElhaney J.E., Walston J.D., Xie D., Fedarko N.S. et Kuchel G.A. (2008), « ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research », *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, vol. 63, n°8, pp. 879-884.

Lenzen S. (2008), « The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes », *Diabetologia*, vol. 51, n°2, pp. 216-226.

Lesuffleur T., Barbat A., Dussaulx E. et Zweibaum A. (1990), « Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells », *Cancer Research*, vol. 50, n°19, pp. 6334-6343.

Lesuffleur T., Barbat A., Luccioni C., Beaumatin J., Clair M., Kornowski A., Dussaulx E., Dutrillaux B. et Zweibaum A. (1991), « Dihydrofolate reductase gene amplification-associated shift of differentiation in methotrexate-adapted HT-29 cells. », *The Journal of Cell Biology*, vol. 115, n°5, pp. 1409 - 1418.

Lesuffleur T., Porchet N., Aubert J.-P., Swallow D., Gum J.R., Kim Y.S., Real F.X. et Zweibaum A. (1993), « Differential expression of the human mucin genes MUC1 to MUC5 in relation to growth and differentiation of different mucus-secreting HT-29 cell subpopulations », *Journal of Cell Science*, vol. 106 (Pt 3), pp. 771-783.

Lesuffleur T., Violette S., Vasile-Pandrea I., Dussaulx E., Barbat A., Muleris M. et Zweibaum A. (1998), « Resistance to high concentrations of methotrexate and 5-fluorouracil of differentiated HT-29 colon-cancer cells is restricted to cells of enterocytic phenotype », *International Journal of Cancer*, vol. 76, n°3, pp. 383-392.

Li N., Sioutas C., Cho A., Schmitz D., Misra C., Sempf J., Wang M., Oberley T., Froines J. et Nel A. (2003), « Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. », *Environmental Health Perspectives*, vol. 111, n°4, pp. 455.

Li N., Xia T. et Nel A.E. (2008), « The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles », *Free radical biology & medicine*, vol. 44, n°9, pp. 1689-1699.

Lim S.B., Banerjee A. et Önyüksel H. (2012), « Improvement of drug safety by the use of lipid-based nanocarriers », *Journal of Controlled Release*, vol. 163, n°1, pp. 34-45.

Lin Y.-S. et Haynes C.L. (2009), « Synthesis and Characterization of Biocompatible and Size-Tunable Multifunctional Porous Silica Nanoparticles », *Chemistry of Materials*, vol. 21, n°17, pp. 3979-3986.

Linden S.K., Sutton P., Karlsson N.G., Korolik V. et McGuckin M.A. (2008), « Mucins in the mucosal barrier to infection », *Mucosal immunology*, vol. 1, n°3, pp. 183-197.

Liu J., Zhang S.M., Chen P.P., Cheng L., Zhou W., Tang W.X., Chen Z.W. et Ke C.M. (2007), « Controlled release of insulin from PLGA nanoparticles embedded within PVA hydrogels », *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 18, n°11, pp. 2205-2210.

Liu X., Liu C., Zhang W., Xie C., Wei G. et Lu W. (2013), « Oligoarginine-modified biodegradable nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin », *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 448, n°1, pp. 159-167.

Loh J.W., Yeoh G., Saunders M. et Lim L.-Y. (2010), « Uptake and cytotoxicity of chitosan nanoparticles in human liver cells », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 249, n°2, pp. 148-157.

Lorenz M.R., Holzapfel V., Musyanovych A., Nothelfer K., Walther P., Frank H., Landfester K., Schrezenmeier H. et Mailänder V. (2006), « Uptake of functionalized, fluorescent-labeled polymeric particles in different cell lines and stem cells », *Biomaterials*, vol. 27, n°14, pp. 2820-2828.

Lummel M. van, Veelen P.A. van, Zaldumbide A., Ru A. de, Janssen G.M.C., Moustakas A.K., Papadopoulos G.K., Drijfhout J.W., Roep B.O. et Koning F. (2012), « Type 1 Diabetes-associated HLA-DQ8 Transdimer Accommodates a Unique Peptide Repertoire », *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, n°12, pp. 9514-9524.

Lundqvist M., Stigler J., Elia G., Lynch I., Cedervall T. et Dawson K.A. (2008), « Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, n°38, pp. 14265-14270.

Lynch I., Salvati A. et Dawson K.A. (2009), « Protein-nanoparticle interactions: What does the cell see? », *Nature nanotechnology*, vol. 4, n°9, pp. 546-547.

Madara J.L. (1998), « Regulation of the movement of solutes across tight junctions », *Annual review of physiology*, vol. 60, pp. 143-159.

Mahapatro A. et Singh D. (2011), « Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines », *Journal of Nanobiotechnology*, vol. 9, n°1, pp. 55.

Mahler G.J., Shuler M.L. et Glahn R.P. (2009), « Characterization of Caco-2 and HT29-MTX cocultures in an in vitro digestion/cell culture model used to predict iron bioavailability », *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 20, n°7, pp. 494-502.

Mahmoudi M., Lynch I., Ejtehadi M.R., Monopoli M.P., Bombelli F.B. et Laurent S. (2011), « Protein–Nanoparticle Interactions: Opportunities and Challenges », *Chem. Rev.*, vol. 111, n°9, pp. 5610-5637.

Makadia H.K. et Siegel S.J. (2011), « Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier », *Polymers*, vol. 3, n°3, pp. 1377-1397.

Malam Y., Loizidou M. et Seifalian A.M. (2009), « Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer », *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 30, n°11, pp. 592-599.

Marano F., Hussain S., Rodrigues-Lima F., Baeza-Squiban A. et Boland S. (2011), « Nanoparticles: molecular targets and cell signalling », *Archives of toxicology*, vol. 85, n°7, pp. 733-741.

Marquis B.J., Love S.A., Braun K.L. et Haynes C.L. (2009), « Analytical methods to assess nanoparticle toxicity », *Analyst*, vol. 134, n°3, pp. 425-439.

Martin-Banderas L., Duran-Lobato M., Munoz-Rubio I., Alvarez-Fuentes J., Fernandez-Arevalo M. et Holgado M. A. (2013), « Functional PLGA NPs for Oral Drug Delivery: Recent Strategies and Developments », *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, vol. 13, n°1, pp. 58-69.

McGuckin M.A., Lindén S.K., Sutton P. et Florin T.H. (2011), « Mucin dynamics and enteric pathogens », *Nat Rev Micro*, vol. 9, n°4, pp. 265-278.

Menser M.A., Forrest J.M. et Bransby R.D. (1978), « Rubella infection and diabetes mellitus », *Lancet*, vol. 1, n°8055, pp. 57-60.

Miao Q., Xu D., Wang Z., Xu L., Wang T., Wu Y., Lovejoy D.B., Kalinowski D.S., Richardson D.R., Nie G. et Zhao Y. (2010), « Amphiphilic hyper-branched co-polymer nanoparticles for the controlled delivery of anti-tumor agents », *Biomaterials*, vol. 31, n°28, pp. 7364-7375.

Moon H.S., Guo D.D., Song H.H., Kim I.Y., Jin H.L., Kim Y.K., Chung C.S., Choi Y.J., Lee H.K. et Cho C.S. (2007), « Regulation of adipocyte differentiation by PEGylated all-

trans retinoic acid: reduced cytotoxicity and attenuated lipid accumulation », *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 18, n°5, pp. 322-331.

Morales C., García M.J., Ribas M., Miró R., Muñoz M., Caldas C. et Peinado M.A. (2009), « Dihydrofolate reductase amplification and sensitization to methotrexate of methotrexate-resistant colon cancer cells », *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 8, n°2, pp. 424-432.

Moran A.P., Gupta A. et Joshi L. (2011), « Sweet-talk: role of host glycosylation in bacterial pathogenesis of the gastrointestinal tract », *Gut*, vol. 60, n°10, pp. 1412-1425.

Moreau F., Agin A. et Jeandidier N. (2007), « Les analogues de l'insuline : mise au point », *STV. Sang thrombose vaisseaux*, vol. 19, n°5, pp. 240-247.

Mukerjee A., Sinha V.R. et Pruthi V. (2007), « Preparation and Characterization of Poly-ε-caprolactone Particles for Controlled Insulin Delivery », *Journal of Biomedical & Pharmaceutical Engineering*, 2007, pp. 40-44.

Mukherjee S., Ghosh R.N. et Maxfield F.R. (1997), « Endocytosis », *Physiological reviews*, vol. 77, n°3, pp. 759-803.

Muthu M. (2009), « Nanoparticles based on PLGA and its co-polymer: An overview », *Asian Journal of Pharmaceutics*, vol. 3, n°4, pp. 266.

Nafee N., Schneider M., Schaefer U.F. et Lehr C.-M. (2009), « Relevance of the colloidal stability of chitosan/PLGA nanoparticles on their cytotoxicity profile », *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 381, n°2, pp. 130-139.

Nair L.S. et Laurencin C.T. (2007), « Biodegradable polymers as biomaterials », *Progress in Polymer Science*, vol. 32, n°8-9, pp. 762-798.

Nel A.E., Mädler L., Velegol D., Xia T., Hoek E.M.V., Somasundaran P., Klaessig F., Castranova V. et Thompson M. (2009), « Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface », *Nature Materials*, vol. 8, n°7, pp. 543-557.

Nel A., Xia T., Mädler L. et Li N. (2006), « Toxic Potential of Materials at the Nanolevel », *Science*, vol. 311, n°5761, pp. 622-627.

Neumeyer A., Bukowski M., Veith M., Lehr C.-M. et Daum N. (2011), « Propidium iodide labeling of nanoparticles as a novel tool for the quantification of cellular binding and uptake », *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 7, n°4, pp. 410-419.

Nollevaux G., Deville C., El Moulaj B., Zorzi W., Deloyer P., Schneider Y.-J., Peulen O. et Dandrifosse G. (2006), « Development of a serum-free co-culture of human intestinal epithelium cell-lines (Caco-2/HT29-5M21) », *BMC Cell Biology*, vol. 7, n°1, pp. 20.

Notkins A.L. (2002), « Immunologic and Genetic Factors in Type 1 Diabetes », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, n°46, pp. 43545-43548.

O'Hagan D.T. et Illum L. (1990), « Absorption of peptides and proteins from the respiratory tract and the potential for development of locally administered vaccine », *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, vol. 7, n°1, pp. 35-97.

Oberdörster G. (2010), « Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology », *Journal of Internal Medicine*, vol. 267, n°1, pp. 89-105.

Oberdörster G., Oberdörster E. et Oberdörster J. (2005), « Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles », *Environmental Health Perspectives*, vol. 113, n°7, pp. 823-839.

Otsuka H., Nagasaki Y. et Kataoka K. (2003), « PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 55, n°3, pp. 403-419.

Owens D.R. (2002), « New horizons — alternative routes for insulin therapy », *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 1, n°7, pp. 529-540.

Owens D.E. 3rd et Peppas N.A. (2006), « Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles », *International journal of pharmaceutics*, vol. 307, n°1, pp. 93-102.

Ozsoy Y., Gungor S. et Cevher E. (2009), « Nasal Delivery of High Molecular Weight Drugs », *Molecules*, vol. 14, n°9, pp. 3754-3779.

Pan Y., Leifert A., Ruau D., Neuss S., Bornemann J., Schmid G., Brandau W., Simon U. et Jahnen-Dechent W. (2009), « Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage », *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, vol. 5, n°18, pp. 2067-2076.

Pang K.S. (2003), « Modeling of Intestinal Drug Absorption: Roles of Transporters and Metabolic Enzymes (for the Gillette Review Series) », *Drug Metabolism and Disposition*, vol. 31, n°12, pp. 1507 -1519.

Panyam J. et Labhasetwar V. (2003a), « Dynamics of endocytosis and exocytosis of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles in vascular smooth muscle cells », *Pharmaceutical research*, vol. 20, n°2, pp. 212-220.

Panyam J. et Labhasetwar V. (2003b), « Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue », *Advanced Drug Delivery Reviews*, 24 février 2003, pp. 329-347.

Plaisancié P., Barcelo A., Moro F., Claustre J., Chayvialle J.-A. et Cuber J.-C. (1998), « Effects of neurotransmitters, gut hormones, and inflammatory mediators on mucus discharge in rat colon », *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 275, n°5, pp. G1073 -G1084.

Pontier C., Pachot J., Botham R., Lenfant B. et Arnaud P. (2001), « HT29-MTX and Caco-2/TC7 monolayers as predictive models for human intestinal absorption: Role of the mucus layer », *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 90, n°10, pp. 1608-1619.

Rees D.A. et Alcolado J.C. (2005), « Animal models of diabetes mellitus », *Diabetic Medicine*, vol. 22, n°4, pp. 359–370.

Reix N., Sigrist S., Heurtault B., Agin A., Moreau F., Pinget M. et Jeandidier N. (2013), « Glycemic management of diabetes by insulin therapy », *Minerva endocrinologica*, vol. 38, n°1, pp. 29-46.

Reix N., Parat A., Seyfritz E., Der Werf R. Van, Epure V., Ebel N., Danicher L., Marchioni E., Jeandidier N., Pinget M., Frère Y. et Sigrist S. (2012), « In vitro uptake evaluation in Caco-2 cells and in vivo results in diabetic rats of insulin-loaded PLGA nanoparticles », *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 437, n°1–2, pp. 213-220.

Rekha M.R. et Sharma C.P. (2013), « Oral delivery of therapeutic protein/peptide for diabetes--future perspectives », *International journal of pharmaceutics*, vol. 440, n°1, pp. 48-62.

Renukuntla J., Vadlapudi A.D., Patel A., Boddu S.H.S. et Mitra A.K. (2013), « Approaches for enhancing oral bioavailability of peptides and proteins », *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 447, n°1–2, pp. 75-93.

Repnik U., Stoka V., Turk V. et Turk B. (2012), « Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, vol. 1824, n°1, pp. 22-33.

Rewers M. (2012), « Challenges in Diagnosing Type 1 Diabetes in Different Populations », *Diabetes & Metabolism Journal*, vol. 36, n°2, pp. 90.

Rhodes C.J. et White M.F. (2002), « Molecular insights into insulin action and secretion », *European journal of clinical investigation*, vol. 32 Suppl 3, pp. 3-13.

Ricotti L., Assaf T., Dario P. et Menciassi A. (2013), « Wearable and implantable pancreas substitutes », *Journal of artificial organs: the official journal of the Japanese Society for Artificial Organs*, vol. 16, n°1, pp. 9-22.

Rieux A. des, Fievez V., Garinot M., Schneider Y.-J. et Pr at V. (2006), « Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach », *Journal of Controlled Release*, vol. 116, n°1, pp. 1-27.

Risom L., M ller P. et Loft S. (2005), « Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution », *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 592, n°1–2, pp. 119-137.

Roberge J.N. et Brubaker P.L. (1993), « Regulation of intestinal proglucagon-derived peptide secretion by glucose-dependent insulinotropic peptide in a novel enteroendocrine loop », *Endocrinology*, vol. 133, n°1, pp. 233-240.

Rocha R.A., V lez D. et Devesa V. (2012), « In vitro evaluation of intestinal fluoride absorption using different cell models », *Toxicology Letters*, vol. 210, n°3, pp. 311-317.

Roger E., Kalscheuer S., Kirtane A., Guru B.R., Grill A.E., Whittum-Hudson J. et Panyam J. (2012), « Folic Acid Functionalized Nanoparticles for Enhanced Oral Drug Delivery », *Molecular pharmaceutics*, n°9, pp. 2103-2110.

Rosa G.D., Iommelli R., Rotonda M.I. La, Miro A. et Quaglia F. (2000), « Influence of the co-encapsulation of different non-ionic surfactants on the properties of PLGA insulin-loaded microspheres », *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, vol. 69, n°2, pp. 283-295.

Saltiel A.R. et Kahn C.R. (2001), « Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism », *Nature*, vol. 414, n°6865, pp. 799-806.

Sambuy Y., Angelis I., Ranaldi G., Scarino M.L., Stamatii A. et Zucco F. (2005), « The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics », *Cell Biology and Toxicology*, vol. 21, n°1, pp. 1-26.

Santos T. dos, Varela J., Lynch I., Salvati A. et Dawson K.A. (2011), « Effects of Transport Inhibitors on the Cellular Uptake of Carboxylated Polystyrene Nanoparticles in Different Cell Lines » Joel M. Schnur (dir.), *PLoS ONE*, vol. 6, n°9, pp. e24438.

Saraste A. et Pulkki K. (2000), « Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis », *Cardiovascular research*, vol. 45, n°3, pp. 528-537.

Sarmiento B., Ribeiro A., Veiga F., Sampaio P., Neufeld R. et Ferreira D. (2007), « Alginate/chitosan nanoparticles are effective for oral insulin delivery », *Pharmaceutical research*, vol. 24, n°12, pp. 2198-2206.

Selam J.L., Bergman R.N., Raccach D., Jean-Didier N., Lozano J. et Charles M.A. (1990), « Determination of portal insulin absorption from peritoneum via novel nonisotopic method », *Diabetes*, vol. 39, n°11, pp. 1361-1365.

Semete B., Booyesen L.I.J., Kalombo L., Venter J.D., Katata L., Ramalapa B., Verschoor J.A. et Swai H. (2010), « In vivo uptake and acute immune response to orally administered chitosan and PEG coated PLGA nanoparticles », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 249, n°2, pp. 158-165.

Shah P., Jogani V., Bagchi T. et Misra A. (2006), « Role of Caco-2 Cell Monolayers in Prediction of Intestinal Drug Absorption », *Biotechnology Progress*, vol. 22, n°1, pp. 186-198.

Sharifi S., Behzadi S., Laurent S., Laird Forrest M., Stroeve P. et Mahmoudi M. (2012), « Toxicity of nanomaterials », *Chemical Society Reviews*.

Shaw L.R., Irwin W.J., Grattan T.J. et Conway B.R. (2005), « The influence of excipients on the diffusion of ibuprofen and paracetamol in gastric mucus », *International journal of pharmaceutics*, vol. 290, n°1-2, pp. 145-154.

Shrayyef M. et Gerich J.E. (2010), « Normal Glucose Homeostasis », in Leonid Poretzky (dir.), *Principles of Diabetes Mellitus*, Springer US, pp. 19-35.

Shvedova A.A., Pietroiusti A., Fadeel B. et Kagan V.E. (2012), « Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: Focus on oxidative stress », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 261, n°2, pp. 121-133.

Silva C.M., Veiga F., Ribeiro A.J., Zerrouk N. et Arnaud P. (2006), « Effect of chitosan-coated alginate microspheres on the permeability of Caco-2 cell monolayers », *Drug development and industrial pharmacy*, vol. 32, n°9, pp. 1079-1088.

Sinclair E.M. et Drucker D.J. (2005), « Proglucagon-derived peptides: mechanisms of action and therapeutic potential », *Physiology (Bethesda, Md.)*, vol. 20, pp. 357-365.

Singh R., Fouladi-Nashta A.A., Li D., Halliday N., Barrett D.A. et Sinclair K.D. (2006), « Methotrexate induced differentiation in colon cancer cells is primarily due to purine deprivation », *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 99, n°1, pp. 146-155.

Singh R. et Lillard J.W. (2009), « Nanoparticle-based targeted drug delivery », *Experimental and Molecular Pathology*, vol. 86, n°3, pp. 215-223.

Sladek R., Rocheleau G., Rung J., Dina C., Shen L., Serre D., Boutin P., Vincent D., Belisle A., Hadjadj S., Balkau B., Heude B., Charpentier G., Hudson T.J., Montpetit A., Pshezhetsky A.V., Prentki M., Posner B.I., Balding D.J., Meyre D., Polychronakos C. et Froguel P. (2007), « A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes », *Nature*, vol. 445, n°7130, pp. 881-885.

Smirnova M.G., Guo L., Birchall J.P. et Pearson J.P. (2003), « LPS up-regulates mucin and cytokine mRNA expression and stimulates mucin and cytokine secretion in goblet cells », *Cellular Immunology*, vol. 221, n°1, pp. 42-49.

Song Q., Wang X., Hu Q., Huang M., Yao L., Qi H., Qiu Y., Jiang X., Chen J., Chen H. et Gao X. (2013), « Cellular internalization pathway and transcellular transport of pegylated polyester nanoparticles in Caco-2 cells », *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 445, n°1-2, pp. 58-68.

Sonia T.A. et Sharma C.P. (2012), « An overview of natural polymers for oral insulin delivery », *Drug Discovery Today*, vol. 17, n°13-14, pp. 784-792.

Srinivasan K. et Ramarao P. (2007), « Animal models in type 2 diabetes research: an overview », *The Indian journal of medical research*, vol. 125, n°3, pp. 451-472.

Stadnyk A.W. (2002), « Intestinal epithelial cells as a source of inflammatory cytokines and chemokines », *Cancer Journal Gastroenterology*, avril 2002, pp. 241-246.

Stefano D. De, Carnuccio R. et Maiuri M.C. (2012), « Nanomaterials Toxicity and Cell Death Modalities », *Journal of Drug Delivery*, vol. 2012.

Stern S., Adisheshaiah P. et Crist R. (2012), « Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity », *Particle and Fibre Toxicology*, vol. 9, n°1, pp. 20.

Still J.G. (2002), « Development of oral insulin: progress and current status - Gordon Still - 2002 - Diabetes/Metabolism Research and Reviews - Wiley Online Library », *Diabetes Metab Res Rev*, 2002, pp. S29-s37.

Stumvoll M., Goldstein B.J. et Haefliger T.W. van (2005), « Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy », *The Lancet*, vol. 365, n°9467, pp. 1333-1346.

Szkudelski T. (2001), « The Mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas », *Physiological Research*, n°50, pp. 536-546.

Tahara K., Samura S., Tsuji K., Yamamoto H., Tsukada Y., Bando Y., Tsujimoto H., Morishita R. et Kawashima Y. (2011), « Oral nuclear factor- κ B decoy oligonucleotides delivery system with chitosan modified poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanospheres for inflammatory bowel disease », *Biomaterials*, vol. 32, n°3, pp. 870-878.

Takahata H., Lavelle E.C., Coombes A.G. et Davis S.S. (1998), « The distribution of protein associated with poly(DL-lactide co-glycolide) microparticles and its degradation in simulated body fluids », *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, vol. 50, n°1-3, pp. 237-246.

Thompson C., Cheng W.P., Gadad P., Skene K., Smith M., Smith G., McKinnon A. et Knott R. (2011), « Uptake and Transport of Novel Amphiphilic Polyelectrolyte-Insulin Nanocomplexes by Caco-2 Cells—Towards Oral Insulin », *Pharmaceutical Research*, vol. 28, pp. 886-896.

Thorens B. (2003), « Incrélines, sécrétion d'insuline et diabète », *M/S: médecine sciences*, vol. 19, n°8-9, pp. 860-863.

Tibaldi J.M. (2012), « Evolution of Insulin Development: Focus on Key Parameters », *Advances in Therapy*, vol. 29, n°7, pp. 590-619.

Torchilin V.P. (2005), « Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers », *Nature reviews. Drug discovery*, vol. 4, n°2, pp. 145-160.

Vaarala O., Atkinson M.A. et Neu J. (2008), « The “Perfect Storm” for Type 1 Diabetes: The Complex Interplay Between Intestinal Microbiota, Gut Permeability, and Mucosal Immunity », *Diabetes*, vol. 57, n°10, pp. 2555-2562.

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M. et Telser J. (2007), « Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease », *The international journal of biochemistry & cell biology*, vol. 39, n°1, pp. 44-84.

Valla V. (2012), « Continuous subcutaneous insulin infusion (CSII) pumps », *Advances in experimental medicine and biology*, vol. 771, pp. 414-419.

Vamanu C.I., Cimpan M.R., Høl P.J., Sørnes S., Lie S.A. et Gjerdet N.R. (2008), « Induction of cell death by TiO₂ nanoparticles: studies on a human monoblastoid cell line », *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, vol. 22, n°7, pp. 1689-1696.

Vandervoort J., Yoncheva K. et Ludwig A. (2004), « Influence of the homogenisation procedure on the physicochemical properties of PLGA nanoparticles », *Chemical & pharmaceutical bulletin*, vol. 52, n°11, pp. 1273-1279.

Vauthier C., Dubernet C., Fattal E., Pinto-Alphandary H. et Couvreur P. (2003), « Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 55, n°4, pp. 519-548.

Venkatraman S.S., Ma L.L., Natarajan J.V. et Chattopadhyay S. (2010), « Polymer- and liposome-based nanoparticles in targeted drug delivery », *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*, vol. 2, pp. 801-814.

Vercauteren D., Vandenbroucke R.E., Jones A.T., Rejman J., Demeester J., Smedt S.C. De, Sanders N.N. et Braeckmans K. (2010), « The Use of Inhibitors to Study Endocytic Pathways of Gene Carriers: Optimization and Pitfalls », *Molecular Therapy*, vol. 18, n°3, pp. 561-569.

Virally M., Kevorkian J.-P. et Guillausseau P.-J. (2008), « Incrélines, incrélinomimétiques et inhibiteurs de la DPP-4: homéostasie glucidique et diabète de type 2 », *STV. Sang thrombose vaisseaux*, vol. 20, n°9, pp. 453-461.

Vos F.E., Manning P.J., Sutherland W.H., Schollum J.B. et Walker R.J. (2011), « Anti-inflammatory effect of an insulin infusion in patients on maintenance haemodialysis: A randomized controlled pilot study », *Nephrology*, vol. 16, n°1, pp. 68-75.

Vranic S., Boggetto N., Contremoulins V., Mornet S., Reinhardt N., Marano F., Baeza-Squiban A. et Boland S. (2013), « Deciphering the mechanisms of cellular uptake of engineered nanoparticles by accurate evaluation of internalization using imaging flow cytometry », *Particle and Fibre Toxicology*, vol. 10, n°1, pp. 2.

Walle J. Van de, Hendrickx A., Romier B., Larondelle Y. et Schneider Y.-J. (2010), « Inflammatory parameters in Caco-2 cells: Effect of stimuli nature, concentration, combination and cell differentiation », *Toxicology in Vitro*, août 2010, pp. 1441-1449.

Walter E., Janich S., Roessler B.J., Hilfinger J.M. et Amidon G.L. (1996), « HT29-MTX/Caco-2 cocultures as an in vitro model for the intestinal epithelium: In vitro-in vivo correlation with permeability data from rats and humans », *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 85, n°10, pp. 1070-1076.

Wang H., Zhao Y., Wu Y., Hu Y., Nan K., Nie G. et Chen H. (2011), « Enhanced anti-tumor efficacy by co-delivery of doxorubicin and paclitaxel with amphiphilic methoxy PEG-PLGA copolymer nanoparticles », *Biomaterials*, vol. 32, n°32, pp. 8281-8290.

Wang J., Gerlach J.D., Savage N. et Cobb G.P. (2013), « Necessity and approach to integrated nanomaterial legislation and governance », *Science of The Total Environment*, vol. 442, pp. 56-62.

Wang M., Zhang Y., Feng Jiao, Gu Tiejun, Dong Qingguang, Yang Xu, Sun Yanan, Wu Yongge, Chen Yan et Kong Wei (2013), « Preparation, characterization, and in vitro and in vivo investigation of chitosan-coated poly (d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles for intestinal delivery of exendin-4 », *International Journal of Nanomedicine*, pp. 1141.

Wang Z., Liu L., Hu T., Lei W., Wan F., Zhang P., Wang Z., Xu J., Zhu H., Zhu Z., Yang Y., Hu X., Xu L. et Wang S. (2012), « Protective effect of glucose–insulin–potassium (GIK) on intestinal tissues after severe burn in experimental rats », *Burns*, vol. 38, n°6, pp. 846-854.

Wawrezynieck A., Péan J.-M., Wüthrich P. et Benoit J.-P. (2008), « Biodisponibilité et vecteurs particuliers pour la voie orale », *médecine/sciences*, vol. 24, n°6-7, pp. 659-664.

Wei M., Ong L., Smith M.T., Ross F.B., Schmid K., Hoey A.J., Burstow D. et Brown L. (2003), « The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes », *Heart, Lung and Circulation*, vol. 12, n°1, pp. 44-50.

White M.F. (1997), « The insulin signalling system and the IRS proteins », *Diabetologia*, vol. 40 Suppl 2, pp. S2-17.

Whiting D.R., Guariguata L., Weil C. et Shaw J. (2011), « IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030 », *Diabetes Research and Clinical Practice*, vol. 94, n°3, pp. 311-321.

Whittingham J.L., Scott D.J., Chance K., Wilson A., Finch J., Brange J. et Guy Dodson G. (2002), « Insulin at pH 2: structural analysis of the conditions promoting insulin fibre formation », *Journal of molecular biology*, vol. 318, n°2, pp. 479-490.

Wolfs M., Hofker M., Wijmenga C. et Haeflén T. van (2009), « Type 2 Diabetes Mellitus: New Genetic Insights will Lead to New Therapeutics », *Current Genomics*, vol. 10, n°2, pp. 110-118.

Wucherpfeffnig K.W. et Eisenbarth G.S. (2001), « Type 1 diabetes », *Nature immunology*, vol. 2, n°9, pp. 767-768.

Xia T., Kovoichich M., Brant J., Hotze M., Sempf J., Oberley T., Sioutas C., Yeh J.I., Wiesner M.R. et Nel A.E. (2006), « Comparison of the Abilities of Ambient and Manufactured Nanoparticles To Induce Cellular Toxicity According to an Oxidative Stress Paradigm », *Nano Letters*, vol. 6, n°8, pp. 1794-1807.

Xu A., Yao M., Xu G., Ying J., Ma W., Li B. et Jin Y. (2012), « A physical model for the size-dependent cellular uptake of nanoparticles modified with cationic surfactants », *International journal of nanomedicine*, vol. 7, pp. 3547-3554.

Yamamoto A., Taniguchi T., Rikyu K., Tsuji T., Fujita T., Murakami M. et Muranishi S. (1994), « Effects of various protease inhibitors on the intestinal absorption and degradation of insulin in rats », *Pharmaceutical research*, vol. 11, n°10, pp. 1496-1500.

Yang J., Sun H. et Song C. (2012), « Preparation, characterization and in vivo evaluation of pH-sensitive oral insulin-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles », *Diabetes, Obesity and Metabolism*, vol. 14, n°4, pp. 358-364.

Yeo Y., Baek N. et Park K. (2001), « Microencapsulation methods for delivery of protein drugs », *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, vol. 6, n°4, pp. 213-230.

Yin Win K. et Feng S.-S. (2005), « Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs », *Biomaterials*, vol. 26, n°15, pp. 2713-2722.

Yip C.C. et Ottensmeyer P. (2003), « Three-dimensional Structural Interactions of Insulin and Its Receptor », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, n°30, pp. 27329-27332.

Yuasa H., Matsuda K. et Watanabe J. (1993), « Influence of anesthetic regimens on intestinal absorption in rats », *Pharmaceutical research*, vol. 10, n°6, pp. 884-888.

Zhang X., Sun M., Zheng A., Cao D., Bi Y. et Sun J. (2012), « Preparation and characterization of insulin-loaded bioadhesive PLGA nanoparticles for oral administration », *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 45, n°5, pp. 632-638.

Zhu M., Nie G., Meng H., Xia T., Nel A. et Zhao Y. (2013), « Physicochemical Properties Determine Nanomaterial Cellular Uptake, Transport, and Fate », *Accounts of chemical research*, vol. 46, n°3, pp. 622-631.

Zhu X.-D., Zhuang Y., Ben J.-J., Qian L.-L., Huang H.-P., Bai H., Sha J.-H., He Z.-G. et Chen Q. (2011), « Caveolae-dependent Endocytosis Is Required for Class A Macrophage Scavenger Receptor-mediated Apoptosis in Macrophages », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, n°10, pp. 8231-8239.

Zinman B. (2013), « Newer insulin analogs: advances in basal insulin replacement », *Diabetes, obesity & metabolism*, vol. 15 Suppl 1, pp. 6-10.

Zödl B., Schmid D., Wassler G., Gundacker C., Leibetseder V., Thalhammer T. et Ekmekcioglu C. (2007), « Intestinal transport and metabolism of acrylamide », *Toxicology*, vol. 232, n°1-2, pp. 99-108.

Zong W.-X. et Thompson C.B. (2006), « Necrotic death as a cell fate », *Genes & Development*, vol. 20, n°1, pp. 1-15.

Zwaal R.F.A., Comfurius P. et Bevers E.M. (2005), « Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells », *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, vol. 62, n°9, pp. 971-988.

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

PUBLICATIONS

Reix N., **Guhmann P.**, Bietiger W., Pinget M., Jeandidier N., Sigrist S. Specific drug delivery: *In vivo* assessment of a pharmaceutically developed enteric-coated capsule for a broad applicability in rat studies. *International Journal of Pharmaceutics* 422 (2012) 338– 340.

En cours de rédaction

Guhmann P., Mura C., Diop M., Bekel A., Frère Y., Pons F., Sigrist S. Uptake and safety of insulin loaded PLGA nanoparticles for oral administration: impact of concentration and size.

Guhmann P., Mura C., Diop M., Bekel A., Frère Y., Pons F., Sigrist S. Internalization pathways and safety of insulin loaded PLGA nanoparticles and microparticles for oral administration of insulin.

POSTER

Guhmann P., Mura C., Bekel A., Auberval N., Pinget M., Jeandidier N., Frère Y., Pons F., Sigrist S. Uptake and safety of insulin-loaded PLGA nanoparticles by Caco-2 cells and Caco-2/HT29-MTX co-cultures as a function of concentration and size. (Groupe Thématique de Recherche sur la Vectorisation, Décembre 2012, Chilly-Mazarin, France).