



## THESE

Pour l'obtention du titre de Docteur de l'université de La Réunion

**Spécialité : Biochimie**

**Présentée par : Latufa YOUSOUF**

Fonctionnalisation de biopolymères extraits de  
macroalgues pour encapsuler des principes actifs  
hydrophobes

Soutenue publiquement le 13 décembre 2016

### Composition du Jury :

Pr Cécile Vindis	Directrice de recherche, INSERM Toulouse	Présidente
Dr Sophie Zinn-Justin	Directrice de recherches, CEA Saclay	Rapporteur
Pr William Helbert	Professeur, Université de Grenoble	Rapporteur
Dr Marjolaine Roche	Maitre de conférences, Université de La Réunion	Examinatrice
Dr Laura Lallemand	Chercheur, CYROI La Réunion	Examinatrice
Pr C. Lefebvre D'Hellencourt	Professeur, Université de La Réunion	Directeur
Pr Dhanjay Jhurry	Professeur, Université de Maurice	Co-directeur
Dr Joël Couprie	Maitre de conférences, Université de La Réunion	Encadrant

*A mes parents, à ma famille,*

## Remerciements

*Je souhaiterais remercier Monsieur Olivier Meilhac pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de l'UMR D  TROI et pour m'avoir aidé à développer ce travail. Je te témoigne ma gratitude et mon respect.*

*J'adresse mes remerciements à Monsieur Christian Lefebvre D'Hellencourt pour avoir dirigé cette thèse, pour ses précieux conseils, sa réactivité et son aide scientifique. Je tiens à t'exprimer ma profonde reconnaissance.*

*Je remercie Monsieur Dhanjay Jhurry pour avoir codirigé cette thèse et pour m'avoir accueill   au sein de sa structure pendant six mois durant lesquels j'ai réalisé une partie de ce travail.*

*Je tiens à exprimer mes remerciements à Monsieur Joël Couprie pour m'avoir donné la chance de réaliser ce travail de thèse et pour m'avoir guidé durant ces trois ans. Je te remercie pour tout le temps que tu m'as accordé et pour tes encouragements pendant la phase de rédaction. Merci de m'avoir transmis une partie de ton savoir en RMN !*

*Je remercie Madame Achana Bhaw-Luximon pour son implication dans la réalisation de ce travail durant mon séjour au CBBR. Je vous adresse ma sincère reconnaissance.*

*Mes remerciements vont également à Madame Laura Lallemand pour ses conseils sur toute la partie éco-extraction des biomolécules.*

*Je remercie l'ensemble des personnalités scientifiques qui ont accepté de juger mon travail de thèse : Madame Sophie Zinn-Justin (CEA Saclay), Monsieur William Helbert (Université de Grenoble), Madame Cécile Vindis (INSERM, Toulouse), Madame Marjolaine Roche (Université de La Réunion).*

*J'adresse mes remerciements à l'ensemble des membres de l'UMR D  TROI et particulièrement à Pierre Giraud, Nicolas Diotel et Aurélie Catan pour avoir contribué à la réalisation de ce travail.*

*Merci    Faiza, Thomas et Ma  va pour avoir été des stagiaires très impliqués. J'ai vraiment apprécié votre joie de vivre et votre bonne humeur à tous les trois.*

*Mes sincères remerciements à Angélique G. qui a été ma voisine de bureau mais pas seulement. Je te remercie pour ton amitié, pour tous ces moments de partage et d'émotions. Je pourrais écrire des lignes et des lignes mais tu sais ce que je pense ! Mille mercis pour tout...*

*Merci à Florence, Anne-Claire, Aurélie, Angélique A., Miora pour les moments conviviaux passés au CYROI ou à l'extérieur.*

*Merci à Nékita, Darshini, Radjeev, Reetesh, Nowsheen, Tasha, Arvind, Srishti, avec qui j'ai passé d'agréables moments à Maurice durant mon séjour de recherche. Je vous remercie de m'avoir fait découvrir la culture mauricienne et surtout les plats mauriciens !*

*Mes plus tendres remerciements à mes parents pour m'avoir toujours encouragé et donné la force d'avancer à chaque instant de ma vie. Je remercie également toute ma famille pour leur présence dans les bons comme les mauvais moments et cela malgré la distance.*

*Je n'oublie pas mes très chères amies Balika et Azal... Aussi loin que vous soyez, votre amitié, vos messages et vos encouragements m'ont toujours apporté de l'énergie positive. Je vous remercie toutes les deux pour votre amitié sans faille.*

*Je remercie toutes les personnes qui m'ont soutenu et encouragé durant cette thèse.*

*Un grand merci à Mourchi, je ne te remercierai jamais assez pour ton soutien et ta présence. Je te remercie également d'avoir essayé de me distraire un peu pendant la rédaction de ce manuscrit.*

## Table des matières

<b>Remerciements</b> .....	<b>3</b>
Liste des Figures .....	<b>7</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>8</b>
<b>Introduction générale</b> .....	<b>10</b>
<b>Partie I : Etude bibliographique</b> .....	<b>12</b>
<b>I. Le diabète, l'athérosclérose et les effets thérapeutiques de la curcumine</b> .....	<b>13</b>
1.1. Le stress oxydatif et ses conséquences moléculaires .....	14
1.1.1. Stress oxydant et modification des protéines.....	15
1.1.2. La peroxydation lipidique par les ROS.....	16
1.2. Le stress oxydant dans le développement du diabète de type 2 .....	18
1.3. Stress oxydant, diabète et complications cardiovasculaires .....	19
1.3.1. L'athérosclérose.....	20
1.3.2. Autres complications vasculaires chez les diabétiques.....	21
1.4. Les propriétés thérapeutiques de la curcumine .....	21
1.4.1. Les effets de la curcumine sur les ROS.....	22
1.4.2. Les effets de la curcumine sur la peroxydation des lipides et les LDL oxydés .....	24
1.4.3. Actions de la curcumine sur l'inflammation.....	24
<b>II. Pharmacocinétique ou devenir d'un principe actif dans l'organisme</b> .....	<b>27</b>
2.1. Absorption des principes actifs ou des médicaments.....	27
2.1.1. Absorption par voie digestive.....	28
2.1.2. Absorption par la peau (percutané) et les muqueuses .....	28
2.1.3. Absorption par voie respiratoire .....	29
2.1.4. Absorption immédiate.....	29
2.2. Distribution d'un principe actif dans l'organisme .....	30
2.3. Métabolisme d'un principe actif .....	32
2.4. Elimination d'un médicament de l'organisme .....	34
2.5. Cas de la curcumine.....	35
2.5.1. Absorption et distribution de la curcumine dans l'organisme .....	35
2.5.2. Métabolisme de la curcumine et son élimination de l'organisme .....	36
2.5.3. Solutions apportées pour améliorer la biodisponibilité de la curcumine .....	38
<b>III. Les systèmes de vectorisation de principes actifs</b> .....	<b>39</b>
3.1. Les nanovecteurs organiques.....	41
3.1.1. Les liposomes .....	41
3.1.2. Les lipoprotéines .....	41
3.1.3. Les dendrimères .....	42

3.1.4.	Les micelles.....	42
3.1.5.	Les nanosphères et les nanocapsules .....	43
3.1.6.	Les nanotubes de carbone .....	44
3.2.	Les nanoparticules inorganiques.....	44
3.2.1.	« Quantum dot » .....	45
3.2.2.	Nanoparticules d'oxyde de fer magnétique .....	45
<b>IV.</b>	<b>Les algues et leur utilisation.....</b>	<b>47</b>
4.1.	Composition des algues marines .....	48
4.1.1.	Les polysaccharides de macroalgues ou phycocolloïdes.....	48
	Les alginates .....	48
	Les carraghénanes.....	49
4.1.2.	Les composés nutraceutiques des algues .....	50
4.2.	Les algues dans l'alimentation humaine et animale .....	51
4.3.	Les algues dans le domaine pharmaceutique et cosmétique .....	52
4.4.	Les algues dans le domaine biomédical .....	53
	<b>Partie II : Résultats et travaux.....</b>	<b>54</b>
	<b>Chapitre 1 : Extraction et caractérisation de polysaccharides de macroalgues .....</b>	<b>56</b>
	Article 1: <i>“Ultrasound-assisted extraction and structural characterization of polysaccharides from seaweeds”</i> .....	57
	<b>Travaux associés.....</b>	<b>81</b>
	Conclusion chapitre 1.....	86
	<b>Chapitre 2 : Fonctionnalisation de phycocolloïdes pour véhiculer des molécules hydrophobes .....</b>	<b>87</b>
	Article 2: <i>“Design of carrageenan based nanomicelles for hydrophobic drug delivery applications, illustrated with Curcumin”</i> .....	88
	<b>Travaux associés.....</b>	<b>114</b>
	Conclusion chapitre 2.....	118
	<b>Conclusion générale .....</b>	<b>121</b>
	<b>Perspectives.....</b>	<b>125</b>
	<b>Bibliographie.....</b>	<b>127</b>
	<b>Résumé.....</b>	<b>143</b>

## Liste des Figures

<b>Figure 1</b> : La provenance et le devenir des ROS dans l'organisme.....	15
<b>Figure 2</b> : Formation des produits avancés de glycation (AGE).....	16
<b>Figure 3</b> : Peroxydation des lipides par les radicaux libres.....	17
<b>Figure 4</b> : Activation de la voie de signalisation NF-KB par les AGE via le récepteur RAGE.....	19
<b>Figure 5</b> : Rôle du stress oxydant et des oxydes de nitrite (NO) dans le développement de l'athérosclérose.....	20
<b>Figure 6</b> : Les trois curcuminoïdes présents dans le curcuma.....	22
<b>Figure 7</b> : Site de réaction de la curcumine avec les radicaux libres.....	23
<b>Figure 8</b> : Inhibition de la réponse immunitaire par la curcumine.....	25
<b>Figure 9</b> : Les différentes voies d'administration des principes actifs ou médicaments.....	30
<b>Figure 10</b> : diffusion passive et active à travers les membranes cellulaires.....	32
<b>Figure 11</b> : Structure du cP450 impliqué dans la biotransformation des principes actifs.....	33
<b>Figure 12</b> : Organisation de l'unité fonctionnelle du rein, le néphron.....	34
<b>Figure 13</b> : Cycle entéro-hépatique .....	35
<b>Figure 14</b> : Métabolisme de la curcumine dans l'organisme.....	37
<b>Figure 15</b> : Représentation schématisée de quelques nanovecteurs organiques et inorganiques.....	40
<b>Figure 16</b> : Domaine de valorisation des algues dans le monde et en France selon le CEVA.....	47
<b>Figure 17</b> : Les différentes structures possibles des alginates.....	48
<b>Figure 18</b> : Les carraghénanes les plus représentés dans la nature.....	49
<b>Figure 19</b> : neutralisation du radical DPPH par une molécule antioxydante AH.....	81
<b>Figure 20</b> : Analyse des extraits éthanoliques (EtOH 80 %) de différentes algues.....	83
<b>Figure 21</b> : cinétique de disparition du rouge de Nil libre et encapsulée de la circulation sanguine chez la souris.....	114
<b>Figure 22</b> : bio-distribution du rouge de Nile libre et vectorisé chez la souris, 4 h après injection par voie intraveineuse.....	115

## Liste des abréviations

AAPH	2, 2'-azobis (2-amidinopropane)
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGE	Advanced glycation end products
ATP	Adénosine triphosphate
AVC	Accident Vasculaire Cérébral
BHE	Barrière Hématoencéphalique
COSY	correlation spectroscopy
DMSO	Diméthylsulfoxyde
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
eNOS	endothelial Nitric Oxide Synthase
GLUT	Glucose Transporter
HDL	High Density Lipoprotein
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
ICAM-1	Intracellular Adhesion Molecule 1
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
IL-1	Interleukine 1
IL-6	Interleukine 6
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
JNK	Janus N-terminal Kinase
LDL	Low Density Lipoprotein
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor-kappa B
nNOS	neuronal Nitric Oxide Synthase
NO	Nitrite Oxide
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PBS	Phosphate buffered saline
PCL	Polycaprolactone
RAGE	Récepteurs membranaires des AGE



RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	Reactive Oxygen Species
RNS	Reactive Nitrogen species
SEC	Size Exclusion Chromatography
SOD	Superoxyde dismutase
SVF	Sérum de veau fœtal
THF	Tétrahydrofurane
TMS	Tétraméthylsilane
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TNF-a	Tumor necrosis factor-alpha
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

## Introduction générale

La sédentarité, une alimentation non équilibrée, l'obésité et le tabagisme sont autant de facteurs qui peuvent induire des maladies métaboliques chroniques. Ces pathologies sont généralement associées à un stress oxydant responsable de nombreux dysfonctionnements dans l'organisme comme cela est observé dans le développement du diabète de type 2 et de ses atteintes cardiovasculaires.

Le stress oxydant correspond à un excès de radicaux libres oxygénés (ROS) dans les cellules par rapport aux défenses antioxydantes de l'organisme. A long terme, les ROS peuvent conduire à un état inflammatoire chronique et contribuer au développement de maladies chroniques. L'organisme dispose d'un ensemble d'enzymes antioxydantes dont la catalase, la superoxyde dismutase et le glutathion qui sont capables de neutraliser les ROS. Cependant l'apport de molécules antioxydantes dans l'organisme est nécessaire pour lutter efficacement contre la survenue d'un stress oxydant. Parmi les composés antioxydants, les polyphénols présents chez les végétaux sont les plus connus.

L'archipel des Mascareignes est qualifié de « hotspot » de biodiversité à la fois marine et terrestre. En effet de nombreux végétaux renferment des molécules valorisables notamment dans les domaines pharmaceutique et médical. Cette étude s'est particulièrement intéressée à la curcumine, un polyphénol retrouvé dans le *curcuma longa* de La Réunion. Cette molécule appartenant à la famille des curcuminoïdes est connue depuis des siècles pour ses nombreux bienfaits en médecine traditionnelle. Les propriétés thérapeutiques de ce composé ont aujourd'hui été largement démontrées dans plusieurs études. En effet, la curcumine est une molécule active capable d'interagir avec de nombreuses cibles moléculaires dans l'organisme telles que les ROS ou les médiateurs inflammatoires. Elle peut ainsi avoir une action préventive en agissant contre l'apparition du stress oxydant et l'inflammation. Elle peut également avoir une action curative en limitant le désordre instauré par les maladies métaboliques.

Cependant malgré les innombrables vertus thérapeutiques de la curcumine, sa consommation par voie orale dans l'alimentation ou en tant que médicament ne permet pas de ralentir l'évolution d'une pathologie ou très faiblement. En effet, la curcumine est très mal absorbée au niveau intestinal du fait de ses propriétés lipophiles et se retrouve directement éliminée par voie fécale. La faible proportion arrivant dans la circulation sanguine ne donne pas d'effets

thérapeutiques significatifs. Alternativement, l'administration par voie intraveineuse augmente la biodisponibilité mais la curcumine est rapidement métabolisée dans l'organisme. Les métabolites secondaires de la curcumine ont très peu d'effets biologiques et sont rapidement éliminés.

Ainsi, l'objectif de cette thèse était de proposer un système de vectorisation de la curcumine dans l'organisme afin d'améliorer sa biodisponibilité, de la protéger contre les dégradations enzymatiques et préserver ses propriétés. Pour ce faire des nanovecteurs sous forme de micelles ont été fabriqués à partir de carraghénanes qui sont des polysaccharides extraits de macroalgues.

Les algues représentent une ressource abondante dans les Mascareignes et sont constitués de plusieurs molécules d'intérêt. La première partie de ce travail de thèse était d'extraire et de caractériser les polysaccharides d'algues marines. Les avantages des polysaccharides sélectionnés sont leur solubilité dans l'eau, leur biocompatibilité et la présence de groupements chimiques hydroxyles pouvant être utilisés par la suite pour la fonctionnalisation de la surface des micelles.

La deuxième partie de ce travail avait pour objectif de fonctionnaliser les polysaccharides de macroalgues (carraghénanes) afin d'obtenir des copolymères ayant à la fois des propriétés hydrophobes et hydrophiles. En effet les carraghénanes sont des polymères hydrosolubles sur lesquels vont être greffés des chaînes de polyesters biocompatibles et hydrophobes pour former des copolymères amphiphiles. En milieu aqueux, ces copolymères devront être capables de s'assembler en micelles.

La capacité de ces micelles à véhiculer et à libérer des composés hydrophobes a été étudiée. Le passage des micelles à travers les bicouches lipidiques ainsi que l'effet biologique de la curcumine véhiculée ont été évalués sur un modèle cellulaire.

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration régionale entre l'UMR DÉTROU d'une part (Diabète athérombose Thérapie Réunion Océan Indien), dont les thématiques de recherches sont orientées sur l'étude des maladies cardiovasculaires liées au diabète et d'autre part le CBBR (Center for Biomaterials and Biomedical Research) spécialisé sur la mise en place de nouveaux matériaux pour la vectorisation de médicaments.

## Partie I : Etude bibliographique

## I. Le diabète, l'athérosclérose et les effets thérapeutiques de la curcumine

Les maladies métaboliques telles que le diabète et ses complications vasculaires figurent parmi les premières causes de mortalité dans le monde. Ces pathologies touchent essentiellement les pays industrialisés et les pays en voie de développement qui adoptent un mode de vie favorable à leur émergence (sédentarité, habitudes alimentaires...).

Le diabète est une maladie chronique caractérisée par une hyperglycémie qui correspond à un taux de glucose supérieur à 1,26 g/l. Il peut provenir d'une insuffisance de la production d'insuline par le pancréas (diabète de type 1) ou d'une incapacité de l'organisme à utiliser l'insuline pour le stockage du glucose (diabète de type 2). En 2012, le diabète a été la cause de 1,5 million de décès dans le monde selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé). En 2014, la prévalence du diabète dans le monde était de 8,5 % et concernait 422 millions de personnes.

Le diabète de type 1 ou insulino-dépendant touche environ 10 % des personnes diabétiques. Il concerne essentiellement les enfants et les jeunes adultes et survient suite à la destruction des cellules  $\beta$  du pancréas qui produisent l'insuline. Il s'agit d'une maladie auto-immune liée à des facteurs génétiques ou environnementaux. Les individus atteints par le diabète de type-1 reçoivent quotidiennement des injections d'insuline.

Le diabète de type 2 ou non insulino-dépendant qui concerne 90 % des diabétiques est caractérisé par une résistance à l'insuline empêchant les cellules de s'approvisionner en glucose. Pour répondre au manque de glucose dans les tissus, les cellules  $\beta$  du pancréas augmentent leur activité en sécrétant plus d'insuline. Cette action conduit à l'épuisement des cellules  $\beta$  qui cessent de fonctionner et ceci entraîne une production excessive de glucose par le foie. Le diabète de type 2 est généralement diagnostiqué chez les adultes de plus 40 ans et est souvent associé à l'obésité ou au surpoids. Le diabète de type 2 est traité avec des antidiabétiques oraux qui peuvent être combinés avec un traitement à l'insuline. Une alimentation saine et la pratique d'une activité physique sont également prescrites.

Les personnes diabétiques sont exposées à plusieurs types de complications dont les atteintes cardiovasculaires. En effet il existe un lien entre le désordre métabolique engendré par le

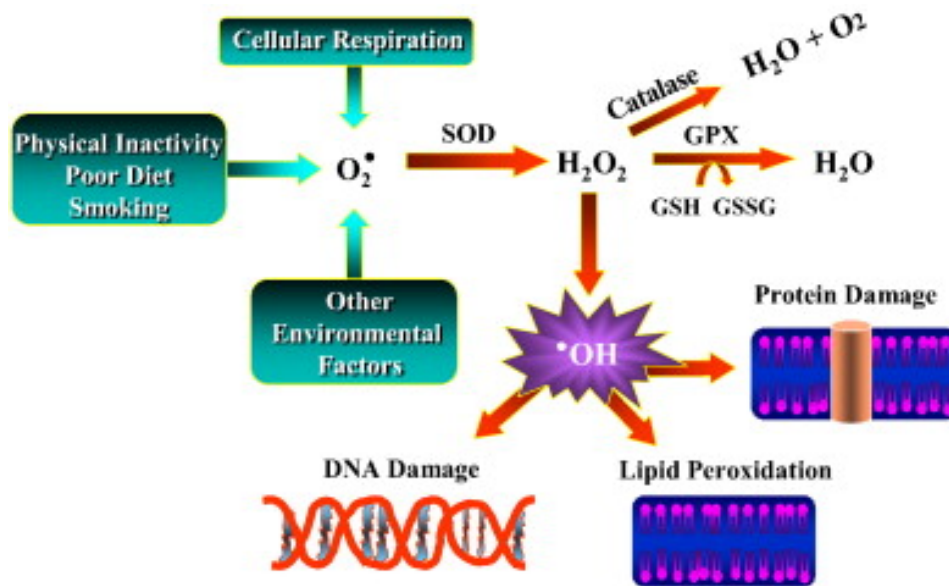
diabète et la survenue d'évènements vasculaires comme l'athérosclérose. Le stress oxydant est central dans l'initiation et le développement des maladies métaboliques.

### **1.1. Le stress oxydatif et ses conséquences moléculaires**

Les radicaux libres sont des espèces chimiques contenant un ou plusieurs électrons non appariés. Il existe plusieurs familles de radicaux libres dont les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les formes réactives de l'azote (RNS).

Les ROS sont les principales espèces pro-oxydantes et les plus impliquées dans les processus biologiques. Les plus connues sont l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ), produites essentiellement au niveau des mitochondries mais pouvant avoir différentes origines. En conditions physiologiques normales, ces ROS sont neutralisées par des enzymes endogènes qui sont le superoxyde dismutase (SOD), la catalase et le glutathion comme cela est présenté sur la figure 1. Cependant, l'excès de radicaux libres peut induire un stress oxydant et perturber le fonctionnement des cellules (Pisoschi et Pop 2015).

Le stress oxydatif est défini comme étant un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les défenses de l'organisme. En conditions normales, les ROS sont indispensables à de nombreux processus tels que la signalisation cellulaire, la différenciation et l'apoptose. Dans des conditions de stress oxydatif, ils contribuent à un dysfonctionnement cellulaire comme l'altération de l'ADN et des protéines ainsi que la peroxydation lipidique. De ce fait, le stress oxydant joue un rôle majeur dans la pathogenèse de nombreuses maladies comme le diabète et l'athérosclérose.

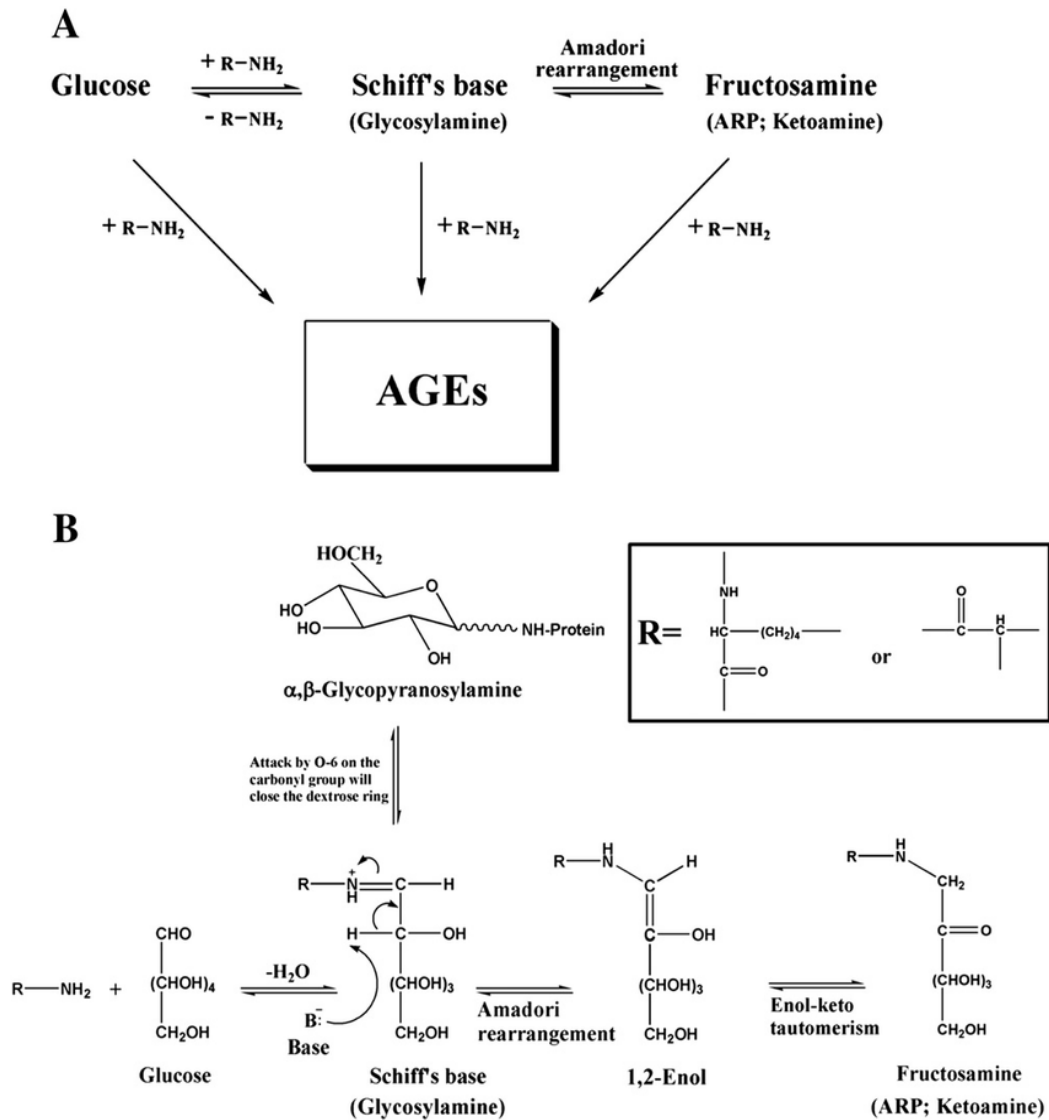


**Figure 1:** La provenance et le devenir des ROS dans l'organisme (Roberts et Sindhu 2009). Les ROS proviennent de la chaîne respiratoire ou de facteurs extérieurs (mode de vie...). Ils sont régulés par les défenses de l'organisme (SOD, catalase, GPX). L'absence de régulation conduit à des dommages sur l'ADN, les lipides et les protéines.

### 1.1.1. Stress oxydant et modification des protéines

Les ROS peuvent agir sur les protéines et induire des modifications pouvant altérer leurs fonctions. Les modifications sont réalisées sur les acides aminés ayant des groupements réactifs au niveau de leurs chaînes latérales (Zheng et al. 2012 ; V. P. Singh et al. 2014). L'arginine, la cystéine, l'histidine, la méthionine et la phénylalanine sont les plus concernées. Un exemple de modifications est la fixation de glucides au niveau de l'arginine ou la lysine pour former des produits avancés de glycation (AGE). Ce processus de glycoxydation est très actif dans des conditions d'hyperglycémie et est réalisé en plusieurs étapes. Tout d'abord, une réaction entre le glucide et un acide aminé a lieu pour donner une base de Schiff. Ensuite, des réarrangements d'Amadori sont effectués et enfin des réactions d'oxydation permettent d'obtenir les AGE (Figure 2).

L'albumine est un exemple de glycoxydation des protéines impliquées dans le développement du diabète. L'une des fonctions de l'albumine est de transporter des métabolites endogènes mais aussi des médicaments. La modification de sa structure peut ainsi avoir des conséquences sur cette fonction de transporteur (Anguizola et al. 2013).



**Figure 2:** Formation des produits avancés de glycation (A) ou AGE (Zheng et al. 2012) faisant intervenir une réaction d'addition nucléophile puis des réarrangement d'Amadori (B).

### 1.1.2. La peroxydation lipidique par les ROS

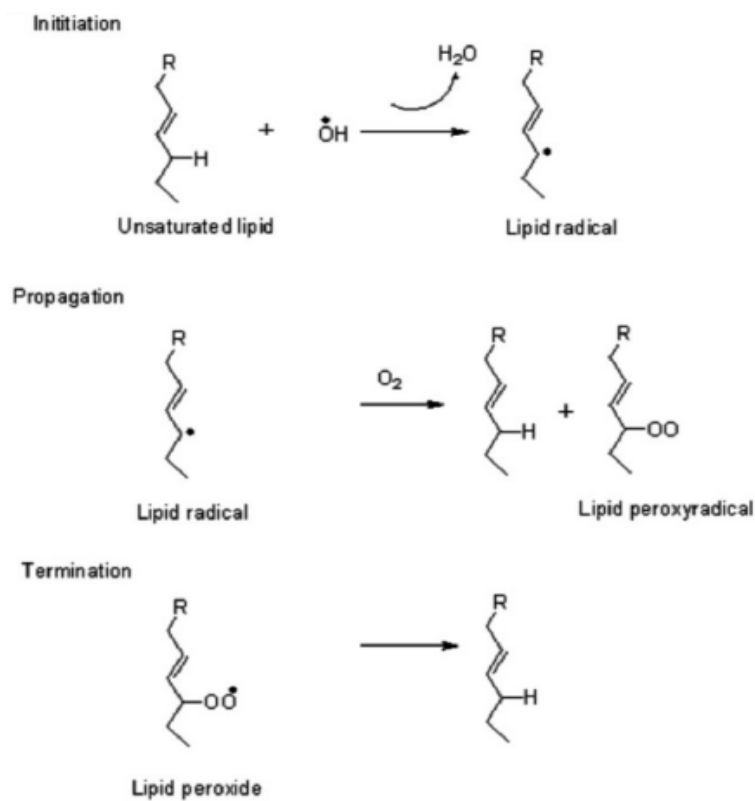
Le stress oxydatif peut avoir un impact sur l'intégrité, la fluidité et la stabilité des membranes cellulaires. En effet, les ROS peuvent interagir avec les acides gras insaturés des membranes cellulaires et récupérer des électrons pour se stabiliser (figure 3). Le radical formé par l'acide gras insaturé induit une réaction en chaîne qui est effectuée en trois phases : l'initiation, la propagation et la terminaison.

La réaction est initiée par un radical OH<sup>\*</sup> qui enlève un proton à un acide gras polyinsaturé pour former une molécule d'eau. Un radical peroxyde est ensuite formé lorsqu'une molécule



de dioxygène s'ajoute au niveau du lipide instable. Des échanges d'électrons sont réalisés avec les acides gras voisins propageant ainsi la réaction. Enfin les acides gras instables peuvent être neutralisés en présence d'une molécule antioxydante (Sachdeva et al. 2014 ; Yoshida, Umeno, et Shichiri 2013).

Ce phénomène est à l'origine du dysfonctionnement des membranes cellulaires et peut induire un dépôt de lipides oxydés dans les vaisseaux. La peroxydation touche également les LDL (*Low Density Lipoprotein*) perturbant ainsi l'homéostasie du cholestérol (Steinberg 1997 ; N. Singh et al. 2012).



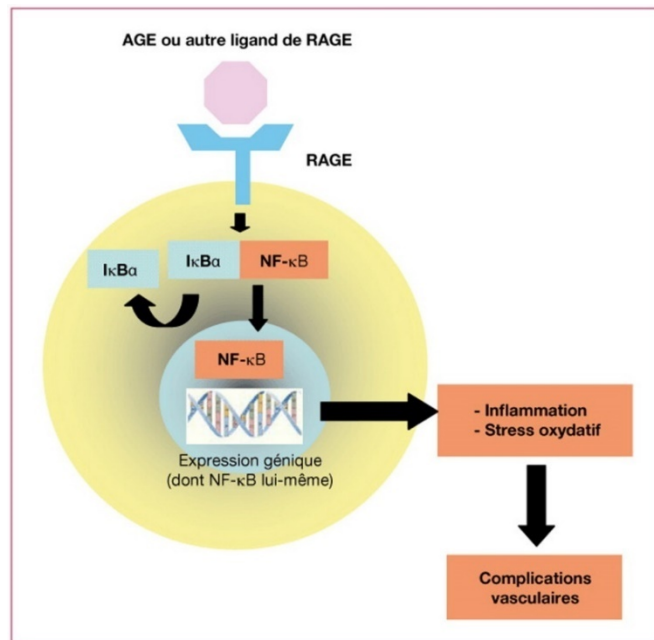
**Figure 3:** Peroxydation des lipides par les radicaux libres (Sachdeva et al. 2014) en trois étapes : initiation, propagation et terminaison.

## 1.2. Le stress oxydant dans le développement du diabète de type 2

L'excès de nutriments, l'hyperglycémie et le stress oxydant peuvent induire la formation des AGE. Certaines cellules expriment à leur surface le récepteur RAGE capable de reconnaître les AGE (figure 4). Ce récepteur spécifique est essentiellement présent au niveau des cellules endothéliales et des cellules du système immunitaire (macrophages, lymphocytes T, cellules dendritiques). La stimulation de RAGE entraîne une activation de la voie de signalisation NF-KB (Vatier et Fève 2010) qui induit une augmentation de la sécrétion des facteurs IL-1 (Interleukine 1), IL-6 (Interleukine 6) et TNF- $\alpha$  (Hommelberg et al. 2008). Ces cytokines entraînent une cascade de réactions responsables de l'activation de nombreuses autres voies de signalisations (Evans et al. 2003 ; Ramasamy, Yan, et Schmidt 2011) telles que MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) et JNK (Janus N-terminal Kinase).

Les facteurs inflammatoires sécrétés à l'issue de ces processus interfèrent avec la voie de signalisation de l'insuline et entretiennent l'hyperglycémie (de Luca et Olefsky 2008 ; Gogg, Smith, et Jansson 2009). Il en résulte une insulino-résistance responsable de l'épuisement des cellules  $\beta$  productrices d'insuline.

L'insuline est une hormone hypoglycémisante produite par les cellules  $\beta$  du pancréas. Sa fonction principale dans l'organisme est de réguler le taux glucose dans le sang en contrôlant les transporteurs de glucose (GLUT) à travers les membranes cellulaires. Après un repas, l'insuline stimule le stockage des glucides et bloque la production de glucose par le foie. A distance des repas, elle favorise la néoglucogenèse et la glycogénolyse (Lavoie et al. 1997). L'insulino-résistance conduit à des désordres métaboliques comme cela est observé dans le diabète de type 2 (Haag et Dippenaar 2005).



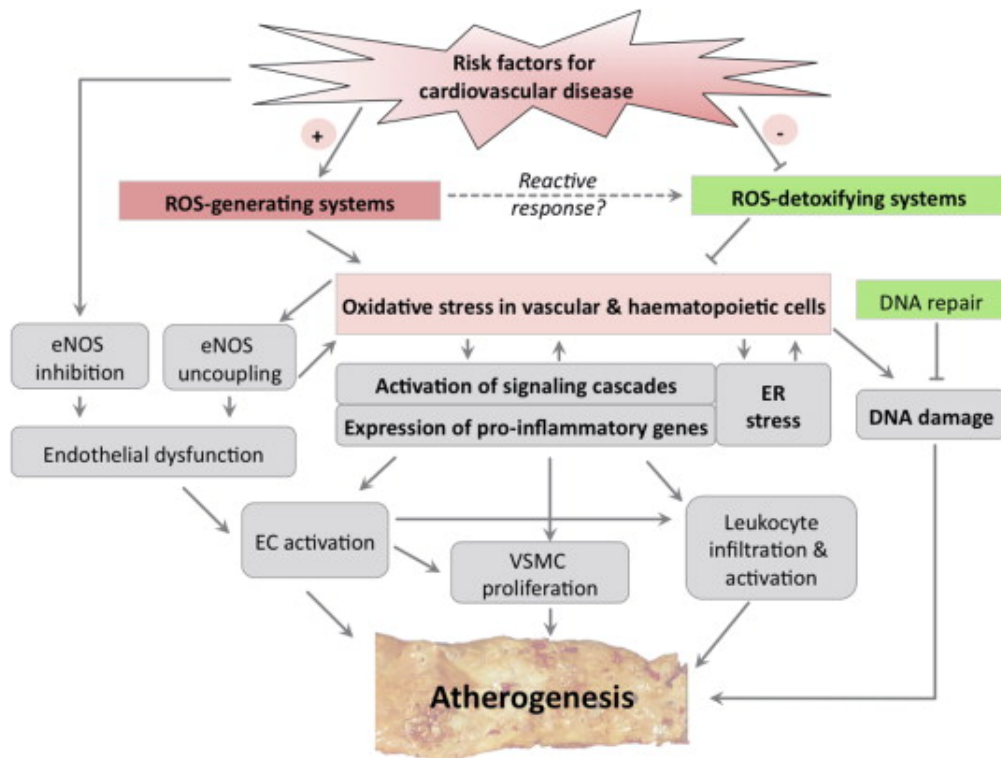
**Figure 4:** Activation de la voie de signalisation NF-κB par les AGE *via* le récepteur RAGE (Vatier et Fève 2010)

### 1.3. Stress oxydatif, diabète et complications cardiovasculaires

L'augmentation du stress oxydatif lors du diabète peut affecter la production d'oxyde de nitrite (NO) qui contrôle la vasomotricité. La voie de synthèse des oxydes de nitrite (NOS) fait appel à trois enzymes, les NO synthases. Il s'agit de la eNOS produite par les cellules endothéliales, la iNOS inducible par différents facteurs et la nNOS exprimée par les cellules neuronales. Ces enzymes catalysent la conversion de la L-arginine en L-citrulline qui est accompagnée par la libération de NO (Morita et al. 2014 ; Willoughby 2015). Il a été démontré que la dérégulation de eNOS favorise les complications cardiovasculaires chez les personnes présentant des facteurs de risques comme les diabétiques (Farhangkhoe et al. 2003). En effet, les LDL oxydés inhibent l'activité de eNOS au niveau des cellules endothéliales entraînant une diminution de la production de NO (Huige Li et Förstermann 2013 ; Mohanan Nair et al. 2016). Cette action est impliquée dans le dysfonctionnement endothélial à l'origine du recrutement des monocytes et lymphocytes initiant l'athérogenèse. Ces processus sont accompagnés par une activation de voies de signalisation inflammatoires comme cela est présenté sur la figure 5 (Huige Li, Horke, et Förstermann 2014).

L'induction de iNOS lors de l'inflammation chronique peut cependant favoriser la pathogenèse. En effet, la sécrétion de cytokine pro-inflammatoire due à l'activation de NF-κB

peut stimuler la production de NO par iNOS. L'induction de iNOS peut entraîner des complications cardiovasculaires notamment dans la vulnérabilité de la plaque d'athérome (Mallat et al. 1999).



**Figure 5 :** Rôle du stress oxydant et des oxydes de nitrite (NO) dans le développement de l'athérosclérose (Huige Li, Horke, et Förstermann 2014). Les facteurs de risques de développement de maladie cardiovasculaires stimulent la production de ROS et l'inhibition des défenses de l'organisme. L'inhibition de la sécrétion eNOS entraîne l'activation des cellules endothéliales (EC) et la formation des cellules spumeuses (VSMC) à partir des macrophages. L'activation des voies de signalisation entretient ce processus permettant le recrutement de leucocytes.

### 1.3.1. L'athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie métabolique qui touche les cellules endothéliales qui tapissent les vaisseaux sanguins. Un excès de cholestérol dans le plasma induit une augmentation de LDL plasmatiques et leur accumulation au niveau de l'intima des vaisseaux sanguins. Le stress oxydant engendré par l'excès de lipides et de cholestérol entraîne l'oxydation des LDL dans les cellules endothéliales (Stocker et Keaney 2004). Ces LDL oxydés induisent l'expression des récepteurs ICAM-1 (*Intercellular Cell Adhesion Molecule 1*) et VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*) responsables du recrutement des monocytes et des lymphocytes T (Galkina et Ley 2007 ; Schmitz et al. 2013). L'expression de MCP-1 (*Monocyte Chemotactic Protein 1*) active le passage des monocytes adhérents à travers les

jonctions inter-épithéliales. Les monocytes sont ensuite différenciés en macrophages qui vont à leur tour sécréter des cytokines permettant d'entretenir le processus en cours (Deshmane et al. 2009 ; Gerszten et al. 1999).

Les macrophages reconnaissent les LDL oxydées et les internalisent pour former les cellules spumeuses riches en lipides. Cette accumulation lipidique est entretenue par la sécrétion de cytokines par les macrophages qui continuent à accumuler les LDL pour donner des cellules spumeuses riches en lipides (Yu et al. 2013 ; Steinbrecher, Zhang, et Loughheed 1990). Par la suite, une chape fibreuse se forme autour du cœur lipidique pour former la plaque d'athérome.

Il en résulte une diminution progressive de la lumière artérielle et une insuffisance d'oxygénation des organes irrigués par le vaisseau touché. La rupture de la plaque devenue instable peut entraîner la formation d'un caillot qui peut avoir pour conséquence un accident vasculaire cérébral (AVC) ou un infarctus du myocarde (Reynal L 2015 ; Ciccone et al. 2014).

### **1.3.2. Autres complications vasculaires chez les diabétiques**

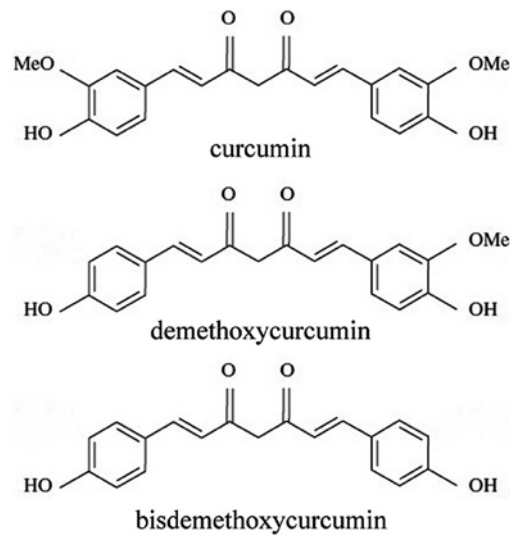
Le diabète peut également entraîner des atteintes microvasculaires qui sont la néphropathie et la rétinopathie (F. He et al. 2012 ; Strojek et al. 1997).

La rétinopathie est essentiellement due à l'hyperglycémie qui induit la formation d'œdème et de nouveaux vaisseaux dans la rétine responsables de la cécité.

La néphropathie est caractérisée par une insuffisance rénale qui a pour origine l'inflammation des cellules du rein après stimulation par l'hyperglycémie.

## **1.4. Les propriétés thérapeutiques de la curcumine**

Le curcuma ou *curcuma longa* est une plante herbacée de la famille des Zingibéracées. Ses racines sont utilisées comme épice dans les pays asiatiques comme l'Inde et la Chine. Cette épice caractérisée par sa couleur jaune, est composée de trois polyphénols appartenant à la famille des curcuminoïdes (Gupta, Kismali, et Aggarwal 2013). Il s'agit de la curcumine, la démetoxycurcumine et la bis-démetoxycurcumine qui diffèrent par le nombre de groupement méthoxy au niveau des cycles aromatiques (Figure 6). La plus abondante est la curcumine connue pour ses propriétés thérapeutiques.



**Figure 6 :** Les trois curcuminoïdes présents dans le curcuma (Shen 2012). La curcumine et la demethoxycurcumine sont constitués respectivement de 2 et 1 groupements méthoxy au niveau des cycles aromatiques. La bisdemethoxycurcumine n'a pas de groupement méthoxy.

Le stress oxydatif est à l'origine de nombreux dommages dans l'organisme pouvant induire un état inflammatoire et ainsi le développement de pathologies chroniques telles que les maladies métaboliques et cardiovasculaires. En effet, les ROS modulent de nombreuses voies de signalisations dont celles activées par le TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ) et celles impliquant le facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor Kappa-B) qui sont centrales dans la réponse immune. L'utilisation de molécules antioxydantes et antiinflammatoires comme la curcumine peut inhiber l'action des ROS.

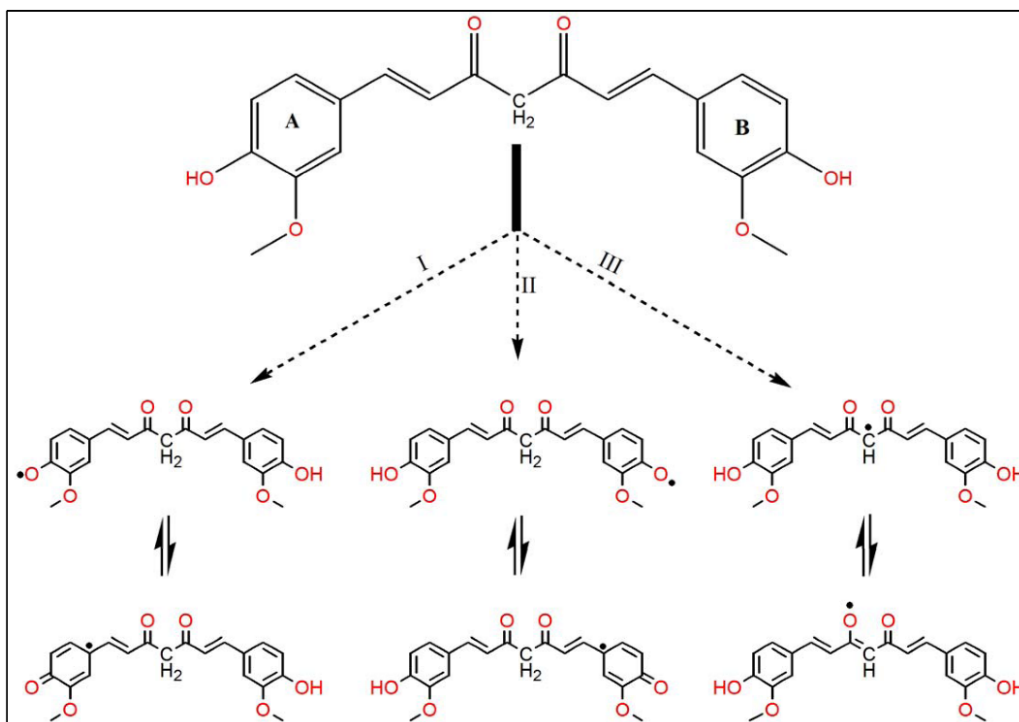
La curcumine est une molécule capable d'interagir avec différentes cibles moléculaires dans l'organisme. En effet, elle peut directement neutraliser les ROS grâce à son pouvoir antioxydant ou exercer un effet antiinflammatoire en inhibant l'expression des facteurs pro-inflammatoires (Y. He et al. 2015 ; Chainani-Wu 2003). Des études ont montré la capacité de la curcumine à agir sur de nombreuses voies de signalisation cellulaires impliquées notamment dans la pathogenèse du diabète et ses complications cardiovasculaires.

#### 1.4.1. Les effets de la curcumine sur les ROS

La curcumine est une molécule antioxydante capable de neutraliser les ROS en libérant un proton. Elle présente différents sites susceptibles de réagir avec les radicaux libres. Les

groupements phénoliques peuvent être à l'origine de l'activité antioxydante de la curcumine en libérant un proton comme cela est indiqué sur la figure 7. Les deux groupements phénoliques A et B sont aussi capables de libérer un proton selon les mécanismes I et II. Les groupements méthylène de la curcumine peuvent également être à l'origine des propriétés antioxydantes de la curcumine comme cela est montré par le mécanisme III. Les radicaux de curcumine formés se stabilisent par résonance (ou mésomérie) qui correspond à la délocalisation de l'électron au sein de la molécule (Barzegar et Moosavi-Movahedi 2011).

Ainsi la capacité de la curcumine à donner un proton permet de neutraliser les radicaux libres dans l'organisme et d'empêcher la survenue d'un stress oxydatif ou de le diminuer lorsque celui-ci est déjà installé.



**Figure 7 :** Site de réaction de la curcumine avec les radicaux libres. Les groupements phénols et méthylène permettent la neutralisation des radicaux libres. La curcumine ayant libéré un proton se stabilise par mésomérie

#### **1.4.2. Les effets de la curcumine sur la peroxydation des lipides et les LDL oxydés**

La peroxydation des lipides est l'une des conséquences du stress oxydatif qui intervient dans le développement des maladies métaboliques. Comme cela a été évoqué, cette modification des lipides altère les membranes cellulaires favorisant les complications vasculaires liées au diabète. Des études ont montré que la curcumine est capable d'interagir avec les lipides oxydés et de les neutraliser en libérant un proton (Sahebkar 2014 ; Akila et al. 1998 ; Y. P. Sun et al. 2016).

La peroxydation des LDL est également un élément clé dans l'athérogenèse. Cette modification entraîne l'accumulation des LDL dans le plasma puis leur recrutement au niveau des cellules endothéliales lors du développement de la plaque d'athérome. La curcumine peut également inhiber l'oxydation des LDL par son pouvoir antioxydant (Ramírez-Tortosa et al. 1999). Les LDL neutralisées par la curcumine pourraient de nouveau être reconnues par leur récepteur cellulaire et ainsi diminuer le taux de cholestérol plasmatique. De plus une étude a montré que la curcumine active l'expression du gène codant pour le récepteur aux LDL au niveau des cellules foie permettant l'élimination du cholestérol (Peschel, Koerting, et Nass 2007). La diminution du taux de cholestérol peut également être liée à l'augmentation des HDL plasmatiques par l'action de la curcumine (Ramírez-Tortosa et al. 1999).

#### **1.4.3. Actions de la curcumine sur l'inflammation**

Lors du développement des maladies métaboliques telles que le diabète, l'activation de nombreuses voies de signalisation entraînent un état inflammatoire chronique. Les cytokines inflammatoires secrétées maintiennent les désordres métaboliques et génèrent des complications.

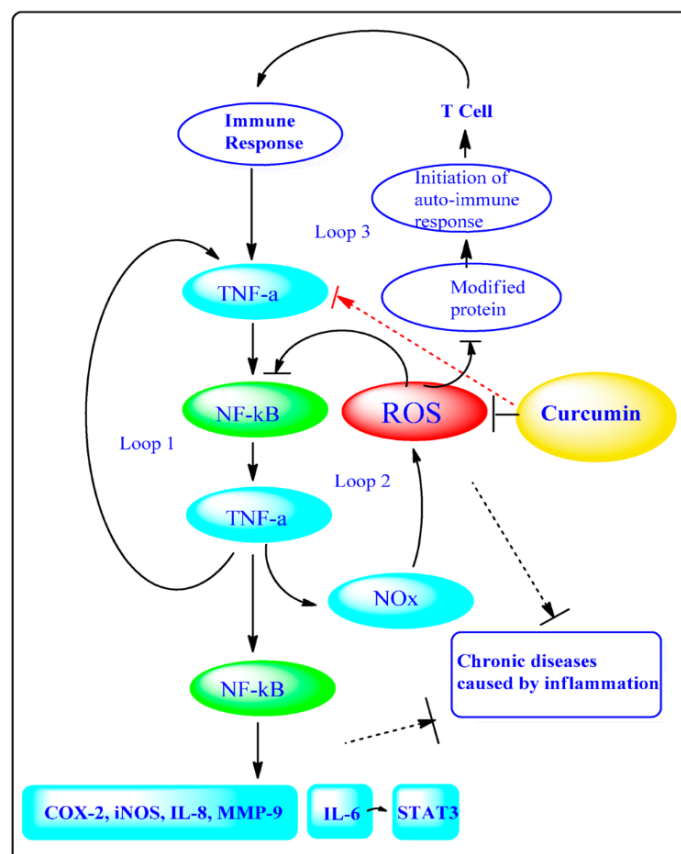
Les propriétés de la curcumine contre les maladies chroniques ont été largement étudiées. Elle inhibe la transcription du facteur NF- $\kappa$ B entraînant ainsi une diminution de la sécrétion de différents facteurs pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ , IL-1 et IL-6 (Jain et al. 2009). L'inhibition de cette voie de signalisation permet une diminution de la glycémie entraînant une diminution de la peroxydation des lipides et des LDL (Ramírez-Tortosa et al. 1999).

La diminution de l'oxydation des LDL par la curcumine entraîne une régulation positive de la voie des NO synthases permettant ainsi une augmentation de la production de NO. Il en résulte une régulation négative du processus d'athérogenèse.



Par ailleurs, l'activité accrue de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B lors de l'inflammation chronique stimule la production de NO par l'iNos. Des études ont démontré l'inhibition de l'iNos par la curcumine limitant ainsi les complications vasculaires (Bengmark 2006).

La figure 8 présente de façon schématique un exemple de régulation de quelques facteurs inflammatoires par la curcumine. En agissant sur les ROS, la curcumine diminue le stress oxydant empêchant ainsi les modifications dues à l'oxydation. Il en résulte une régulation négative de la réponse et de l'inflammation. L'inhibition des ROS a une conséquence directe sur l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B et donc sur sa voie de signalisation. Les autres voies de signalisation reliées au facteur NF- $\kappa$ B connaissent également une régulation négative. La diminution de l'inflammation diminue le risque d'apparition de syndromes physiopathologiques.



**Figure 8 :** Inhibition de la réponse immunitaire par la curcumine d'après (Y. He et al. 2015). La curcumine peut agir au niveau des ROS et inhiber ainsi la réponse immunitaire et les voies NF- $\kappa$ B et TNF- $\alpha$  inhibant ainsi la sécrétion de cytokine (IL-6, IL-8, MMP-9...). Elle peut également agir directement sur les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et TNF- $\alpha$ . L'ensemble de ces mécanismes diminue les risques de développement des maladies chroniques causées par l'inflammation.

Ainsi La curcumine peut agir à différents stades dans le développement des maladies chroniques telles que le diabète et ses complications cardiovasculaires. Son action antioxydante et antiinflammatoire permet à la curcumine d'interagir avec les ROS, les lipides, les facteurs de transcription et les protéines. De ce fait, qu'en est-il de l'utilisation de la curcumine dans le traitement des maladies inflammatoires ?

## II. Pharmacocinétique ou devenir d'un principe actif dans l'organisme

Afin de comprendre le devenir de la curcumine dans l'organisme, il est important de connaître les différentes barrières que peuvent rencontrer les substances introduites dans l'organisme. En effet, un principe actif ou un médicament administré dans l'organisme est soumis à quatre grands processus physiologiques que sont l'absorption, la distribution, la métabolisation et l'élimination (Benet et al. 1996).

L'absorption est la phase durant laquelle le principe actif traverse les membranes biologiques pour rejoindre la circulation sanguine. Cette phase dépend directement du mode d'administration du médicament qui peut se faire par différentes voies (orale, percutanée etc..). Les propriétés physico-chimiques (taille, charge, caractère lipophile ou hydrophile) du principe actif ont également une influence sur cette étape d'absorption.

Lorsque le médicament arrive dans la circulation sanguine, l'étape de distribution peut commencer. Le principe actif se retrouve sous forme libre ou lié à des protéines plasmatiques telles que l'albumine et les globulines. Seule la forme libre peut être distribuée aux organes alors que la forme liée reste dans le sang et constitue un réservoir circulant du médicament.

Une fois distribué dans les organes, le principe actif peut exercer son effet biologique mais peut également être métabolisé, notamment au niveau du foie. En effet, le foie est le siège de nombreuses réactions enzymatiques permettant la biotransformation des médicaments. Les métabolites secondaires obtenus sont généralement plus hydrophiles pour une élimination plus facile par les urines. Ces métabolites peuvent conserver l'effet biologique, être inactifs ou présenter un effet toxique avant d'être éliminés.

Lorsqu'un médicament a rempli sa fonction ou après l'étape de biotransformation, il est ensuite éliminé, principalement par voie urinaire et biliaire.

### 2.1. Absorption des principes actifs ou des médicaments

L'absorption d'un principe actif dans l'organisme dépend du mode d'administration (Chillistone et Hardman 2014). On distingue l'absorption médiate qui a lieu lorsque l'administration de la substance est réalisée à l'extérieur de l'organisme (tube digestif, peau). L'absorption est dite immédiate lorsque le principe actif est administré par effraction et

pénètre directement dans l'organisme (voie intraveineuse, sous cutanée, intradermique, intramusculaire ou intrapéritonéale).

### **2.1.1. Absorption par voie digestive**

Après administration d'un médicament par voie orale, l'absorption est possible tout au long du tube digestif. Elle peut avoir lieu par la muqueuse buccale, œsophagienne, gastrique et intestinale.

Certaines substances sont assimilées très rapidement après la prise par voie orale. Dans cette catégorie sont retrouvés certains antibiotiques comme la rovamycine qui est absorbée par voie perlinguale. L'aspirine provoquait autrefois des ulcères puisque ce médicament est assimilé au niveau de l'estomac (Philip et al. 2015).

La majorité des médicaments passe dans la circulation sanguine par diffusion passive à travers la muqueuse intestinale (Augustijns et al. 2014). L'intestin offre en effet une plus grande surface organisée sous forme de repliement et présente un certain nombre de transporteurs qui peuvent aussi donner lieu à des diffusions actives et facilitées. Les molécules absorbées rejoignent la circulation sanguine par la veine porte qui mène vers le foie pour la métabolisation. Les composés ayant un poids moléculaire élevé (lipides, protéines...) peuvent dans un premier temps être pris en charge par le système lymphatique avant de rejoindre la circulation sanguine (Khan et al. 2013).

La prise des médicaments par voie orale peut présenter néanmoins quelques inconvénients. En effet, certains principes actifs peuvent être dégradés au niveau de l'estomac par les enzymes gastriques ou par l'acidité. D'autres peuvent être éliminés dans les fèces du fait de leurs propriétés physico-chimiques (hydrophobe essentiellement) inadaptées ou après complexation avec des nutriments faisant obstacle à leur absorption.

### **2.1.2. Absorption par la peau (percutané) et les muqueuses**

La peau constitue une barrière de protection contre l'environnement extérieur. Si la couche cornée est imperméable, il existe cependant un certain nombre d'effractions comme les glandes sudoripares, les follicules pileux ou encore la présence de lésions (bouton, coupure).

Ces passages permettent l'application de médicaments (pommades) pour obtenir un effet local (Jepps et al. 2013).

L'administration peut également être réalisée au niveau des muqueuses qui sont plus perméables du fait de l'absence d'une couche cornée (spray pour les muqueuses rhinopharyngée, collyre pour les yeux).

### **2.1.3. Absorption par voie respiratoire**

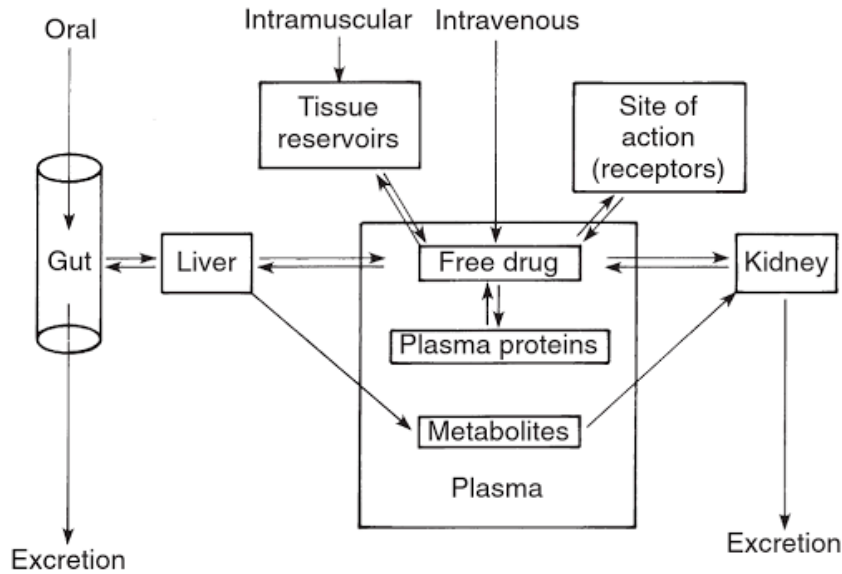
L'administration d'un principe actif par voie respiratoire est principalement utilisée pour les anesthésiants. La surface d'échange disponible varie entre 100 et 200 m<sup>2</sup> et permet une absorption importante des médicaments. Le principe actif est généralement sous forme de gaz, d'aérosol ou de liquide (Ruge, Kirch, et Lehr 2013). Les formes solides sont plus rarement utilisées par cette voie et présentent une durée d'absorption plus longue.

### **2.1.4. Absorption immédiate**

L'absorption est dite immédiate lorsque la substance est administrée directement dans l'organisme par voie intraveineuse, intramusculaire ou sous cutanée. Ces voies d'administration ont la particularité d'éviter le premier passage des principes actifs par le foie où ils sont pour la plupart rapidement métabolisés (**Figure 9**)

L'injection intraveineuse est principalement utilisée en cas d'urgence ou pour les substances très mal absorbées par voie orale. Dans ce cas, le médicament ne passe pas par une phase d'absorption et cela permet une meilleure biodisponibilité dans l'organisme. Ainsi, le principe actif agit plus rapidement que lorsqu'il est administré par voie intraveineuse.

L'administration de médicaments par les voies sous-cutanée et intramusculaire impose aux médicaments de franchir la barrière capillaire (Mathaes et al. 2016). Le passage du principe actif dans la circulation sanguine est réalisé par diffusion passive. L'absorption est généralement assez rapide et dépend des propriétés physico-chimiques du médicament. Par ces voies, le médicament peut également atteindre la circulation générale sans passer par la veine porte et le foie.



**Figure 9** : Les différentes voies d'administration des principes actifs ou médicaments. L'absorption par voie orale dirige le médicament par le foie avant qu'il ne soit distribué. L'absorption immédiate évite le premier passage hépatique (Yagiela et al. 2010).

## 2.2. Distribution d'un principe actif dans l'organisme

La distribution d'un médicament dans l'organisme se fait principalement par la circulation sanguine. Ils peuvent être véhiculés par les protéines plasmatiques telles que l'albumine qui est la protéine majoritaire du plasma. D'autres éléments du sang comme les lipoprotéines et les globulines peuvent également jouer le rôle de transporteur (Jusko et Gretch 1976 ; Pugeat, Dunn, et Nisula 1981).

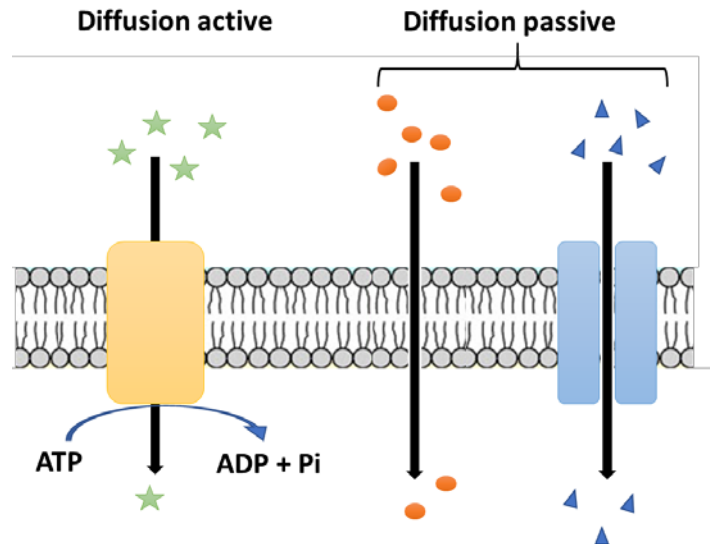
L'albumine est la protéine majoritaire dans le sang et permet le transport de nombreuses substances, en particulier hydrophobes tels que les acides gras ou des médicaments comme l'ibuprofène et le kétoprofène (Nakagawa, Shimizu, et Yamada 1999). Il s'agit d'une protéine non spécifique, constituée à la fois de charges négatives et positives réparties uniformément permettant ainsi le transport de plusieurs types de molécules. La fixation des médicaments est réversible puisqu'elle met généralement en jeu des liaisons de faible énergie (liaisons hydrogène ou électrostatiques).

Les lipoprotéines et les globulines peuvent également jouer le rôle de transporteurs de substances actives dans l'organisme en véhiculant les composés lipophiles tels que les vitamines et les métaux (Wasan et al. 2008).

La liaison aux protéines plasmatiques facilite la circulation de composés très lipophiles dans le plasma. La forme liée du principe actif reste dans le sang alors que la forme libre est diffusée à travers les membranes cellulaires pour rejoindre les différents organes. L'internalisation dans les différents tissus est fonction de plusieurs paramètres et peut se faire par diffusion passive, par filtration ou par diffusion active (Yuhua 1980).

La diffusion passive dépend directement du gradient de concentration de part et d'autre de la membrane à traverser mais aussi des propriétés physico-chimiques de la molécule (taille, caractère lipophile...). Les composés de faible poids moléculaires traversent plus facilement les membranes. La diffusion est également possible par filtration à travers les pores membranaires et concerne les molécules de faible masse molaire. Elle permet le passage des molécules hydrosolubles en suivant le flux de l'eau.

La diffusion active fait appel à des transporteurs membranaires pour le transport de composés contre le gradient de concentration. Le récepteur est dans ce cas spécifique à une molécule donnée et à ses homologues structuraux. Ce processus est cependant saturable et énergétiquement dépendant. La diffusion facilitée utilise également des transporteurs mais permet le passage des médicaments dans le sens du gradient de concentration et ne nécessite pas d'énergie (Figure 10).



**Figure 10** : diffusion passive et active à travers les membranes cellulaires. Les petites molécules passent à travers les pores membranaires. La diffusion facilitée nécessite un transport et la diffusion active utilise de l'énergie sous forme d'ATP.

La distribution des principes actifs dépend également du débit sanguin : Les médicaments sont dirigés au niveau des organes les plus vascularisés tels que le foie et le rein (Wilkinson et Shand 1975). Dans le foie, les principes actifs peuvent être métabolisés puis redistribués dans l'organisme.

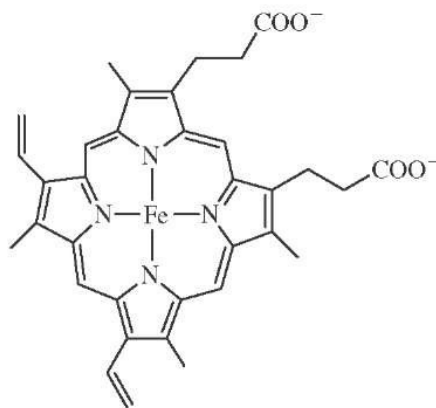
### 2.3. Métabolisme d'un principe actif

La métabolisation est un processus biochimique de défense mis en œuvre par l'organisme à l'égard des molécules étrangères. Elle a pour objectif principal de transformer les substances lipophiles en composés hydrosolubles pouvant facilement être éliminés par l'organisme. Elle permet de détoxifier les composés administrés ou ingérés mais peut également contribuer à leur activation. Cette biotransformation est principalement réalisée au niveau du foie mais elle peut également avoir lieu dans les poumons et les intestins. Deux phases peuvent être distinguées : La phase 1 consiste à dégrader la molécule administrée et la phase 2 correspond à la conjugaison des métabolites pour les rendre hydrophiles (Schmucker 2012 ; Rowland, Miners, et Mackenzie 2013). Un composé suffisamment hydrosoluble peut être éliminé sans passer par les phases 1 et 2. D'autres molécules passent par la phase 1 uniquement ou directement à la phase 2 avant d'être éliminées.

La phase 1 correspond à des réactions d'oxydoréduction faisant appel aux cytochromes P450 (Wrighton et Stevens 1992). Ces cytochromes sont une famille d'enzymes retrouvées



majoritairement dans le foie et l'intestin où elles catalysent les réactions d'oxydoréduction nécessaires à la biotransformation des médicaments. Ces enzymes portent un groupement prosthétique constitué de quatre noyaux pyrole et d'un atome de fer ( $\text{Fe}^{2+}$ ) capable de fixer l'oxygène moléculaire et de l'activer (figure 10). Cet oxygène est ensuite transféré sur le médicament qui est fixé sur la partie protéique du cytochrome P450. Cette réaction nécessite l'intervention du NADH (nicotinamide adénine dinucléotide) ou NADPH comme donneur d'électrons (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate).



**Figure 11** : Structure du cytochrome P450 impliqué dans la biotransformation des principes actifs

Durant la phase 2, les groupements fonctionnels issus des réactions de phase 1 sont conjugués avec un groupement polaire.

La glucuroconjugaison, qui est le mécanisme principal de la phase 2, consiste en la fixation de l'acide glucuronique sur les atomes d'oxygène, d'azote ou de soufre des métabolites à transformer (Rowland, Miners, et Mackenzie 2013). Cette réaction est catalysée par les UDP-glucuronyl-transférases essentiellement retrouvées dans le foie.

Les métabolites peuvent également subir des réactions de sulfoconjugaison, de méthylation ou d'acétylation (Kauffman 2004). La sulfoconjugaison est catalysée par les sulfotransférases principalement produites par le foie mais aussi par les intestins, les reins et les poumons. Cette réaction est possible sur des composés comme les alcools et les amines. La méthylation est assurée par des méthyltransférases et l'acétylation par des acétyltransférases.

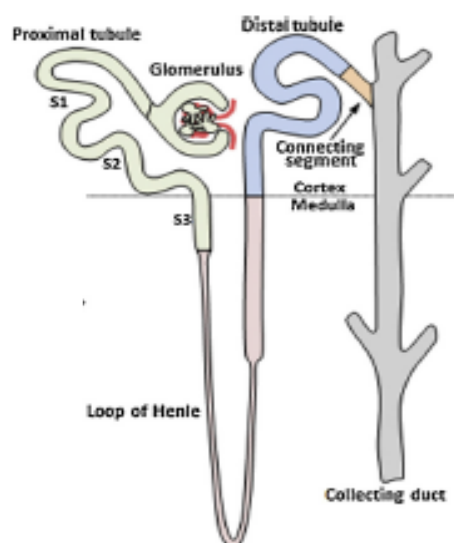
Enfin les métabolites peuvent être conjugués avec des acides aminés, la glycine ou la glutamine.

## 2.4. Elimination d'un médicament de l'organisme

L'élimination des substances administrées peut être réalisée selon différents mécanismes dans l'organisme. Cette étape concerne uniquement la forme libre du principe actif métabolisé ou ayant gardé sa structure d'origine. L'élimination est principalement réalisée par la voie urinaire et la voie biliaire (Benet et al. 1996).

L'élimination rénale fait intervenir trois processus qui sont la filtration glomérulaire, la réabsorption tubulaire et la sécrétion tubulaire (Figure 12). La filtration glomérulaire permet le passage des molécules de taille inférieure à 60 000 Da. Ainsi seule la forme libre des médicaments peut être éliminée pour se retrouver dans l'urine primitive. L'élimination dépend également de la pression sanguine au niveau du glomérule pour contrer la pression osmotique due à la concentration très élevée (de l'ordre de 40 à 50 g/L) de l'albumine, principale protéine sérique. Les molécules éliminées dans l'urine primitive peuvent être réabsorbées au niveau du tube contourné proximal ou de l'anse de Henlé. Les médicaments éliminés peuvent alors retourner dans la circulation sanguine et potentiellement exercer à nouveau une fonction biologique ou toxique.

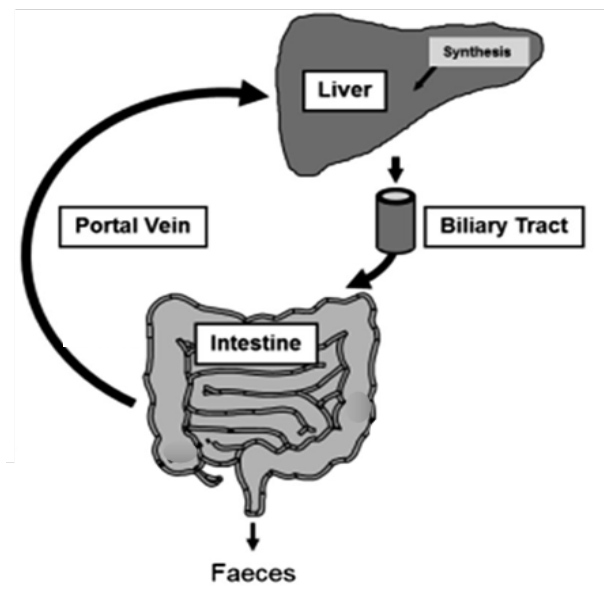
L'élimination des substances peut être réalisée au niveau du tube contourné distal (TCD). Les molécules passent directement du sang vers le TCD sans passer par la filtration glomérulaire. Il s'agit de la sécrétion tubulaire qui est un mécanisme actif faisant appel à un transporteur.



**Figure 12** : Organisation de l'unité fonctionnelle du rein, le néphron. Le sang est filtré au niveau de la capsule de Bowman. L'urine primitive arrive au niveau du tube contourné proximal et se dirige vers tube collecteur pour constituer l'urine définitive prête à être éliminée (O'Brien et McMahon 2014).

La deuxième voie principale d'élimination des médicaments et des métabolites dérivés est la voie biliaire. Elle permet d'éliminer les composés non pris en charge par les reins comme les molécules lipophiles et les molécules de haut poids moléculaire. Les substances excrétées par la bile sont retrouvées dans l'intestin où elles sont éliminées dans les fèces ou réintroduites dans l'organisme via le cycle entero-hépatique (Tse, Ballard, et Skinn 1982). Les composés réabsorbés vont être de nouveau excrétés jusqu'à ce qu'ils soient complètement éliminés par la voie fécale (Figure 13).

Il existe également des voies mineures d'élimination qui sont la salive, les larmes, le lait maternel (Benedetti et al. 2009). La voie pulmonaire est une voie importante d'élimination des composés volatiles (Chiou 2015).



**Figure 13** : Cycle entérohépatique permettant l'élimination des principes actifs dans l'organisme. Les substances secrétées par la biles sont réabsorbées au niveau de l'intestin et redirigées vers le foie *via* la veine cave (Jahnel et al. 2014).

## 2.5. Cas de la curcumine

### 2.5.1. Absorption et distribution de la curcumine dans l'organisme

Malgré les innombrables propriétés thérapeutiques de la curcumine, son insolubilité dans l'eau est un obstacle majeur à son utilisation en tant que médicament.

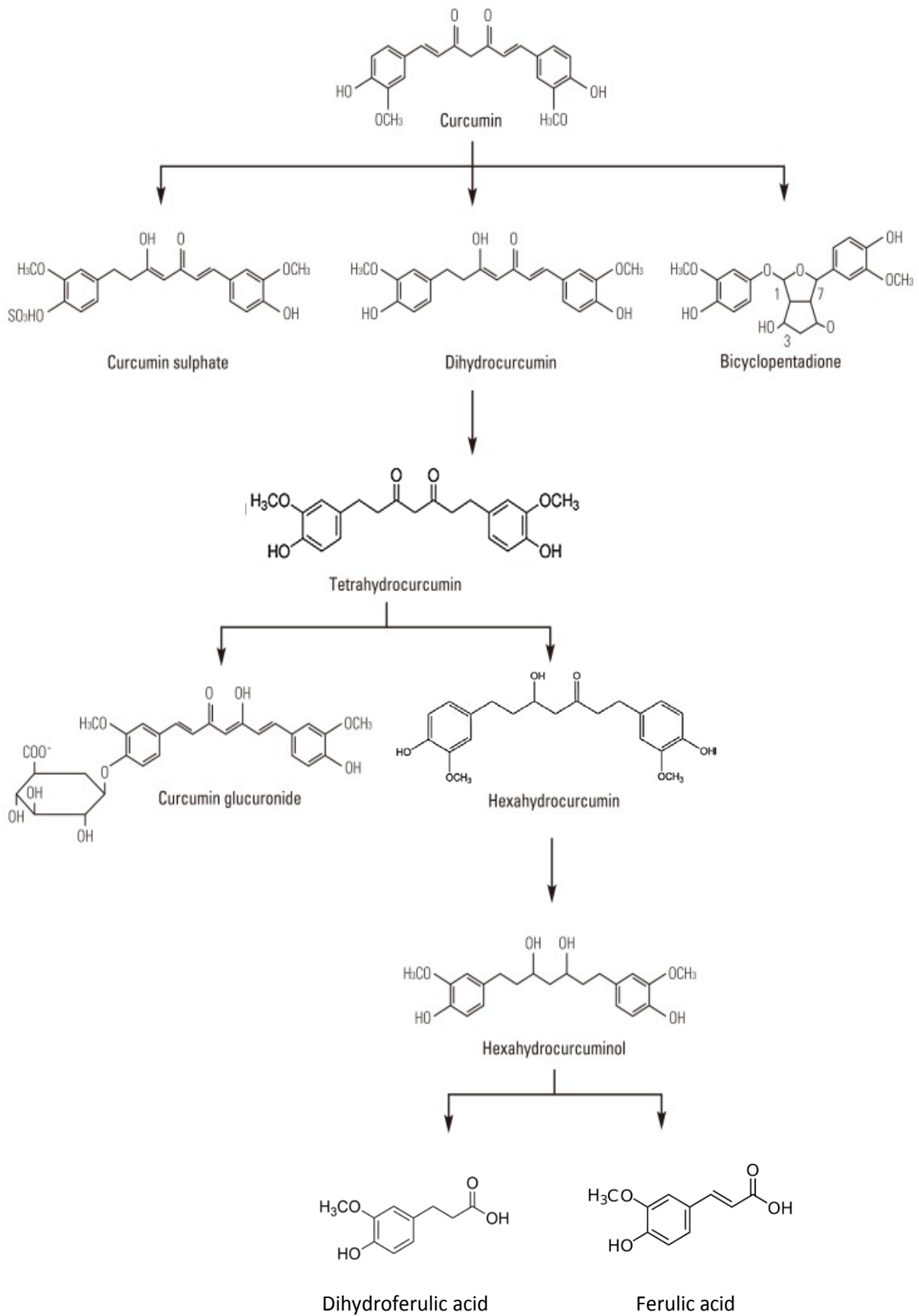
Des études se sont intéressées à l'absorption par voie orale de la curcumine chez l'animal. Après ingestion de 500 mg/kg de curcumine, il en résulte une concentration plasmatique de seulement 1,8 ng/ml sous forme de curcumine sulfaté et de curcumine glucuronide (Jurenka 2009). En effet, plusieurs études réalisées chez l'animal montrent que plus de 50 % de la dose ingérée est retrouvée dans les fèces (Anand et al. 2007).

Des essais cliniques réalisés chez des personnes atteintes du cancer montrent également une très faible absorption de la curcumine dans l'organisme et une métabolisation très rapide (Jurenka 2009; Y. He et al. 2015). Des doses quotidiennes supérieures à 3,6 mg/kg sont requises pour produire un léger effet thérapeutique (R. A. Sharma et al. 2004).

L'administration de la curcumine par voie intraveineuse chez l'animal permet d'augmenter la biodisponibilité de la curcumine dans le plasma. Une injection intraveineuse de 2 mg/kg de curcumine donne une concentration plasmatique de 6,6 µg/ml (J. Sun et al. 2013).

### **2.5.2. Métabolisme de la curcumine et son élimination de l'organisme**

La curcumine étant une molécule hydrophobe, elle subit rapidement une biotransformation au niveau du foie en faveur de métabolites plus solubles (Jurenka 2009 ; Prasad, Tyagi, et Aggarwal 2014). En effet, des études réalisées chez la souris ont montré que la curcumine absorbée dans l'organisme ou administrée par voie intraveineuse est biotransformée en curcumine glucuronide, en tétrahydrocurcumine ou en hexa-hydrocurcumine au niveau du foie (figure 14). L'acide férulique et l'acide dihydroférulique sont également des métabolites secondaires de la curcumine. L'ensemble de ces composés secondaires ont des propriétés thérapeutiques (antioxydantes et antiinflammatoires) qui sont néanmoins très faibles par rapport à celles de la curcumine native (Jurenka 2009). Ils sont principalement éliminés par voies biliaires (Prasad, Tyagi, et Aggarwal 2014; Jurenka 2009).



**Figure 14** : Métabolisme de la curcumine dans l'organisme d'après Prasad et al. (2014).

### **2.5.3. Solutions apportées pour améliorer la biodisponibilité de la curcumine**

Différentes solutions ont été expérimentées pour améliorer l'absorption et la biodisponibilité de la curcumine dans l'organisme.

Tout d'abord, l'utilisation de composés naturels comme la pipérine augmente l'absorption intestinale de la curcumine et améliore sa biodisponibilité dans l'organisme (Moorthi et Kathiresan 2013).

La pipérine, un alcaloïde présent dans les fruits de la famille des pipéracées, est le composé majoritaire du poivre noir. Cette molécule diminue l'activité intestinale permettant à plusieurs composés de passer dans la circulation sanguine. Ainsi la pipérine peut être combinée avec la curcumine pour améliorer sa biodisponibilité dans l'organisme. Des études réalisées chez le rat et l'homme indiquent que la pipérine inhibe la glucuronidation de la curcumine au niveau de l'intestin et du foie. Ainsi, chez le rat l'utilisation de la pipérine augmente la concentration plasmatique de la curcumine de 154 %. Chez l'homme la pipérine permet de multiplier considérablement le taux de curcumine bio-disponible (Shoba et al. 1998). De plus, des études soulignent que l'affinité qui existe entre la pipérine et l'albumine contribue à cette meilleure distribution de la curcumine (Moorthi et Kathiresan 2013; Suresh et al. 2007). Cependant, le métabolisme hépatique reste un obstacle à l'efficacité de la curcumine.

Des solutions plus technologiques comme les nanovecteurs sont également proposées afin d'améliorer la disponibilité des principes actifs comme la curcumine. On peut citer les nanoparticules de PLGA-PEG développée par Khalil et al. (2013) qui ont augmenté la biodisponibilité de la curcumine de 55,4 fois. Les cyclodextrines présentées par (Rachmawati et al. (2013) favorisent également l'incorporation de la curcumine dans les cellules et augmentent ses effets thérapeutiques.

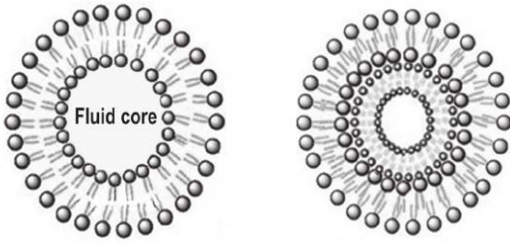
Les nanovecteurs offrent en effet plusieurs avantages dont la possibilité de réaliser un ciblage de tissus en fixant une molécule d'adressage à la surface mais également de protéger le principe actif des dégradations et de la métabolisation rapide par l'organisme. La vectorisation est aujourd'hui une approche prometteuse pour délivrer efficacement les traitements dans l'organisme.

### III. Les systèmes de vectorisation de principes actifs

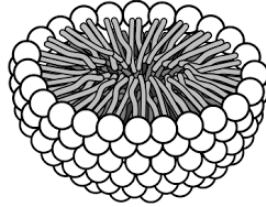
La vectorisation des médicaments est un concept qui a été évoqué pour la première fois à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle par le docteur Paul Ehrlich. Cet immunologiste allemand avait imaginé le développement d'un « *Magic Bullet* » capable d'acheminer un médicament jusqu'à son site d'action. Comme cela a été évoqué dans le chapitre sur la pharmacocinétique, un principe actif administré dans l'organisme est confronté à de nombreux paramètres pouvant limiter ses effets thérapeutiques. Les propriétés physico-chimiques du médicament (hydrophobes, hydrophiles, poids moléculaire etc.) peuvent constituer un premier obstacle à sa distribution dans l'organisme. Certains principes actifs se heurtent à de nombreuses barrières biologiques telles que les membranes cellulaires, l'épithélium et l'endothélium. Des dégradations enzymatiques peuvent également survenir et diminuer l'efficacité de la molécule administrée. D'autres médicaments peuvent donner lieu à des effets toxiques en s'accumulant préférentiellement dans certains tissus. Ainsi la vectorisation des médicaments est parue comme étant une alternative prometteuse afin d'améliorer l'absorption, la biodisponibilité et cela en conservant les propriétés thérapeutiques de la molécule active. Cependant les éléments constituant le vecteur doivent être métabolisables, biocompatibles et ne présenter aucun danger pour l'organisme. D'autre part, ces vecteurs doivent préférentiellement permettre une libération contrôlée dans le temps et pouvoir diriger le médicament vers un organe cible.

A la fin du 20<sup>ème</sup> siècle la théorie de Paul Ehrlich est devenue possible avec la découverte des liposomes et des nanotechnologies. À ce jour, des avancées considérables ont été réalisées permettant de proposer divers systèmes à l'échelle du nanomètre pour le transport et la libération des médicaments dans l'organisme. Ces nanotechnologies apportent de nouvelles caractéristiques physico-chimiques grâce à l'utilisation de nouveaux matériaux. Les nanovecteurs sont classifiés en deux grandes catégories en fonction de leur composition chimique. Les vecteurs organiques peuvent être d'origine biologique, naturelle ou synthétique. Les vecteurs inorganiques sont exclusivement de nature synthétique (Figure 15).

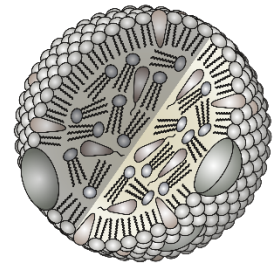
**Liposomes**



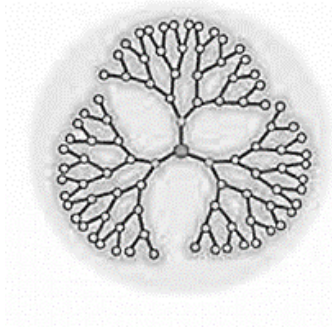
**Micelles**



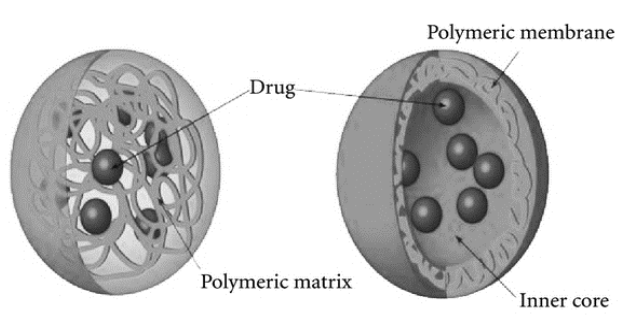
**Lipoprotéine**



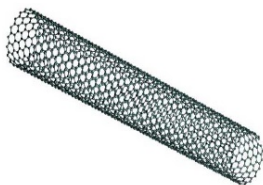
**Dendrimère**



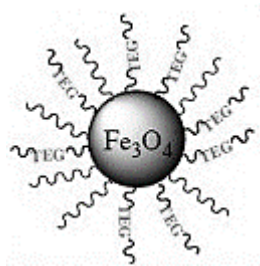
**nanosphère**



**Nanotube de carbone**



**NP d'oxyde de fer**



**Quantum dot**



**Figure 15** : Représentation schématique de quelques nanovecteurs organiques et inorganiques



### **3.1. Les nanovecteurs organiques**

Les nanoparticules organiques sont les premières à avoir été développées dans le domaine de la vectorisation des médicaments pour leur biocompatibilité. Les plus connues sont les liposomes, les lipoprotéines, les dendrimères, les nanotubes de carbone, les nanoparticules polymériques telles que les micelles, les nanosphères et les nanocapsules.

#### **3.1.1. Les liposomes**

Les liposomes sont des vésicules synthétiques, constituées de couches lipidiques semblables à celles des membranes cellulaires. Ces vésicules sont dites unilamellaires lorsqu'elles sont composées d'une seule bicouche de phospholipides et multilamellaires lorsque celles-ci sont formées de plusieurs bicouches lipidiques (A. Sharma et Sharma 1997). La structure de ces nanovecteurs biodégradables et biocompatibles leur permet de traverser facilement les membranes cellulaires ou de fusionner avec elles pour libérer les principes actifs.

Ces nanovecteurs lipidiques ont connu de nombreuses améliorations depuis leur création afin d'augmenter l'effet thérapeutique des médicaments transportés. Les liposomes de seconde génération sont greffés avec des chaînes de polyéthylène glycol (PEG) à leur surface. Cette « PEGylation » empêche la reconnaissance des vésicules par le système immunitaire (Dzienciuch et al. 2015). Les liposomes de troisième génération intègrent également des éléments de reconnaissance (anticorps, peptides) dans le but de cibler des tissus (Samorì et al. 2010).

La doxorubicine, un médicament anticancéreux, est le premier médicament à avoir été transporté par les liposomes (Barenholz 2012). L'encapsulation a montré une libération prolongée du médicament dans le plasma et une diminution des effets secondaires.

#### **3.1.2. Les lipoprotéines**

Les lipoprotéines sont des complexes naturellement présents dans l'organisme et permettant la circulation des lipides dans l'organisme. Il existe plusieurs groupes de lipoprotéines classées en fonction de leur densité. Il s'agit des chylomicrons, des lipoprotéines de très faible densité

(VLDL), des lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL), des lipoprotéines de faible densité (LDL) et des lipoprotéines de haute densité (HDL). Le rôle des chylomicrons et des VLDL est le transport des acides gras vers les cellules. Les LDL ont pour fonction de fournir le cholestérol aux cellules alors que les HDL le transportent vers le foie pour qu'il soit éliminé (Song et al. 2014 ; Zhang et al. 2016 ; Bryant Miles, 2003).

Ces molécules naturelles et biologiques présentent un intérêt grandissant dans le domaine de la vectorisation de médicaments notamment pour leur biocompatibilité. À ce jour, l'utilisation de ces molécules biologiques comme vecteur de médicament est en cours de genèse. Plusieurs études traitent de l'utilisation de lipoprotéines reconstituées pour la vectorisation de principes actifs (Song et al. 2014 ; Zhang et al. 2016).

### **3.1.3. Les dendrimères**

Les dendrimères sont des macromolécules synthétiques de quelques nanomètres avec une structure branchée au niveau des extrémités et un cœur moléculaire. Ces particules nanométriques présentent un intérêt grandissant dans le domaine des nanovecteurs puisqu'il est possible de moduler la composition des extrémités de façon à pouvoir réaliser l'adressage d'un principe actif vers un organe cible (Malik et al. 2000). Les principes actifs peuvent être introduits à l'intérieur des dendrimères ou fixés à leur surface.

Les dendrimères PAMAM (polyamidoamine) sont les plus connus et les premiers à avoir été commercialisés. Les dendrimères appartenant à cette famille sont biocompatibles, présentent des extrémités hydrosolubles et permettent le transport de composés hydrophobes. Des groupements amines se trouvant au niveau de ces extrémités offre la possibilité de fixer des molécules spécifiques des tissus cibles (Cloninger 2002; Kurtoglu et al. 2009).

### **3.1.4. Les micelles**

Les micelles sont des vésicules sphériques et constituées d'une molécule amphiphile avec une tête hydrophile dirigée vers le solvant et une chaîne hydrophobe orientée vers l'intérieur de la particule. La formation des micelles dépend de la concentration micellaire critique (CMC) qui est la concentration de molécules amphiphiles à partir de laquelle les micelles se forment

spontanément. La stabilité des micelles est augmentée avec la concentration en molécules amphiphiles. Cependant, plusieurs CMC peuvent être atteintes et les copolymères peuvent ainsi adopter d'autres arrangements dans l'espace (cylindrique, hexagonale etc.) possédant une meilleure stabilité stérique (C. K. Liu et Warr 2014). En dessous de la CMC les micelles sont instables et les molécules amphiphiles peuvent se séparer.

Des micelles peuvent être obtenues à partir d'un tensioactif composé d'une tête hydrophile et d'une chaîne hydrophobe. Ce type de micelle présente une CMC très élevée et se déstructure à faible concentration. Cette instabilité rend leur utilisation difficile en conditions *in vivo* (Oerlemans et al. 2010).

Les micelles polymériques ont quant à eux l'avantage d'être constitués d'un bloc de polymère hydrophile relié à un bloc de polymère hydrophobe. Les micelles obtenues à partir de ces copolymères amphiphiles présentent une solubilité plus importante en milieu aqueux et une meilleure stabilité (Lamprecht et Benoit 2006; Rösler, Vandermeulen, et Klok 2001). Ces micelles polymériques ont également une structure mieux adaptée pour le transport et la libération de principes actifs *in vivo* (Cote et al. 2015).

### **3.1.5. Les nanosphères et les nanocapsules**

Les nanosphères et les nanocapsules sont des particules biodégradables sphériques, composées de polymères ou de copolymères. Ces nanovecteurs polymériques sont facilement modifiables chimiquement afin de fixer à leur surface des groupements fonctionnels tels que des anticorps, des polypeptides ou des protéines permettant de réaliser un ciblage de tissus (Bazylińska et al. 2014).

Les nanosphères sont des systèmes matriciels organisés sous forme de réseaux. Le principe actif est uniformément réparti dans la matrice de polymères enchevêtrés. La libération du médicament est réalisée par diffusion ou lors de la dégradation de la particule dans l'organisme (Liu et al. 2015, Wang et al. 2011). Plusieurs types de nanosphères ont été développés et diffèrent par leur composition chimique. Les plus cités sont les poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) et poly(alkyl-cyanoacrylate) (PACA). Des nanosphères de type PACA avec de plus petites chaînes latérales ont été mises en place par la suite pour une dégradation plus rapide dans l'organisme. On peut citer les poly(ethyl-cyanoacrylate) ou PECA, les PICBA ou

poly(isobutyl-cyanoacrylate) et les poly(isohexyl-cyanoacrylate) ou PIHCA (Chiu et al. 2015 ; DeMarino et al. 2016 ; Mazzaferro, Bouchemal, et Ponchel 2013 ; Trajkovski et al. 2013).

Les nanocapsules sont des vésicules constituées par un noyau central généralement lipophile et d'une couche externe de polymère. Ces nanoparticules dites de type « réservoirs » contiennent un liquide dont les propriétés (polaire ou apolaire) dépendent du médicament à transporter (hydrophile ou hydrophobe). Le médicament confiné au cœur de la capsule est libéré progressivement dans l'organisme au cours de la dégradation de couche polymérique (Teixeira et al. 2012).

### **3.1.6. Les nanotubes de carbone**

Les nanotubes de carbone sont des structures régulières constituées uniquement d'atomes de carbones reliés de façon à obtenir des arrangements cristallins disposés sous forme de pentagones, d'hexagones ou d'heptagones. Ils peuvent être composés d'un seul feuillet de graphène enroulé sur lui-même (SWNT, *single-walled nanotube*) ou de couches multiples concentriques (MWNT, *multiple-walled nanotube*). Ces nanotubes possèdent des propriétés thermiques, électriques et mécaniques. Ils ont également la particularité d'être à la fois souple et d'avoir une très grande dureté. Ces nanotubes de carbone nécessitent néanmoins une modification au niveau de leur surface afin de permettre leur solubilité et de délivrer un principe actif (Kholmanov et al. 2015 ; Song et al. 2013 ; Wu et al. 2013). Ces nanovecteurs sont dégradés dans l'organisme par la myéloperoxidase qui est une enzyme produite par les neutrophiles (Kotchey et al. 2013).

Les nanotubes ont montré leur efficacité dans le domaine des nano-médicaments en transportant des principes actifs comme le méthotrexate, un agent anticancéreux (Samori et al. 2010).

### **3.2. Les nanoparticules inorganiques**

Les nanoparticules inorganiques ont la particularité d'avoir un noyau présentant de nombreuses propriétés magnétiques, fluorescentes ou optiques. Une couche protectrice organique est ajoutée à leur surface afin de ne pas être reconnues par le système immunitaire.

À cette pellicule de surface peuvent être attachées des molécules d'adressage aux tissus cibles. Dans cette catégorie peuvent être cités les « quantum dot » et les nanoparticules d'oxyde de fer magnétique.

### **3.2.1. « Quantum dot »**

Les « quantum dot » sont des particules constituées d'atomes métalliques formant des nanocristaux sphériques et semi-conducteurs. Ces nanoparticules ont la particularité d'émettre une fluorescence lorsqu'elles sont excitées par une source lumineuse. L'un des avantages des « quantum dot » réside dans leur durée d'émission plus longue que celle des fluorophores organiques. La longueur d'onde d'émission dépend de la taille des particules et présente une large gamme. Ces nanoparticules sont essentiellement utilisées pour le transport de métaux lourds (Se, Cd, Te) et nécessitent l'ajout de ligands à la surface pour leur solubilité (Probst et al. 2013 ; Han et al. 2015).

### **3.2.2. Nanoparticules d'oxyde de fer magnétique**

Les nanoparticules d'oxyde de fer sont constituées d'un noyau magnétiquement actif comme le fer, le Nickel ou le cobalt et peuvent être classées en deux catégories. Les SPION (*SuperParamagnetic Iron Oxides Nanoparticles*) ont un diamètre supérieur à 50 nm et les USPIO (*Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxides Nanopartic*) une taille inférieure à 50 nm. Ces nanoparticules nécessitent le greffage de composés organiques à leur surface afin de ne pas induire de toxicité liée au métal qu'elles contiennent. L'une des utilisations des nanoparticules d'oxyde de fer est de cibler les cellules cancéreuses afin de les éliminer. Un ligand fixé à la surface de ces particules et spécifique de récepteurs exprimés par les cellules cancéreuses favorise leur fixation et leur internalisation. Une onde électromagnétique est ensuite appliquée afin de perturber le fonctionnement de la cellule et induire la production de radicaux libres responsables de la mort cellulaire ou apoptose (Mustafa et al. 2013). Les nanoparticules d'oxyde de fer trouvent également leur place en imagerie médicale puisqu'elles sont détectables en Résonance magnétique nucléaire (Kucheryavy et al. 2013 ; Ling et Hyeon 2013 ; Rosen et al. 2012 ; Stanley et al. 2012).

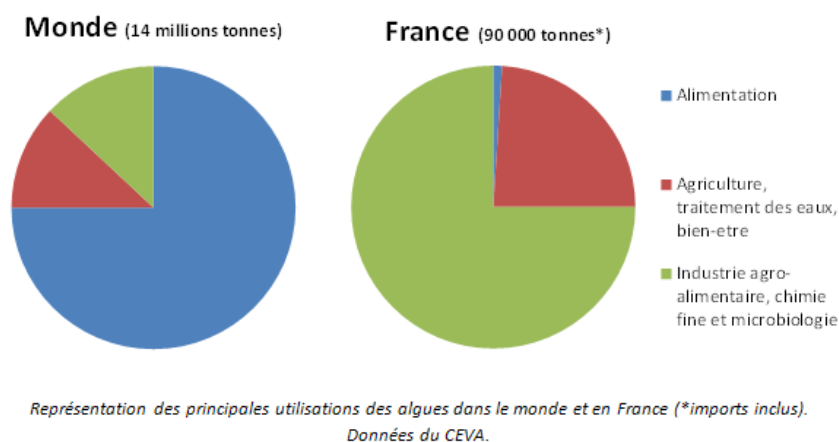
Il existe ainsi plusieurs types de nanovecteurs permettant de transporter des principes actifs dans l'organisme. Cependant, les vecteurs organiques sont privilégiés du fait de leur caractère biocompatible et biodégradable. De ce fait, l'utilisation de polymères naturels tels que les polysaccharides de macroalgues dans le domaine des nano-médicaments suscite beaucoup d'intérêt.

#### IV. Les algues et leur utilisation

Les algues sont des organismes aquatiques et chlorophylliens qui peuvent être classifiées en fonction de leurs caractéristiques morphologiques, de leur composition et de leur utilisation. Certains de ces organismes comme les cyanobactéries appartiennent au règne des procaryotes. Dans la catégorie des eucaryotes peuvent être citées les macroalgues telles que les Chlorophycées, les Phéophycées et les Rhodophycées. Les macroalgues constituent une ressource importante de composés tels que les polyphénols, les vitamines, les lipides, les sels minéraux et les polysaccharides. Ces molécules bioactives sont valorisables dans divers domaines tels que l'industrie alimentaire, les cosmétiques, l'industrie pharmaceutique. L'industrie mondiale des algues marines représente 6 milliards de dollars annuels et près de 1 million de tonnes d'algues sont exploitées chaque année (Figure 16).

L'alimentation humaine est le premier secteur d'utilisation des macroalgues dans le monde. Dans les pays asiatiques, les algues ont toujours eu leur place dans l'alimentation notamment pour leur richesse nutritionnelle. Le secteur alimentaire exploite également les propriétés rhéologiques que peuvent apporter certaines molécules algales telles que les polysaccharides. Dans l'industrie cosmétique, les molécules d'algues trouvent également leur place dans la composition de nombreux produits.

Le domaine pharmaceutique et médical valorise les composés antioxydants et anti-inflammatoires des algues permettant de lutter contre le développement de pathologies comme le cancer et les maladies cardiovasculaires.



**Figure 16** : Domaine de valorisation des algues dans le monde et en France selon le CEVA (Centre d'Etude et de Valorisation des algues)

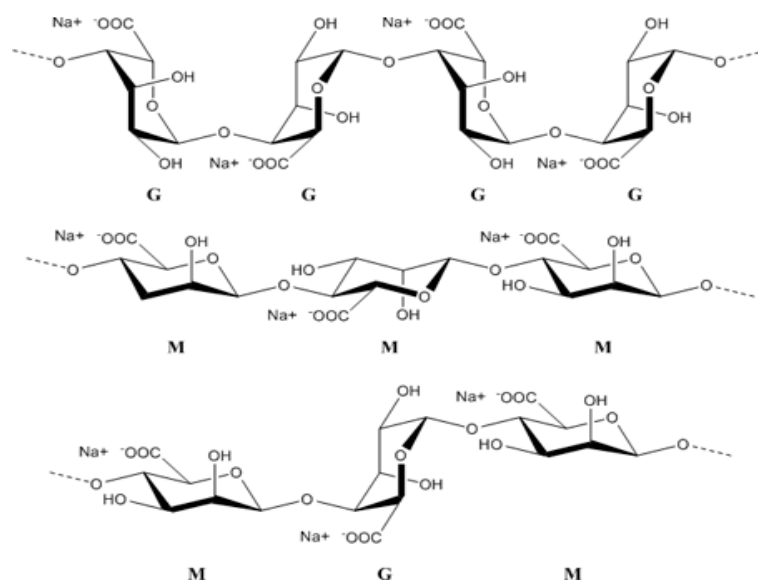
## 4.1. Composition des algues marines

### 4.1.1. Les polysaccharides de macroalgues ou phycocolloïdes

Les polysaccharides de macroalgues, également appelés phycocolloïdes, sont les principaux constituants de la paroi. Parmi les plus connus sont retrouvés l'agar, les alginates et les carraghénanes qui peuvent représenter jusqu'à 50 % de la masse sèche des algues. Cette étude est focalisée essentiellement sur les alginates et les carraghénanes. Les alginates peuvent être extraits d'algues brunes tels que *Sargassum binderi* et *Turbinaria ornata*. Les carraghénanes sont des constituants d'algues rouges comme *kappaphycus alvarezii* et *Euchema denticulatum*.

#### Les alginates

Les alginates sont les polymères les plus représentés dans la composition des algues brunes de la famille des Sargasses. Ils sont formés d'un enchainement linéaire de deux monomères dérivés du mannose, l'acide mannuronique (M) et l'acide guluronique (G). Ces monomères sont reliés par une liaison  $\beta$  1,4 et peuvent former un homopolymère ou un hétéropolymère. Un homopolymère peut être constitué d'un enchainement d'acide mannuronique ou d'acide guluronique (figure 17). Un hétéropolymère est caractérisé par une succession des deux types de monomère (Santi et al. 2008).



**Figure 17** : Les différentes structures possibles des alginates (Paques et al. 2014)



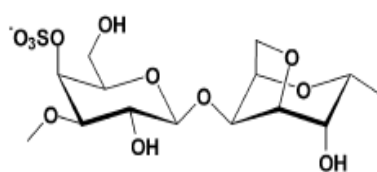
La composition en M et G d'un extrait d'alginate a une influence sur les propriétés physico-chimiques et rhéologique du polymère. Un extrait riche en acide guluronique est apprécié dans l'industrie alimentaire pour sa capacité à former un gel. Un extrait riche en acide mannuronique a une apparence plus visqueuse. Le rapport M/G qui varie entre 0,25 et 2,25 permet d'apprécier la qualité des alginate (Mitchell et Blanshard 1976).

Les alginate peuvent exister sous différentes formes qui n'ont pas les mêmes propriétés. L'alginate de sodium par exemple est soluble dans l'eau alors que l'alginate de calcium peut être dissout uniquement en milieu alcalin.

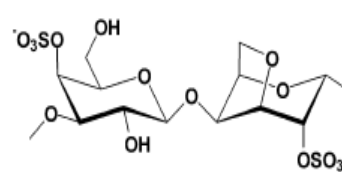
Du fait de leurs propriétés physico-chimiques et rhéologiques, les alginate sont valorisés dans plusieurs domaines. Ils trouvent leur place essentiellement dans les domaines alimentaire, pharmaceutique, cosmétique et médical.

### Les carraghénanes

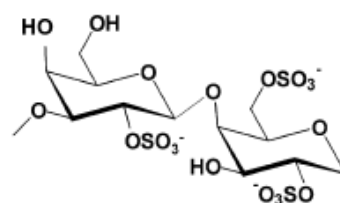
Les carraghénanes sont des polysaccharides sulfatés qui sont classés en fonction du nombre de ces groupement sulfate et de leur position au sein de la molécule. Ils sont constitués par un enchainement de D-galactopyranose sulfatés et reliés entre eux par des liaisons glycosidiques  $\alpha$ -(1 - 3) et  $\beta$ -(1 - 4). Les plus cités sont les kappa-carraghénanes, les iota-carraghénanes et les lambda-carraghénanes (figure 18). Plusieurs carraghénanes différents peuvent être retrouvés au sein d'une même algue (van de Velde et al. 2002).



Kappa-carrageenan



iota-carrageenan



Lambda carrageenan

**Figure 18** : Les carraghénanes les plus représentés dans la nature (van de Velde et al. 2002). Ils sont constitués de dérivés de galactopyranose sulfatés.

Les carraghénanes font partie des agents texturant les plus utilisés dans l'industrie agroalimentaire. Le marché mondial de ces biopolymères a été estimé à 750 millions de dollars en 2013 et les plus gros producteurs sont les Philippines (77 % du marché mondial). Comme les alginates, les nombreuses propriétés des carraghénanes permettent leur valorisation dans d'autres secteurs. Ils sont également présents dans les industries cosmétique et pharmaceutique et dans le domaine biomédical comme décrit dans les paragraphes suivants.

#### 4.1.2. Les composés nutraceutiques des algues

De nombreuses études réalisées sur la biodiversité ont pu démontrer la richesse des algues en polyphénols, vitamines, oligoéléments et acides gras insaturés (Kendel et al. 2012).

Les molécules antioxydantes sont produites par les végétaux supérieurs terrestres et marins pour se protéger de l'environnement extérieur. Ces composés ont pour fonction de neutraliser les espèces réactives à l'oxygène connues pour leurs effets néfastes sur les cellules. Les molécules antioxydantes les plus représentées chez les algues marines sont les phlorotannins, les flavonoïdes, les caroténoïdes, le tocophérol, et l'acide ascorbique (Heo et al. 2003 ; T. Wang et al. 2012).

Les algues sont également une source importante de minéraux qu'elles puisent dans leur environnement aquatique. Elles sont appréciées pour leur richesse en macroéléments comme le magnésium, le calcium. Elles contiennent aussi des oligoéléments comme l'iode, le zinc, le bore et le fer (Elmegeed et al. 2014 ; Bhatia 2015).

Les vitamines sont également présentes dans la composition de ces végétaux aquatiques (Ragupathi Raja Kannan et al. 2013). Les algues brunes et vertes sont majoritairement très riches en vitamine C et les algues rouges en vitamine E. Ces deux derniers composés sont aussi connus pour leur pouvoir antioxydant. Certaines algues comme la spiruline renferment de vitamine du groupe B comme la vitamine B12 qui est très peu retrouvée chez les végétaux terrestres (Kumudha et Sarada 2014).

Le taux de protéines dans la composition des algues est variable selon l'espèce (Mæhre et al. 2014). Les algues rouges montrent généralement une teneur plus importante que les algues brunes. La spiruline est connue comme étant l'algue la plus riche en protéines.

Les algues contiennent très peu de lipides qui ne représentent que 3 % de la matière sèche (Tibbetts, Milley, et Lall 2016). Cette faible proportion correspond à des acides gras essentiels tels que les oméga 3 et les oméga 6 (Schmid, Guihéneuf, et Stengel 2016).

Les algues ont donc cette particularité d'avoir un large spectre de composés qui sont à l'origine de leur valorisation dans différents secteurs.

#### 4.2. Les algues dans l'alimentation humaine et animale

Dans les pays asiatiques comme le Japon et la Chine, les algues sont consommées traditionnellement depuis des siècles. Ces pays restent aujourd'hui les plus gros consommateurs d'algues et détiennent le monopole de l'industrie algale. Dans les pays européens, l'utilisation traditionnelle des algues dans l'alimentation humaine est très peu connue et limitée aux zones côtières comme la Bretagne, et quelques pays du nord de l'Europe. De nos jours, les algues séduisent de plus en plus les consommateurs européens du fait de leur richesse nutritionnelle, de leur valeur diététique et de leurs nombreux bienfaits sur la santé mis en avant par de récentes études. Cependant, en Europe, l'utilisation alimentaire des algues et de ses produits dérivés est soumise à des réglementations depuis la fin du 20<sup>ème</sup> siècle. À ce jour, seulement une vingtaine d'espèces d'algues sont autorisées à la consommation directe.

Les algues du genre *Porphyra*, également connues sous le nom de Nori, sont les plus consommées et sont utilisées majoritairement dans les sushis (Taboada, Millán, et Miguez 2012). Certaines algues du genre *Laminaria* sont également utilisées dans l'alimentation principalement en Asie. Elles sont également cultivées et consommées en France.

Si la consommation directe des algues est peu connue dans les pays européens et en Amérique du Nord, leurs produits dérivés comme les phycocolloïdes sont largement appréciés pour leurs propriétés texturantes. Les carraghénanes sont des additifs alimentaires (E407) retrouvés dans la composition de nombreux produits comme gélifiant, épaississant et stabilisant. Ils sont principalement utilisés dans l'industrie laitière pour leurs propriétés gélifiantes. De plus, les carraghénanes permettent de remplacer les gélatines animales pour les consommateurs végétariens.

Les alginates sont également des agents texturant correspondant à l'additif E400. Les propriétés physico-chimiques des alginates sont aussi très appréciées dans la cuisine moléculaire pour obtenir des sphères de différents goûts comme les *perles* assimilable au caviar.

Depuis des siècles, les algues sont utilisées pour l'alimentation animale, aussi bien en Europe que dans les pays asiatiques. De nos jours les algues sont présentées sous forme de farine pour la nutrition des animaux d'élevage. Parmi les algues les plus utilisés, *Macrocystis pyrifera* et *Ascophyllum nodosum* peuvent être citées (Cruz-Suárez et al. 2009 ; Chaves Lopez et al. 2016).

#### 4.3. Les algues dans le domaine pharmaceutique et cosmétique

À l'image des végétaux terrestres, les algues marines ont également développé des mécanismes de défense contre les agressions extérieures tels que l'exposition au soleil. Ces agressions extérieures entraînent la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) capables de générer des dommages responsables de la destruction des cellules. De nombreuses études ont démontré que les algues, comme les végétaux terrestres, produisent des enzymes pro-oxydantes et des molécules antioxydantes pouvant empêcher la survenue d'un stress oxydatif (Zubia et al. 2009 ; Sabeena Farvin et Jacobsen 2013).

Les molécules antioxydantes ont montré leur efficacité contre plusieurs pathologies et sont de ce fait de plus en plus recherchées. Parmi ces molécules, certaines sont également associées à des propriétés anti-inflammatoires agissant en synergie avec leur pouvoir antioxydant pour lutter efficacement contre ces pathologies (Ku et al. 2013 ; Mikami et Hosokawa 2013).

Dans le domaine de la cosmétique, les antioxydants sont également appréciés pour leurs nombreux bienfaits. Ils peuvent être utilisés pour la conservation des produits cosmétiques contre l'oxydation et le rancissement. Cependant leur intérêt majeur dans ce domaine est leur pouvoir anti-âge sur les cellules de l'épiderme. Lors du vieillissement de la peau, un déséquilibre entre la production de ROS et celle des molécules antioxydantes est instauré. L'utilisation de produits cosmétiques contenant des composés antioxydants permet de restaurer cet équilibre et de préserver la structure des cellules (H.-M. D. Wang et al. 2015).

Les phycocolloïdes des macroalgues sont largement utilisés dans le domaine pharmaceutique. Leurs propriétés biocompatibles permettent leur intégration dans la formulation d'excipient de médicaments. Les alginates sont utilisés comme étant des agents stabilisant, de viscosité ou peuvent servir de liant pour comprimés. Les alginates sont également utilisés dans la fabrication de pommade et de pansement pour leur capacité à accélérer le processus de cicatrisation (Pereira et al. 2013 ; T. Wang et al. 2015).

Dans l'industrie cosmétique les alginates et les fucanes extraits de macroalgues sont connus pour leurs effets contre l'acné et le vieillissement. Ils sont ainsi retrouvés dans la composition de nombreux produits de soin pour la peau (Thomas et Kim 2013 ; Kang et al. 2013).

#### 4.4. Les algues dans le domaine biomédical

Dans le domaine médical, la recherche de nouveaux matériaux biocompatibles pouvant favoriser la régénération d'organes défaillants ou véhiculer des principes actifs suscite beaucoup d'intérêt. Ces polymères ont l'avantage d'être non toxiques, biodégradables et abondants.

Ces dernières années des études ont montré la capacité de certains phycocolloïdes à aider à la réparation de tissus endommagés. Les alginates ont largement été évalués pour la reconstruction des os du squelette (Venkatesan et al. 2015). Les polysaccharides sulfatés comme les carraghénanes ont montré leur capacité à favoriser la régénération du cartilage articulaire (Silva et al. 2012).

Les phycocolloïdes ont un intérêt majeur dans le domaine des nano-médicaments pour leurs propriétés physico-chimiques et leur biocompatibilité. Des études sont focalisées sur l'utilisation des polymères extraits d'algues pour la vectorisation de principes actifs dans l'organisme. Différents types de nanovecteurs ont pu être développés au cours des dernières décennies pour véhiculer différents types de principes actifs en utilisant les phycocolloïdes. Ils peuvent être sous forme de nanosphères, de nanocapsules ou encore présentés sous forme de micelles (Ahn et al. 2014 ; Cavalli et al. 2014, Sarei et al. 2013).

## Partie II : Résultats et travaux



## Chapitre 1 : Extraction et caractérisation de polysaccharides de macroalgues

Les algues marines sont une source importante de molécules d'intérêt telles que les vitamines, les minéraux, les acides gras et les polyphénols. De ce fait, ces végétaux marins trouvent leur place dans différentes filières de valorisation comme les industries alimentaire, cosmétique et pharmaceutique. Dans les Mascareignes, les algues constituent une ressource abondante et invasive mais très peu valorisée. Dans cette partie de l'étude, des algues issues de La Réunion, Maurice et Madagascar ont été évaluées pour leur potentiel de valorisation notamment pour leur teneur en polysaccharides.

Les polysaccharides de macroalgues ou phycocolloïdes sont les composés majoritaires de ces végétaux marins. Cette étude s'est intéressée aux alginates provenant d'algues brunes (*Sargassum binderi*) et aux carraghénanes extraits d'algues rouges (*Kappahycus Alvarezii* et *Euchema denticulatum*). Ces polymères sont principalement valorisés dans les domaines alimentaire, pharmaceutique et médical comme cela a été présenté dans la partie I. En effet, les alginates et les carraghénanes sont retrouvés dans la composition de nombreux produits alimentaires pour leurs propriétés texturantes. Les polysaccharides de macroalgues sont également présents dans l'industrie pharmaceutique comme excipients de médicaments ou pour leurs propriétés biologiques.

L'objectif de cette partie était d'extraire les polysaccharides des macroalgues et de caractériser leur structure. Pour ce faire, un nouveau protocole utilisant les ultrasons a été développé. Il s'agit d'une méthode d'éco-extraction visant à extraire rapidement les polymères tout en conservant leur structure et leurs propriétés physico-chimiques. L'optimisation des paramètres (puissance des ultrasons, température etc.) permet d'atteindre en quelques minutes des rendements obtenus en quelques heures par des protocoles conventionnels. Les extraits ont été ensuite analysés par spectroscopie RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) et chromatographie d'exclusion pour vérifier l'intégrité structurale des polysaccharides. En effet, l'objectif final de ce travail de thèse étant d'utiliser ces polymères naturels pour la confection de nanovecteurs de médicaments, il était important d'extraire ces molécules sans altérer leur structure et leurs propriétés physico-chimiques.



La méthode est décrite sur l'article suivant soumis au journal Carbohydrate Polymers :  
« *ultrasound-assisted extraction and structural characterization of polysaccharides from seaweeds* ».

# Ultrasound-assisted extraction and structural characterization of polysaccharides from seaweeds

Latufa Youssouf <sup>a</sup>, Laura Lallemand <sup>b</sup>, Pierre Giraud <sup>a</sup>, Faiza Soulé <sup>a</sup>, Archana Bhaw-Luximon <sup>c</sup>, Olivier Meilhac <sup>a</sup>, Christian Lefebvre D'Hellencourt <sup>a</sup>, Dhanjay Jhurry <sup>c</sup>, Joël Couprie <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> UMR DÉTROIT, Inserm U1188 - Université de la Réunion, Diabète et Hérombose Thérapies Réunion Océan Indien CYROI, 2 rue Maxime Rivière, 97490 SAINTE CLOTILDE, La Réunion, France

<sup>b</sup> Plateforme de recherche CYROI, 2 rue Maxime Rivière, 97490 Sainte Clotilde, La Réunion, France

<sup>c</sup> Centre for Biomedical and Biomaterials Research (CBBR), University of Mauritius, MSIRI Building, Réduit, Mauritius

\* Corresponding author. Tel.: +262 262 93 33 65; Fax: +262 262 93 82 37; E-mail address: joel.couprie@univ-reunion.fr

## Abstract

Polysaccharides from seaweeds are interesting materials for food and pharmaceutical applications such as drug delivery due their biocompatibility and biodegradability. Extraction of these biopolymers is usually performed during several hours to obtain a significant extraction yield. In this paper, we report on a new process to extract alginates from brown seaweeds (*Sargassum binderi* and *Turbinaria ornata*) and carrageenans from red seaweeds (*Kappaphycus alvarezii* and *Euchema denticulatum*) with the assistance of ultrasound. The effect of several parameters (pH, temperature, algae/water ratio, ultrasound power and duration) was investigated to determine optimal extraction conditions. The extracted polysaccharides represented up to 55% of the seaweeds dry weight and were obtained in a short time (15-30 minutes) as compared to 27 % in 2 hours for conventional extraction. NMR and SEC analysis were used to characterize the extracted polymers. Ultrasound allowed the reduction of extraction time without affecting the chemical structure and molar mass distribution of alginates and carrageenans.

**Key words:** Alginates, Carrageenans, Extraction, Ultrasound, NMR, SEC

## 1. Introduction

Seaweeds represent a natural resource of numerous valuable compounds such as polyphenols, vitamins, peptides and polysaccharides (García-Ríos et al. 2012, Sabeena Farvin & Jacobsen 2013, Škrovánková, 2011). These bioactive components find their applications in food, pharmaceutical and cosmetic industries. The economic potential of seaweeds is getting more and more important with the

seaweed industry representing more than US\$7.4 billion (Bolton et al. 2012, FAO 2014). Many studies have focused on the use of polysaccharides from seaweeds for drug delivery systems (Wang 2014, Nesamony et al. 2012, Silva et al. 2012). Polysaccharides, including alginates and carrageenans, are the major components of seaweeds where they constitute the cell wall (Holdt et al. 2011).

Alginates are a family of natural brown seaweed polymers consisting of 1-4 linked  $\beta$ -D-mannuronic acid (M) and 1-4 linked  $\alpha$ -L-guluronic acid (G) residues. The two monomers can be arranged in homopolymeric and heteropolymeric blocks (Davis et al. 2003). A high proportion in guluronic acid gives gel forming properties to alginates appreciated for food applications (Brownlee et al. 2009). In the pharmaceutical industry, alginates are used for their capacity to activate the healing process (Catanzano et al. 2015, Doyle et al. 1996, Yanova et al. 2012).

Carrageenans are a family of linear sulfated polysaccharides from red seaweeds. The repeat unit is a disaccharide of 3-linked beta-D-galactopyranose (G) and 4-linked alpha-D-galactopyranose (D) or 4-linked 3,6-anhydro-alpha-D-galactopyranose (DA). There are several types of carrageenans that are classified according to the number, the position of sulfate groups and also by the presence of the 3,6-anhydro-bridge on the 4-linked-galactopyranose unit (van de Velde et al. 2002). Carrageenans are widely used in many food products as gelling agents, emulsifiers, thickeners or stabilizers (Djaeni et al. 2013).

Extraction of alginates and carrageenans is usually carried out in hot water during several hours (Al-Alawi et al. 2011, Andriamanantoanina et al. 2010, Fertah et al. 2014). Nowadays, eco-friendly methods are increasingly developed in order to improve extraction processes. Ultrasounds and microwaves can be used to limit energy consumption by reducing the time of the process. Microwave-assisted extraction of carrageenans from *E. cottonii* and *E. spinosum* in aqueous organic solvents allowed a substantial reduction of extraction time and low consumption of organic solvents (Uy et al. 2005) and the same method was also applied successfully to extract carrageenans from *Hypnea musciformis* (Vázquez-Delfín et al., 2014). The efficiency of ultrasound to extract phenolic compounds and essential oils has already been demonstrated and show better yields of extract than conventional processes (khan et al. 2010, Tekin et al. 2015, Wong Paz et al. 2015). However, there are few studies on the use of ultrasound to extract compounds from marine resources.

In the present study, we report on the extraction of alginates from *Sargassum binderi* using ultrasound. The effect of temperature, time, pH, algae/water ratio and ultrasound power on the yield of polysaccharide extraction was analysed. Ultrasound-assisted extraction efficiency was also assessed on carrageenans from *Kappaphycus Alvarezii* and *Euchema Denticulatum*. After extraction and purification, the extracted polysaccharides were fully characterized by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Size Exclusion Chromatography (SEC).

## 2. Material and experimental methods

### 2.1. Collection and preparation of the seaweeds

Species of brown seaweeds (*Sargassum binderi* and *Turbinaria ornata*) were collected in Mauritius in May 2014. A specimen of *Sargassum* was harvested from Pointe-aux-Piments. A second sample of *Sargassum* and *Turbinaria* were collected from Baie-du-Cap. Red seaweeds (*Eucheuma Denticulatum* and *Kappaphycus alvarezii*) were provided by IBIS Algoculture (Madagascar). Voucher specimen of each sample were deposited at the Herbarium of the Mauritius Sugar Industry Research Institute (MSIRI).

Once harvested, the seaweeds were washed with water to remove sand, salts and epiphytes. The algae were then dried, milled into a powder with a home blender and stored under vacuum until extraction stage.

### 2.2. Extraction of polysaccharides

Before polysaccharide extraction, dried seaweeds were treated overnight with an 80 % ethanol solution at room temperature. Pre-treated algae were filtered with a 10 µm Millipore nylon mesh and washed with distilled water. Ultrasound-assisted extraction of the polysaccharides was then performed using a PEX3 Sonifier (REUS, Contes, France) consisting of a temperature-controlled inox jug with maximal capacity of 3 L topped by a stirring system and equipped with a transducer operating at a frequency of 25 kHz at the base with maximum input power of 150 W.

Temperature, pH, algae/water ratio and the ultrasound power were varied to determine the optimal conditions of extraction for each type of polysaccharides (alginates and carrageenans). To remove algae residues after extraction, hot filtration was realised because of the viscosity or the rapid gelling of polysaccharides. The calculated yield of polysaccharides corresponded to the mass ratio of sugar over the quantity of extracted seaweeds.

### 2.3. Experimental design for alginates extraction using ultrasound

To evaluate the influence of several parameters (pH, algae/water ratio, ultrasound power) on the yield of polysaccharides, a 3<sup>2</sup> fractional experimental design with 3 replicates at the centre point was used (Supplementary data 1). The pH was varied from 8 to 12 using NaOH, the algae/water ratio from 10 to 30 g/l and the duration from 20 to 40 min. The response corresponded to the yield of extracted polysaccharides.

### 2.4. Purification of alginates

Two methods adapted from Gomez et al. (2009) were performed to isolate extracted polysaccharides from others compounds. The first technique consisted in adding ethanol slowly into the suspension under stirring. The precipitate was then isolated and freeze-dried to obtain sodium alginate in powder form. The second way used to purify alginates was the precipitation of these biopolymers using calcium chloride. A 5 % solution of  $\text{CaCl}_2$  was added slowly to transform sodium alginate into calcium alginate. A 1 N hydrochloric acid solution was added up to pH 4 in order to convert polysaccharides into the insoluble alginic acid form. The formed precipitate was first filtered using a 0.45  $\mu\text{m}$  Millipore filter to eliminate calcium ions and washed. The precipitate was then suspended in water and all alginic acid molecules were changed into sodium alginates with a 0.5 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  solution. Polysaccharides were isolated by precipitation using ethanol and then filtered. Finally, the precipitate was washed with ethanol and freeze-dried.

#### 2.5. *Extraction of carrageenans using ultrasound*

To extract carrageenans, 10 g of pre-treated seaweed (*Kappahycus Alvarezii* or *Euchema Denticulatum*) were suspended in water (10 g/l) at pH 7 and subjected to ultrasound (150 W). After extraction, a hot filtration was performed to remove algae residues. The filtrate was placed at 4 ° C for several hours to obtain a gel. Carrageenans were isolated by filtration, washed with cold water (4°C), frozen and lyophilized.

#### 2.6. *Size exclusion chromatography (SEC)*

SEC was performed on a 1260 Infinity GPC/SEC System (Agilent Technologies) with a PSS Suprema column. After filtration using a 0.22  $\mu\text{m}$  Millipore filter, 400  $\mu\text{l}$  of the sample (1 mg/ml) was injected into the column. Elution was realised with a 0.5 g/l  $\text{NaNO}_3$  solution at a flow rate of 1ml/min. The calibration was performed using a mixture of dextran with various molar weights (180 Da, 4400 Da, 21400 Da and 277 000 Da). The molecular weight of extracted polysaccharides was estimated using the obtained calibration curve.

#### 2.7. *Structural characterization*

To perform NMR analysis, 10 mg of sample (either alginates or carrageenans) were dissolved in 1 ml of  $\text{D}_2\text{O}$ , tetramethylsilane (TMS, Sigma-Aldrich, Germany) was used as reference. Spectra were recorded on a 600 MHz Avance III Bruker NMR spectrometer equipped with a  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  cryoprobe. All NMR data such as  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , 2D COSY, 2D TOCSY, 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC and 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC were obtained at 344 K.  $^1\text{H}$  NMR spectra were recorded with 128 scans using a sweep width of 10 ppm. 2D spectra were obtained with 32 scans and a sweep width of 10 ppm for  $^1\text{H}$  and 120 ppm for  $^{13}\text{C}$ . In all spectra, the carrier was placed at 4.7 ppm for  $^1\text{H}$  and 50 ppm for  $^{13}\text{C}$ .

#### 2.8. *Statistical analysis*

All statistical analyses were carried out using Minitab 17 software. The Student t-test was used to compare the yields of alginates obtained with ultrasounds against the extract obtained without ultrasounds ( $p < 0.01$ ). One-way analysis of variance (ANOVA) was performed to compare the yield of carrageenans with the control obtained without ultrasounds. When data showed significant differences a Tukey post-test was used ( $p < 0.05$ ).

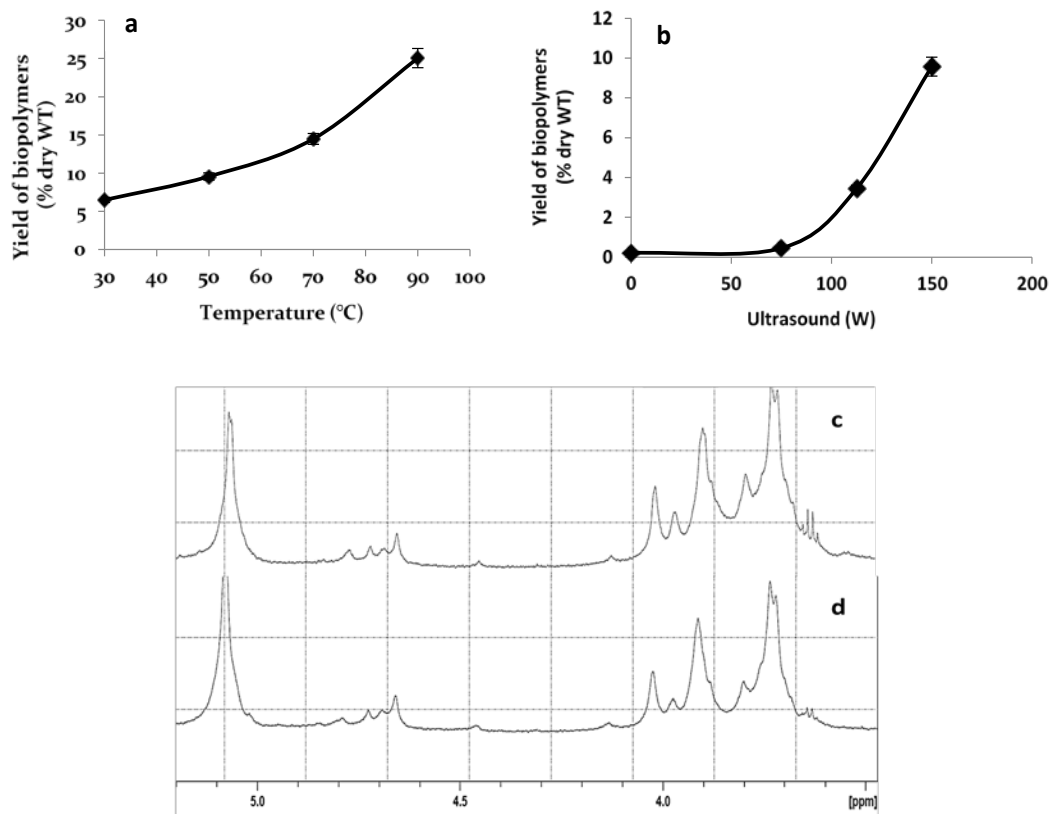
### **3. Results and discussion**

#### *3.1. Optimisation of the temperature and ultrasound power for alginate extraction*

The effects of temperature and ultrasonic power on the yield of polysaccharides were investigated while keeping the other parameters constant (algae mass/water volume, pH and extraction time). Alginates can be extracted in alkaline conditions and ideally at temperature varying between 60°C and 100°C (Andriamanantoanina et al. 2010, Fenoradosoa et al. 2009, García-Ríos et al. 2012, Gomez et al. 2009). The optimal temperature and ultrasound power were determined by setting the algae/water ratio to 10 g/l and the pH to 11. For ultrasound power optimisation, the temperature was set to 50°C and for temperature optimisation, the ultrasound power was set to 150W.

In all tested conditions, the extraction process was stopped after 30 min and polysaccharides were isolated and dried. The results showed that the yields of extracted polysaccharides increased with temperature (Fig. 1a) and the best yield (27 %) was obtained at 90°C. Increasing ultrasound power from 75 to 150 W also improved the extraction process efficiency (Fig. 1b). The optimal ultrasound power corresponds to the limit of the extractor device (150 W) but was enough to enhance by tenfold the extraction yield compared to the extraction without ultrasound.

NMR analysis was performed on extracted alginates exposed to ultrasound (50°C, 150 W, 30 minutes) and without ultrasound to compare the structure of the polysaccharides. No significant difference between the  $^1\text{H}$  NMR spectra was seen (Fig. 1c and 1d). In the light of these results, the temperature was increased to 90 °C and the ultrasonic power at 150 W during 30 minutes, in order to maximize the extraction yield.



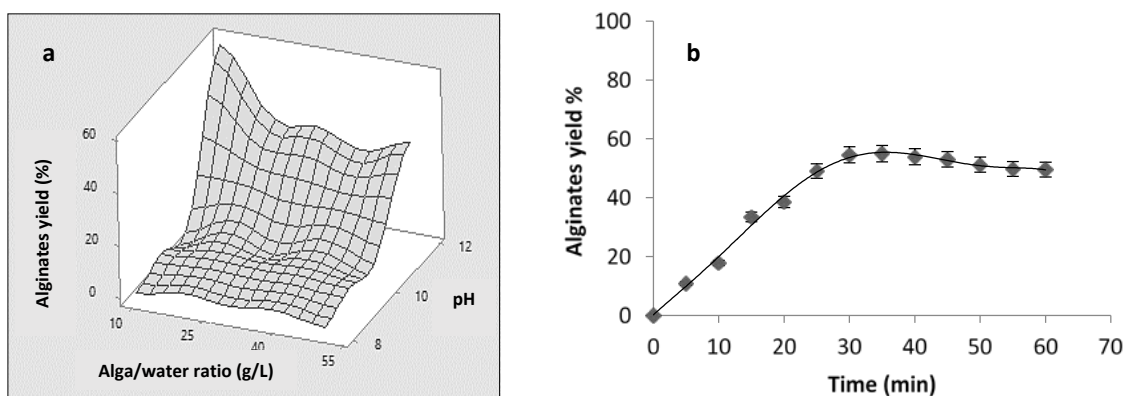
**Fig. 1.** Effect of the temperature (a) and the ultrasound power (b) on the yield of polysaccharides (n=3). Extractions were performed during 30 min and the pH was set at 11. <sup>1</sup>H NMR Spectra of alginates extracted with ultrasound at 150 W (c) and without ultrasound (d).

### 3.2. Parameters affecting alginate extraction by ultrasound

The influence of pH, algae/water ratio and the time of exposure to ultrasound on the extraction efficiency was analysed using a fractional experimental design with 3 replicates at the centre point. The highest extraction yield of alginates (54%) was obtained by applying ultrasounds for 40 min at pH=12 using an algae/water ratio of 10g/l (see Supplementary data 1).

The results showed that both ultrasound and pH strongly influenced the extraction yield (Fig. 2a). When the pH was lower than 10, the extraction yields remained weak regardless of the other variables. Na<sup>+</sup> ions interact with the carboxylic groups of the alginates. A very basic pH led to a faster diffusion of alginates from the seaweed extracts to the solvent. Furthermore, figure 2a shows that the lowest algae/water ratio gave the highest yield of polysaccharides. The difference of concentration between the intracellular medium and the extraction solvent helped the diffusion of the polysaccharides to the external environment. Thus, the higher the algae/water ratio, the lesser was the polysaccharides diffusion. The effect of time on alginate yield was investigated in the established optimal conditions

(ultrasounds: 150 W, algae/water ratio: 10 g/l, pH 12). The use of ultrasounds required 30 minutes to reach a plateau for extraction (Fig. 2b). NMR data showed that application of ultrasound for more than 1 hour probably led to polysaccharide degradations with the appearance of additional signals at 3,8 ppm, 3,9 ppm and in the anomeric region (between 4,75 and 4,85 ppm) (see supplementary data 2).



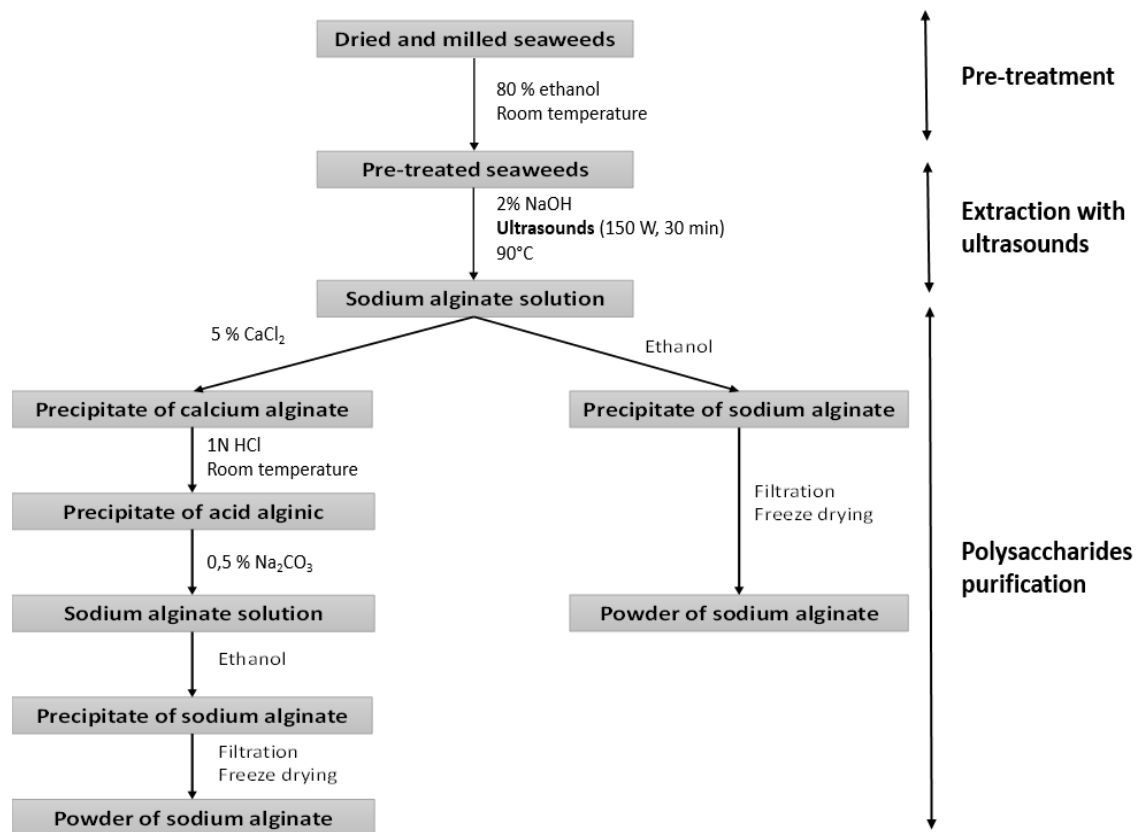
**Fig. 2.** Response surface of alginates yield corresponding to tested experimental points presented in Supplementary data 1 (a). Extraction efficiency in optimized conditions of ultrasound power (150 W), pH (12), temperature and algae/water (10g/l) ratio (b). The bars represent the standard deviation (n=3).

Based on these results, an optimized process for alginates extraction to maximise yields (Fig. 3) as compared to conventional methods was thus established. First, a pre-treatment with an ethanol solution allowed the elimination of compounds other than polysaccharides such as pigments, fatty acids and polyphenols (Hong et al. 2007, Nawaz et al. 2006, Norziah & Ching 2000). The efficiency of alcoholic solvents to extract this type of molecules from plants has already been demonstrated (Gironi & Piemonte 2011, Metivier et al. 1980, Zhao & Li 2015). Acid pre-treatment is often performed before alginate extraction (Fenoradosoa et al. 2014, Torres et al. 2007, Vauchel et al. 2008). In our study, NMR analysis showed that ethanol was highly effective for eliminating impurities (fig. 4). Indeed, the  $^1\text{H}$  NMR spectrum of untreated algae (Fig. 4a) shows peaks which are not corresponding to alginate signals and that are effectively suppressed by ethanol pre-treatment (fig. 4c).

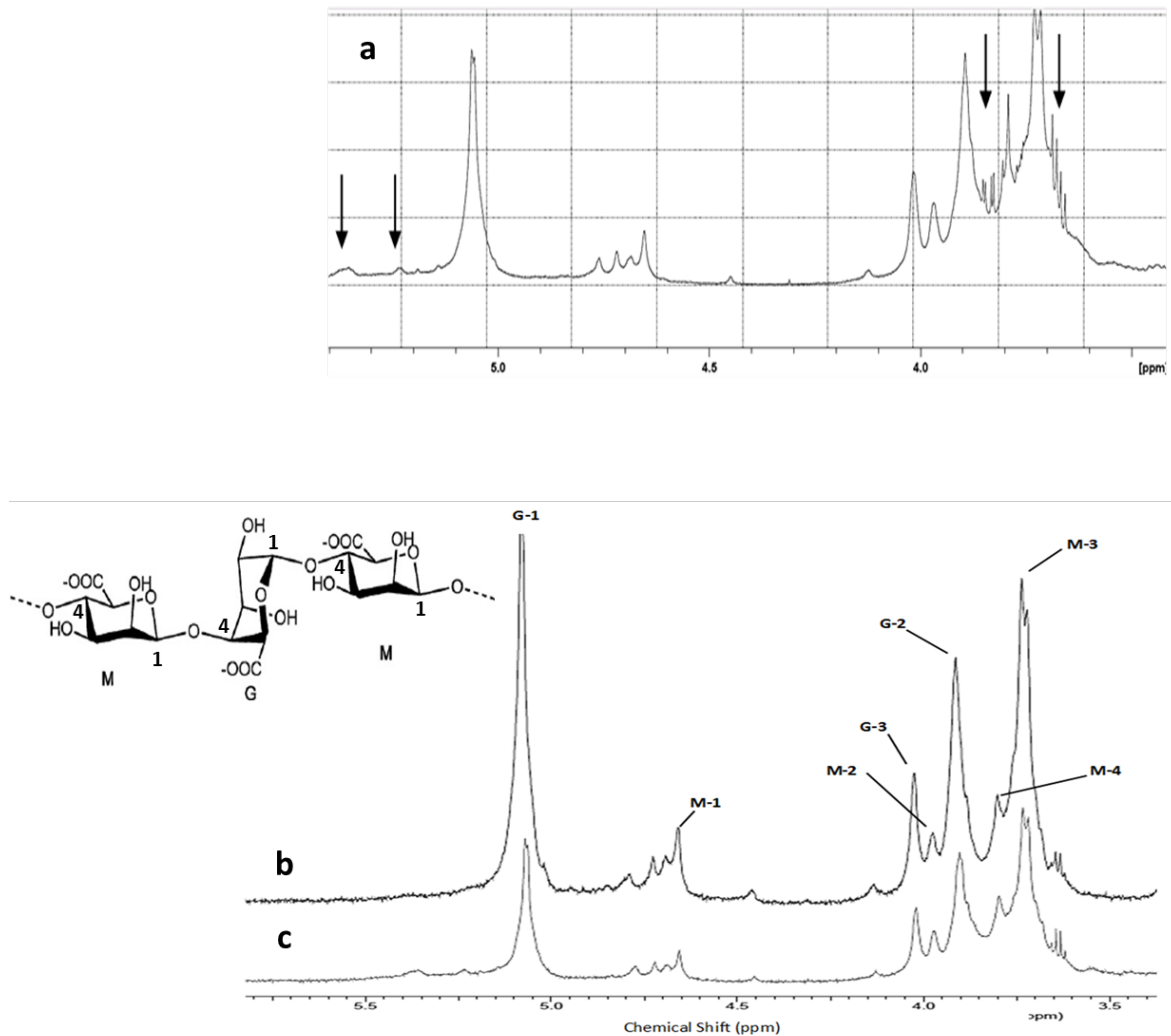
Second, the extraction of polysaccharides was performed on pre-treated seaweeds using determined optimal conditions of pH (12), temperature (90°C), algae/water ratio (10 g/l) and ultrasounds (150 W). Purification of alginate extracts was adapted from Gomez et al. (2009) as presented in figure 3. NMR analysis did not reveal significant differences of composition between the sample obtained by  $\text{CaCl}_2$  precipitation and those purified with ethanol only (Fig. 4b and 4c.). The latter process may be preferred for economical reasons since both purification methods gave approximately the same alginate yields



(50-55 %). Conventional extraction methods required 2 hours to obtain 25 % of polysaccharides on average (Andriamanantoanina et al. 2010, Gomez et al. 2009). In our study, the optimization of all parameters which influence the alginates yield (pH, temperature, algae/water ratio) allowed us to reach a 28 % alginate yield without ultrasound in only 30 min (Supplementary data 3). Ultrasound-assisted extraction process allowed doubling the yield of extracted polysaccharides in only 30 min.



**Fig. 3.** Essential steps involved in alginates extraction and purification. A pre-treatment with 80 % ethanol was performed overnight. Then alginates extraction was realised under sonication (150W) at pH 12 for 30 min. Subsequent alginates purification was carried out using CaCl<sub>2</sub> (left) or ethanol only (right).



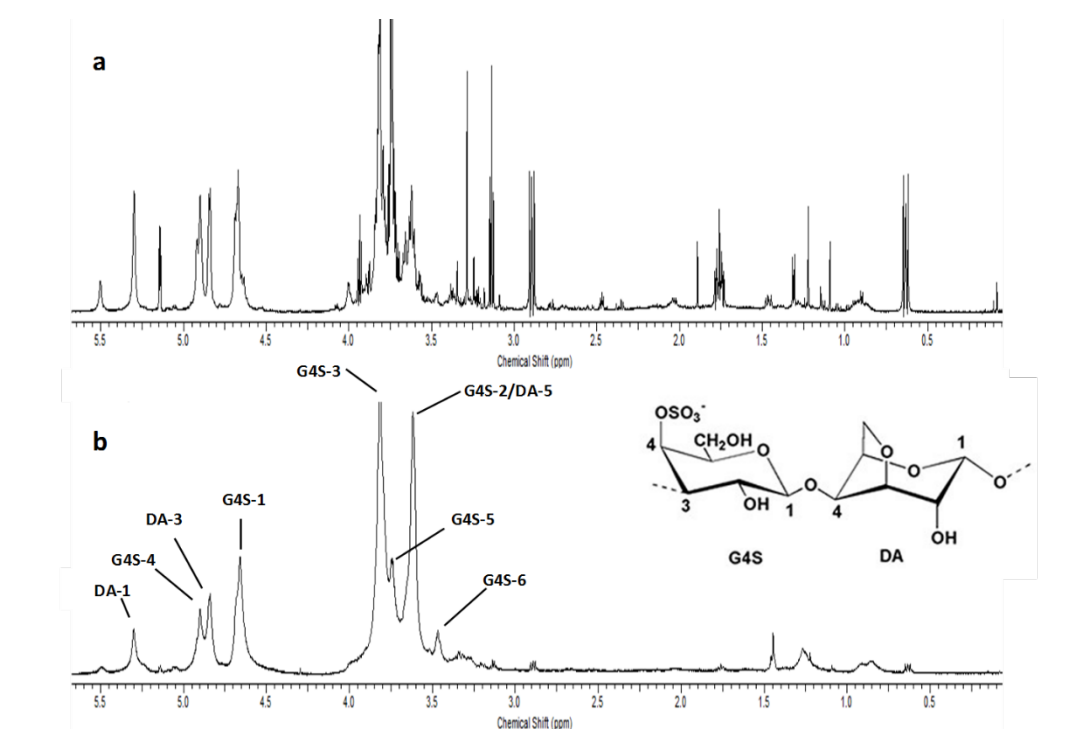
**Fig. 4.** <sup>1</sup>H NMR Spectra of alginates extracted from *Sargassum binderi* using ultrasounds: (a) untreated algae. Impurities are indicated by arrows. Figure (b) and (c) <sup>1</sup>H NMR spectra of alginates from pre-treated algae with 80% ethanol at room temperature. The impurities observed in (a) are effectively suppressed in (b) and (c). Purification was realised either by precipitation with CaCl<sub>2</sub> (b) or with ethanol only (c). Letters correspond to Mannuronic acid (M) and guluronic acid (G) forming alginates. The numbers indicate the position of protons in each monomer (see representative alginic acid MGM sequence on the upper left of Figure b).

### 3.3 Ultrasound-assisted extraction of carrageenans

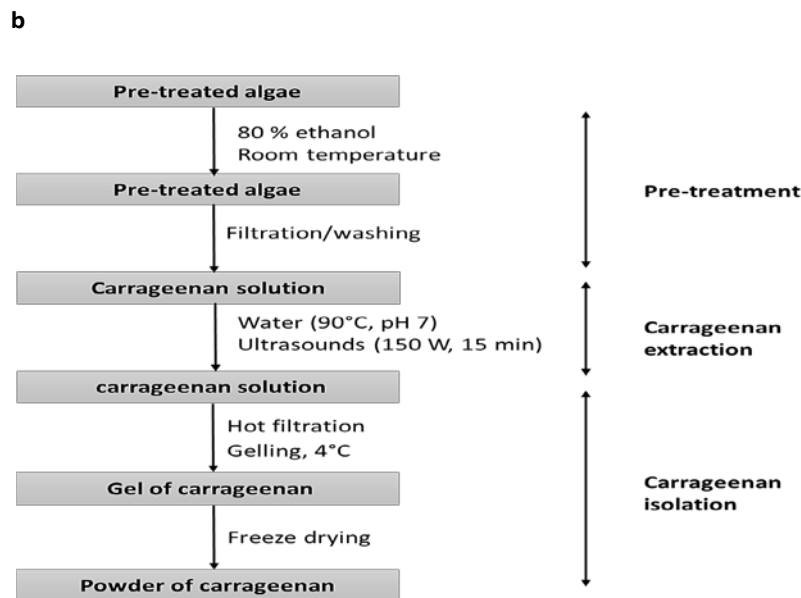
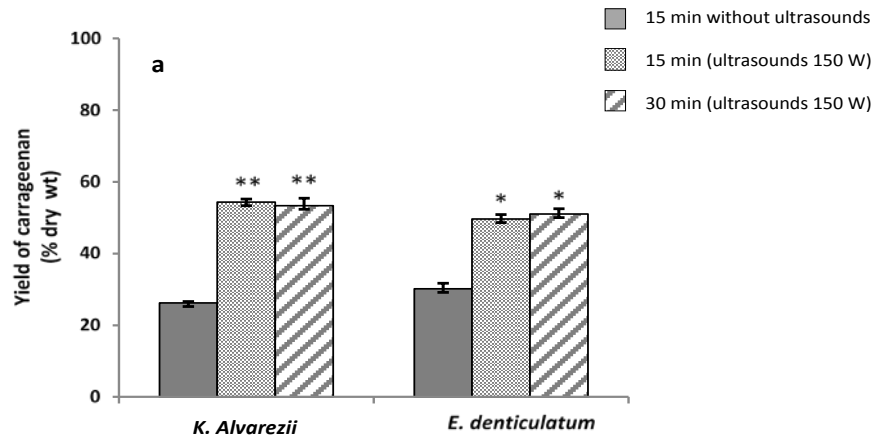
The effect of ultrasound on the yield of extraction was also tested on carrageenans from red algae. A hydro-alcoholic pre-treatment was carried out on dried and milled algae. This first stage allowed the extraction of numerous molecules as shown on the <sup>1</sup>H NMR spectra (Fig. 5) where pre-treatment lead to the elimination of signals not originating from carrageenans.

Based on previous experiments performed on alginates, extraction of carrageenans was carried out at 90° C with ultrasound during 15 and 30 minutes. The ultrasound power was set to 150 W as no degradation was previously observed on alginates for a 30 minutes treatment. Ultrasounds allowed

reaching a 50-55% yield of carrageenans in 15 minutes with similar results using two different red seaweeds (Fig. 6a). Interestingly, a longer ultrasound treatment (30 min) did not further improve the extraction yield. It was reported that *Kappaphycus*, *Gigartina*, *Euचेuma*, *Chondrus*, and *Hypnea* species contain carrageenans up to 50% of their dry weight (McHugh, 1987). The resulting eco-extraction protocol of carrageenans is presented in Figure 6b.



**Fig. 5.** <sup>1</sup>H NMR Spectra of an extract of *Eucheema Denticulatum* obtained using ultrasounds: (a) Untreated algae, (b) pre-treated algae with 80% ethanol. Signals corresponding to kappa-carrageenan monomers (letter coded G4S-DA) are identified.



**Fig. 6.** (a) Efficiency of ultrasounds on carrageenans extraction from two red seaweeds (*Kappaphycus Alvarezii* and *Euchema denticulatum*). The bars represent the standard deviation (n=3). Significant differences were determined by Tuckey test (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ). (b) Essential steps of carrageenans extraction method with ultrasounds (150 W).

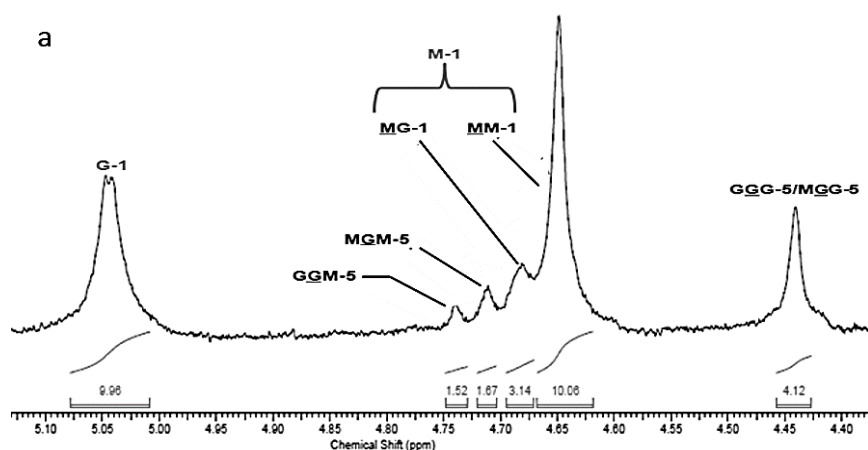
### 3.4. Determination of polysaccharides molar masses

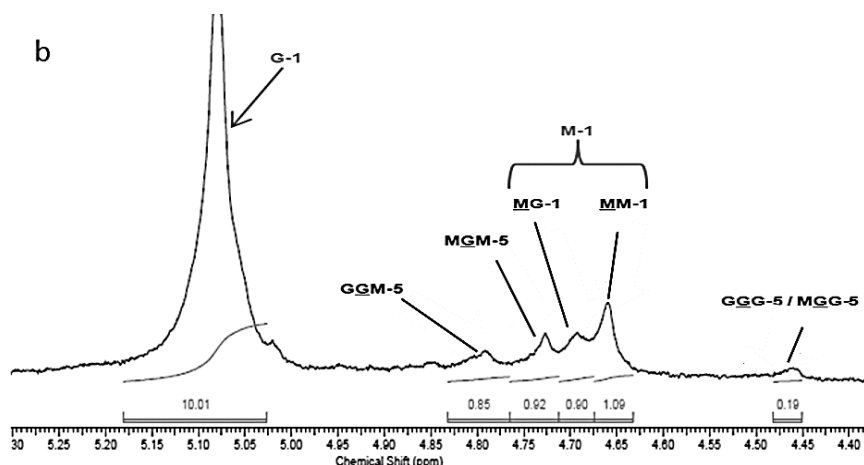
The molar mass of polysaccharides extracted from seaweeds using ultrasound was determined by size exclusion chromatography. All polysaccharides from *Sargassum binderi*, *Euchema denticulatum* and *Kappaphycus alvarezii* were detected in elution fractions ranging from 8.5 ml to 19 ml corresponding to molar masses varying from  $10^3$  to  $10^5$  Da (Supplementary data 4). A wide range of molar masses was observed for each type of polysaccharide extract reflecting heterogeneity in the length of polysaccharides. Analysis of polysaccharides obtained without ultrasound showed similar chromatograms (data not shown) indicating that chain length was unaffected by ultrasound.

### 3.5 Structure analysis of alginates using 1D $^1\text{H}$ , 2D $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC, 2D COSY and TOCSY NMR

Extracted alginates were analysed by NMR for their purity and integrity. All NMR data, namely 1D  $^1\text{H}$ , 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, 2D COSY and TOCSY spectra enabled the identification of signals corresponding to alginates. NMR assignments for alginates extracted from two specimens of *Sargassum binderi* harvested from Mauritius are reported in supplementary data 5.

Alginates quality was assessed using the ratio between mannuronic acid (M) and guluronic acid (G). The M/G ratio defines the rheological properties of alginates and varies according to the species of algae (Ballance et al. 2005). The mannuronic acid gives viscous solutions whereas the guluronic acid forms gels.  $^1\text{H}$  NMR spectrum allowed the estimation of the M/G ratio of alginates from three Mauritian brown seaweeds (Fig. 7). Frequencies corresponding to anomeric proton signals G-1 and M-1 were used to determine the M/G ratio. HSQC spectrum did not show any superposition concerning these anomeric signals (supplementary data 6). Alginates from *Sargassum binderi* 1, collected from Pointe-Aux-Piments, presented the lowest M/G ratio (table 1). Alginates from *Sargassum binderi* 1 has a strong capacity to gelling, unlike those extracted from *Sargassum binderi* 2 and *Turbinaria ornata*. These ratios were unaffected by ultrasound treatment, as evidenced by the similarity between the  $^1\text{H}$  NMR spectra of alginates extracted with or without ultrasound (Fig. 1c and 1d).





**Fig. 7.**  $^1\text{H}$  NMR spectra of alginates from (a) *Sargassum binderi* 1 harvested from Pointe-Aux-Piments and (b) *Sargassum binderi* 2 from Baie-Du-Cap

	$F_G$	$F_M$	M/G
<i>Sargassum binderi</i> 1	0.83	0.17	0.2
<i>Sargassum binderi</i> 2	0.43	0.57	1.32
<i>Turbinaria ornata</i>	0.38	0.62	1.63

**Table 1.** Composition of different samples of alginates in mannuronic acid and guluronic acid. *Sargassum binderi* 1 was harvested from Pointe-Aux-Piments. *Sargassum binderi* 2 and *Turbinaria ornata* were collected from Baie-Du-Cap (Mauritius)

### 3.6. Structural analysis of extracted carrageenans by NMR

Carrageenans extracted from *Euchema denticulatum* were further investigated by NMR. HSQC spectra (supplementary data 7) confirmed that *Euchema denticulatum* is composed of kappa-carrageenan (letter coded G4S-DA) and allowed the detection of signals corresponding to iota-carrageenans (letter coded G4S-DA2S). NMR assignment are presented in supplementary data 8 and did not reveal signals corresponding to carrageenan degradations. *Kappaphycus alvarezii* from Madagascar was also composed of kappa-carrageenan and iota-carrageenan. Quantification using  $^1\text{H}$  NMR spectra showed that *Kappaphycus Alvarezii* contains 68 % of  $\kappa$ -carrageenans and 32 % of  $\iota$ -carrageenans. *Euchema denticulatum* is mainly made up of  $\iota$ -carrageenans (87%).

## 4. Conclusion

The extraction method by means of ultrasound described in this paper allowed the optimization of the yields of polysaccharides (alginates and carrageenans) extracted from seaweeds. The time of the process was significantly reduced compared from 2h with conventional methods to 15-30 min with

ultrasound assistance. NMR analysis did not show degradation or structural modification of the extracted polysaccharides due to ultrasound exposure for up to 30 minutes. At the end of the process, only polysaccharides were detected in the extracts by the NMR technique. This method using ultrasounds is more eco-friendly than conventional methods and affords good quality extracts for both alginates and carrageenans. Red and brown seaweeds represent abundant sources of alginates and carrageenans that are used in various fields of industry such as food, cosmetics and pharmaceuticals. These biopolymers also display a good potential for drug delivery applications. The use of ultrasounds may improve industrial extraction of these biopolymers as presented in this paper.

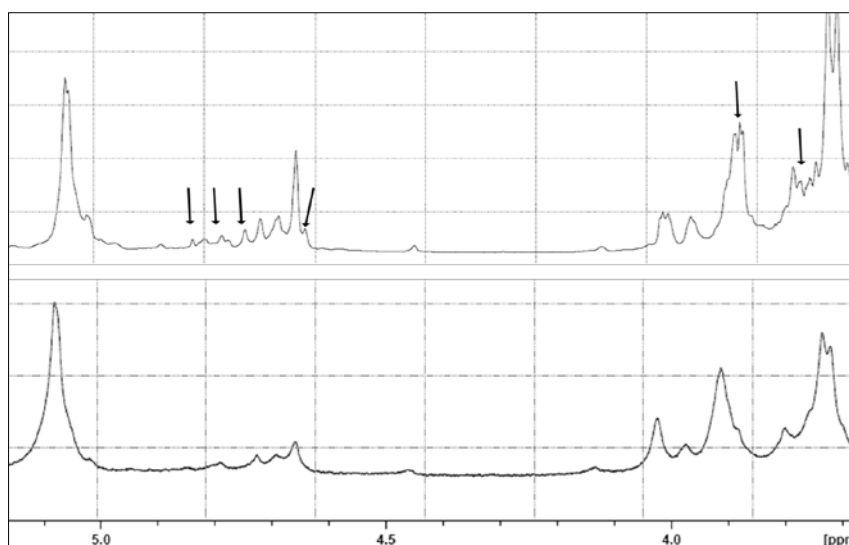
**Acknowledgments:**

The authors thank the university of Mauritius and IBIS Algoculture (Madagascar) for the algae selection. The financial support from the department of Mayotte, the Regional Council and the FEDER are gratefully acknowledged. Ultrasound extractions and NMR experiments were realised at the CYROI biotechnologies platform.

## Supplementary data

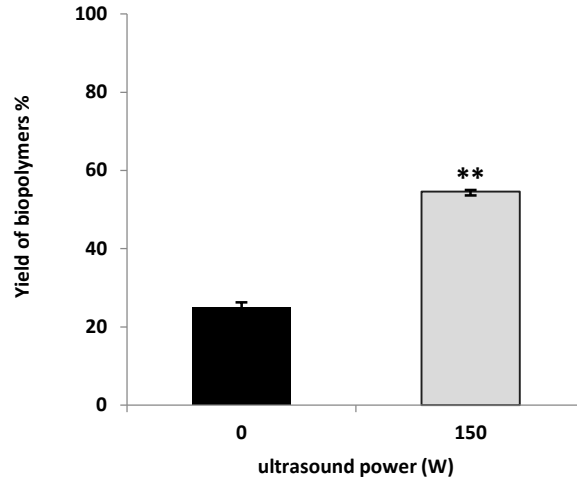
Assay	pH	alga/water ratio (g/l)	Time (min)	Yield of alginates (%)
1	8	10	20	0.61
2	10	10	30	0.64
3	12	10	40	54.06
4	8	30	30	1.64
5	10	30	40	3.03
6	12	30	20	33.41
7	8	50	40	0.47
8	10	50	20	1.76
9	12	50	30	33.64
10	10	30	30	0.92
11	10	30	30	1.35
12	10	30	30	1.17

**Supplementary data 1.** Experimental conditions of alginate extraction according to a fractional experimental design.

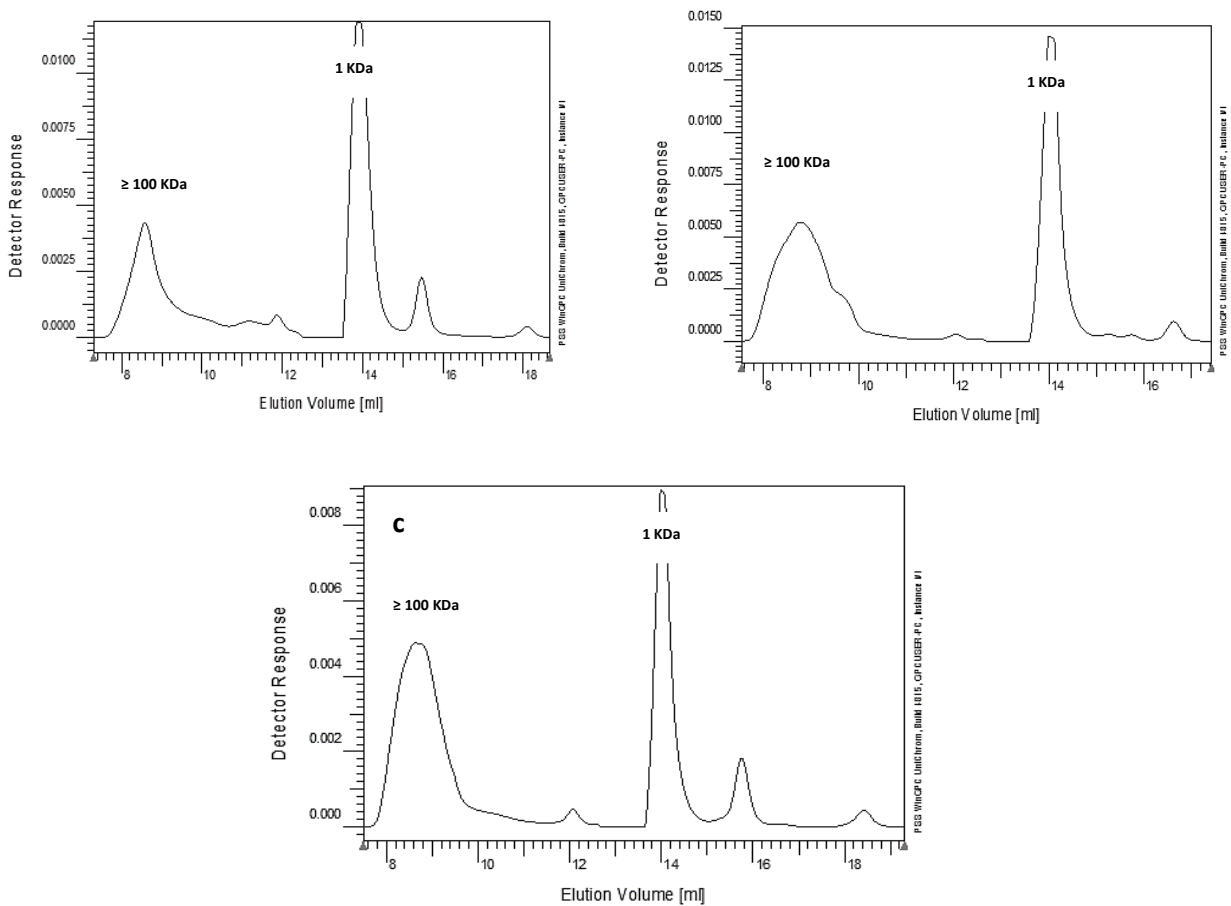


**Supplementary data 2 :**  $^1\text{H}$  NMR Spectra of alginates extracted from *Sargassum binderi* using ultrasounds at 150 W for 1 hour (a) and 30 minutes (b). Degradation signals are indicated by arrows.





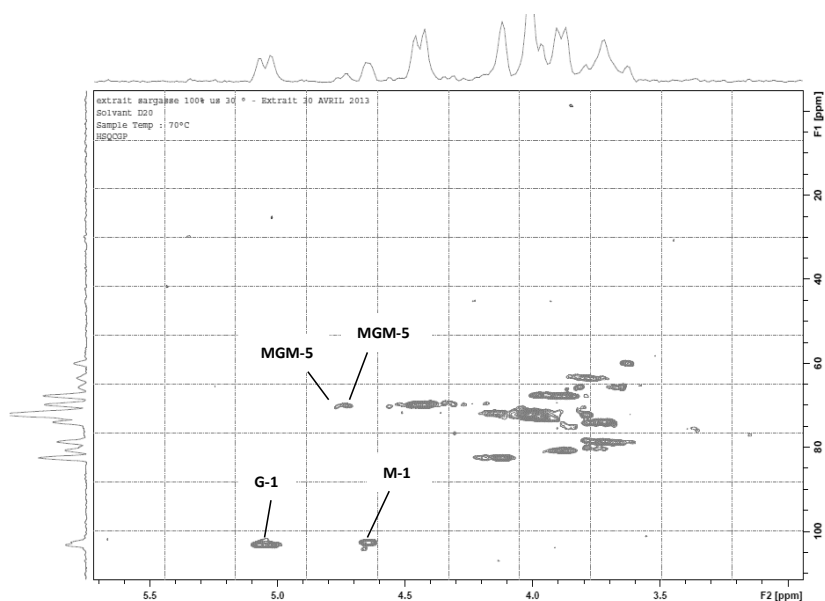
**Supplementary data 3.** Comparison of alginate yield obtained with and without ultrasound for 30 min, under optimal conditions of pH (12), temperature (90°C) and algae/water ratio (10 g/l). The bars represent the standard deviation (n=3). Significant differences were determined by t-test ( $p < 0.01$ ).



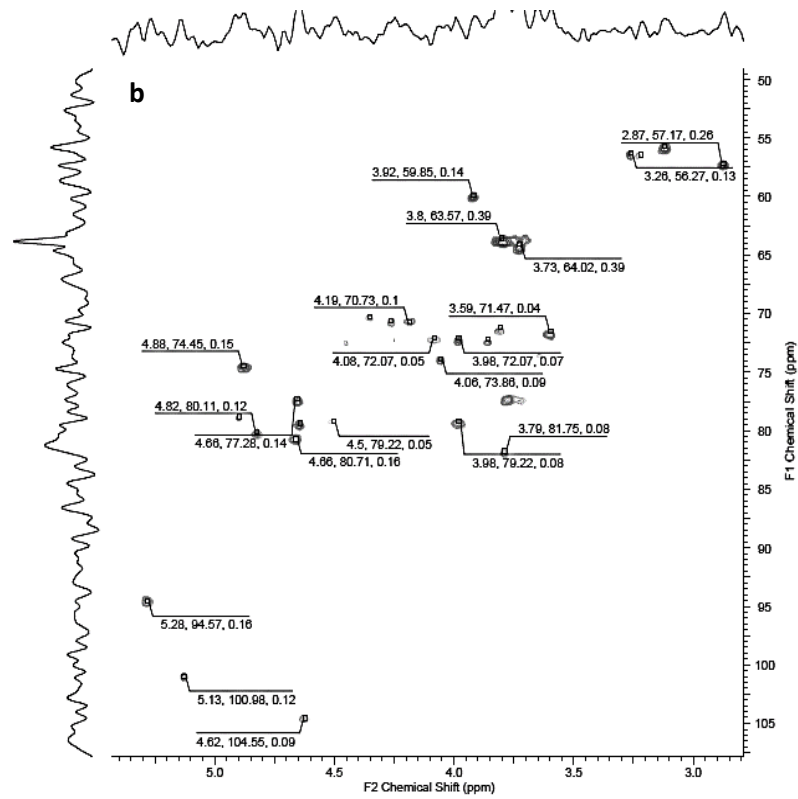
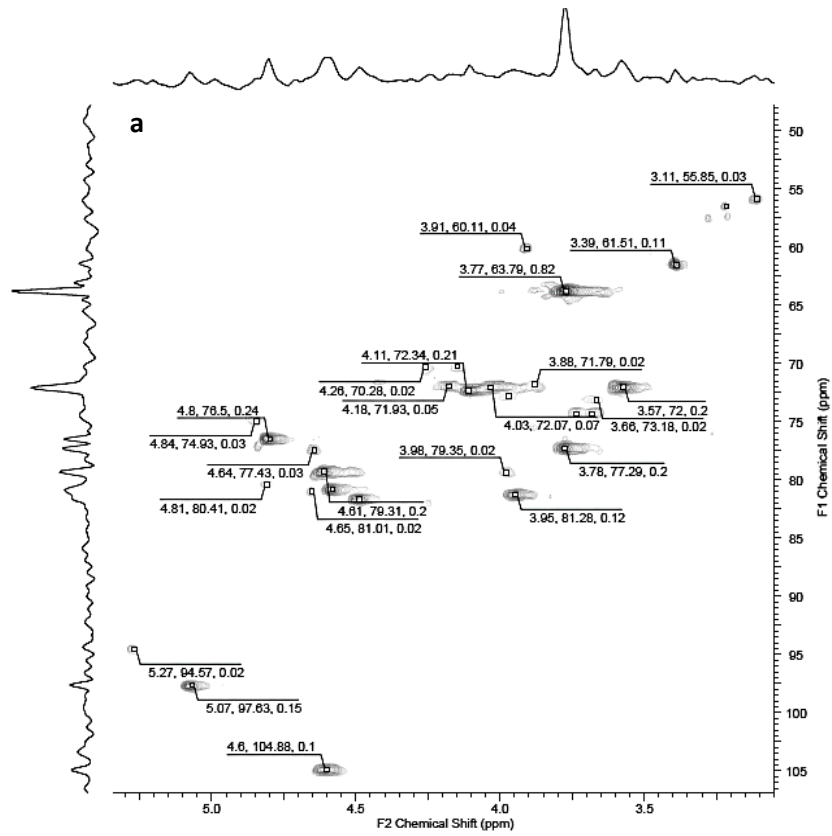
**Supplementary data 4.** Size-exclusion chromatography of alginates from *Sargassum binderi* 2 (a), Carrageenans from *Euchema Denticulatum* (b) and *Kappaphycus Alvarezii* (c). Detection of polysaccharides was monitored by refractive index measurement.

	<i>Sargassum binderi</i> 1		<i>Sargassum binderi</i> 2	
Annotation	Proton (ppm)	Carbone (ppm)	Proton (ppm)	Carbone (ppm)
G-1	5.04	103.26	5.05	101.06
G-2	3.88	67.39	3.91	65.15
G-3	4.00	72.26	4.02	69.63
G-4	4.11	80.42	4.13	80.20
<u>GG</u> -5	4.43	69.83	4.46	67.75
<u>GGM</u> -5	4.76	70.30	4.73	67.98
<u>MGM</u> -5	4.73	70.00	4.65	67.75
<u>MM</u> -1	4.65	102.73	4.66	100.41
<u>MG</u> -1	4.65	104.14	4.70	101.35
M-2	3.95	67.19	3.98	64.93
M-3	3.71	74.09	3.73	71.51
M-4	3.87	80.59	3.91	78.32
M-5	4.43	69.83	4.14	70.8

**Supplementary data 5.**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  chemical shifts of alginates extracted from *Sargassum binderi* 1 and *Sargassum binderi* 2 collected from Pointe-Aux-Piments and Baie-Du-Cap, respectively.



**Supplementary data 6:** HSQC spectrum of alginates extracted from *Sargassum binderi* using ultrasounds at 150 W for 30 min.



**Supplementary data 7.** HSQC spectra of carrageenans from *Kappaphycus Alvarezii* (a) and *Euchema Denticulatum* (b) extracted using ultrasounds for 30 min. NMR assignment are presented as supplementary data 6.

	Annotations	<i>K. Alvarezii</i>		<i>E. denticulatum</i>	
		<sup>1</sup> H (ppm)	<sup>13</sup> C (ppm)	<sup>1</sup> H (ppm)	<sup>13</sup> C (ppm)
Kappa-carrageenan	DA-1	5,04	97,63	5,13	100,98
	DA-2	4,11	72,34	4,19	70,73
	DA-3	3,98	79,35	4,5	79,22
	DA-4	4,58	80,79	4,64	79,37
	DA-5	4,65	81,01	4,66	77,28
	DA-6	4,26	70,28	4,26	77,26
	G4S-1	4,6	104,88	4,62	104,55
	G4S-2	3,66	73,18	3,59	71,47
	G4S-3	3,98	79,35	3,98	79,22
	G4S-4	4,84	74,84	4,88	74,45
	G4S-5	3,73	74,4	4,06	73,86
	G4S-6	3,39	61,51	3,81	71,17

iota-carrageenan	DA2S-1	5,27	94,57	5,28	94,56
	DA2S-2	4,64	77,43	4,66	77,28
	DA2S-3	4,81	80,81	3,79	81,75
	DA2S-4	3,94	81,28	4,66	80,71
	DA2S-5	3,57	72	4,9	78,77
	DA2S-6	3,95	81,28	3,81	71,17
	G4S-1	4,6	104,88	4,62	104,55
	G4S-2	3,66	73,18	3,59	71,47
	G4S-3	3,98	79,35	3,98	79,22
	G4S-4	4,84	74,84	4,88	74,45
	G4S-5	3,73	74,4	4,06	73,86
	G4S-6	3,39	61,51	3,81	71,17

**Supplementary data 8.** <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C chemical shifts of carrageenans extracted from *Kappaphycus alvarezii* and *Euchema Denticulatum* using ultrasounds at 150 W for 30 min.

## References

- Al-Alawi, A. A., Al-Marhubi, I. M., Al-Belushi, M. S. M., & Soussi B. (2011). Characterization of Carrageenan Extracted from *Hypnea Bryoides* in Oman. *Marine Biotechnology*, *13*, 893-99. doi:10.1007/s10126-010-9350-7.
- Altemimi, A., Watson, D. G., Choudhary, R., Mallika R. Dasari, M. R., & Lightfoot, D. A. (2016). Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Peaches and Pumpkins. *PLOS ONE*, *11*, e0148758. doi:10.1371/journal.pone.0148758.
- Andriamanantoanina, H., & Rinaudo, M. (2010). Characterization of the alginates from five Madagascan brown algae. *Carbohydrate Polymers*, *82*, 555-60. doi:10.1016/j.carbpol.2010.05.002.
- Ballance, S., Holtan, S., Aarstad, O. A., Pawel Sikorski, P., Skjåk-Braek, G., & Christensen, B. E. 2005. Application of High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection and Statistical Analysis to Study Oligosaccharide Distributions--a Complementary Method to Investigate the Structure and Some Properties of Alginates. *J. Chromatogr. A*, *1093*, 59-68. doi:10.1016/j.chroma.2005.07.051.
- Brownlee, I. A., Seal, C. J., Wilcox, M. D., Dettmar, P. W., & Pearson, J. P. (2009). Applications of Alginates in Food. In *Alginates: Biology and Applications*, edited by Bernd H. A. Rehm, 211-28. Microbiology Monographs 13. Springer Berlin Heidelberg. [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-92679-5\\_9](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-92679-5_9).
- Bolton, J. J., Bhagooli, R., & Mattio, L. (2012) The Mauritian seaweed flora: diversity and potential for sustainable utilisation. *University of Mauritius Research Journal*, *18*, 6–27.
- Catanzano, O., D'Esposito, V., Acierno, S., Ambrosio, M. R., De Caro, C., Avagliano, C., Russo, P. Miro, A., Ungaro, F., Calignano, A., Formisano, P., & Quaglia, F. (2015) Alginate-Hyaluronan Composite Hydrogels Accelerate Wound Healing Process. *Carbohydrate Polymers*, *131*, 407-14. doi:10.1016/j.carbpol.2015.05.081.
- Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., & Vitaliy V. Khutoryanskiy, V. V. (2011). Production and Evaluation of Dry Alginate-Chitosan Microcapsules as an Enteric Delivery Vehicle for Probiotic Bacteria. *Biomacromolecules*, *12*, 2834-40. doi:10.1021/bm200576h.
- Davis, T. A., Llanes, F., Volesky, B., Diaz-Pulido, G., McCook, L., & Mucci, A. (2003). <sup>1</sup>H-NMR Study of Na Alginates Extracted from *Sargassum* Spp. in Relation to Metal Biosorption. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *110*, 75-90. doi:10.1385/ABAB:110:2:75.
- Djaeni, M., Prasetyaningrum, A., Sasongko, S. B., Widayat, W., & Hii, C. L. (2013). Application of Foam-Mat Drying with Egg White for Carrageenan: Drying Rate and Product Quality Aspects. *Journal of Food Science and Technology*, *52*, 1170-75. doi:10.1007/s13197-013-1081-0.
- Doyle, J. W., Roth, T. P., Smith, R. M., Li, Y. Q., & Dunn, R. M. (1996). Effects of Calcium Alginate on Cellular Wound Healing Processes Modeled in Vitro. *Journal of Biomedical*

*Materials Research*, 32, 4, 561-68. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(199612)32:4<561::AID-JBM9>3.0.CO;2-P.

FAO. The state of world fisheries and aquaculture: opportunities and challenges. Rome, 209. Available at: <http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf> (2014).

Fenoradosoa, T. A., Ali, G., Delattre, C., Laroche, C., Petit, E., Wadouachi, A., & Michaud, P. (2009). Extraction and Characterization of an Alginate from the Brown Seaweed *Sargassum Turbinarioides* Grunow. *Journal of Applied Phycology*, 22, 131-37. doi:10.1007/s10811-009-9432-y.

Fertah, M., Belfkira, A., Dahmane, E. M., Moha Taourirte, M., & Brouillette, F. (2014). Extraction and characterization of sodium alginate from Moroccan *Laminaria digitata* brown seaweed ». *Arabian Journal of Chemistry*. Consulted on August 5th 2016. doi:10.1016/j.arabjc.2014.05.003.

García-Ríos, V., Ríos-Leal, E., Robledo, D., & Freile-Pelegri, Y. (2012). Polysaccharides Composition from Tropical Brown Seaweeds. *Phycological Research*, 60, 305-15. doi:10.1111/j.1440-1835.2012.00661.x.

Gironi, F., & Piemonte, V. (2011). Temperature and solvent effects on polyphenol extraction process from chestnut tree wood. *Chemical Engineering Research and Design*, 89, 857-62. doi:10.1016/j.cherd.2010.11.003.

Gomez, C. G., Pérez Lambrecht, M. V., Lozano, J. E., Rinaudo, M., & Villar, M. A. (2009). Influence of the Extraction–purification Conditions on Final Properties of Alginates Obtained from Brown Algae (*Macrocystis Pyrifera*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 44, 365–71.

Holdt, S. L., & Kraan, S. (2011). Bioactive Compounds in Seaweed: Functional Food Applications and Legislation. *Journal of Applied Phycology*, 23, 543-97. doi:10.1007/s10811-010-9632-5.

Hong, D. D., H. M. Hien, H. M., a Son, P. N. (2007). Seaweeds from Vietnam Used for Functional Food, Medicine and Biofertilizer. *Journal of Applied Phycology*, 19, 817-26. doi:10.1007/s10811-007-9228-x.

Jhurry, D., Bhaw-Luximon, A., Mardamootoo, T., & Ramanjooloo, A. (2006). Biopolymers from the Mauritian marine environment. In *Macromolecular symposia*, 231:16–27. Wiley Online Library, 2006. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/masy.200590020/abstract>.

Khan, M. K., Maryline Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Dangles, O., & Chemat, F. (2010). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*, 119, 851-58. doi:10.1016/j.foodchem.2009.08.046.

Luo, Y., & Wang, Q. (2014). Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 64, 353-67. doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.12.017.

McHugh, D. (1987). Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds. Food and Agriculture Organization of the United Nations; Rome, Italy. FAO Fisheries Technical Paper 288.

Metivier, R. P., Francis, F. J., & Clydesdale, F. M. (1980). Solvent Extraction of Anthocyanins from Wine Pomace. *Journal of Food Science*, 45, 1099-1100. doi:10.1111/j.1365-2621.1980.tb07534.x.

Nawaz, H., Shi, J., Mittal, G. S., & Kakuda, Y. (2006). Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration ». *Separation and Purification Technology*, 48, 176-81. doi:10.1016/j.seppur.2005.07.006.

Nesamony, J., Singh, P. R., Nada, S. E., Shah, Z. A. & Kolling, W. M. (2012). Calcium Alginate Nanoparticles Synthesized through a Novel Interfacial Cross-Linking Method as a Potential Protein Drug Delivery System. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101, 2177-84. doi:10.1002/jps.23104.

Norziah, M. H., & Ching, C. Y. (2000). Nutritional composition of edible seaweed *Gracilaria changgi* ». *Food Chemistry*, 68, 69-76. doi:10.1016/S0308-8146(99)00161-2.

Pingret, D., Fabiano-Tixier, A. S., & Chemat, F. (2013). An Improved Ultrasound Clevenger for Extraction of Essential Oils ». *Food Analytical Methods*, 7, 9-12. doi:10.1007/s12161-013-9581-0.

Sabeena Farvin, K. H., & Jacobsen, C. (2013). Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. *Food Chemistry*, 138, 1670-81. doi:10.1016/j.foodchem.2012.10.078.

Silva, T. H., Alves, A., Popa, E. G., Reys, L. L., Gomes, M. E., Sousa, R. A., Silva, S. S., Mano, J. F., & Reis, R. L. (2012). Marine algae sulfated polysaccharides for tissue engineering and drug delivery approaches. *Biomatter*, 2, 278-89. doi:10.4161/biom.22947.

Tekin, K., Akalın, M. K., & Şeker, M. G. (2015). Ultrasound bath-assisted extraction of essential oils from clove using central composite design ». *Industrial Crops and Products*, 77, 954-60. doi:10.1016/j.indcrop.2015.09.071.

Torres, M. R., Sousa, A. P., Eduardo A. T. Silva Filho, E. A., Melo, D. F., Feitosa, J. P., de Paula, R. C., & Lima, M. G. (2007). Extraction and physicochemical characterization of *Sargassum vulgare* alginate from Brazil. *Carbohydrate Research*, 342, 2067-74. doi:10.1016/j.carres.2007.05.022.

Uy, S. F., Eastal, A. J., Farid, M. M., Keam, R. B., & Conner, G. T. (2005). Seaweed processing using industrial single-mode cavity microwave heating: a preliminary investigation. *Carbohydrate Research*, 340, 1357-64. doi:10.1016/j.carres.2005.02.008.

Van de Velde, F., Knutsen, S. H., Usov, A. I., Rollema, H. S., & Cerezo, A. S. (2002). <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. *Trends in Food Science & Technology*, 13, 73-92.

Vázquez-Delfín, E., Robledo, D., Freile-Peigrín, Y. (2014). Microwave-assisted extraction of the Carrageenan from *Hypnea musciformis* (Cystocloniaceae, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 26, 901-907. doi: 0.1007/s10811-013-0090-8.

Vauchel, P., Kaas, R., Arhaliass, A., Baron, R., & Legrand, J. (2008). A New Process for Extracting Alginates from *Laminaria Digitata*: Reactive Extrusion. *Food and Bioprocess Technology*, 1, 297-300. doi:10.1007/s11947-008-0082-x.

Wong Paz, J. E., Muñiz Márquez, D. B., Martínez Ávila, G. C., Belmares Cerda, R. E., & Aguilar, C. N. (2015). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from native plants in the Mexican desert. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, 474-81. doi:10.1016/j.ultsonch.2014.06.001.

Yanova, O.B., Kim, V.A., & Treiman, E.V. (2012). Alginates in the treatment of postgastroresection reflux esophagitis. *Terapevticheskii Arkhiv*, 84, 48-50.

Zhao, Z. S., & Li, T.P. (2015). Extraction and Purification of Pigment from Purple Sweet Potato Wine Vinasse. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 7, 298-301.



## Travaux associés

A l'image des végétaux terrestres, les algues marines sont également dotées de mécanismes de défenses contre l'oxydation comme les enzymes (superoxyde dismutase, catalase etc.) ainsi que des molécules antioxydantes. Ces composés naturels sont très recherchés du fait de leurs propriétés biologiques multiples. Comme cela a été évoqué dans la partie I, les molécules antioxydantes sont connues pour leurs propriétés thérapeutiques contre l'inflammation, les cancers, les maladies cardiovasculaires mais aussi pour leur pouvoir antiviellissement (Cardoso et al. 2015 ; Park et Pezzuto 2013; Kelman et al. 2012). Dans cette partie de l'étude la teneur en composés phénoliques ainsi que l'activité antioxydante de différents extraits de macroalgues issues des Mascareignes a été estimée.

### Matériels et méthodes

Les algues *Sargassum binderi*, *Actinotricia fragilis* et *Gracilaria corticata* ont été récoltées à l'île Maurice. Les algues rouges *Kappaphycus alvarezii* et *Euchema denticulatum* proviennent d'IBIS Algoculture situé à Madagascar. Ces algues ont été séchées, broyées avant de réaliser l'extraction. Pour effectuer les tests antioxydants, les algues ont été traitées avec une solution d'éthanol 80 % (10 g d'algue pour 50 ml de solvant) afin d'extraire les molécules lipophiles comme les composés phénoliques. L'extraction a été réalisée sous agitation, à température ambiante et les extraits éthanoliques ainsi obtenus ont ensuite été séchés puis analysés. Cette étape a également servi de prétraitement avant l'extraction des polysaccharides comme cela a été présenté dans l'article « ultrasound-assisted extraction and structural characterization of polysaccharides from seaweeds ».

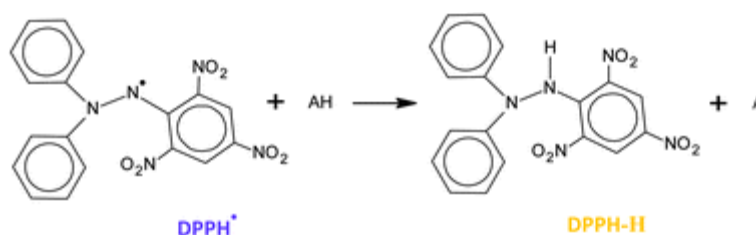
#### Test de Folin-Ciocalteu

Le dosage des composés phénoliques totaux a été réalisé sur plaque 96 puits dans lesquels 25 µl d'extrait d'algue (1mg/ml dissout dans le DMSO) sont mélangés avec 125 µl de réactif de Folin-Ciocalteu (10 %) et 100 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) et d'acide phosphomolybdique (H<sub>3</sub>PMO<sub>12</sub>O<sub>40</sub>). Lors de l'oxydation des composés phénoliques, ce réactif est réduit en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits. La plaque a été

incubée pendant 5 min à 50 °C puis l'absorbance mesurée à 760 nm. Une gamme étalon d'acide gallique (0 à 250 µM) a permis de déduire la quantité de composés phénoliques totaux.

### Test DPPH

Sur une plaque 96 puits, 25 µl d'échantillon (10 mg/ml) dissout dans le DMSO sont mélangés avec 225 µl de solution de DPPH à 0,15 mM. Après 30 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 517 nm. La méthode est standardisée avec une gamme étalon (0 à 200 µM) de trolox (acide 3,4-dihydro-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthyl-2H-1-benzopyran-2-carboxylique), un dérivé soluble de la vitamine E possédant de puissantes propriétés antioxydantes. Le radical DPPH (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl), caractérisé par sa couleur bleue, est stable à température ambiante. Les antioxydants présents dans l'échantillon le réduisent entraînant alors sa décoloration (figure 19).



**Figure 19** : neutralisation du radical DPPH par une molécule antioxydante AH

### Test ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

Sur une plaque 96 puits, 25 µl d'échantillon (1mg/ml d'extrait dissout dans le DMSO) sont mélangés avec 150 µl de fluorescéine puis incubés pendant 20 min à 37°C. Ensuite, 25 µl d'AAPH (2,2'-azobis (2 amidinopropane) dihydrochloride) sont ajoutés puis la décroissance de la fluorescence est mesurée sur une durée de 2H. La dégradation de la fluorescéine est induite par la décomposition thermique (37°C) de l'AAPH en deux radicaux libres. La présence de molécules antioxydantes dans l'échantillon retarde la dégradation de l'AAPH et donc diminue la vitesse de décroissance de la fluorescence. La réaction est standardisée en utilisant une gamme étalon de trolox (0 à 200 µM).

## **Résultats**

### Recherches d'activités antioxydantes

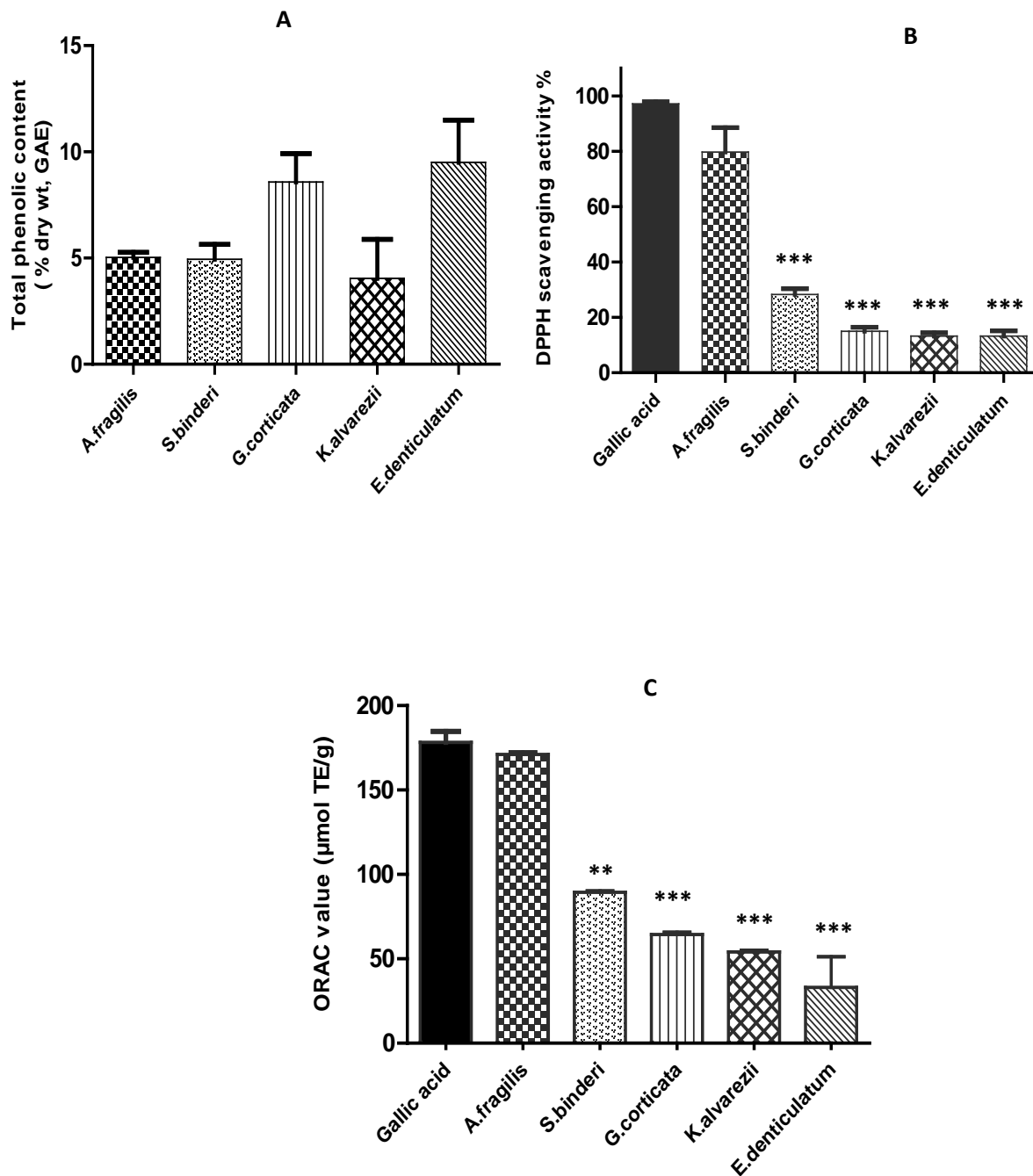
La teneur en composés phénoliques et les activités antioxydantes des différentes algues sont présentées sur la figure 20. L'algue brune *Sargassum binderi* est constituée de 4.94 % (masse/masse d'algue sèche) de composés phénoliques et les algues rouges *Actinotrichia fragilis*, *Gracilaria corticata*, *Kappaphycus alvarezii* et *Eucheuma denticulatum* en contiennent respectivement 5.03, 8.58, 4.04 et 9.50 %. Ces valeurs sont similaires aux données rapportées dans la littérature concernant les algues brunes et les algues rouges (Zubia, Robledo, et Freile-Pelegrin 2007; Zubia et al. 2009; Connan et Stengel 2011) dont voici quelques valeurs :

- *Sargassum pteropleuron* : 0.76 %  $\pm$  0.04
- *Sargassum ramifolium* : 0.95 %  $\pm$  0.10
- *Eucheuma isiforme* : 0,36 %
- *Turbinaria tricostrata* : 1.05 %  $\pm$  0.08
- *Fucus ceranoides* : 5.47  $\pm$  0.40 %
- *Fucus serratus* : 2.82  $\pm$  0.23
- *Fucus vesiculosus* : 6.28 ( $\pm$ 1.04)
- *Fucus vesiculosus* : 11.30 ( $\pm$ 1.06)

Cependant la teneur en composés phénoliques des algues peut varier selon les espèces, les saisons et le lieu de récolte.

Les mesures d'activités antioxydantes ont été réalisées en utilisant les tests DPPH et ORAC. Ces deux méthodes reposent sur la capacité des extraits algaux à piéger des radicaux libres. Le premier test mesure la réduction du radical DPPH par les extraits d'algue en DPPH. Le test ORAC mesure la capacité de ces extraits à piéger les radicaux libres de AAPH formés.

Ces deux méthodes révèlent que l'ensemble des algues étudiées possède des propriétés anti-radicalaires. *Actinotrichia fragilis* présente une activité proche de celle de l'acide gallique connu pour son fort pouvoir antiradicalaire. Cependant, la teneur en polyphénols de cette algue est plus faible que celle de *Gracilaria corticata* ou *Eucheuma denticulatum*. De ce fait, cette forte activité de l'extrait *Actinotrichia fragilis* peut provenir de composés phénoliques mais également d'un ou plusieurs autres constituants ayant des propriétés antioxydantes. L'indice d'oxydation (EC50) d'*Actinotrichia fragilis* a été estimés à 4,02  $\pm$  1,67 mg/ml. Les autres algues montrent une activité anti-radicalaire plus faible que celle d'*Actinotrichia fragilis* mais toutefois non négligeable.



**Figure 20** : Analyse des extraits éthanoliques (EtOH 80 %) de différentes algues. Détermination de la teneur en composés phénolique (A) et de la proportion de radicaux libres piégés selon le test DPPH (B) et le test ORAC (C). Test de Tukey : \*\*\*p < 0,001 en comparaison avec l'acide gallique, \*\*p < 0,01 en comparaison avec l'acide gallique.

## Conclusion

La teneur en polyphénols et les activités anti-radicalaires d'extraits éthanoliques d'une algue brune et d'algues rouges issues des Mascareignes ont été caractérisées. L'algue *Actinotrichia fragilis* dont la composition est très peu documentée dans la littérature montre une activité antioxydante valorisable, proche de celle de composés de référence comme l'acide gallique. Il serait donc intéressant d'identifier et de caractériser la ou les molécule(s) responsable(s) de cette activité, en combinant par exemple les techniques de Chromatographie Liquide Haute Performance, de Résonance Magnétique Nucléaire et de spectrométrie de masse. Des expériences au niveau cellulaire pourraient compléter les résultats obtenus, afin de confirmer le potentiel antioxydant de ces extraits et d'évaluer leur toxicité.

Pour la plupart des algues brunes et rouges étudiées ici, (*Actinotrichia fragilis*, *Sargassum binderi*, *Gracilaria corticata*, *Euchema denticulatum*) il serait donc potentiellement intéressant d'exploiter les coproduits d'extraction des polysaccharides obtenus lors de l'étape de prétraitement à l'éthanol 80% puisqu'ils présentent des teneurs en polyphénols et/ou des activités anti-radicalaires élevées.

## Conclusion chapitre 1

L'extraction des polysaccharides de macroalgues est habituellement effectuée durant plusieurs heures pour obtenir un rendement d'extraction significatif. Dans cette étude, un nouveau protocole a été développé pour extraire les polysaccharides de macroalgues en utilisant des ultrasons.

Tout d'abord, les algues séchées et broyées ont subi un prétraitement avec un solvant hydro-alcoolique permettant d'éliminer les composés lipophiles. Cet extrait éthanolique peut être valorisé puisqu'il contient dans la plupart des algues brunes et rouges des molécules d'intérêt telles que les composés phénoliques ou d'autres composés ayant des propriétés antioxydantes.

Ensuite, les algues ainsi traitées ont été soumises aux ultrasons afin d'extraire les polysaccharides. Cette étude s'est particulièrement intéressée aux alginates et carraghénanes pour leur solubilité en milieu aqueux et leur biocompatibilité, important pour la suite de ce travail. L'effet de plusieurs paramètres a été analysé (pH, température, le rapport algues/eau, la puissance des ultrasons et la durée) afin de déterminer les conditions d'extraction optimales. Les polysaccharides extraits représentent jusqu'à 55% de la masse sèche des algues et ont été obtenus sur une courte durée (15-30 minutes). En comparaison, les méthodes d'extraction conventionnelles nécessitent plusieurs heures pour des rendements plus faibles. L'analyse des extraits par spectroscopie RMN et chromatographie d'exclusion n'a pas révélé de dégradations des polymères. Ainsi les ultrasons ont permis de réduire le temps d'extraction sans affecter la structure chimique et le poids moléculaire des alginates et des carraghénanes.

La suite de ce travail porte sur la valorisation de ces polymères extraits, purifiés et caractérisés dans le but de former des nanovecteurs de principes actifs.

## Chapitre 2 : Fonctionnalisation de phycocolloïdes pour véhiculer des molécules hydrophobes

Les principes actifs hydrophobes présentent une absorption faible et une bio-distribution limitée dans l'organisme. L'utilisation des nanovecteurs permet de faciliter la circulation de ce type de molécules dans l'organisme. Dans cette étude, des nanomicelles biodégradables ont été synthétisées afin de véhiculer les principes actifs hydrophobes notamment la curcumine. Ces nanomicelles sont obtenues à partir de polysaccharides extraits de macroalgues. La curcumine est connue pour ses propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anti-tumorales ainsi que pour sa capacité à diminuer les risques liés aux maladies cardiovasculaires (He et al. 2015). Cependant la lipophilie de la curcumine est un obstacle à son efficacité dans l'organisme.

Le premier objectif de cette partie était d'obtenir des copolymères amphiphiles capables de s'auto-assembler pour former des micelles en milieu aqueux. Pour ce faire, les carraghénanes ont tout d'abord été hydrolysés à l'aide d'une enzyme spécifique naturellement sécrétée par une bactérie marine en présence de carraghénophytes. Sur les oligocarraghénanes obtenus après hydrolyse, des chaînes de polycaprolactone (PCL), ont ensuite été greffées au niveau des fonctions hydroxyles (OH). Le polycaprolactone est un polyester biodégradable et biocompatible déjà largement utilisé dans la synthèse de vecteurs de médicament (Dash et Konkimalla 2012). Cette réaction de greffage a été réalisée en plusieurs étapes qui sont : (i) l'acétylation partielle des fonctions -OH libres ; (ii) la polymérisation du caprolactone sur les groupements -OH non protégés et (iii) la déprotection des fonctions -OH acétylées. Les copolymères amphiphiles obtenus sont constitués d'oligocarraghénanes hydrophiles et de chaînes de polyester hydrophobes. La capacité des copolymères obtenus à former des micelles a ensuite été évaluée par diffusion dynamique de la lumière (DLS) permettant de détecter et d'estimer la taille des particules en solution. La formation des micelles a également été vérifiée par microscopie électronique à transmission (TEM).

La deuxième étape de travail était de réaliser l'encapsulation de médicaments hydrophobes et leur libération. L'incorporation de trois molécules hydrophobes (le rouge de Nil, la rifampicine et la curcumine) dans les micelles a été effectuée et leur libération dans le PBS a

été suivie au cours du temps à 37 °C (pH 7,4). La libération de ces composés s'étend sur une durée de 48 à 72 heures en condition *in vitro*.

L'effet des micelles sur la viabilité des cellules endothéliales humaines (Eahy926) a ensuite été déterminé. Ce modèle cellulaire a été choisi puisque l'une des perspectives de cette étude serait de pouvoir agir contre le développement de l'athérosclérose qui touche les cellules de l'endothélium vasculaire. Par la suite, l'incorporation des micelles contenant la curcumine ou le rouge de Nil dans ces cellules a été mise en évidence par microscopie à fluorescence et confirmée par microscopie confocale. Le dosage de facteurs inflammatoires (IL-6, MCP-1) dans le milieu cellulaire a permis de conclure sur la libération de la curcumine encapsulée dans les cellules.

Ces travaux sont décrits dans l'article suivant (en préparation) :

*« Design of carrageenan based nanomicelles for hydrophobic drug delivery applications, illustrated with Curcumin ».*



## Design of carrageenan based nanomicelles for hydrophobic drug delivery applications, illustrated with Curcumin

Latufa Youssouf <sup>a</sup>, Archana Bhaw-Luximon <sup>b</sup>, Aurélie Catan <sup>a</sup>, Nicolas Diotel <sup>a</sup>, Pierre Giraud <sup>a</sup>, Laura Lallemand <sup>c</sup>, Olivier Meilhac <sup>a</sup>, Christian Lefebvre D'Hellencourt <sup>a</sup>, Dhanjay Jhurry <sup>b</sup>, Joël Couprie <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> UMR DÉTROU, Inserm U1188 - Université de la Réunion, Diabète athÉrothrombose Thérapies Réunion Océan Indien CYROI, 2 rue Maxime Rivière, 97490 SAINTE CLOTILDE, La Réunion, France

<sup>b</sup> Centre for Biomedical and Biomaterials Research (CBBR), University of Mauritius, MSIRI Building, Réduit, Mauritius

<sup>c</sup> Plateforme de recherche CYROI, 2 rue Maxime Rivière, 97490 Sainte Clotilde, La Réunion, France

\* Corresponding author. Tel.: +262 262 93 33 65; Fax: +262 262 93 82 37; E-mail address: joel.couprie@univ-reunion.fr

### Abstract

Carrageenan are marine sulphated polysaccharides widely used in food, cosmetics and pharmaceuticals for their biocompatible and biodegradable properties. These biopolymers become increasingly investigated as drug delivery carriers such as carrageenan-based pellets, beads, hydrogels, microparticles or nanoparticles. In the present work, we have used  $\kappa$ -carrageenan as a starting material to produce oligocarrageenan on which we grafted polycaprolactone chains (named oligocarrageenan-graft-polycaprolactone). The resulting amphiphilic copolymer form spherical nanomicelles with a mean size of  $187 \pm 21$  nm. Hydrophobic drugs such as curcumin, rifampicin as well as the Nile red lipophilic stain were efficiently encapsulated into the micelles and released within 24 to 72 hours in solution. The effect of micelle encapsulated curcumin was investigated on endothelial EA-hy926 cells by means of MTT assay and fluorescence microscopy. The micelles appear to be non-cytotoxic and they facilitate the uptake of curcumin by cells. They also increase the anti-inflammatory effect of curcumin as evidenced by the decreased secreted levels of inflammatory factors IL-6 and MCP-1 in TNF induced inflammation experiments. Taken together our results suggest that oligocarrageenan-graft-polycaprolactone could be an interesting way to vectorise hydrophobic drugs.

**Keywords:** Carrageenan, Poly- $\epsilon$ -caprolactone, Curcumin, Nanomicelles, Drug delivery, endothelial cell

### Introduction

Marine biomolecules such as polyphenols, vitamins, peptides and polysaccharides have useful applicability in biomedicine because they are non-cytotoxic, biodegradable and biocompatible. Marine polysaccharides represent one of the most abundant biomolecules found in the seas and as such, they

are highly available at relatively low cost. These biopolymers are mainly found in the cell wall of macroalgae, where they can represent up to 50% of the dry weight. Although, marine polysaccharides are mostly used in food and cosmetics industry, they become also largely present in pharmaceutical sciences, with an increasing interest in their use as materials for the incorporation of bioactive agents (Cardoso et al., 2016). Among them, sulphated polysaccharides represent a group of major interest for their bioactivities such as antioxidant (Barahona et al., 2011), anticoagulant (Ciancia et al., 2010) anticancer (Sithranga Boopathy et Kathiresan, 2010) antiviral (Bouhlal et al., 2011), anti-allergic (Vo et al., 2012) and anti-inflammatory properties (Cumashi et al., 2007). This group include carrageenan in red algae, ulvan in green algae and fucoidan in brown algae. Carrageenan is the most widely used of the three, mainly for its ability to form thermoreversible gels or highly viscous solution. It is thus commonly used as gelifying, stabilizing or emulsifying agent. The backbone structure of this polysaccharide consists of linear chains of repeating galactose units in D configuration and 3,6-anhydro-galactose copolymer, joined by alternating  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) and  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) linkages. Depending on their degree of sulfation, the position of the sulfate groups and the presence of 3-6-anhydro bridges, carrageenans are classified into different groups, the three main being kappa ( $\kappa$ ), iota ( $\iota$ ) and lambda ( $\lambda$ ) carrageenans (supplementary figure 1a). The use of carrageenan as drug delivery carriers such as carrageenan-based pellets, beads, nanoparticles, microparticles, hydrogels, film and matrices has already been investigated (Cunha and Grenha, 2016). A major advantage of polysaccharides including carrageenan is the presence of hydroxyl groups (OH) on their structure that can be chemically modified to modulate their properties or to target specific cells.

Curcumin (diferuloylmethane) is the main curcuminoid present in turmeric (Supplementary figure 1b). This molecule possesses significant anti-inflammatory, anti-oxidant, anti-carcinogenic, anti-mutagenic, anticoagulant and anti-infective effects (Mahmood et al., 2015). Curcumin also exerts a protective effect against cardiovascular diseases, including atherosclerosis, mainly through diverse mechanisms such as oxidative stress, inflammation and cell death (He et al, 2015). However, due to its hydrophobic nature, its rapid metabolism and its physicochemical and biological instability, curcumin has a poor bioavailability. To circumvent these problems, several approaches have been proposed like encapsulation of curcumin in liposomes and polymeric micelles, inclusion complex formation with cyclodextrin or formation of polymer–curcumin conjugates (Mahmood et al., 2015).

In this article, we have used  $\kappa$ -carrageenans extracted and purified from the red seaweed *Kappaphycus Alvarezii* as a starting material to form nanomicelles and encapsulate curcumin.  $\kappa$ -Carrageenans were first hydrolysed into oligocarragenans with  $\kappa$ -carrageenase isolated from the bacteria *Pseudoaltermonas carrageenovora*. Then, polycaprolactone (PCL) was grafted on these oligosaccharides to form amphiphilic copolymers (oligocarrageenan-graft-PCL). The capacity of these

copolymers to form micelles, to encapsulate and to release lipophilic molecules (namely curcumin, rifampicin and Nile red) was studied using Dynamic Light Scattering (DLS), Transmission Electron Microscopy (TEM), fluorescence and absorbance measurements. In addition, to evaluate the potential beneficial influence of curcumin encapsulated into oligocarrageenan-graft-PCL against atherosclerosis, which affects vascular endothelium cells, their effect was evaluated on endothelial EA-hy926 cells. The cytotoxicity of curcumin encapsulated into micelles was studied using MTT assay and its incorporation into cells was visualized by fluorescence and confocal laser scanning microscopy. Finally, the anti-inflammatory effect of curcumin encapsulated micelles was evaluated by measuring the secreted levels of inflammatory factors IL-6 and MCP-1 in TNF induced inflammation experiments.

## **Materials and Methods**

### ***Cell line***

EA-hy926, human endothelial cells were cultured in DMEM medium (HF scientific technologies, Réunion) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere.

### ***NMR analysis***

All NMR analyses were performed on a 600 MHz Avance III Bruker NMR spectrometer equipped with a <sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F, <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N cryoprobe. 1D <sup>1</sup>H, 1D <sup>13</sup>C, 2D COSY and 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC spectra were recorded in 100% D<sub>2</sub>O or CDCl<sub>3</sub> (Eurisotop, France) at room temperature and tetramethylsilane (TMS, Sigma-Aldrich, Germany) was used as reference. <sup>1</sup>H NMR spectra were recorded with 128 scans using a sweep width of 10 ppm. 2D spectra were obtained with 32 scans and a sweep width of 10 ppm for <sup>1</sup>H and 120 ppm for <sup>13</sup>C. In all spectra, the carrier was placed at 4.7 ppm for <sup>1</sup>H and 50 ppm for <sup>13</sup>C.

### ***Size exclusion chromatography***

Size Exclusion Chromatography (SEC) was performed on a 1260 Infinity GPC/SEC System (Agilent Technologies) with a PSS Suprema column. The sample was filtrated with a 0.22 µm Millipore filter and 400 µl of the solution (1 mg/ml) was injected on to the column. Elution was carried out at a flow rate of 1ml/min with a 0.5 g/l NaNO<sub>3</sub> solution. A calibration curve was obtained using a mixture of dextran with various molar weights (180 Da, 4400 Da, 21400 Da and 277 000 Da).

### ***Carrageenan sample preparation***

carrageenans were extracted from the cultivated red algae *Kappaphycus Alvarezii* received from Ibis Algoculture (Madagascar) as described previously (Youssof et al., submitted). Briefly, algae were first pre-treated with an hydro-alcoholic solution (80% ethanol), and carrageenans were then hot extracted in water (90°C, pH 7) with the assistance of ultrasounds (150W, 15min). Afterwards, a hot filtration was performed to remove algae residues. Carrageenans were then jellified by lowering the temperature to 4°C, isolated by filtration, frozen and lyophilized. The resulting carrageenans are composed of  $\kappa$ -carrageenan (68%) and  $\iota$ -carrageenan (32%) as evidenced by NMR (Youssof et al., submitted).

### ***Production and isolation of kappa-carrageenase from P. carrageenovora***

#### *Production of $\kappa$ -carrageenase for $\kappa$ -carrageenan degradation*

$\kappa$ -carrageenase was expressed and isolated from *Pseudoaltermonas carrageenovora* (DSMZ, Germany) after stimulation with a  $\kappa$ -carrageenan solution. The protocol was adapted from the production of  $\lambda$ -carrageenan from the same bacterial strain (Guibet et al., 2007). Bacteria were grown in 1 liter of Marine Broth culture medium (HF scientific technologies, Réunion) in erlen flasks incubated at 21°C under shaking. After 3 to 4H of culture, when the OD<sub>600nm</sub> reached 0.6, the expression of  $\kappa$ -carrageenase was stimulated with a  $\kappa$ -carrageenan stock solution dissolved in Tris-HCl 100mM pH=8,5 at a 0.15 % final  $\kappa$ -carrageenan concentration (Mass/Volume of culture). After 24 h of culture, bacteria were eliminated by centrifugation (4000 rpm, 30 min, 4°C). The supernatant was filtered twice through a 0.45  $\mu$ m filter (Millipore) and a 300 kDa membrane (HF scientific technologies, Réunion), respectively. The enzyme was then concentrated using a 10 kDa centrifugal filter and a desalting was performed with a 3 KDa centrifugal filter (HF scientific technologies, Réunion). The protein content was determined using Bradford assay.

#### *Enzymatic degradation of $\kappa$ -carrageenan*

Enzymatic degradations were carried out to obtain oligocarrageenans using  $\kappa$ -carrageenase isolated from *Pseudoaltermonas carrageenovora*. 150 mg of carrageenans were dissolved in a tris-HCl solution (100 mM, pH 8.5) and incubated with  $\kappa$ -carrageenase (75,3  $\mu$ g in 1 ml). Different durations of degradation (2 h, 6 h and 24 h) were tested. An ultrafiltration using a 10kDa centricon device was then performed to eliminate the enzyme, non-hydrolysed  $\kappa$ -carrageenan and  $\iota$ -carrageenan. Oligocarrageenans were then isolated by precipitation with methanol and the product was freeze-dried and analysed by NMR and SEC.

### Reducing sugar measurement

The enzyme activity was evaluated by measuring the amount of reducing sugar according to the assay describe by Kidby and Davidson (1976). After hydrolysis, 100  $\mu\text{l}$  of substrate were mixed with 900  $\mu\text{l}$  of ferricyanide solution 1X (300 mg potassium hexacyanoferrate III, 28 g of  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 1mL NaOH 5M, QSP 1 L). The mixture was boiled during 10 min and the absorbance at 420 nm was measured at room temperature. The control was obtained in the same condition by using a boiled-inactivated enzyme. The method was calibrated using a glucose solution ranging from 0 to 300  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ .

### Synthesis of oligocarrageenan-graft-polycaprolactone

The synthesis of oligocarrageenan-graft-polycaprolactone involve three steps: (i) a partial acetylation of oligocarrageenan; (ii) polymerisation of caprolactone on the partially acetylated oligocarrageenan; (iii) deprotection of the hydroxyl groups. The protocol was adapted from a previous work in which polycaprolactone was grafted on oligoagarose (Bhaw-Luximon et al., 2009)

### Partially acetylation of oligocarrageenan

To realise a partial acetylation on oligocarrageenan, 4 ml of pyridine and 644  $\mu\text{l}$  of acetic anhydride were added on 500 mg of oligo-kappa-carrageenan. The mixture was placed at room temperature under stirring during 3 hours. The reaction was stopped by adding ice to the mixture to hydrolyse unreacted acetic anhydride and partially acetylated-oligocarrageenan were isolated by precipitation using cold methanol. The precipitate was then frozen, lyophilized and a characterization by NMR was performed.

### Polymerisation of caprolactone

To obtain hydrophobic chains of the copolymer, 200 mg of acetylated-oligocarrageenan were dissolved in 2 ml of toluene and 20  $\mu\text{l}$  of the catalyst tin (II) ethylhexanoate was added. After 2 hours of stirring at 40  $^{\circ}\text{C}$  under nitrogen atmosphere, 330 mg of  $\epsilon$ -caprolactone was used to build the hydrophobic chain of the copolymer by polymerization during 20 h at 110  $^{\circ}\text{C}$ . The resulting totally hydrophobic product called Acetylated-oligocarrageenan-graft-PCL was dissolved in chloroform. Then, cold methanol was used to obtain a precipitate. After freezing and lyophilization, the product was characterized by NMR.

### Deprotection of hydroxyl groups from acetylated-oligocarrageenan-graft-PCL

To remove acetyl groups from acetylated-oligocarrageenan-graft-PCL, copolymers were diluted in a solution of THF/methanol (v/v=1/1). A sodium methoxide ( $\text{NaOCH}_3$ ) solution was added drop by drop

up to pH 8 and the mixture was kept under stirring at room temperature. After 4 hours, the pH was neutralized with HCl 0.5M and solvents were evaporated under vacuum. This reaction permits to obtain the amphiphilic copolymer named oligocarrageenan-graft-PCL. The product was analyzed by NMR.

#### ***Acetone volatilization method for curcumin, rifampicin and Nile Red encapsulation in micelles***

curcumin, rifampicin and Nile Red were purchased from Sigma (Sigma-Aldrich, France). Encapsulation of these hydrophobic molecules was performed using the acetone volatilization method. 500 mg of oligo-carrageenan-graft PCL and 50 mg of drug were dissolved in 10 ml of acetone. Deionized water was added slowly drop by drop (250 ml) and the mixture was kept under stirring at room temperature overnight to maximise the encapsulation and allow the precipitation of free drug. Acetone was then evaporated at 30 °C and precipitate of free drug was eliminated through a 0.22 µm filter (stericup GP Millipore). A dialysis was performed using a membrane with a MWCO of 2000Da (Cellu-Sep H1; Orange Scientifics, Belgium) to remove residue of soluble free hydrophobic molecule. Nanomicelles loaded with either curcumin, rifampicin or Nile Red were then frozen and lyophilized. The amount of encapsulated curcumin was determined by fluorescence measurements (excitation wavelength = 550nm – emission wavelength = 630nm) for Nile Red, or by absorbance (at 420nm for curcumin and 475nm for rifampicin).

#### ***Morphology, particle size***

The Particle size and distribution of micelles were recorded on a Dynamic Light Scattering (DLS) particle size analyzer (90 Plus Particle Size Analyzer, Dynamic Light Scattering (Brookhaven Instruments Corporation)). The analyses were conducted in aqueous solution after filtration through a 0.45-µm pore size PTFE syringe filter to remove free drug/small polymer aggregates. Each analysis was performed at 25°C in triplicate with an angle detection of 90°. The CMC was determined by DLS analysis of oligocarrageenan-graft-PCL dissolved in H<sub>2</sub>O at concentrations ranging from 0.2 to 2 mg.mL<sup>-1</sup>. To obtain the CMC, the logarithm of intensity of the scattered light was plotted as a function of oligocarrageenan-graft-PCL concentration. The resulting curve can be fitted as two straight lines whose intercept correspond to the CMC (Topel et al., 2013 – Supplementary figure 3). The morphology of NPs was also examined using a transmission electron microscopy (TEM). After dilution with distilled water, the samples were negatively stained for observation.

### ***In vitro release of encapsulated drug***

10 mg of drug-loaded micelles were dissolved in 5 ml of PBS and subjected to dialysis at 37°C using a Cellu-Sep H1 dialysis membrane (MWCO = 2000 Da) immersed in 100 ml of PBS. The amount of released drug in the external medium was measured either by fluorescence (excitation wavelength = 550 nm ; emission wavelength = 630 nm) for Nile Red, or by absorbance (at 420 nm for curcumin and 475 nm for rifampicin) during several days.

### ***Cellular cytotoxicity study of oligocarrageenan-graft-PCL micelles***

Cellular cytotoxicity of curcumin-loaded and empty micelles was evaluated by MTT assay (Sigma-Aldrich) with EA-hy96 endothelial cells. Cells were seeded in 96-well plates in 200 µL of DMEM medium to obtain a concentration of 50 000 cells per well, and incubated at 37 °C for 24. The medium in each well was then removed and replaced with 200 µL of fresh medium containing either a blank vehicle, curcumin-loaded micelles or free curcumin. Free curcumin was dissolved in DMSO, empty micelles and curcumin-loaded micelles were diluted in culture medium at concentrations ranging from 0.1 µg/ml to 1000 µg/ml. After 48h, the supernatant was removed and a MTT solution (100 µl, 0.5 mg/ml) was added to each well and the cells were incubated during 4 hours at 37 °C. The supernatant was then eliminated and 100 ml of DMSO was added to each well to dissolve the formazan crystals. The absorbance at 570 nm was measured with a microplate reader (Tecan, Infinite M200Pro). Cell viability (%) correspond to  $(\text{Optical density of test group} / \text{Optical density of control group}) \times 100$ .

### ***Cellular uptake of micelles imaging by Fluorescence microscopy and confocal laser scanning microscopy***

EA-hy926 cells were cultured in 12-well microplates containing cover slips with 2 mL of DMEM media (10% fetal bovine serum) to about 70% confluency. After 24h, the culture media were replaced with fresh media containing curcumin or curcumin-loaded micelles and incubated at 37°C for 4 h, 6 h, 8 h, 16 h and 24 h. After incubation, the culture media were removed and the cells were washed three times with PBS to remove micelles or free curcumin that were not incorporated in the cells. EA-hy926 cells were then fixed using PFA (4%, 10 min), treated with DAPI (200 ng/ml, 20 min) and visualized using an Eclipse 80i fluorescence microscope (Nikon, France) equipped with a Hamamatsu ORCA-ER digital camera (Life Sciences, Japan). To confirm the incorporation of micelles inside cells, confocal laser scanning microscopy using a Nikon D Eclipse C1 (Nikon, France) was then employed.

### ***Effect of oligocarrageenan-g-PCL loaded with curcumin on inflammation***

To confirm the capacity of micelles to release curcumin inside cells, the protective effect of curcumin on EA-hy926 cells was evaluated. Cells were seeded in 6-well microplates containing 2 ml of culture medium and cultured to about confluency (24 h). The medium was then replaced with solutions of either empty micelles, curcumin-loaded micelles or free curcumin. Two concentrations of curcumin were evaluated, 5  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  and 15  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . After 24 h, the medium was removed and cells were stimulated with TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor-alpha) overnight, diluted in culture medium (200  $\mu\text{l}$ , 10 ng/ml). The supernatants were then subjected to ELISA assay (e.Biosciences, France) to measure the secretion of inflammatory factors (IL-6 and MCP-1). ELISA was performed according to the manufacturer instructions.

## **Results and Discussion**

### **1. Synthesis of oligocarrageenan-graft-polycaprolactone**

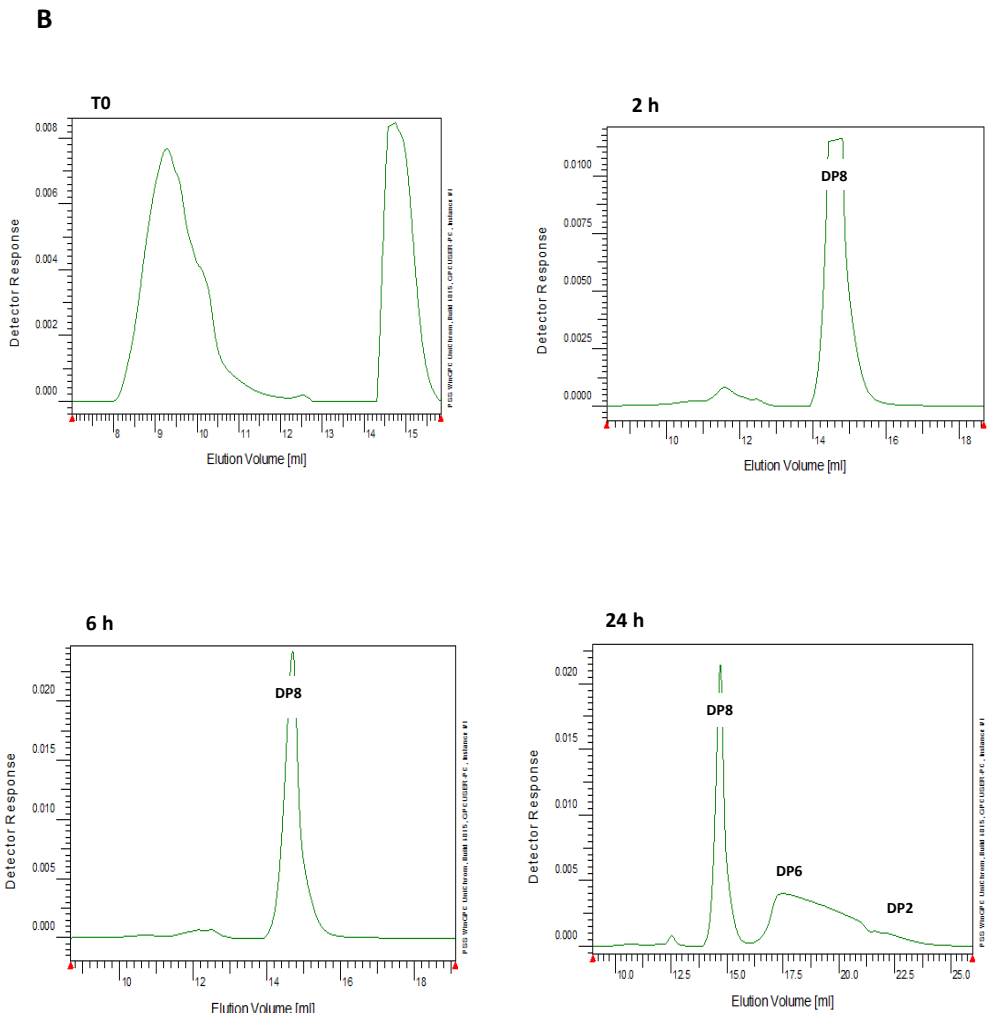
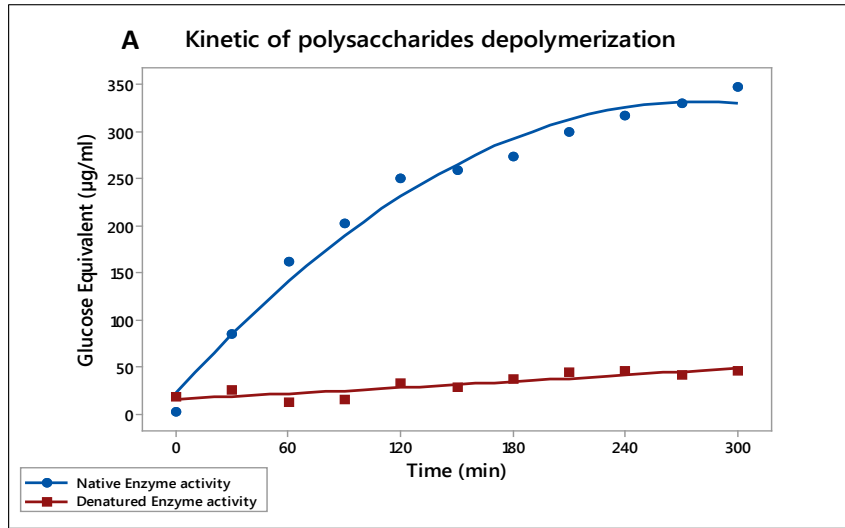
Carrageenan and poly- $\epsilon$ -caprolactone are both biocompatible and biodegradable molecules that are suitable to design copolymeric nanoparticles for drug delivery applications (Cunha and Grenha, 2016; Dash and Konkimalla, 2016). The synthesis of copolymers able to form micelles was performed using a method described by Bhaw-Luximon et al. (2009) to obtain oligoagarose-graft-polycaprolactone starting from oligoagarose. First carrageenan was degraded into oligocarrageenans using a  $\kappa$ -carrageenase enzyme isolated from *Pseudoaltermonas carrageenovora*. Then a partial acetylation on oligocarrageenan was realized. A polymerization of  $\epsilon$ -caprolactone on free hydroxyl groups allowed the addition of hydrophobic chains on the oligocarrageenans. Finally, acetyl groups were removed to recover hydrophilic oligocarrageenan chains grafted with polycaprolactone. The resulting amphiphilic copolymer was expected to be able to assemble itself in micelles in aqueous solution.

#### **1.1 Hydrolysis of $\kappa$ -carrageenan**

$\kappa$ -carrageenase (EC3.2.1.83) is a member of the GH16 (glycoside hydrolase 16 family). This enzyme hydrolyses  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) linkage with retention of the anomeric configuration (Potin et al., 1995). It can be isolated from the cell free culture medium of the bacteria *Pseudoaltermonas carrageenovora* (McLean and Williamson, 1979).  $\kappa$ -carrageenase was produced from a carrageenan stimulated culture of *Pseudoaltermonas carrageenovora* and the enzyme was recovered from the bacterial culture medium. A reducing ends measurement was performed to check the activity of the enzyme. The results



presented in **Figure 1a** indicate that the amount of reducing sugar increased during the degradation of carrageenan with  $\kappa$ -carrageenase, while this amount remained weak on a control reaction performed with a boiled- inactivated enzyme. Degradation of carrageenan was further characterized using permeation gel chromatography as shown in **Figure 1b**. A calibration curve obtained using a mixture of dextran of different lengths allowed the determination of molar masses of the hydrolysate. After 2 hour of hydrolysis, a majority of carrageenans were converted into octamers (DP8). At 24 hours of degradation, hexamers (DP6) and dimers (corresponding to neo- $\kappa$ -carrabiose) could be identified. A previous study on oligoagarose-graft-polycaprolactone copolymers showed that oligosaccharide chains between 8 and 15 repeated unit were best suited for functionalization to form micelles (Bhaw-Luximon et. al 2009, Bhaw-Luximon et al. 2011). Thus, to obtain a good yield of oligocarrageenan in the DP8 form, hydrolysis of carrageenan was performed during 6 hours and oligocarrageenan where then separated from the enzyme and unreacted carrageenan by ultrafiltration.



**Figure 1:** Hydrolysis of  $\kappa$ -carrageenan using  $\kappa$ -carrageenases isolated from *Pseudoaltermonas carrageenovora*. Degradation was analysed by quantification of reducing ends of carrageenan (A). Size exclusion chromatography allowed to determine carrageenan chain length after hydrolysis (B). DP correspond to the degree of polymerisation (or number of repeat unit).

## 1.2 Partially acetylation of oligocarrageenan

Our objective was to synthesize amphiphilic copolymers consisting of hydrophilic hydroxyl-free oligocarrageenan and hydrophobic grafted polycaprolactone chains (see supplementary Figure 2). Therefore, it was necessary to protect a fraction of free hydroxyl groups before the polymerization with caprolactone to prevent a high degree of grafting of polycaprolactone on free hydroxyl groups in the next step. This protection was achieved by a partial acetylation of free hydroxyl groups with acetic anhydride in the presence of pyridine at room temperature. The reaction efficiency was confirmed on the  $^1\text{H}$  NMR spectrum which reveal a peak corresponding to the acetyl function at 2,13 ppm (**figure 3A**). The acetylation yield was expected to fall in the range 30-70 % to obtain a good stability between the hydrophilic oligocarrageenan chain and the hydrophobic core added in the next stage (Bhaw-luximon et al.2009).  $^1\text{H}$  NMR spectra allowed an estimation of the oligocarrageen acetylation yield of 60 % (which correspond to the number of acetyl function compared to the initial amount of hydroxyl groups) using the integration values of protons at 5.04 ppm and 4.6 ppm (corresponding to anomeric H in oligocarrageenan) and at 2.13 ppm (acetyl groups).

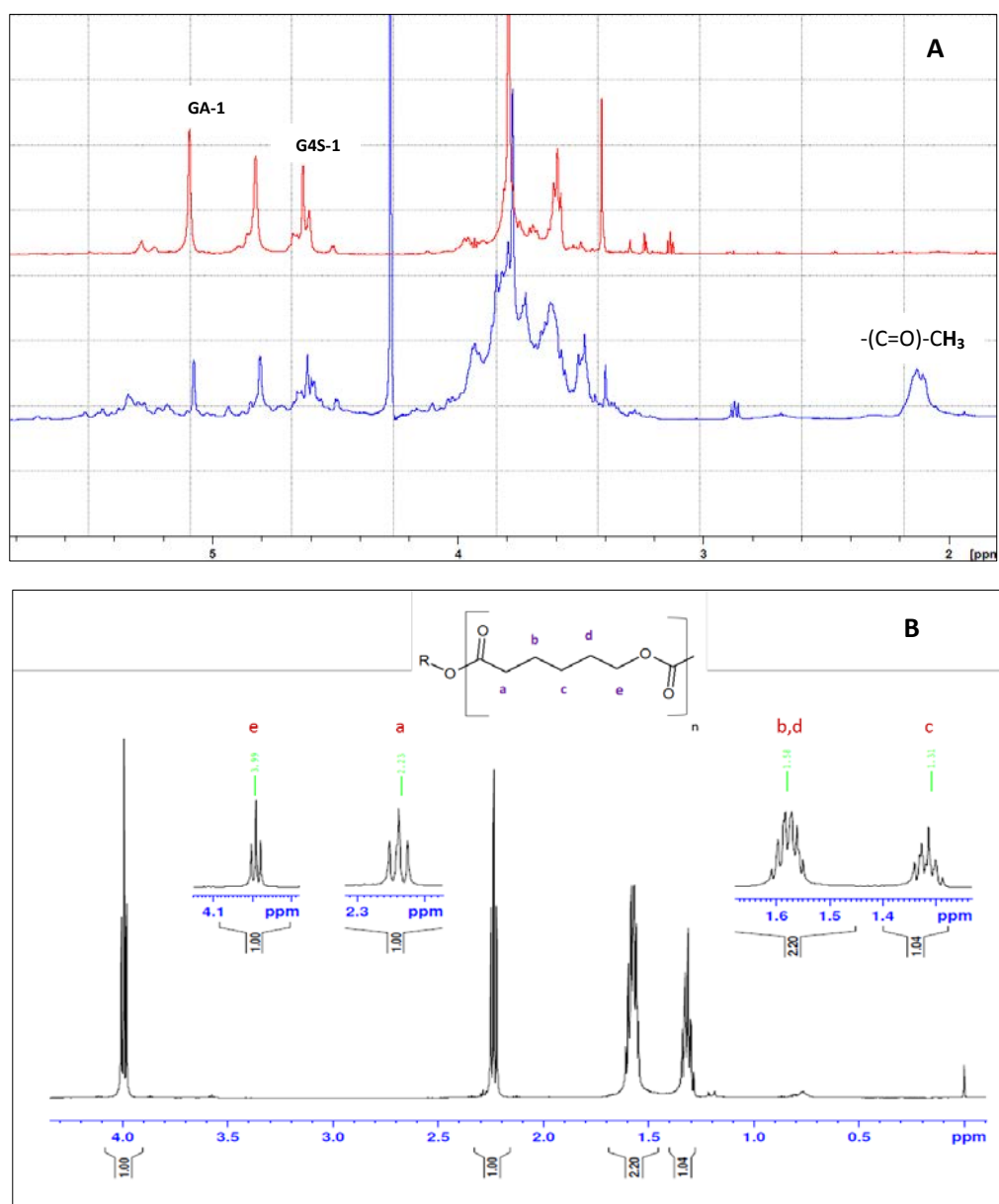
## 1.3 Polymerization of caprolactone

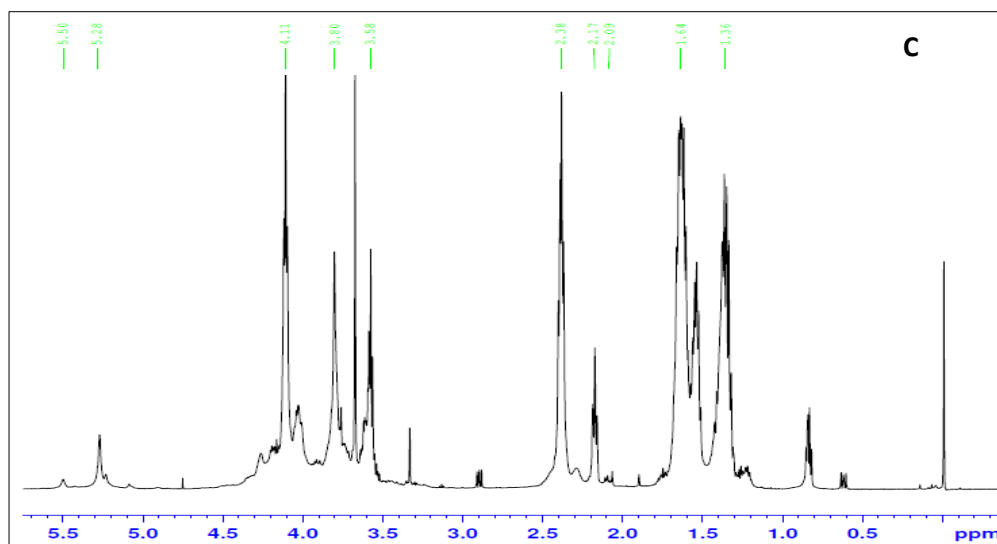
The polymerization of caprolactone on free hydroxyl group was performed to obtain the hydrophobic core of the micelles. This was achieved in the presence of an initiator system consisting of an alcohol and tin(II) octanoate (Bhaw-luximon et al.2009). Several length of polycaprolactone chain were tested and finally copolymers with 10 caprolactone unit showed the best stability and were selected for this study.  $^1\text{H}$  NMR spectra of the resulting products showed 4 peaks which correspond to the 4 groups of protons present on caprolactone as described in **figure 3B**. Assignments of the polycaprolactone moiety were completed using information from 1D  $^{13}\text{C}$ , 2D COSY and  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC spectra (Supplementary figure 4). The peaks at 3,99 and 2,23 ppm were assigned to  $-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-O-C=O}$  protons and  $-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-C=O}$  protons respectively.  $-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2$  proton groups were detected at 1,58 and  $\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_2$  protons at 1,31 ppm. This results indicate that the polymerization of caprolactone was successfully realised.

## 1.4 Deprotection of hydroxyl groups

Deprotection of hydroxyl groups was the last stage to obtain the amphiphilic copolymers consisting of hydrophilic oligocarrageenan chain grafted with polycaprolactone chains for the formation of micelles. Acetyl groups were removed by hydrolysis under mild conditions to remove acetyl groups without cleavage of the grafted PCL chains. The  $^1\text{H}$  NMR spectrum (**figure 3C**) of this oligocarrageen-graft-PCL showed polycaprolactone signals between 1.3 and 4 ppm and oligocarrageenan signals from 3 to 5,5

ppm. The peak corresponding to acetyl proton at 2,09 ppm was not detected after this last step indicating that complete deprotection of hydroxyl groups was achieved.



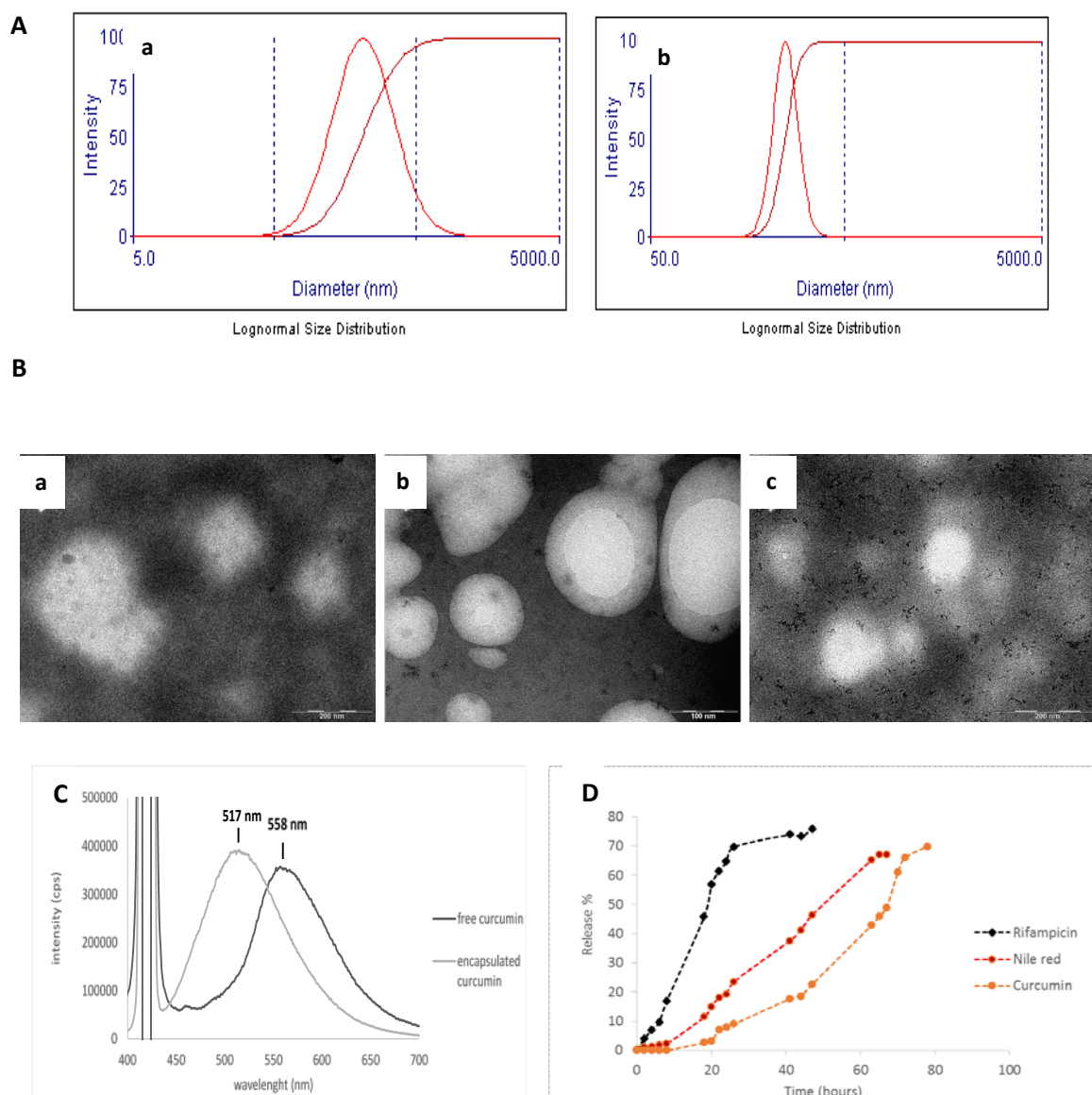


**Figure 3:** (A)  $^1\text{H}$  NMR spectra of oligo-carrageenan (a) and acetylated-oligocarrageen (b) obtained in  $\text{D}_2\text{O}$ . Acetyl-group protons were detected at 2.13 ppm. GA-1 and G4S correspond to anomeric protons of the repeat unit of  $\kappa$ -carrageenan. (B)  $^1\text{H}$  NMR spectrum of acetylated-oligocarrageen-graft-PCL obtained in  $\text{CDCl}_3$ . a, b, c, d and e correspond to caprolactone protons. R represent the partially acetylated-oligocarrageen chain. (C)  $^1\text{H}$  NMR spectrum of oligocarrageen-graft-PCL obtained in  $\text{D}_2\text{O}$ . Signals corresponding to oligocarrageenan (between 3ppm and 5.5ppm) and caprolactone (between 1.3 ppm and 4 ppm) are both observed.

## 2. Formation and characterization of micelles

Carrageenan-graft-PCL copolymers were studied by dynamic light scattering (DLS). The amphiphilic copolymer self-assemble in micelles in aqueous solvent and showed a mean particle size of  $187 \pm 21$  nm (**figure 4A.a**). The CMC (Critical Micelle Concentration) estimated by DLS was 0.8 mg/mL (see supplementary figure 3). Encapsulation of lipophilic molecules namely curcumin, rifampicin and Nile Red was performed using the acetone volatilisation method. The loading capacity was estimated at 16 % and correspond to the mass of encapsulated drug compared to the amount of copolymer. After encapsulation of a hydrophobic molecule, a thin decrease of particle size could be noted (**figure 4A.b**). This could be explained by a high affinity between the micelle and the hydrophobic molecule. The spherical nature of empty, Nile red-loaded and curcumin loaded micelles was confirmed by transmission electron microscopy (**figure 4B**). Spherical particles were observed in all cases although the diameter of the micelles appear generally smaller than the value determined by DLS, probably because of the dry state of samples in TEM measurements. Fluorescence analysis of curcumin either free in solution or encapsulated into Carrageenan-graft-PCL micelles showed a maximum emission at 558 nm for free curcumin and 517 nm for curcumin-loaded micelles (**figure 4C**), which reflects the different environment of curcumin in the micelles compared to free curcumin. The fluorescence or absorbance properties of encapsulated lipophilic molecule were used to follow the kinetics of their release from the micelles in aqueous buffer (**figure 4D**). Curcumin and Nile red were progressively

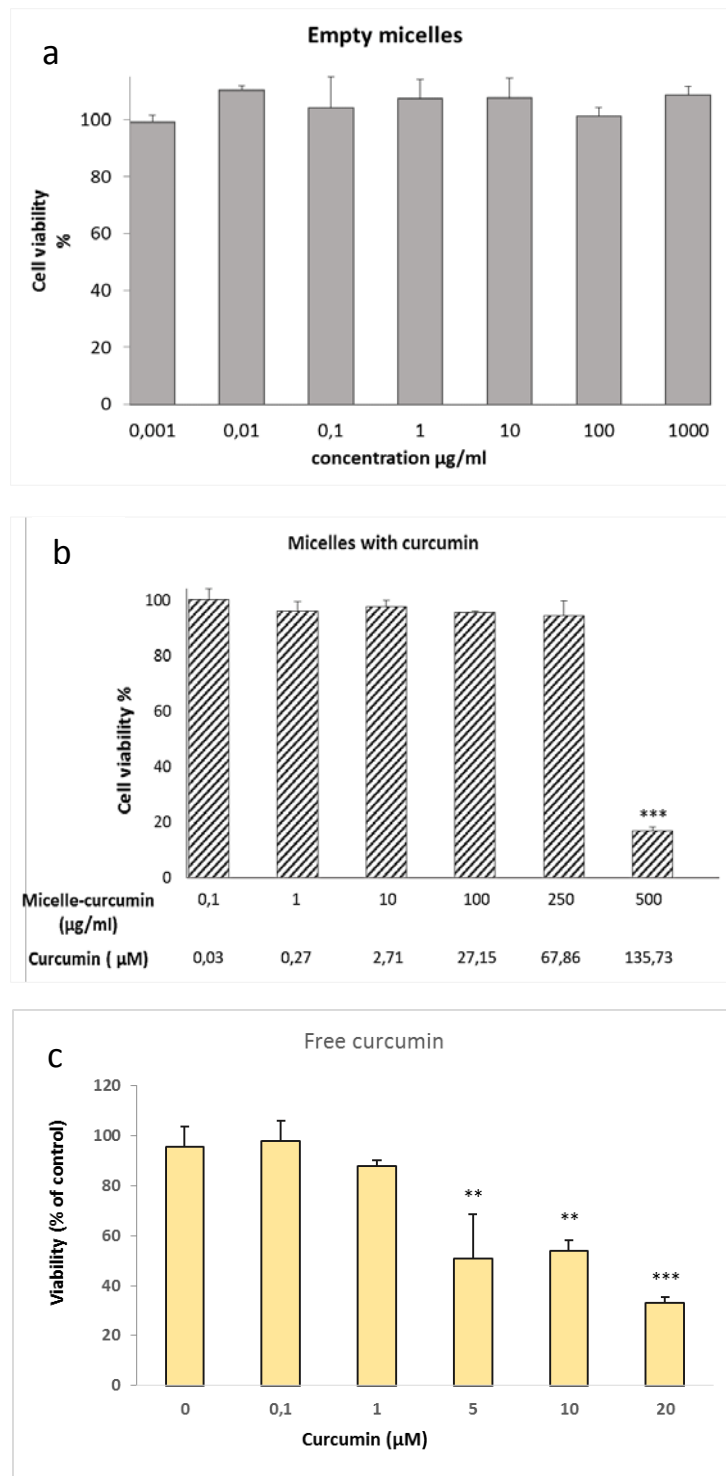
liberated from the micelles during about 72H and 60H hours, respectively. Rifampicin was released faster from the micelles; the majority of this antibiotic being released in solution within 24H. The time of release could depend on the affinity between the micelle core and the encapsulated molecule. It can be noted that rifampicin, the biggest, and the most hydrophobic molecule (MW: 822,953 g/mol ; logP: 4; PUBCHEM data base), is released faster than curcumin and Nile red.



**Figure 4: Characterization of Carrageenan-graft-PCL:** (A) Size distribution of empty micelles (a) and curcumin-loaded micelles (b) by Dynamic Light Scattering (DLS); (B) TEM images of empty micelles (a) Nile red loaded micelles (b) and curcumin-loaded micelles registered at a concentration of 0.5 or 1 mg.mL<sup>-1</sup>; (C) Characterization of free curcumin and encapsulated curcumin by fluorescence. Excitation was performed at 420 nm, and the maximum emission wavelength of free curcumin and curcumin-loaded micelle was detected at 558 nm and 517 nm respectively. (D) kinetics of release of curcumin, Nile red and rifampicin from Carrageenan-graft-PCL micelles. The concentrations of lipophilic molecule released in the medium during time was measured either by fluorescence (excitation wavelength = 550nm – emission wavelength = 630nm) for Nile Red, or by absorbance (at 420nm for curcumin and 475nm for rifampicin).

### 3. Cytotoxicity of oligocarrageenan-graft-PCL particles

To determine the relative toxicity of oligocarrageenan-graft-PCL particles to endothelial cells, the MTT assay has been used. Even if the MTT is not a direct viability measurement, the quantification of the mitochondrial activity is, in most of the case, proportional to the number of cells and thus give an indirect idea of the toxicity. The empty micelles did not affect the viability as determined by the MTT assay in concentrations up to 1000  $\mu\text{g/ml}$  (**Fig 5a**). When the micelles were loaded with curcumin, the viability was not affected to a concentration up to 250  $\mu\text{g/ml}$ , however a significant decrease in viable cells was observed at a concentration of 500  $\mu\text{g/ml}$  (**Fig 5b**). This probably reflects a cytotoxic effect of curcumin, which is known to be cytotoxic to a large variety of cell lines (Kuttan et al., 2007). Indeed, this effect was observed on endothelial cells incubated with free curcumin at concentration above 5  $\mu\text{M}$  (**Fig 5c**). A similar effect was also noticed on another study of the effect of curcumin on EAhy926 endothelial cells, although toxicity was observed only at curcumin concentrations above 10  $\mu\text{M}$  (Kam et al., 2015). Interestingly, the vectorization of curcumin with oligocarrageenan-graft-PCL particles seemed to decrease the cytotoxicity of curcumin. A progressive release of encapsulated curcumin may be involved in this lower cytotoxicity. Further investigations are needed to determine the mechanism.

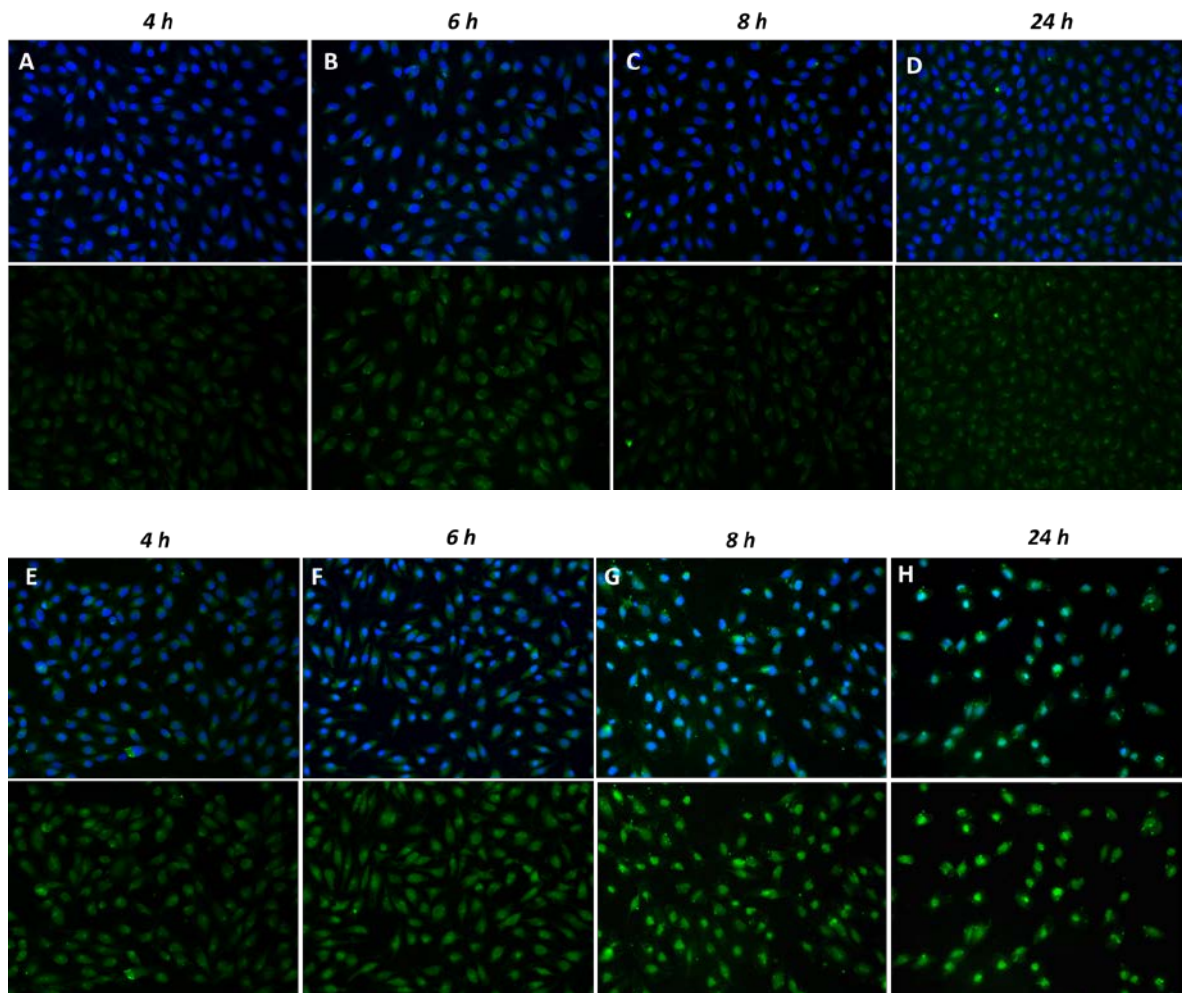


**Figure 5:** EA.hy926 cell viability measurement using MTT assay after treatment with empty micelles (a), or curcumin-loaded micelles (b) or curcumin (c) during 48 h. , \*\*\*( $p < 0.01$ ) significant difference compared with the control without treatment.



#### 4. Cellular uptake of curcumin by EA.hy926 cells

To investigate the capacity of carrageenan-graft-PCL micelles to facilitate the uptake of curcumin, EA-hy926 cells were treated with curcumin or curcumin-loaded micelles during periods ranging from 4h to 24 h and the incorporation of curcumin in cells was visualized using fluorescence microscopy. Curcumin by itself was not very efficient in getting in the cell as demonstrated by the curcumin fluorescence in cultured cells (Fig 6 a-d). When curcumin was vectorised with the micelles, the cellular fluorescence intensity associated to curcumin was increased starting 6 hours after contact and still elevated after 24 hours (Fig 6 e-h). The presence of curcumin inside cells has been confirmed by confocal laser microscopy (data not shown). According to these results the oligocarrageenan-graft-PCL micelles facilitate the incorporation of curcumin inside endothelial cells.

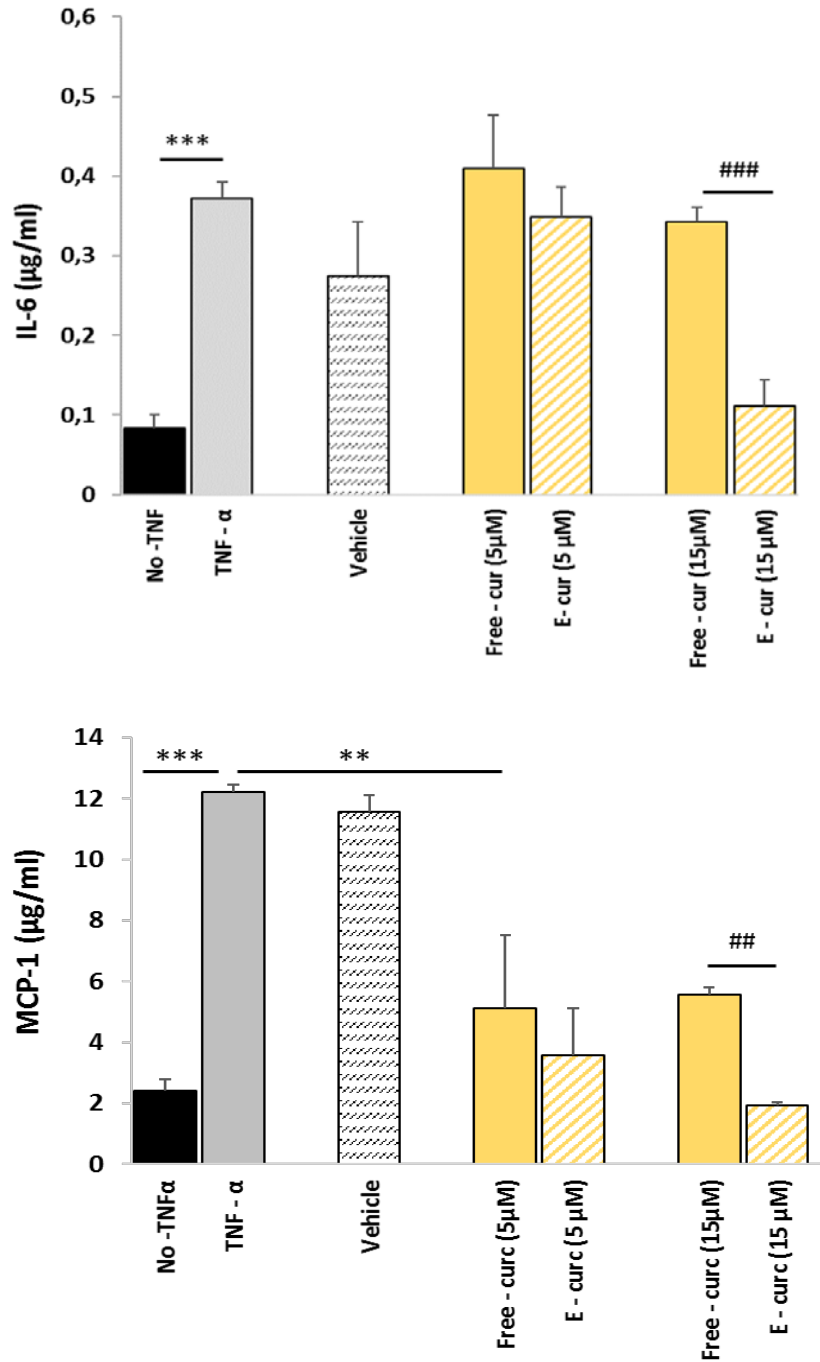


**Figure 6:** Cellular uptake in EA.h926 cells of free curcumin (A-D) and curcumin-loaded micelle (E-H). The incorporation was studied between 4 h and 24 h with free or encapsulated curcumin concentrated at 15  $\mu$ M. For each condition, the overlay of DAPI staining (blue, nuclear) with curcumin fluorescence was shown and below the curcumin fluorescence only. (Magnification X20)

## 5. Effect of oligocarrageenan-g-PCL loaded with curcumin on inflammation

To stimulate endothelial cells and mimicks inflammatory conditions, TNF was added to the cells. As previously described, TNF induce the secretion of inflammatory factors such as IL-6 and MCP-1 (Cella et al., 1997; Scarpini et al., 1999 - fig 7). In these conditions, the biological effects of curcumin and oligocarrageenan-g-PCL loaded with curcumin were investigated on endothelial cells in inflammatory condition. Free or encapsulated curcumin at 5  $\mu\text{M}$  did not modify the secretion of IL-6. At a higher dose of 15  $\mu\text{M}$  the encapsulated curcumin inhibited almost completely the TNF-induced IL-6 production, while the free curcumin did not induce any significant effect compared to the control (Vehicle plus TNF) (fig 7A). For the chemokine MCP-1, the dose of 5  $\mu\text{M}$  of free or encapsulated curcumin gave a similar inhibition. The 15  $\mu\text{M}$  dose induced a higher inhibition for the encapsulated curcumin with a level similar to the basal level (fig 7B). Similarly, to what has been observed about incorporation of curcumin inside endothelial cells, the inhibitory effect of curcumin on inflammatory stimulated cells is significantly enhanced when curcumin is encapsulated into oligocarrageenan-g-PCL micelles.

These results are in agreement with other studies using vectorised curcumin. For example, liposomes used to vectorise curcumin demonstrated a reduction of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  secretion by lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophages, compared to free curcumin (Basnet et al. (2012)). In another study realized in LPS-stimulated mice, curcumin-loaded exosomes showed better anti-inflammatory effect than free curcumin (Sun et al. 2010).



**Figure 7:** Protective effect of free curcumin (Free-curc) and encapsulated curcumin (E-curc) on production of IL-6 and MCP-1. Cells were treated during 24 h with free curcumin or encapsulated curcumin at 5 µM and 15 µM. Then production of inflammatory factors was stimulated using TNF-α. No-TNF-α group did not receive any treatment and TNF-α cell group were treated with TNF-α. Vehicle group correspond to cells treated with empty micelles before the stimulation with TNF-α. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 compared with TNF-α group. ##p < 0.01 compared to cells treated with Free-curcumin at 15 µM.

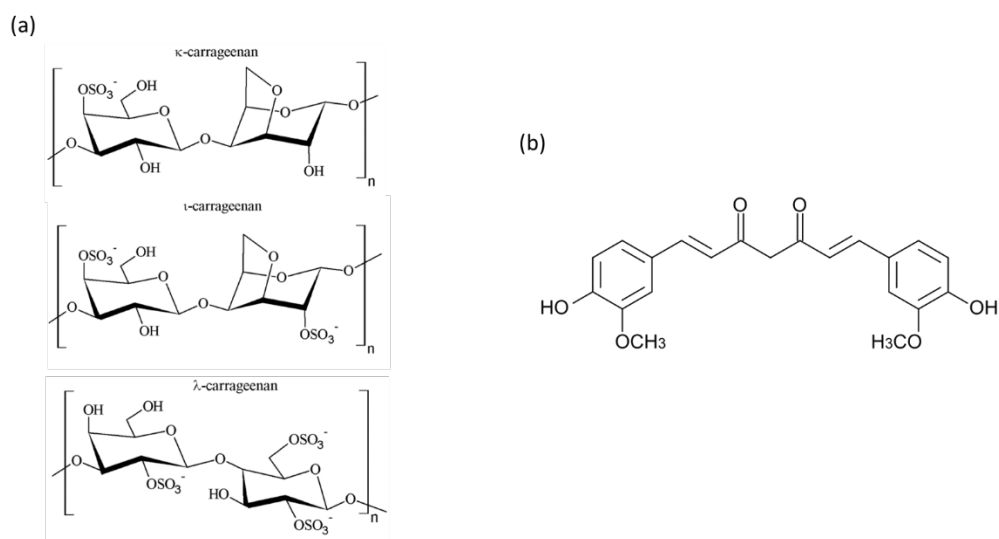
## Conclusion

Since the last decade, carrageenan has attracted major interest as drug delivery carriers for biopharmaceutical applications. In this paper, we have developed  $\kappa$ -carrageenan based nanomicelles to transport hydrophobic drugs.  $\kappa$ -carrageenan were first hydrolysed with  $\kappa$ -carrageenase isolated from *P. carrageenovora* into oligocarrageenans of defined length (DP=8). The biodegradable and biocompatible polycaprolactone polyester was then grafted on oligosaccharides in a three steps chemical synthesis, resulting in the formation of amphiphilic copolymers called oligocarrageenan-graft-polycaprolactone. These copolymers self-assemble into spherical nanomicelles of about 190 nm diameter in solution and they can efficiently encapsulate hydrophobic molecules such as the lipophilic stain Nile red or drugs (curcumin or rifampicin). These molecules are released from the micelles in about 24 to 72H *in vitro*.

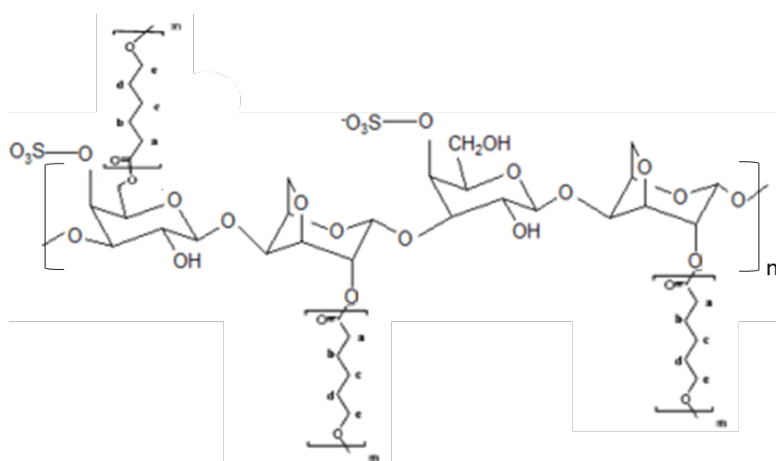
Curcumin is well known for its anti-inflammatory, anti-oxidant and anti-carcinogenic effects. This drug also exerts protective effects against cardiovascular diseases (He et al., 2015), including atherosclerosis which affect vascular endothelium cells. We thus characterized the effect of curcumin encapsulated in our micelles on endothelial EA.hy926 cells. The oligocarrageenan-graft-polycaprolactone micelles are not cytotoxic and they facilitate the delivery of curcumin inside endothelial cells as evidenced by fluorescence and confocal laser scanning microscopy. The nanomicelles also potentiate the anti-inflammatory activity of curcumin on TNF-induced inflammation experiments as evidenced by the decreased secreted levels of inflammatory factors IL-6 and MCP-1.

Although these results appear promising, further characterization of the oligocarrageenan-graft-polycaprolactone micelles will be necessary to evaluate their potential use as drug delivery carriers. In particular, *in vivo* experiments to study the biodistribution and the efficient release of drugs will be of interest to evaluate a potential targeting of the micelles. In addition, the presence of free hydroxyl groups on the oligocarrageenan-graft-polycaprolactone micelles offer the possibility to graft ligands that would target specific cells.

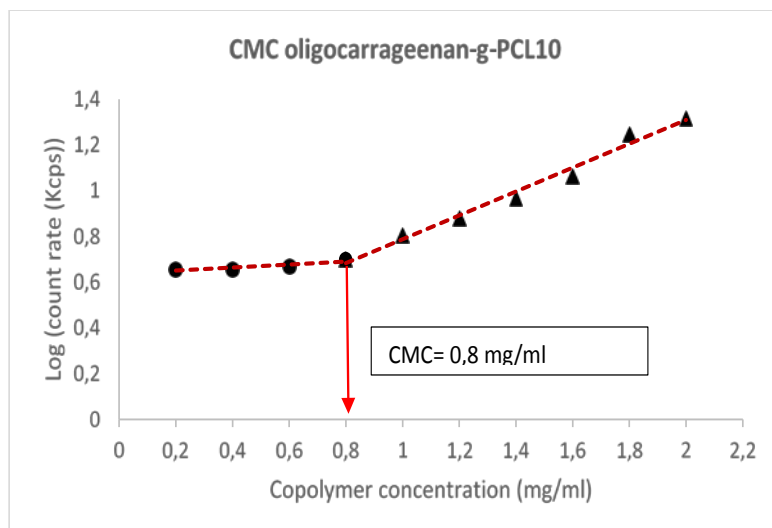
## Supplementary material



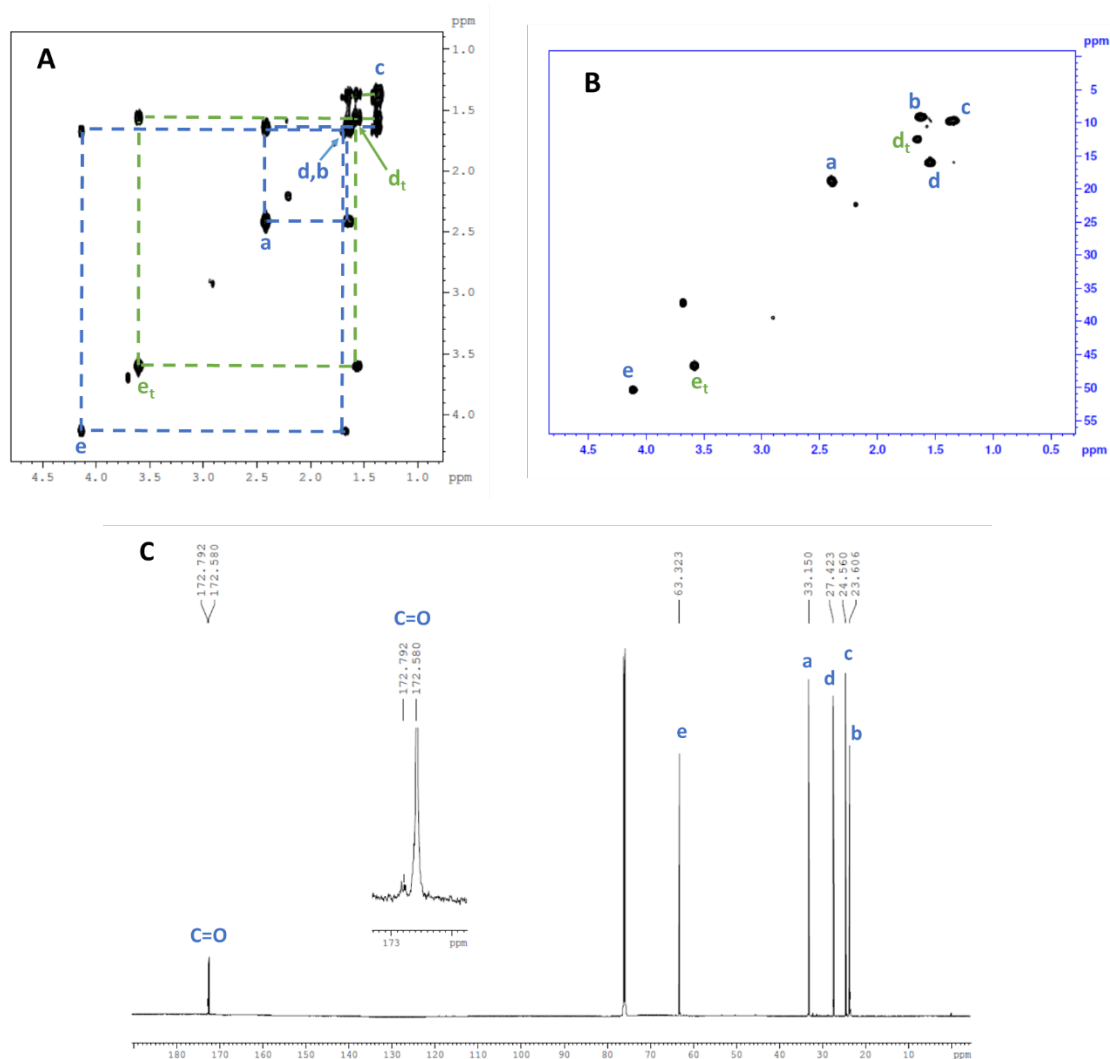
**Supplementary figure 1** : structure of (a) the three main classes of carrageenans (b) curcumin.



**Supplementary figure 2**: Schematic representation of the oligocarrageenan-graft-polycaprolactone synthesised for micelle formation. The number of polycaprolactone repeats  $m = 10$ .



**Supplementary figure 3:** Determination of CMC (critical micelle concentration) of oligocarrageenan-graft-PCL. The intensity of the scattered light is expressed in kilo counts per second (Kcps).



**Supplementary figure 4:** 600 MHz NMR spectra of (A) COSY; (B) <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC and (C) 1D <sup>13</sup>C of oligocarrageenan-graft-PCL recorded in D<sub>2</sub>O at 25°C. Assignments a, b, c, d and e refer to the caprolactone chain atoms as indicated in supplementary figure 2. d<sub>t</sub> and e<sub>t</sub> correspond to chemical shifts of d and e at the extremity of the polycaprolactone chain (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH end).

## References

Barahona, T.; Chandia, N.P.; Encinas, M.V.; Matsuhira, B.; Zuniga, E.A. Antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from seaweeds. A kinetic approach. *Food Hydrocoll.* **2011**, *25*, 529–535.

Basnet, Purusotam, Haider Hussain, Ingunn Tho, et Natasa Skalko-Basnet. 2012. « Liposomal Delivery System Enhances Anti-Inflammatory Properties of Curcumin ». *Journal of Pharmaceutical Sciences* 101 (2): 598- 609. doi:10.1002/jps.22785.

Bouhlal, R.; Haslin, C.; Chermann, J.C.; Collic-Jouault, S.; Sinquin, C.; Simon, G.; Cerantola, S.; Riadi, H.; Bourgougnon, N. Antiviral activities of sulfated polysaccharides isolated from *sphaerococcus coronopifolius* (rhodophyta, gigartinales) and *boergeseniella thuyoides* (rhodophyta, ceramiales). *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 1187–1209.

Cardoso, M.J.; Costa, R.R.; Mano, J.F. Marine Origin Polysaccharides in Drug Delivery Systems. *Mar Drugs*. 14(2). pii: E34. doi: 10.3390/md14020034. Review.

Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature*. 1997 Aug 21;388(6644):782-7.

Ciancia, M.; Quintana, I.; Cerezo, A.S. Overview of anticoagulant activity of sulfated polysaccharides from seaweeds in relation to their structures, focusing on those of green seaweeds. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 2503–2529.

Cumashi, A.; Ushakova, N.A.; Preobrazhenskaya, M.E.; D’Incecco, A.; Piccoli, A.; Totani, L.; Tinari, N.; Morozevich, G.E.; Berman, A.E.; Bilan, M.I.; et al. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology* **2007**, *17*, 541–552.

Cunha, L., Grenha, A. Sulfated seaweed polysaccharides as multifunctional materials in drug delivery applications. *Mar Drugs*. 2016 Feb 25;14(3). pii: E42. doi: 10.3390/md14030042.

Dash, T.K., Konkimalla, V.B. Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. *J Control Release*. 2012, *158*:15-33. doi:10.1016/j.jconrel.2011.09.064. **Review**

Guibet M, Colin S, Barbeyron T, Genicot S, Kloareg B, Michel G, Helbert W. Degradation of lambda-carrageenan by *Pseudoalteromonas carrageenovora* lambda-carrageenase: a new family of glycoside hydrolases unrelated to kappa- and iota-carrageenases. *Biochem J*. 2007 May 15;404(1):105-14.

He, Y., Yuan, Y, Zheng, X., Zhang, K., Chen, S., Du, Z. 2015. « Curcumin, Inflammation, and Chronic Diseases: How Are They Linked? » *Molecules* 20 (5): 9183-9213.

Kam A, Li KM, Razmovski-Naumovski V, Nammi S, Chan K, Grau GE, Li GQ. Curcumin Reduces Tumour Necrosis Factor-Enhanced Annexin V-Positive Microparticle Release in Human Vascular Endothelial Cells. *J Pharm Pharm Sci*. 2015;18(4):424-33.

Kuttan G, Kumar KB, Guruvayoorappan C, Kuttan R. Antitumor, anti-invasion, and antimetastatic effects of curcumin. *Adv Exp Med Biol*. 2007;595:173-84.



Mahmood K, Zia KM, Zuber M, Salman M, Anjum MN. Recent developments in curcumin and curcumin based polymeric materials for biomedical applications: A review. *Int J Biol Macromol.* 2015 Nov;81:877-90. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.09.026

McLean MW, Williamson FB. kappa-Carrageenase from *Pseudomonas carrageenovora*. *Eur J Biochem.* 1979 Feb 1;93(3):553-8.

Potin P1, Richard C, Barbeyron T, Henrissat B, Gey C, Petillot Y, Forest E, Dideberg O, Rochas C, Kloareg B. Processing and hydrolytic mechanism of the cgkA-encoded kappa-carrageenase of *Alteromonas carrageenovora*. *Eur J Biochem.* **1995**. 228:971-5.

Scarpini, E., G. C. Conti, S. Bussini, R. Clerici, I. Siglienti, L. Piccio, A. Pol, P. L. Baron, et G. Scarlato. Human Schwann Cell Proliferation and IL-6 Production Following TNF-Alpha Stimulation in Vitro. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1999**. 883: 520-22. doi:10.1111/j.1749-6632.1999.tb08626.x.

Sithranga Boopathy, N.; Kathiresan, K. Anticancer drugs from marine flora: An Overview. *J. Oncol.* **2010**, 2010, 1–18.

Sun, Dongmei, Xiaoying Zhuang, Xiaoyu Xiang, Yuelong Liu, Shuangyin Zhang, Cunren Liu, Stephen Barnes, William Grizzle, Donald Miller, et Huang-Ge Zhang. 2010. « A Novel Nanoparticle Drug Delivery System: The Anti-Inflammatory Activity of Curcumin Is Enhanced When Encapsulated in Exosomes ». *Molecular Therapy* 18 (9): 1606- 14. doi:10.1038/mt.2010.105.

Topel, O; Cakir, BA; Budama, L; Hoda, N. Determination of critical micelle concentration of polybutadiene-block-poly(ethyleneoxide) diblock copolymer by fluorescence spectroscopy and dynamic light scattering. *JOURNAL OF MOLECULAR LIQUIDS* 2013. Volume: 177 Pages: 40-43 DOI: 10.1016/j.molliq.2012.10.013

Vo, T.S.; Ngo, D.H.; Kim, S.K. Potential targets for anti-inflammatory and anti-allergic activities of marine algae: An Overview. *Inflamm. Allergy Drug Targets* **2012**, 11, 90–101.

Youssef, L., Lallemand, L., Giraud, P., Soulé, F., Bhaw-Luximon, A., Meilhac, O., Lefèbvre D'Hellencourt<sup>a</sup>, C., Jhurry, D., Couprie, J. Ultrasound-assisted extraction and structural characterization by NMR of alginates and carrageenans from seaweeds. Submitted to *Carbohydrate Polymers*.

## Travaux associés

Les expérimentations menées sur les cellules endothéliales humaines ont montré que les micelles sont internalisées dans ces cellules et qu'elles délivrent la curcumine. Afin de compléter ce travail, des essais chez l'animal sont envisagés pour soumettre les micelles à la complexité physiologique d'un organisme vivant. En effet, un principe actif introduit dans l'organisme est soumis à plusieurs processus dont la distribution, la métabolisation et l'élimination. L'utilisation des micelles a pour objectif d'améliorer la distribution, de protéger le principe actif de dégradations qui surviennent lors du métabolisme et éventuellement d'orienter cette molécule vers un organe cible. Actuellement, les nanomicelles ne possèdent pas de système d'adressage. En première approche, des essais préliminaires ont été réalisés chez la souris pour évaluer leur capacité à s'introduire dans les différents tissus de l'organisme. Ces premiers essais ont été effectués avec le rouge de Nil, une molécule fluorescente et hydrophobe qui est ainsi facilement détectable.

## Matériel et méthodes

### *Distribution du rouge de Nil encapsulé ou libre chez la souris*

Les souris (lignée C57/Black 6) ont reçu par voie intraveineuse les micelles contenant le rouge de Nil (3 souris) ou le rouge de Nil libre (3 souris). Le sang a été prélevé à 1 h, 2 h et 4h après l'injection afin d'extraire et doser le rouge de Nil. Au bout de 4 h, les souris ont été sacrifiées et les organes (cerveau, foie, poumons, tissu adipeux, rate et reins) prélevés pour extraire le rouge de Nil et réaliser une quantification.

### *Extraction et dosage du rouge de Nil*

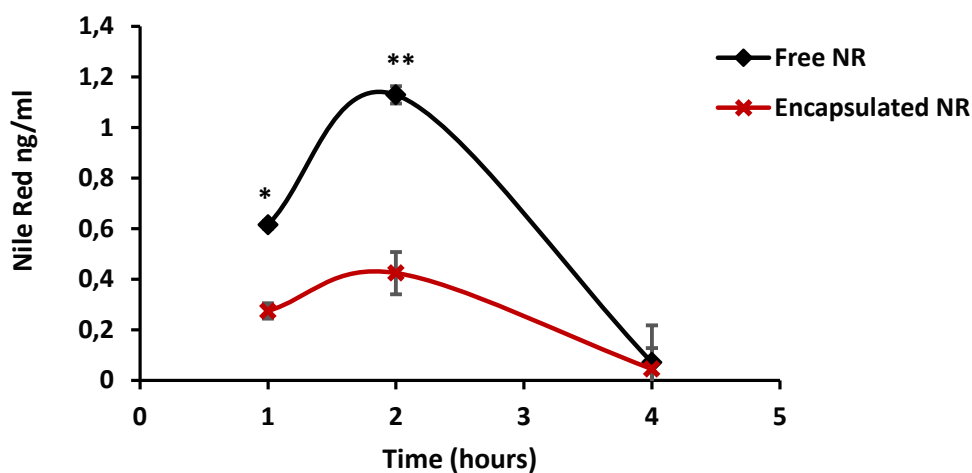
Les échantillons de sang traités avec l'héparine ont été acidifiés à pH 3 avec du HCl 6 N avant d'être repris dans un mélange acétate d'éthyle/propanol (9 :1). Après quelques minutes sous agitation, les échantillons ont été centrifugés pendant 20 min à 5000 g. Les phases organiques ont été récupérées pour mesurer la fluorescence du rouge de Nil (excitation : 550 nm, émission : 630 nm). Une gamme étalon de rouge de Nil a permis de réaliser une quantification.

Les organes ont été prélevés après sacrifice des souris puis repris dans du PBS à pH 3 (3 fois le volume de l'organe) et broyés avant d'ajouter l'acétate d'éthyle/propanol (9 :1). Après centrifugation à 5000 g pendant 20 min, les phases organiques ont été prélevées et la fluorescence du rouge de Nil mesurée selon la même procédure que pour les échantillons sanguins (Kim et al. 2011).

## Résultats

### Dosage du rouge de Nil dans le plasma

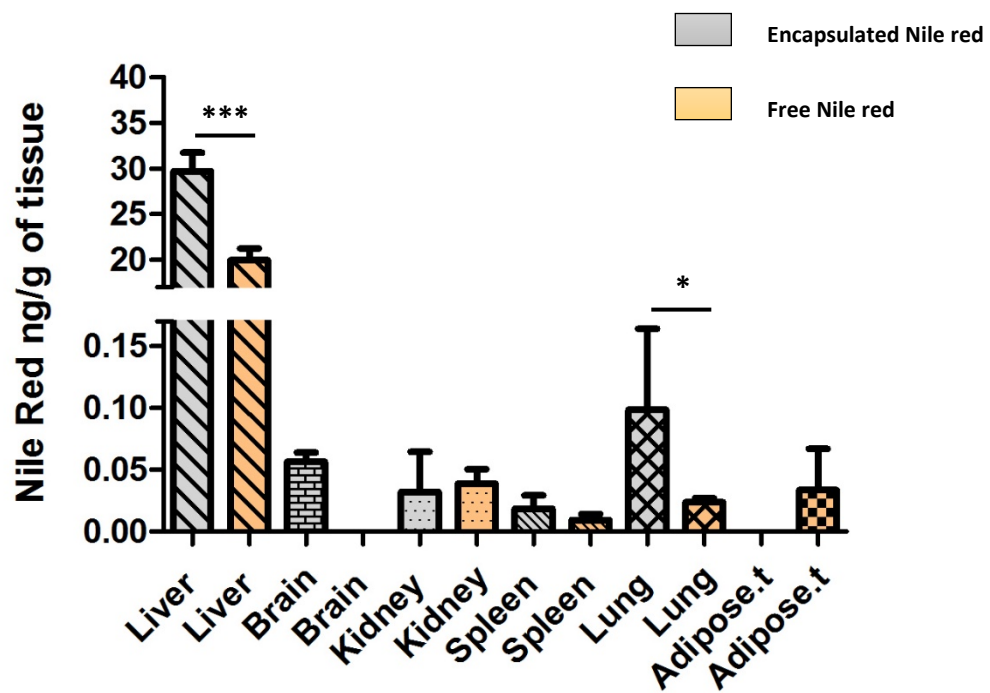
Afin de réaliser une cinétique de variation de la concentration plasmatique du rouge de Nil en fonction du temps, des prélèvements sanguins ont été effectués à 1 h, 2 h et 4 h après injection chez la souris C57/Black 6. La figure 21 met en évidence des concentrations plasmatiques significativement plus importantes pour le rouge de Nil libre en comparaison avec le rouge de Nil véhiculée. La concentration du rouge de Nil libre est ainsi 2,3 fois plus élevée 1 h après injection que celle de la molécule encapsulée. Cette différence devient plus importante entre 1 h et 2 h après injection puis une diminution de la concentration sanguine du rouge de Nil libre et véhiculé est observée jusqu'à 4 h. La disparition des molécules du plasma peut être due à leur distribution dans les organes et/ou à leur élimination de l'organisme.



**Figure 21** : cinétique de disparition du rouge de Nil libre et encapsulée de la circulation sanguine chez la souris. Le rouge de Nil est extrait du sang total puis quantifié en mesurant sa fluorescence.

Etude de la bio-distribution du rouge de Nil libre ou encapsulé

La bio-distribution du rouge de Nil libre et du rouge de Nil encapsulé a été étudiée chez la souris C57/Black 6 (figure 22) en prélevant différents organes (foie, cerveau, rein, rate, poumon et tissu adipeux). La concentration maximale apparaît dans le foie, 4 heures après l'administration par voie intraveineuse. Le foie est l'organe principal impliqué dans le métabolisme des molécules introduites dans l'organisme avant qu'elles ne soient redistribuées ou éliminées. Dans les autres organes, les quantités de rouge de Nil libre ou véhiculé sont moins importantes que dans le foie. Toutefois, des différences sont observées entre le rouge de Nil libre et véhiculé dans certains organes : ainsi, dans le cerveau, le rouge de Nil encapsulé est présent alors que le rouge de Nil libre n'est pas détecté. De façon similaire, au niveau des poumons, la quantité de rouge de Nil encapsulé est significativement plus importante que celle du rouge de Nil libre. A l'inverse, dans le tissu adipeux, seul le rouge de Nil libre est détecté.



**Figure 22** : bio-distribution du rouge de Nil libre et vectorisé chez la souris, 4 h après injection par voie intraveineuse(n=3). Test de Tukey : \*\*\*p < 0,001, \*\*p <0,01.

## Conclusion

Des différences de bio-distribution et de cinétique de concentration du rouge de Nil libre et vectorisé ont été observées en condition *in vivo* chez la souris C57/Black 6. La molécule libre montre une durée de vie plus longue dans le sang que la molécule encapsulée. L'étude de la bio-distribution montre des quantités plus importantes de rouge de Nil véhiculé dans le foie, le cerveau et les poumons. Une incorporation plus rapide des micelles dans les différents organes pourrait expliquer les différences de concentration plasmatique au cours du temps.

Les différences de bio-distribution avec la forme encapsulée pourraient être exploitées. Cela pourrait notamment permettre de cibler plus spécifiquement certains tissus avec les nanomicelles d'oligocarraghénanes-*graft*-PCL. La possibilité d'augmenter l'entrée de molécules dans le système nerveux central est particulièrement intéressante. Le cerveau est, en effet, séparé de la circulation par des vaisseaux aux propriétés particulières, formant la barrière hémato encéphalique (BHE). Cette BHE évite l'entrée de molécules potentiellement toxiques, mais est également un frein à l'entrée de molécules thérapeutiques dans le système nerveux central. Des systèmes de vectorisation permettant de délivrer de telles molécules ont donc un potentiel intéressant.

## Conclusion chapitre 2

L'objectif de cette partie était de développer des nanomicelles à partir des polysaccharides extraits des macroalgues. Sur ces polymères naturels, des chaînes hydrophobes de polycaprolactone ont été greffées. Ainsi des micelles avec un cœur hydrophobe de PCL et une surface hydrophile d'oligocarraghénanes ont été obtenues.

La première étape était de réduire la taille de ces polymères qui est de l'ordre de  $10^7$  Da pour obtenir des oligomères constitués de quelques unités répétitives. De ce fait, ce sont les carraghénanes qui ont été utilisés puisqu'il existe des enzymes spécifiques capables de les hydrolyser en oligomères. Celles-ci sont produites par la bactérie marine *Pseudoaltermonas carrageenovora* stimulée avec des carraghénanes. Les chaînes de carraghénanes ont ainsi été hydrolysées en octamères grâce à ces enzymes.

Les oligomères ont ensuite été fonctionnalisés en fixant des chaînes de polycaprolactone (PCL) au niveau des fonctions hydroxyles grâce à un protocole constitué de trois étapes : Dans un premier temps, l'acétylation partielle des oligocarraghénanes a été réalisée de façon à protéger 60 % des fonctions -OH libres de chaque oligomère. La polymérisation du caprolactone en polycaprolactone a alors été effectuée sur les fonctions hydroxyles libres. Enfin, la déprotection des fonctions -OH acétylées a permis d'obtenir les copolymères amphiphiles qui constitueront les micelles.

La formation des micelles est possible à des concentrations de copolymères supérieures ou égales à 0,8 mg/ml. En dessous de cette concentration appelée CMC (concentration micellaire critique), les micelles ne peuvent pas se former. Ces micelles ont une taille moyenne de  $187 \pm 21$  nm et montrent une forme sphérique en microscopie électronique à transmission (TEM).

La capacité de ces micelles à incorporer des molécules hydrophobes a été vérifiée et trois composés ont été testés. Il s'agit de la curcumine, de la rifampicine (antibiotique) et du rouge de Nil qui est un fluorophore hydrophobe. La cinétique de libération de ces molécules a été réalisée in vitro dans le PBS (pH 7,4) à 37 °C. La curcumine est libérée durant 72 heures, la rifampicine et le rouge de Nil pendant respectivement 24 h et 60 h.

L'une des pathologies visées par le développement de ces nanomicelles est l'athérosclérose qui touche les cellules endothéliales qui tapissent les vaisseaux sanguins. Dans cette partie, des tests *in vitro* ont été réalisés sur les cellules endothéliales humaines (EAhy926). Tout d'abord l'effet des micelles sur la viabilité de ces cellules a été évalué et les résultats ont montré l'absence de toxicité. La différence d'incorporation de la curcumine libre et vectorisée dans les cellules endothéliales a ensuite été observée par microscopie à fluorescence. La vectorisation de la curcumine par les micelles permet ainsi d'augmenter sa concentration intracellulaire.

Afin de vérifier la libération de la curcumine par les micelles dans les cellules, les propriétés anti-inflammatoires de cette dernière ont été mesurées. Pour cela, les cellules ont été traitées avec la curcumine libre ou vectorisée durant 24 heures avant l'induction d'un stress inflammatoire. Les cellules ayant été mises en contact avec la curcumine vectorisée montre une meilleure capacité à empêcher la production de facteurs inflammatoires (IL-6 et MCP-1) que les cellules traitées avec la curcumine libre. Ces résultats indiquent que la vectorisation améliore les effets protecteurs de la curcumine contre l'inflammation.

Afin de confirmer l'ensemble de ces résultats, il sera nécessaire de réaliser différents tests *in vivo*. Les premiers essais ont été effectués sur des souris C57/Black 6 traitées avec le rouge de Nil encapsulé pour étudier la cinétique d'absorption et la bio-distribution des micelles. Les concentrations sanguines du rouge de Nil véhiculé sont moins importantes que celles du rouge de Nil libre et cela durant les 4 premières heures après injection. Les deux types de molécules (libre et véhiculé) ne sont plus détectés dans le sang après 4 heures.

La bio-distribution dans les différents organes a été étudiée 4 h après injection et le rouge de Nil libre a été retrouvé dans le foie, le cœur, la rate, les poumons, les tissus adipeux et les reins. Le rouge de Nil encapsulé a été détecté dans ces mêmes organes sauf dans les tissus adipeux, avec des concentrations plus élevées dans le foie et le poumon. Il est également présent dans le cerveau contrairement au rouge de Nil libre.

A l'exception du foie, les concentrations observées dans les organes 4 h après injection apparaissent faibles (< 0,1 ng/g de tissu). D'autre part, les concentrations plasmatiques de rouge de Nil libre ou encapsulées apparaissent également très faibles 4 h après injection. Il

serait donc intéressant de renouveler ces expériences en arrêtant la cinétique dès 2 h après injection. En effet, les données de la littérature montrent que l'étude de la bio-distribution de nanoparticules et de principes actifs libres chez la souris est plus aisée durant les deux premières heures suivant l'administration (Kim et al. 2011 ; Z. Wang et al. 2015). Au-delà de deux heures, les concentrations dans les organes sont souvent déjà trop faibles pour avoir une bonne estimation de la distribution.

Pour compléter ce travail, les effets de la curcumine véhiculée dans les nanomicelles obtenues dans cette étude seront étudiés chez la souris sur un modèle physiopathologique d'athérosclérose et d'AVC. Pour un meilleur contrôle de la libération de la curcumine, le ciblage des tissus par ces nanovecteurs pourrait être envisagé.



## Conclusion générale

Le diabète et l'athérosclérose figurent parmi les premières causes de mortalité dans le monde. Plusieurs facteurs peuvent contribuer à l'apparition de ces pathologies dont l'hérédité, l'alimentation et le mode de vie. Les facteurs communs entre ces deux maladies sont le stress oxydant et l'inflammation chronique. Les ROS en excès activent de nombreuses voies de signalisations (Evans et al. 2003) telles que NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor Kappa-B), TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ) et MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases). L'activation de ces voies est caractérisée par la sécrétion de cytokines et chimiokines inflammatoires dont IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-8 et MCP-1 (Hommelberg et al. 2008). L'utilisation de molécules antioxydantes et antiinflammatoires comme la curcumine peut inhiber ces processus.

Les effets biologiques et thérapeutiques de la curcumine ont été décrits dans plusieurs études (Jang et al. 2008 ; Aggarwal 2005 ; Akila et al. 1998). Grâce à ses propriétés antioxydantes, la curcumine peut neutraliser les ROS et diminuer le stress oxydant. Elle est également capable d'inhiber les voies de signalisation impliquées dans le développement de plusieurs pathologies liées à l'inflammation comme le diabète et l'athérosclérose. Ainsi la curcumine peut diminuer la sécrétion des facteurs TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, et MCP-1 (Jain et al. 2009), fortement activés lors du développement de ces pathologies.

Cependant, la curcumine étant une molécule hydrophobe, elle est très peu absorbée par voie orale et peu disponible dans l'organisme. Son administration par voie intraveineuse améliore sa biodisponibilité mais la curcumine est alors rapidement métabolisée par les enzymes de l'organisme et éliminée. Dans ce travail de thèse, des nanomicelles ont été développées afin de véhiculer la curcumine, d'augmenter sa biodisponibilité et de contrôler sa libération. Ces nanovecteurs ont été développés à partir de polysaccharides extraits de macroalgues.

La première partie de cette étude a donc consisté à isoler les polysaccharides de macroalgues brunes et rouges sans altérer leur structure. Pour réaliser cela, un protocole utilisant les ultrasons a été élaboré afin d'extraire rapidement et efficacement ces polymères. L'assistance des ultrasons a permis d'atteindre en quelques minutes des rendements généralement obtenus en quelques heures pour les protocoles classiques. Les polysaccharides ont été isolés puis caractérisés en spectroscopie RMN et en chromatographie d'exclusion. Les données RMN ont montré que les polymères n'étaient pas dégradés par les ultrasons et la chromatographie

d'exclusion a permis de vérifier que la taille de ces polymères était bien similaire à celle des polysaccharides obtenus par un protocole d'extraction classique.

Ainsi le protocole d'éco-extraction mis en place a permis l'extraction efficace des alginates et des carraghénanes. Les alginates proviennent de l'algue brune *Sargassum binderi* et les carraghénanes constituent les algues rouges *Kappaphycus alvarezii* et *Euchema denticulatum*. Ces deux polymères ont la particularité d'être hydrosolubles et tolérés par l'organisme.

Dans la deuxième partie de cette étude, les carraghénanes extraits de *Kappaphycus alvarezii* ont été choisis pour être fonctionnalisés afin d'obtenir des nanomicelles visant à transporter des médicaments hydrophobes et plus particulièrement la curcumine. Ces polysaccharides ont été combinés avec le polycaprolactone qui est un polyester hydrophobe. L'avantage de ces deux entités est leur biocompatibilité et leur dégradation possible dans l'organisme.

Les nanomicelles obtenues ont une taille de  $187 \pm 21$  nm et permettent une libération progressive des molécules qu'elles transportent. La libération de la curcumine se prolonge sur une durée 72 heures en conditions *in vitro*. Ce temps de libération dépend de plusieurs paramètres dont la longueur des chaînes de polycaprolactone des micelles mais aussi de la molécule encapsulée. En effet plus la longueur des chaînes de polycaprolactone est importante et plus la libération de la molécule véhiculée est prolongée (Bhaw-Luximon et al. 2011). L'affinité entre la molécule encapsulée et la micelle peut également avoir un rôle sur la durée de la libération. En effet, les temps de relargage varient selon la molécule introduite dans la micelle. La curcumine qui est délivrée durant 72 heures présente apparemment une plus forte interaction avec la micelle que la rifampicine et le rouge de Nil qui sont respectivement libérés en 24 et 60 heures. Les nanomicelles d'oligoagarose développées par Bhaw-Luximon et al. (2011) montrent également des durées de libérations compris entre 50 et 100 h pour le kétoprofène, un médicament anticancéreux hydrophobe.

Des essais réalisés *in vitro* sur des cellules endothéliales humaines ont montré une meilleure incorporation de la curcumine vectorisée dans le cytoplasme. L'introduction de la micelle dans les cellules peut être effectuée par un mécanisme d'endocytose. En effet, des études démontrent que les nanovecteurs sont pris en charge par les cellules *via* ce processus (A. T. Singh et al. 2008). Quant à la curcumine libre, son caractère hydrophobe pourrait limiter son introduction dans les cellules.

Un dosage des facteurs inflammatoires sécrétés (IL-6 et MCP-1) a été réalisé sur les cellules endothéliales humaines ayant subi un stress inflammatoire après avoir été traitées avec la curcumine libre et vectorisée. Les cellules mises en contact avec la curcumine vectorisée sont mieux protégées face à ce stress inflammatoire que les cellules qui ont reçu une quantité équivalente de curcumine libre. En augmentant les quantités de curcumine disponibles dans les cellules, l'utilisation des micelles a donc un effet positif sur les propriétés anti-inflammatoires de ce composé. La diminution de la sécrétion des facteurs IL-6 et MCP-1 est significativement plus marquée pour les cellules traitées avec la curcumine vectorisée. Ces résultats indiquent que la curcumine a été délivrée dans les cellules permettant une meilleure inhibition des voies de signalisation responsables de l'expression des facteurs IL-6 et MCP-1. L'inhibition de leur expression par la curcumine est possible par différentes voies dont NF- $\kappa$ B, MAPK ou JNK (He et al. 2015 ; Liu et al. 2014).

Par la suite, il est envisagé d'étudier l'efficacité de la vectorisation de la curcumine en condition *in vivo*. Des essais ont été initiés chez la souris et avaient pour objectif de vérifier l'internalisation des micelles dans les différents organes et de déterminer leur biodisponibilité. Pour ce premier test *in vivo*, le rouge de Nil a été introduit dans les micelles à la place de la curcumine pour une détection plus aisée par fluorescence.

Le rouge de Nil libre ou véhiculé a été administré par voie intraveineuse chez la souris. La molécule libre a montré une disparition significativement plus lente de la circulation sanguine que la molécule véhiculée par les nanomicelles. En effet, Les principes actifs ou molécules introduites dans l'organisme peuvent être pris en charge par les protéines plasmatiques comme l'albumine ou la globuline (Sackett et Wolff 1987). Le rouge de Nil libre étant une molécule hydrophobe sa fixation aux protéines plasmatiques est nécessaire à sa circulation. Seule la forme libre peut être distribuée au niveau des organes, lorsque la forme liée est libérée au cours du temps. Les micelles peuvent quant à elles circuler librement grâce à leur surface hydrophile et pénétrer ainsi plus rapidement dans les organes.

Le rouge de Nil libre ou encapsulé a ensuite été dosé dans différents organes, 4 h après son administration par voie intraveineuse. Quelques différences ont été notées dans la bio-distribution de ces deux types de composés. Le rouge de Nil vectorisé montre une incorporation plus importante dans certains organes (le foie, le cerveau et les poumons).

Cependant la molécule qu'elle soit libre ou vectorisée est retrouvée majoritairement dans le foie et en faible quantité dans les autres organes. Afin de contrôler la distribution des micelles, il est prévu par la suite de fixer des molécules d'adressage à leur surface pour pouvoir les diriger vers les tissus cibles. Pour ce faire, la présence de groupements hydroxyles (-OH) libres sur les PCL-oligocarraghénanes constitue un atout majeur de ces nanomicelles car ces fonctions sont *à priori* aisément substituables par des ligands qui permettraient le ciblage de récepteurs de cellules spécifiques.

Dans la littérature, de nombreuses études se sont intéressées à la formulation de nanovecteurs pour transporter la curcumine (Prasad, Tyagi, et Aggarwal 2014). Plusieurs types de nanoparticules ont été développés dont des nanotubes de carbones, des liposomes et des cyclodextrine (H. Li et al. 2014 ; L. Li, Braiteh, et Kurzrock 2005 ; Ghanghoria et al. 2012). Il existe très peu de données sur l'utilisation des carraghénanes pour véhiculer la curcumine. L'étude réalisée par Xu et al. (2014) présente des particules obtenues à partir de kappa-carraghénanes complexés avec le lysozyme. Ces vecteurs ont permis d'augmenter la solubilité de la curcumine. Cependant, la taille de ces vecteurs étant de l'ordre de 1  $\mu\text{m}$ , leur incorporation par des cellules pourrait être limitée. Les nanomicelles développées dans cette étude ont une taille d'environ 200 nm favorisant leur introduction dans les cellules.

## Perspectives

Des nanomicelles biodégradables ont été obtenues à partir des carraghénanes extrait de l'algue rouge *Kappaphycus alvarezii*. Il a été démontré dans ce travail de thèse que la vectorisation de la curcumine augmente son incorporation dans les cellules et son activité anti-inflammatoire, en condition *in vitro*. Afin de compléter ces résultats, il sera nécessaire de réaliser des tests chez l'animal en condition physiopathologique :

- Les effets de la curcumine véhiculée pourraient être analysés sur des souris diabétiques afin d'étudier l'impact sur l'hyperglycémie, l'insulinorésistance et la peroxydation des lipides et la modulation des marqueurs moléculaires de complications vasculaires.
- Il serait également intéressant de vérifier les résultats obtenus *in vitro* sur les cellules endothéliales, en utilisant un modèle animal d'athérosclérose. Cela permettrait d'étudier l'incorporation de la curcumine encapsulée au niveau de l'endothélium vasculaire et ainsi mesurer les effets sur l'athérogenèse.
- Les premiers essais réalisés sur la souris avec les micelles contenant le rouge de Nil ont montré une incorporation possible des micelles à travers la barrière hématoencéphalique. Après avoir approfondi la bio-distribution de la curcumine encapsulée dans les micelles et confirmé leur passage à travers la barrière hématoencéphalique, les propriétés thérapeutiques de la curcumine pourraient être étudiées au niveau du cerveau sur un modèle d'AVC et notamment sur les conséquences de l'ischémie cérébrale. Il faut rappeler que l'AVC peut provenir de l'érosion de la plaque d'athérome.

Par ailleurs, la libération de la curcumine au niveau des tissus cibles peut être contrôlée en utilisant des éléments d'adressage fixés sur les micelles. En effet, les micelles sont constituées d'un cœur hydrophobe de polycaprolactone et d'une surface hydrophile d'oligocarraghénanes riches en groupements chimiques hydroxyles. Ces fonctions-OH à la surface des micelles sont facilement modifiables et peuvent servir de point d'ancrage pour

des récepteurs spécifiques. Dans de nombreuses pathologies, les cellules touchées présentent des modifications à leur surface qui pourraient être ciblées par les micelles.

A titre d'exemple, lors du développement de l'athérosclérose, des molécules d'adhésions sont exprimées à la surface des cellules endothéliales. Parmi ces récepteurs sont retrouvés VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*) et ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*) permettant le recrutement des monocytes et des lymphocytes au niveau des cellules endothéliales en transformation (Nakashima et al. 1998 ; Fotis et al. 2012). Des peptides spécifiques de ces récepteurs pourraient être générées et fixées à la surface des micelles pour cibler les cellules endothéliales et libérer la curcumine et freiner l'athérogenèse.

## Bibliographie

1. Aggarwal, S. 2005. « Curcumin (Diferuloylmethane) Downregulates Expression of Cell Proliferation, Antiapoptotic and Metastatic Gene Products Through Suppression of I B Kinase and AKT Activation ». *Molecular Pharmacology*, octobre. doi:10.1124/mol.105.017400.
2. Ahn, Dong-Gyun, Jangwook Lee, So-Young Park, Young-Je Kwark, et Kuen Yong Lee. 2014. « Doxorubicin-Loaded Alginate-G-poly(N-Isopropylacrylamide) Micelles for Cancer Imaging and Therapy ». *ACS Applied Materials & Interfaces* 6 (24): 22069- 77. doi:10.1021/am505444c.
3. Akila, G, V Rajakrishnan, P Viswanathan, K. N Rajashekar, et Venugopal P Menon. 1998. « Effects of curcumin on lipid profile and lipid peroxidation status in experimental hepatic fibrosis ». *Hepatology Research* 11 (3): 147- 57. doi:10.1016/S1386-6346(98)00026-6.
4. Anand, Preetha, Ajaikumar B. Kunnumakkara, Robert A. Newman, et Bharat B. Aggarwal. 2007. « Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises ». *Molecular Pharmaceutics* 4 (6): 807- 18. doi:10.1021/mp700113r.
5. Anguizola, Jeanethe, Ryan Matsuda, Omar S. Barnaby, K. S. Hoy, Chunling Wa, Erin DeBolt, Michelle Koke, et David S. Hage. 2013. « Review: Glycation of human serum albumin ». *Clinica Chimica Acta* 425 (octobre): 64- 76. doi:10.1016/j.cca.2013.07.013.
6. Augustijns, Patrick, Benjamin Wuyts, Bart Hens, Pieter Annaert, James Butler, et Joachim Brouwers. 2014. « A review of drug solubility in human intestinal fluids: Implications for the prediction of oral absorption ». *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, Special Issue on 7th International Symposium on Microdialysis - Edited By: William Couet and Hartmut Derendorf & Special Issue on The status of understanding and predicting gastrointestinal drug absorption and the way forward by means of the novel EU project OrBiTo - Edited By: Bertil Abrahamsson, Peter Langguth, Hans Lennernäs, 57 (juin): 322- 32. doi:10.1016/j.ejps.2013.08.027.
7. Barenholz, Yechezkel (Chezy). 2012. « Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned ». *Journal of Controlled Release*, Past, current and future applications of liposomes - Grand Challenges and Opportunities in Nanomedicine, 160 (2): 117- 34. doi:10.1016/j.jconrel.2012.03.020.
8. Barzegar, Abolfazl, et Ali A. Moosavi-Movahedi. 2011. « Intracellular ROS Protection Efficiency and Free Radical-Scavenging Activity of Curcumin ». *PLOS ONE* 6 (10): e26012. doi:10.1371/journal.pone.0026012.
9. Basnet, Purusotam, Haider Hussain, Ingunn Tho, et Natasa Skalko-Basnet. 2012. « Liposomal Delivery System Enhances Anti-Inflammatory Properties of Curcumin ». *Journal of Pharmaceutical Sciences* 101 (2): 598- 609. doi:10.1002/jps.22785.
10. Bazylińska, Urszula, Agnieszka Lewińska, Łukasz Lamch, et Kazimiera A. Wilk. 2014. « Polymeric nanocapsules and nanospheres for encapsulation and long sustained release of hydrophobic

cyanine-type photosensitizer ». *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Selected papers from the 26th European Colloid and Interface Society conference (26th ECIS 2012), 442 (février): 42- 49. doi:10.1016/j.colsurfa.2013.02.023.

11. Benedetti, Margherita Strolin, Rhys Whomsley, Italo Poggesi, Willi Cawello, François-Xavier Mathy, Marie-Laure Delporte, Peggy Papeleu, et Jean-Baptiste Watelet. 2009. « Drug metabolism and pharmacokinetics ». *Drug Metabolism Reviews* 41 (3): 344- 90. doi:10.1080/10837450902891295.
12. Benet, Leslie Z., D. Kroetz, L. Sheiner, J. Hardman, et L. Limbird. 1996. « Pharmacokinetics: the dynamics of drug absorption, distribution, metabolism, and elimination ». *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, 3–27.
13. Bengmark, Stig. 2006. « Curcumin, An Atoxic Antioxidant and Natural NFκB, Cyclooxygenase-2, Lipooxygenase, and Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibitor: A Shield Against Acute and Chronic Diseases ». *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 30 (1): 45- 51. doi:10.1177/014860710603000145.
14. Bhatia, Mr Saurabh. 2015. « Evaluation of pharmacognostical, phytochemical and antimicrobial properties of *Porphyra vietnamensis* ». *International Journal of Green Pharmacy (IJGP)* 9 (2): 131- 37.
15. Bhaw-Luximon, Archana, Laila Musharat Meeram, Yeshma Jugdawa, William Helbert, et Dhanjay Jhurry. 2011. « Oligoagarose-G-Polycaprolactone Loaded Nanoparticles for Drug Delivery Applications ». *Polymer Chemistry* 2 (1): 77. doi:10.1039/c0py00311e.
16. Cardoso, Susana M., Olívia R. Pereira, Ana M. L. Seca, Diana C. G. A. Pinto, et Artur M. S. Silva. 2015. « Seaweeds as Preventive Agents for Cardiovascular Diseases: From Nutrients to Functional Foods ». *Marine Drugs* 13 (11): 6838- 65. doi:10.3390/md13116838.
17. Cavalli, Roberta, Federica Leone, Rosalba Minelli, Roberto Fantozzi, et Chiara Dianzani. 2014. « New Chitosan Nanospheres for the Delivery of 5-Fluorouracil: Preparation, Characterization and in Vitro Studies ». *Current Drug Delivery* 11 (2): 270- 78.
18. Chainani-Wu, Nita. 2003. « Safety and Anti-Inflammatory Activity of Curcumin: A Component of Tumeric (*Curcuma longa*) ». *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* 9 (1): 161- 68. doi:10.1089/107555303321223035.
19. Chaves Lopez, Clemencia, Annalisa Serio, Chiara Rossi, Giovanni Mazzarrino, Sonia Marchetti, Federica Castellani, Lisa Grotta, Francesco Paolo Fiorentino, Antonello Paparella, et Giuseppe Martino. 2016. « Effect of diet supplementation with *Ascophyllum nodosum* on cow milk composition and microbiota ». *Journal of Dairy Science* 99 (8): 6285- 97. doi:10.3168/jds.2015-10837.



20. Chillistone, Shruti, et Jonathan G. Hardman. 2014. « Factors affecting drug absorption and distribution ». *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, Physics, 15 (7): 309- 13. doi:10.1016/j.mpaic.2014.04.004.
  
21. Chiou, Win L. 2015. « Potential Pitfalls in the Conventional Pharmacokinetic Studies: Effects of the Initial Mixing of Drug in Blood and the Pulmonary First-Pass Elimination ». *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* 7 (5): 527- 36. doi:10.1007/BF01062393.
  
22. Chiu, Jasper Z. S., Ian G. Tucker, Bernie J. McLeod, et Arlene McDowell. 2015. « Arginine-tagging of polymeric nanoparticles via histidine to improve cellular uptake ». *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 89 (janvier): 48- 55. doi:10.1016/j.ejpb.2014.11.014.
  
23. Ciccone, Marco Matteo, Pietro Scicchitano, Matteo Cameli, Annagrazia Cecere, Francesca Cortese, Ilaria Dentamaro, Francesco Gentile, et al. 2014. « Endothelial Function in Pre-diabetes, Diabetes and Diabetic Cardiomyopathy: A Review ». *Journal of Diabetes & Metabolism* 5 (4): 1- 10. doi:10.4172/2155-6156.1000364.
  
24. Cloninger, Mary J. 2002. « Biological applications of dendrimers ». *Current Opinion in Chemical Biology* 6 (6): 742- 48. doi:10.1016/S1367-5931(02)00400-3.
  
25. Connan, Solène, et Dagmar B. Stengel. 2011. « Impacts of ambient salinity and copper on brown algae: 2. Interactive effects on phenolic pool and assessment of metal binding capacity of phlorotannin ». *Aquatic Toxicology* 104 (1–2): 1- 13. doi:10.1016/j.aquatox.2011.03.016.
  
26. Cote, Brianna, Lisa Janssen Carlson, Deepa A. Rao, et Adam W. G. Alani. 2015. « Combinatorial resveratrol and quercetin polymeric micelles mitigate doxorubicin induced cardiotoxicity in vitro and in vivo ». *Journal of Controlled Release* 213 (septembre): 128- 33. doi:10.1016/j.jconrel.2015.06.040.
  
27. Cruz-Suárez, L.e., M. Tapia-Salazar, M.g. Nieto-López, C. Guajardo-Barbosa, et D. Ricque-Marie. 2009. « Comparison of Ulva Clathrata and the Kelps Macrocystis Pyrifera and Ascophyllum Nodosum as Ingredients in Shrimp Feeds ». *Aquaculture Nutrition* 15 (4): 421- 30. doi:10.1111/j.1365-2095.2008.00607.x.
  
28. Dash, Tapan K., et V. Badireenath Konkimalla. 2012. « Polymeric Modification and Its Implication in Drug Delivery: Poly-ε-Caprolactone (PCL) as a Model Polymer ». *Molecular Pharmaceutics* 9 (9): 2365- 79. doi:10.1021/mp3001952.
  
29. DeMarino, Catherine, Angela Schwab, Michelle Pleet, Allison Mathiesen, Joel Friedman, Nazira El-Hage, et Fatah Kashanchi. 2016. « Biodegradable Nanoparticles for Delivery of Therapeutics in CNS Infection ». *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, juillet, 1- 20. doi:10.1007/s11481-016-9692-7.

30. Elmegeed, Dalia F. Abd, Doaa A. Ghareeb, Muhammed Elsayed, Muhammad El-Saadani, et others. 2014. « Phytochemical constituents and bioscreening activities of green algae (*Ulva Lactuca*) ». *International Journal of Agricultural Policy and Research* 2 (11): 373–378.
31. Evans, Joseph L., Ira D. Goldfine, Betty A. Maddux, et Gerold M. Grodsky. 2003. « Are Oxidative Stress–Activated Signaling Pathways Mediators of Insulin Resistance and  $\beta$ -Cell Dysfunction? » *Diabetes* 52 (1): 1- 8. doi:10.2337/diabetes.52.1.1.
32. Farhangkhoei, Hana, Zia A. Khan, Suranjana Mukherjee, Mark Cukiernik, Yousef P. Barbin, Morris Karmazyn, et Subrata Chakrabarti. 2003. « Heme oxygenase in diabetes-induced oxidative stress in the heart ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 35 (12): 1439- 48. doi:10.1016/j.yjmcc.2003.09.007.
33. Fotis, Lampros, Georgios Agrogiannis, Ioannis S. Vlachos, Alkistis Pantopoulou, Angeliki Margoni, Maria Kostaki, Christos Verikokos, Dimitrios Tzivras, Dimitri P. Mikhailidis, et Despina Perrea. 2012. « Intercellular Adhesion Molecule (ICAM)-1 and Vascular Cell Adhesion Molecule (VCAM)-1 at the Early Stages of Atherosclerosis in a Rat Model ». *In Vivo* 26 (2): 243- 50.
34. Galkina, Elena, et Klaus Ley. 2007. « Vascular Adhesion Molecules in Atherosclerosis ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27 (11): 2292- 2301. doi:10.1161/ATVBAHA.107.149179.
35. Gerszten, Robert E., Eduardo A. Garcia-Zepeda, Yaw-Chyn Lim, Masayuki Yoshida, Han A. Ding, Michael A. Gimbrone, Andrew D. Luster, Francis W. Luscinskas, et Anthony Rosenzweig. 1999. « MCP-1 and IL-8 Trigger Firm Adhesion of Monocytes to Vascular Endothelium under Flow Conditions ». *Nature* 398 (6729): 718- 23. doi:10.1038/19546.
36. Ghanghoria, Raksha, Prashant Kesharwani, Hrushikesh Bharat Agashe, et N. K. Jain. 2012. « Transdermal Delivery of Cyclodextrin-Solubilized Curcumin ». *Drug Delivery and Translational Research* 3 (3): 272- 85. doi:10.1007/s13346-012-0114-y.
37. Gogg, Silvia, Ulf Smith, et Per-Anders Jansson. 2009. « Increased MAPK Activation and Impaired Insulin Signaling in Subcutaneous Microvascular Endothelial Cells in Type 2 Diabetes: The Role of Endothelin-1 ». *Diabetes* 58 (10): 2238- 45. doi:10.2337/db08-0961.
38. Gupta, Subash C., Gorkem Kismali, et Bharat B. Aggarwal. 2013. « Curcumin, a Component of Turmeric: From Farm to Pharmacy ». *BioFactors* 39 (1): 2- 13. doi:10.1002/biof.1079.
39. Haag, Marianne, et Nola G. Dippenaar. 2005. « Dietary fats, fatty acids and insulin resistance: short review of a multifaceted connection. » *Medical Science Monitor* 11 (12): RA359-RA367.
40. Han, Hee-Sun, Elisabeth Niemeyer, Yuhui Huang, Walid S. Kamoun, John D. Martin, Jayeeta Bhaumik, Yunching Chen, et al. 2015. « Quantum Dot/Antibody Conjugates for in Vivo Cytometric Imaging in Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (5): 1350- 55. doi:10.1073/pnas.1421632111.

41. He, F., X. Xia, X. F. Wu, X. Q. Yu, et F. X. Huang. 2012. « Diabetic Retinopathy in Predicting Diabetic Nephropathy in Patients with Type 2 Diabetes and Renal Disease: A Meta-Analysis ». *Diabetologia* 56 (3): 457- 66. doi:10.1007/s00125-012-2796-6.
42. He, Yan, Yuan Yue, Xi Zheng, Kun Zhang, Shaohua Chen, et Zhiyun Du. 2015. « Curcumin, Inflammation, and Chronic Diseases: How Are They Linked? » *Molecules* 20 (5): 9183- 9213. doi:10.3390/molecules20059183.
43. Heo, Su Jin, Gi Wan Lee, Chun Bok Song, et Yu Jin Jeon. 2003. « Antioxidant Activity of Enzymatic Extracts from Brown Seaweeds ». *ALGAE* 18 (1): 71- 81. doi:10.4490/ALGAE.2003.18.1.071.
44. Hommelberg, P. P. H., J. Plat, R. C. J. Langen, A. M. W. J. Schols, et R. P. Mensink. 2008. « Fatty Acid-Induced NF- B Activation and Insulin Resistance in Skeletal Muscle Are Chain Length Dependent ». *AJP: Endocrinology and Metabolism* 296 (1): E114- 20. doi:10.1152/ajpendo.00436.2007.
45. Jahnel, Jörg, Peter Fickert, Almuthe C. Hauer, Christoph Högenauer, Alexander Avian, et Michael Trauner. 2014. « Inflammatory Bowel Disease Alters Intestinal Bile Acid Transporter Expression ». *Drug Metabolism and Disposition* 42 (9): 1423- 31. doi:10.1124/dmd.114.058065.
46. Jain, Sushil K., Justin Rains, Jennifer Croad, Bryon Larson, et Kimberly Jones. 2009. « Curcumin Supplementation Lowers TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, and MCP-1 Secretion in High Glucose-Treated Cultured Monocytes and Blood Levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1, Glucose, and Glycosylated Hemoglobin in Diabetic Rats ». *Antioxidants & Redox Signaling* 11 (2): 241- 49. doi:10.1089/ars.2008.2140.
47. Jang, Eun-Mi, Myung-Sook Choi, Un Ju Jung, Myung-Joo Kim, Hye-Jin Kim, Seon-Min Jeon, Su-Kyung Shin, Chi-Nam Seong, et Mi-Kyung Lee. 2008. « Beneficial effects of curcumin on hyperlipidemia and insulin resistance in high-fat-fed hamsters ». *Metabolism* 57 (11): 1576- 83. doi:10.1016/j.metabol.2008.06.014.
48. Jepps, Owen G., Yuri Dancik, Yuri G. Anissimov, et Michael S. Roberts. 2013. « Modeling the human skin barrier — Towards a better understanding of dermal absorption ». *Advanced Drug Delivery Reviews*, Modeling the human skin barrier - Towards a better understanding of dermal absorption, 65 (2): 152- 68. doi:10.1016/j.addr.2012.04.003.
49. Jurenka, Julie S. 2009. « Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*. A preclinical and clinical research ». *ResearchGate* 14 (2): 141- 53.
50. Jusko, William J., et Mark Gretch. 1976. « Plasma and Tissue Protein Binding of Drugs in Pharmacokinetics ». *Drug Metabolism Reviews* 5 (1): 43- 140. doi:10.3109/03602537608995839.

51. Kang, Ki Joo, Byung-Hoon Min, Jun Haeng Lee, Eun Ran Kim, Chang Ohk Sung, Joo Young Cho, Soo Won Seo, et Jae J. Kim. 2013. « Alginate Hydrogel as a Potential Alternative to Hyaluronic Acid as Submucosal Injection Material ». *Digestive Diseases and Sciences* 58 (6): 1491- 96. doi:10.1007/s10620-012-2555-z.
52. Kauffman, Frederick C. 2004. « Sulfonation in Pharmacology and Toxicology ». *Drug Metabolism Reviews* 36 (3- 4): 823- 43. doi:10.1081/DMR-200033496.
53. Kelman, Dovi, Ellen Kromkowski Posner, Karla J. McDermid, Nicole K. Tabandera, Patrick R. Wright, et Anthony D. Wright. 2012. « Antioxidant Activity of Hawaiian Marine Algae ». *Marine Drugs* 10 (2): 403- 16. doi:10.3390/md10020403.
54. Kendel, Melha, Aurélie Couzinet-Mossion, Michèle Viau, Joël Fleurence, Gilles Barnathan, et Gaëtane Wielgosz-Collin. 2012. « Seasonal Composition of Lipids, Fatty Acids, and Sterols in the Edible Red Alga *Grateloupia Turuturu* ». *Journal of Applied Phycology* 25 (2): 425- 32. doi:10.1007/s10811-012-9876-3.
55. Khalil, Najeh Maissar, Thuane Castro Frabel do Nascimento, Diani Meza Casa, Luciana Facco Dalmolin, Ana Cristina de Mattos, Ivonete Hoss, Marco Aurélio Romano, et Rubiana Mara Mainardes. 2013. « Pharmacokinetics of Curcumin-Loaded PLGA and PLGA-PEG Blend Nanoparticles after Oral Administration in Rats ». *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces* 101 (janvier): 353- 60. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.06.024.
56. Khan, Arshad Ali, Jahanzeb Mudassir, Noratiqah Mohtar, et Yusrida Darwis. 2013. « Advanced drug delivery to the lymphatic system: Lipid-based nanoformulations ». *ResearchGate* 8 (1): 2733- 44. doi:10.2147/IJN.S41521.
57. Kholmanov, Iskandar N., Carl W. Magnuson, Richard Piner, Jin-Young Kim, Ali E. Aliev, Cheng Tan, Tae Young Kim, et al. 2015. « Optical, Electrical, and Electromechanical Properties of Hybrid Graphene/Carbon Nanotube Films ». *Advanced Materials* 27 (19): 3053- 59. doi:10.1002/adma.201500785.
58. Kim, Tae Hyung, Hai Hua Jiang, Yu Seok Youn, Chan Woong Park, Kyung Kook Tak, Seulki Lee, Hyungjun Kim, Sangyong Jon, Xiaoyuan Chen, et Kang Choon Lee. 2011. « Preparation and characterization of water-soluble albumin-bound curcumin nanoparticles with improved antitumor activity ». *International Journal of Pharmaceutics* 403 (1–2): 285- 91. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.10.041.
59. Kotchey, Gregg P., Yong Zhao, Valerian E. Kagan, et Alexander Star. 2013. « Peroxidase-mediated biodegradation of carbon nanotubes in vitro and in vivo ». *Advanced Drug Delivery Reviews, Carbon Nanotubes in Medicine and Biology: Therapy and Diagnostics & Safety and Toxicology*, 65 (15): 1921- 32. doi:10.1016/j.addr.2013.07.007.
60. Ku, Chai Siah, Tho X. Pham, Youngki Park, Bohkyung Kim, Min Sun Shin, Insoo Kang, et Jiyoun Lee. 2013. « Edible blue-green algae reduce the production of pro-inflammatory cytokines by

inhibiting NF- $\kappa$ B pathway in macrophages and splenocytes ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1830 (4): 2981- 88. doi:10.1016/j.bbagen.2013.01.018.

61. Kucheryavy, Pavel, Jibao He, Vijay T. John, Pawan Maharjan, Leonard Spinu, Galina Z. Goloverda, et Vladimir L. Kolesnichenko. 2013. « Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles with Variable Size and an Iron Oxidation State as Prospective Imaging Agents ». *Langmuir* 29 (2): 710- 16. doi:10.1021/la3037007.
62. Kumudha, Anantharajappa, et Ravi Sarada. 2014. « Effect of Different Extraction Methods on Vitamin B12 from Blue Green Algae, *Spirulina Platensis* ». *Pharmaceutica Analytica Acta* 6 (2). doi:10.4172/2153-2435.1000337.
63. Kurtoglu, Yunus E., Raghavendra S. Navath, Bing Wang, Sujatha Kannan, Robert Romero, et Rangaramanujam M. Kannan. 2009. « Poly(amidoamine) dendrimer–drug conjugates with disulfide linkages for intracellular drug delivery ». *Biomaterials* 30 (11): 2112- 21. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.12.054.
64. Lamprecht, Alf, et Jean-Pierre Benoit. 2006. « Etoposide nanocarriers suppress glioma cell growth by intracellular drug delivery and simultaneous P-glycoprotein inhibition ». *Journal of Controlled Release* 112 (2): 208- 13. doi:10.1016/j.jconrel.2006.02.014.
65. Lavoie, C, F Ducros, J Bourque, H Langelier, et J -L Chiasson. 1997. « Glucose metabolism during exercise in man: the role of insulin and glucagon in the regulation of hepatic glucose production and gluconeogenesis ». *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 75 (1): 26- 35. doi:10.1139/y96-161.
66. Li, Haixia, Nan Zhang, Yongwei Hao, Yali Wang, Shasha Jia, Hongling Zhang, Yun Zhang, et Zhenzhong Zhang. 2014. « Formulation of curcumin delivery with functionalized single-walled carbon nanotubes: characteristics and anticancer effects in vitro ». *Drug Delivery* 21 (5): 379- 87. doi:10.3109/10717544.2013.848246.
67. Li, Huige, et Ulrich Förstermann. 2013. « Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease ». *Current Opinion in Pharmacology, Cardiovascular and renal*, 13 (2): 161- 67. doi:10.1016/j.coph.2013.01.006.
68. Li, Huige, Sven Horke, et Ulrich Förstermann. 2014. « Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis ». *Atherosclerosis* 237 (1): 208- 19. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.09.001.
69. Li, Lan, Fadi S. Braitheh, et Razelle Kurzrock. 2005. « Liposome-Encapsulated Curcumin ». *Cancer* 104 (6): 1322- 31. doi:10.1002/cncr.21300.
70. Ling, Daishun, et Taeghwan Hyeon. 2013. « Chemical Design of Biocompatible Iron Oxide Nanoparticles for Medical Applications ». *Small* 9 (9- 10): 1450- 66. doi:10.1002/smll.201202111.

71. Liu, Connie K., et Gregory G. Warr. 2014. « Hexagonal Closest-Packed Spheres Liquid Crystalline Phases Stabilised by Strongly Hydrated Counterions ». *Soft Matter* 10 (1): 83- 87. doi:10.1039/C3SM52339J.
72. Liu, Tingrong, Chen Li, Haige Sun, Tiantian Luo, Ying Tan, Di Tian, et Zhigang Guo. 2014. « Curcumin Inhibits Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression and Enhances Cholesterol Efflux by Suppressing the c-Jun N-Terminal Kinase Pathway in Macrophage ». *Inflammation Research* 63 (10): 841- 50. doi:10.1007/s00011-014-0758-9.
73. Mæhre, Hanne K, Marian K Malde, Karl-Erik Eilertsen, et Edel O Elvevoll. 2014. « Characterization of Protein, Lipid and Mineral Contents in Common Norwegian Seaweeds and Evaluation of Their Potential as Food and Feed ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94 (15): 3281- 90. doi:10.1002/jsfa.6681.
74. Malik, N, R Wiwattanapatapee, R Klopsch, K Lorenz, H Frey, J. W Weener, E. W Meijer, W Paulus, et R Duncan. 2000. « Dendrimers:: Relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of 125I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo ». *Journal of Controlled Release* 65 (1–2): 133- 48. doi:10.1016/S0168-3659(99)00246-1.
75. Mallat, Ziad, Christophe Heymes, Jeanny Ohan, Elisabetta Faggin, Guy Lesèche, et Alain Tedgui. 1999. « Expression of Interleukin-10 in Advanced Human Atherosclerotic Plaques ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 19 (3): 611- 16. doi:10.1161/01.ATV.19.3.611.
76. Mathaes, Roman, Atanas Koulov, Susanne Joerg, et Hanns-Christian Mahler. 2016. « Subcutaneous Injection Volume of Biopharmaceuticals—Pushing the Boundaries ». *Journal of Pharmaceutical Sciences* 105 (8): 2255- 59. doi:10.1016/j.xphs.2016.05.029.
77. Mazzaferro, Silvia, Kawthar Bouchemal, et Gilles Ponchel. 2013. « Oral delivery of anticancer drugs III: formulation using drug delivery systems ». *Drug Discovery Today* 18 (1–2): 99- 104. doi:10.1016/j.drudis.2012.08.007.
78. Mikami, Koji, et Masashi Hosokawa. 2013. « Biosynthetic Pathway and Health Benefits of Fucoxanthin, an Algae-Specific Xanthophyll in Brown Seaweeds ». *International Journal of Molecular Sciences* 14 (7): 13763- 81. doi:10.3390/ijms140713763.
79. Mitchell, J. R., et J. M. V. Blanshard. 1976. « Rheological Properties of Alginate Gels ». *Journal of Texture Studies* 7 (2): 219- 34. doi:10.1111/j.1745-4603.1976.tb01263.x.
80. Mohanan Nair, Manoj, Ruozhi Zhao, Xueping Xie, et Garry X. Shen. 2016. « Impact of glycated LDL on endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells: involvement of transmembrane signaling and endoplasmic reticulum stress ». *Journal of Diabetes and its Complications* 30 (3): 391- 97. doi:10.1016/j.jdiacomp.2016.01.008.

81. Moorthi, C., et K. Kathiresan. 2013. « Curcumin–Piperine/Curcumin–Quercetin/Curcumin–Silibinin dual drug-loaded nanoparticulate combination therapy: A novel approach to target and treat multidrug-resistant cancers ». *Journal of Medical Hypotheses and Ideas* 7 (1): 15- 20. doi:10.1016/j.jmhi.2012.10.005.
82. Morita, Masahiko, Toshio Hayashi, Masayuki Ochiai, Morihiko Maeda, Tomoe Yamaguchi, Koichiro Ina, et Masafumi Kuzuya. 2014. « Oral supplementation with a combination of l-citrulline and l-arginine rapidly increases plasma l-arginine concentration and enhances NO bioavailability ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 454 (1): 53- 57. doi:10.1016/j.bbrc.2014.10.029.
83. Mustafa, Thikra, Yongbin Zhang, Fumiya Watanabe, Alokita Karmakar, Madhu P. Asar, Reginald Little, M. Keith Hudson, Yang Xu, et Alexandru S. Biris. 2013. « Iron Oxide Nanoparticle-Based Radio-Frequency Thermotherapy for Human Breast Adenocarcinoma Cancer Cells ». *Biomaterials Science* 1 (8): 870. doi:10.1039/c3bm60015g.
84. Nakagawa, Hiroko, Katsuyo Shimizu, et Koh-Ichi Yamada. 1999. « Chiral Discrimination in the Transport of Ketoprofen and Ibuprofen Esters through an Aqueous Phase Mediated by Various Serum Albumins ». *Chirality* 11 (5- 6): 516- 19. doi:10.1002/(SICI)1520-636X(1999)11:5/6<516::AID-CHIR27>3.0.CO;2-W.
85. Nakashima, Yutaka, Elaine W. Raines, Andrew S. Plump, Jan L. Breslow, et Russell Ross. 1998. « Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at Atherosclerosis-Prone Sites on the Endothelium in the ApoE-Deficient Mouse ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 18 (5): 842- 51. doi:10.1161/01.ATV.18.5.842.
86. O'Brien, Lori L., et Andrew P. McMahon. 2014. « Induction and patterning of the metanephric nephron ». *Seminars in Cell & Developmental Biology, Development of the urogenital system & mTOR Signalling & Tight Junctions in Health and Disease*, 36 (décembre): 31- 38. doi:10.1016/j.semcdb.2014.08.014.
87. Oerlemans, Chris, Wouter Bult, Mariska Bos, Gert Storm, J. Frank W. Nijssen, et Wim E. Hennink. 2010. « Polymeric Micelles in Anticancer Therapy: Targeting, Imaging and Triggered Release ». *Pharmaceutical Research* 27 (12): 2569- 89. doi:10.1007/s11095-010-0233-4.
88. Paques, Jerome P., Erik van der Linden, Cees J.M. van Rijn, et Leonard M.C. Sagis. 2014. « Preparation Methods of Alginate Nanoparticles ». *Advances in Colloid and Interface Science* 209 (juillet): 163- 71. doi:10.1016/j.cis.2014.03.009.
89. Park, Eun-Jung, et John M. Pezzuto. 2013. « Antioxidant Marine Products in Cancer Chemoprevention ». *Antioxidants & Redox Signaling* 19 (2): 115- 38. doi:10.1089/ars.2013.5235.
90. Pereira, Rúben, Anabela Carvalho, Daniela C. Vaz, M. H. Gil, Ausenda Mendes, et Paulo Bártole. 2013. « Development of novel alginate based hydrogel films for wound healing applications ».

91. Peschel, Dieter, Ramona Koerting, et Norbert Nass. 2007. « Curcumin induces changes in expression of genes involved in cholesterol homeostasis ». *The Journal of Nutritional Biochemistry* 18 (2): 113- 19. doi:10.1016/j.jnutbio.2006.03.007.
92. Philip, Justin, Byoungwook Bang, Tri Phan, et Lenard Lichtenberger. 2015. « Aspirin (ASA) Absorption In Rats Is Much Greater in Stomach vs Duodenum ». *The FASEB Journal* 29 (1 Supplement): 779.1.
93. Pisoschi, Aurelia Magdalena, et Aneta Pop. 2015. « The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review ». *European Journal of Medicinal Chemistry* 97 (juin): 55- 74. doi:10.1016/j.ejmech.2015.04.040.
94. Prasad, Sahdeo, Amit K. Tyagi, et Bharat B. Aggarwal. 2014. « Recent Developments in Delivery, Bioavailability, Absorption and Metabolism of Curcumin: The Golden Pigment from Golden Spice ». *Cancer Research and Treatment* 46 (1): 2- 18. doi:10.4143/crt.2014.46.1.2.
95. Probst, Christine E., Pavel Zrazhevskiy, Vaishali Bagalkot, et Xiaohu Gao. 2013. « Quantum dots as a platform for nanoparticle drug delivery vehicle design ». *Advanced Drug Delivery Reviews, Inorganic nanoparticle platforms*, 65 (5): 703- 18. doi:10.1016/j.addr.2012.09.036.
96. Pugeat, Michel M., James F. Dunn, et Bruce C. Nisula. 1981. « Transport of Steroid Hormones: Interaction of 70 Drugs with Testosterone-Binding Globulin and Corticosteroid-Binding Globulin in Human Plasma ». *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 53 (1): 69- 75. doi:10.1210/jcem-53-1-69.
97. Rachmawati, Heni, Citra Ariani Edityaningrum, et Rachmat Mauludin. 2013. « Molecular Inclusion Complex of Curcumin- $\beta$ -Cyclodextrin Nanoparticle to Enhance Curcumin Skin Permeability from Hydrophilic Matrix Gel ». *AAPS PharmSciTech* 14 (4): 1303- 12. doi:10.1208/s12249-013-0023-5.
98. Ragupathi Raja Kannan, Rengasamy, Radjasagarin Arumugam, Thirunavukarasu Thangaradjou, et Perumal Anantharaman. 2013. « Phytochemical constituents, antioxidant properties and p-coumaric acid analysis in some seagrasses ». *Food Research International* 54 (1): 1229- 36. doi:10.1016/j.foodres.2013.01.027.
99. Ramasamy, Ravichandran, Shi Fang Yan, et Ann Marie Schmidt. 2011. « Receptor for AGE (RAGE): Signaling Mechanisms in the Pathogenesis of Diabetes and Its Complications ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1243 (décembre): 88. doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06320.x.
100. Ramírez-Tortosa, M. C., M. D. Mesa, M. C. Aguilera, J. L. Quiles, L. Baró, C. L. Ramirez-Tortosa, E. Martinez-Victoria, et A. Gil. 1999. « Oral administration of a turmeric extract



inhibits LDL oxidation and has hypocholesterolemic effects in rabbits with experimental atherosclerosis ». *Atherosclerosis* 147 (2): 371- 78. doi:10.1016/S0021-9150(99)00207-5.

101. Reynal L, Taura L Barr. 2015. « Systemic Transcriptional Alterations of Innate and Adaptive Immune Signaling Pathways in Atherosclerosis, Ischemia Stroke, and Myocardial Infarction ». *Journal of Bioanalysis & Biomedicine* 07 (02). doi:10.4172/1948-593X.1000120.
102. Roberts, Christian K., et Kunal K. Sindhu. 2009. « Oxidative stress and metabolic syndrome ». *Life Sciences* 84 (21–22): 705- 12. doi:10.1016/j.lfs.2009.02.026.
103. Rosen, Joshua E., Lorena Chan, Dar-Bin Shieh, et Frank X. Gu. 2012. « Iron oxide nanoparticles for targeted cancer imaging and diagnostics ». *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 8 (3): 275- 90. doi:10.1016/j.nano.2011.08.017.
104. Rösler, Annette, Guido W. M Vandermeulen, et Harm-Anton Klok. 2001. « Advanced drug delivery devices via self-assembly of amphiphilic block copolymers ». *Advanced Drug Delivery Reviews, Polymeric Materials for Advanced Drug Delivery*, 53 (1): 95- 108. doi:10.1016/S0169-409X(01)00222-8.
105. Rowland, Andrew, John O. Miners, et Peter I. Mackenzie. 2013. « The UDP-glucuronosyltransferases: Their role in drug metabolism and detoxification ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45 (6): 1121- 32. doi:10.1016/j.biocel.2013.02.019.
106. Ruge, Christian A, Julian Kirch, et Claus-Michael Lehr. 2013. « Pulmonary drug delivery: from generating aerosols to overcoming biological barriers—therapeutic possibilities and technological challenges ». *The Lancet Respiratory Medicine* 1 (5): 402- 13. doi:10.1016/S2213-2600(13)70072-9.
107. Sabeena Farvin, K. H., et Charlotte Jacobsen. 2013. « Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast ». *Food Chemistry* 138 (2–3): 1670- 81. doi:10.1016/j.foodchem.2012.10.078.
108. Sachdeva, Mamta, Maninder Karan, Tejvir Singh, et Sameer Dhingra. 2014. « Oxidants and Antioxidants in Complementary and Alternative Medicine: A Review ». *Spatula DD - Peer Reviewed Journal on Complementary Medicine and Drug Discovery* 4 (1): 1. doi:10.5455/spatula.20140131074751.
109. Sackett, Dan L., et J. Wolff. 1987. « Nile red as a polarity-sensitive fluorescent probe of hydrophobic protein surfaces ». *Analytical Biochemistry* 167 (2): 228- 34. doi:10.1016/0003-2697(87)90157-6.
110. Sahebkar, Amirhossein. 2014. « A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials investigating the effects of curcumin on blood lipid levels ». *Clinical Nutrition* 33 (3): 406- 14. doi:10.1016/j.clnu.2013.09.012.

111. Samorì, Cristian, Hanene Ali-Boucetta, Raquel Sainz, Chang Guo, Francesca Maria Toma, Chiara Fabbro, Tatiana da Ros, Maurizio Prato, Kostas Kostarelos, et Alberto Bianco. 2010. « Enhanced Anticancer Activity of Multi-Walled Carbon Nanotube–methotrexate Conjugates Using Cleavable Linkers ». *Chemical Communications* 46 (9): 1494-96. doi:10.1039/B923560D.
112. Santi, Claudio, Daniela Coppetta, Stefano Santoro, Giuseppe Basta, Pia Montanucci, Leda Racanicchi, et Riccardo Calafiore. 2008. « NMR Analysis of Non Hydrolyzed Samples of Sodium Alginate ». In *12th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry ECSOC-12*, 1–10. [https://usc.es/congresos/ecsoc/12/hall\\_f\\_PSC/f1002/f1002.pdf](https://usc.es/congresos/ecsoc/12/hall_f_PSC/f1002/f1002.pdf).
113. Sarei, F., N. Mohammadpour Dounighi, H. Zolfagharian, P. Khaki, et S. Moradi Bidhendi. 2013. « Alginate Nanoparticles as a Promising Adjuvant and Vaccine Delivery System ». *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 75 (4): 442- 49. doi:10.4103/0250-474X.119829.
114. Schmid, Matthias, Freddy Guihéneuf, et Dagmar B. Stengel. 2016. « Evaluation of food grade solvents for lipid extraction and impact of storage temperature on fatty acid composition of edible seaweeds *Laminaria digitata* (Phaeophyceae) and *Palmaria palmata* (Rhodophyta) ». *Food Chemistry* 208 (octobre): 161- 68. doi:10.1016/j.foodchem.2016.03.123.
115. Schmitz, Boris, Peter Vischer, Eva Brand, Klaus Schmidt-Petersen, Adelheid Korb-Pap, Katrin Guske, Johanna Nedele, et al. 2013. « Increased monocyte adhesion by endothelial expression of VCAM-1 missense variation in vitro ». *Atherosclerosis* 230 (2): 185- 90. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2013.07.039.
116. Schmucker, Douglas L. 2012. « Liver Function and Phase I Drug Metabolism in the Elderly ». *Drugs & Aging* 18 (11): 837- 51. doi:10.2165/00002512-200118110-00005.
117. Sharma, Amarnath, et Uma S. Sharma. 1997. « Liposomes in drug delivery: Progress and limitations ». *International Journal of Pharmaceutics* 154 (2): 123- 40. doi:10.1016/S0378-5173(97)00135-X.
118. Sharma, Ricky A., Stephanie A. Euden, Sharon L. Platton, Darren N. Cooke, Aisha Shafayat, Heather R. Hewitt, Timothy H. Marczylo, et al. 2004. « Phase I Clinical Trial of Oral Curcumin ». *Clinical Cancer Research* 10 (20): 6847- 54. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0744.
119. Shen, Hong. 2012. « P-gp upregulation may be blocked by natural curcuminoids, a novel class of chemoresistance-preventing agent ». *Molecular Medicine Reports*, septembre. doi:10.3892/mmr.2012.1106.
120. Shoba, G., D. Joy, T. Joseph, M. Majeed, R. Rajendran, et P. S. Srinivas. 1998. « Influence of Piperine on the Pharmacokinetics of Curcumin in Animals and Human Volunteers ». *Planta Medica* 64 (4): 353- 56. doi:10.1055/s-2006-957450.

121. Silva, Tiago H., Anabela Alves, Elena G. Popa, Lara L. Reys, Manuela E. Gomes, Rui A. Sousa, Simone S. Silva, João F. Mano, et Rui L. Reis. 2012. « Marine algae sulfated polysaccharides for tissue engineering and drug delivery approaches ». *Biomatter* 2 (4): 278- 89. doi:10.4161/biom.22947.
122. Singh, A. T., M. Jaggi, D. Khattar, A. Awasthi, S. K. Mishra, S. Tyagi, et A. C. Burman. 2008. « A novel nanopolymer based tumor targeted delivery system for paclitaxel ». *ASCO Meeting Abstracts* 26 (15\_suppl): 11095.
123. Singh, Nivedita, Neelima Singh, Sanjeev Kumar Singh, Ajay Kumar Singh, Deepak Kafle, et Navneet Agrawal. 2012. « Reduced Antioxidant Potential of LDL Is Associated With Increased Susceptibility to LDL Peroxidation in Type II Diabetic Patients ». *International Journal of Endocrinology and Metabolism* 10 (4): 582. doi:10.5812/ijem.5029.
124. Singh, Varun Parkash, Anjana Bali, Nirmal Singh, et Amteshwar Singh Jaggi. 2014. « Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications ». *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology* 18 (1): 1- 14. doi:10.4196/kjpp.2014.18.1.1.
125. Song, Zhicheng, Zhi Yang, Jianjun Yang, Zhengni Liu, Zhiyou Peng, Rui Tang, et Yan Gu. 2013. « Repair of Abdominal Wall Defects In Vitro and In Vivo Using VEGF Sustained-Release Multi-Walled Carbon Nanotubes (MWNT) Composite Scaffolds ». *PLOS ONE* 8 (5): e64358. doi:10.1371/journal.pone.0064358.
126. Stanley, Sarah A., Jennifer E. Gagner, Shadi Damanpour, Mitsukuni Yoshida, Jonathan S. Dordick, et Jeffrey M. Friedman. 2012. « Radio-Wave Heating of Iron Oxide Nanoparticles Can Regulate Plasma Glucose in Mice ». *Science* 336 (6081): 604- 8. doi:10.1126/science.1216753.
127. Steinberg, Daniel. 1997. « Low Density Lipoprotein Oxidation and Its Pathobiological Significance ». *Journal of Biological Chemistry* 272 (34): 20963- 66. doi:10.1074/jbc.272.34.20963.
128. Steinbrecher, Urs P., Hanfang Zhang, et Marilee Lougheed. 1990. « Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis ». *Free Radical Biology and Medicine* 9 (2): 155- 68. doi:10.1016/0891-5849(90)90119-4.
129. Stocker, Roland, et John F. Keane. 2004. « Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis ». *Physiological Reviews* 84 (4): 1381- 1478. doi:10.1152/physrev.00047.2003.
130. Strojek, Krzysztof, Władysław Grzeszczak, Ewa Morawin, Mirosław Adamski, Beata Lacka, Henryk Rudzki, Susanne Schmidt, Christine Keller, et Eberhard Ritz. 1997. « Nephropathy of type II diabetes: Evidence for hereditary factors? » *Kidney International* 51 (5): 1602- 7. doi:10.1038/ki.1997.220.

131. Sun, Dongmei, Xiaoying Zhuang, Xiaoyu Xiang, Yuelong Liu, Shuangyin Zhang, Cunren Liu, Stephen Barnes, William Grizzle, Donald Miller, et Huang-Ge Zhang. 2010. « A Novel Nanoparticle Drug Delivery System: The Anti-Inflammatory Activity of Curcumin Is Enhanced When Encapsulated in Exosomes ». *Molecular Therapy* 18 (9): 1606- 14. doi:10.1038/mt.2010.105.
132. Sun, Jiabei, Chao Bi, Hok Man Chan, Shaoping Sun, Qingwen Zhang, et Ying Zheng. 2013. « Curcumin-loaded solid lipid nanoparticles have prolonged in vitro antitumour activity, cellular uptake and improved in vivo bioavailability ». *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 111 (novembre): 367- 75. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.06.032.
133. Sun, Yan Ping, Yan Ping Sun, Jun Fei Gu, Jun Fei Gu, Xiao Bin Tan, Xiao Bin Tan, Chun Fei Wang, et al. 2016. « Curcumin inhibits advanced glycation end product- induced oxidative stress and inflammatory responses in endothelial cell damage via trapping methylglyoxal ». *Molecular Medicine Reports* 13 (2): 1475- 86.
134. Suresh, Dodda Venkatanna, Honsigere G. Mahesha, A. G. Appu Rao, et Krishnapura Srinivasan. 2007. « Binding of Bioactive Phytochemical Piperine with Human Serum Albumin: A Spectrofluorometric Study ». *Biopolymers* 86 (4): 265- 75. doi:10.1002/bip.20735.
135. Taboada, M. C., R. Millán, et M. I. Miguez. 2012. « Nutritional Value of the Marine Algae Wakame (*Undaria Pinnatifida*) and Nori (*Porphyra Purpurea*) as Food Supplements ». *Journal of Applied Phycology* 25 (5): 1271- 76. doi:10.1007/s10811-012-9951-9.
136. Teixeira, Zaine, Cécile A. Dreiss, M. J. Lawrence, Richard K. Heenan, Daisy Machado, Giselle Z. Justo, Sílvia S. Guterres, et Nelson Durán. 2012. « Retinyl palmitate polymeric nanocapsules as carriers of bioactives ». *Journal of Colloid and Interface Science* 382 (1): 36- 47. doi:10.1016/j.jcis.2012.05.042.
137. Thomas, Noel Vinay, et Se-Kwon Kim. 2013. « Beneficial Effects of Marine Algal Compounds in Cosmeceuticals ». *Marine Drugs* 11 (1): 146. doi:10.3390/md11010146.
138. Tibbetts, Sean M., Joyce E. Milley, et Santosh P. Lall. 2016. « Nutritional Quality of Some Wild and Cultivated Seaweeds: Nutrient Composition, Total Phenolic Content and in Vitro Digestibility ». *Journal of Applied Phycology*, mai, 1- 11. doi:10.1007/s10811-016-0863-y.
139. Trajkovski, B., A. Petersen, C. Perka, N. Scharnagl, C. Wischke, W. Wagermaier, A. Lendlein, et G. N. Duda. 2013. « Local Drug Delivery by Personalized, Intraoperative Custom-Made Implant Coating ». *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 101B (6): 950- 63. doi:10.1002/jbm.b.32900.
140. Tse, F. L. S., F. Ballard, et J. Skinn. 1982. « Estimating the Fraction Reabsorbed in Drugs Undergoing Enterohepatic Circulation ». *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* 10 (4): 455- 61. doi:10.1007/BF01065175.

141. Vatieer, C., et B. Fève. 2010. « Place des produits de glycation avancés (AGEs) dans les complications du diabète: Advanced glycation end products (AGEs) and diabetic complications ». *Médecine des Maladies Métaboliques* 4 (6): 637- 42. doi:10.1016/S1957-2557(10)70156-5.
142. Velde, F. van de, S. H. Knutsen, A. I. Usov, H. S. Rollema, et A. S. Cerezo. 2002. « <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry ». *Trends in Food Science & Technology* 13 (3): 73- 92. doi:10.1016/S0924-2244(02)00066-3.
143. Venkatesan, Jayachandran, Ira Bhatnagar, Panchanathan Manivasagan, Kyong-Hwa Kang, et Se-Kwon Kim. 2015. « Alginate composites for bone tissue engineering: A review ». *International Journal of Biological Macromolecules* 72 (janvier): 269- 81. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.07.008.
144. Wang, Hui-Min David, Ching-Chun Chen, Pauline Huynh, et Jo-Shu Chang. 2015. « Exploring the potential of using algae in cosmetics ». *Bioresource Technology, Advances in biofuels and chemicals from algae*, 184 (mai): 355- 62. doi:10.1016/j.biortech.2014.12.001.
145. Wang, Tao, Qisheng Gu, Jun Zhao, Jiakai Mei, Mingzhe Shao, Ye Pan, Jian Zhang, Haisheng Wu, Zhen Zhang, et Fang Liu. 2015. « Calcium Alginate Enhances Wound Healing by up-Regulating the Ratio of Collagen Types I/III in Diabetic Rats ». *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8 (6): 6636.
146. Wang, Tao, Rósa Jónsdóttir, Haiyan Liu, Liwei Gu, Hordur G. Kristinsson, Sivakumar Raghavan, et Gudrún Ólafsdóttir. 2012. « Antioxidant Capacities of Phlorotannins Extracted from the Brown Algae *Fucus vesiculosus* ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (23): 5874- 83. doi:10.1021/jf3003653.
147. Wang, Zhongyuan, Yue Zhao, Yan Jiang, Wei Lv, Lin Wu, Baoyan Wang, Lingyan Lv, Qunwei Xu, et Hongliang Xin. 2015. « Enhanced anti-ischemic stroke of ZL006 by T7-conjugated PEGylated liposomes drug delivery system ». *Scientific Reports* 5 (juillet): 12651. doi:10.1038/srep12651.
148. Wasan, Kishor M., Dion R. Brocks, Stephen D. Lee, Kristina Sachs-Barrable, et Sheila J. Thornton. 2008. « Impact of Lipoproteins on the Biological Activity and Disposition of Hydrophobic Drugs: Implications for Drug Discovery ». *Nature Reviews Drug Discovery* 7 (1): 84- 99. doi:10.1038/nrd2353.
149. Wilkinson, Grant R., et David G. Shand. 1975. « A Physiological Approach to Hepatic Drug Clearance ». *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 18 (4): 377- 90. doi:10.1002/cpt1975184377.
150. Willoughby, Darryn S. 2015. « Intracellular Mechanistic Role of Nitric Oxide: A Comparative Analysis of the Effectiveness of L-Arginine and L-Citrulline Supplementation on

- Nitric Oxide Synthesis and Subsequent Exercise Performance in Humans » 2 (1). <http://www.omegaonline.org/article-details/Intracellular-Mechanistic-Role-of-Nitric-Oxide--A-Comparative-Analysis-of-the-Effectiveness-of-L-Arginine-and-L-Citrulline-Supplementation-on-Nitric-Oxide-Synthesis-and-Subsequent-Exercise-Performance-in-Humans/118>.
151. Wrighton, Steven A., et Jeffrey C. Stevens. 1992. « The Human Hepatic Cytochromes P450 Involved in Drug Metabolism ». *Critical Reviews in Toxicology* 22 (1): 1- 21. doi:10.3109/10408449209145319.
  152. Wu, Gang, Karren L. More, Ping Xu, Hsing-Lin Wang, Magali Ferrandon, Arthur J. Kropf, Deborah J. Myers, Shuguo Ma, Christina M. Johnston, et Piotr Zelenay. 2013. « A Carbon-Nanotube-Supported Graphene-Rich Non-Precious Metal Oxygen Reduction Catalyst with Enhanced Performance Durability ». *Chemical Communications* 49 (32): 3291- 93. doi:10.1039/C3CC39121C.
  153. Xu, Wei, Weiping Jin, Chunlan Zhang, Zhenshun Li, Liufeng Lin, Qing Huang, Shuxin Ye, et Bin Li. 2014. « Curcumin loaded and protective system based on complex of  $\kappa$ -carrageenan and lysozyme ». *Food Research International* 59 (mai): 61- 66. doi:10.1016/j.foodres.2014.01.059.
  154. Yagiela, John A., Frank J. Dowd, Bart Johnson, Angelo Mariotti, et Enid A. Neidle. 2010. *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry*. Elsevier Health Sciences.
  155. Yoshida, Yasukazu, Aya Umeno, et Mototada Shichiri. 2013. « Lipid peroxidation biomarkers for evaluating oxidative stress and assessing antioxidant capacity *in vivo* ». *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 52 (1): 9- 16. doi:10.3164/jcbtn.12-112.
  156. Yu, Xiao-Hua, Yu-Chang Fu, Da-Wei Zhang, Kai Yin, et Chao-Ke Tang. 2013. « Foam cells in atherosclerosis ». *Clinica Chimica Acta* 424 (septembre): 245- 52. doi:10.1016/j.cca.2013.06.006.
  157. Yuhas, John M. 1980. « Active versus Passive Absorption Kinetics as the Basis for Selective Protection of Normal Tissues by S-2-(3-Aminopropylamino)-Ethylphosphorothioic Acid ». *Cancer Research* 40 (5): 1519- 24.
  158. Zheng, Cai-Mei, Wen-Ya Ma, Chia-Chao Wu, et Kuo-Cheng Lu. 2012. « Glycated Albumin in Diabetic Patients with Chronic Kidney Disease ». *Clinica Chimica Acta* 413 (19- 20): 1555- 61. doi:10.1016/j.cca.2012.04.025.
  159. Zubia, Mayalen, Marie Sophie Fabre, Véronique Kerjean, Klervi Le Lann, Valérie Stiger-Pouvreau, Marilyne Fauchon, et Eric Deslandes. 2009. « Antioxidant and Antitumoural Activities of Some Phaeophyta from Brittany Coasts ». *Food Chemistry* 116 (3): 693- 701. doi:10.1016/j.foodchem.2009.03.025.

160. Zubia, Mayalen, Daniel Robledo, et Yolanda Freile-Pelegrin. 2007. « Antioxidant Activities in Tropical Marine Macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico ». *Journal of Applied Phycology* 19 (5): 449- 58. doi:10.1007/s10811-006-9152-5.

# Fonctionnalisation de biopolymères extraits de macroalgues pour véhiculer des principes actifs hydrophobes

## Résumé

Le diabète est caractérisé par une hyperglycémie chronique mais également par un stress oxydant et une inflammation chronique conduisant à des complications cardiovasculaires telles que l'athérosclérose.

La curcumine est un polyphénol connu pour ses propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. Elle est capable de neutraliser les radicaux libres et les médiateurs inflammatoires impliqués dans le développement des maladies métaboliques. De ce fait, la curcumine peut avoir une action préventive contre le diabète de type 2 et ses complications cardiovasculaires.

Cependant la curcumine, comme de nombreux médicaments hydrophobes, est très peu absorbée dans l'organisme. De plus sa métabolisation et son élimination rapide de l'organisme limite ses effets thérapeutiques.

Ainsi ce travail de thèse a consisté à mettre en place un système de vectorisation pour le transport de molécules hydrophobes comme la curcumine en utilisant les carraghénanes, des polysaccharides de macroalgues. Pour ce faire, les polysaccharides ont été tout d'abord extraits des macroalgues issues des Mascareignes en mettant en place et en optimisant un protocole d'éco-extraction. Ces polysaccharides ont ensuite été caractérisés par RMN puis fonctionnalisés pour former des micelles de taille nanométrique. Nos résultats montrent que ces nanovecteurs sont biodégradables, non toxiques et permettent d'améliorer l'introduction de la curcumine dans des cellules endothéliales humaines, ainsi que d'accroître ses propriétés anti-inflammatoires. Ces nanomicelles représentent donc potentiellement un moyen de transport prometteur de médicaments hydrophobes tels que la curcumine.

**Mots Clés :** Macroalgues, alginates, carraghénanes, micelles, curcumine, anti-inflammatoire, diabète, athérosclérose

## Abstract

Diabetes is characterized by high blood glucose but also by an oxidative stress and a chronic inflammation which lead to cardiovascular complications like atherosclerosis.

Curcumin is a polyphenol known for its antioxidant and anti-inflammatory properties. It can react against free radical and downregulate inflammatory factors involved in the development of metabolic diseases. Therefore, curcumin can prevent the occurrence of type 2 diabetes and its cardiovascular complications.

However, as many others hydrophobic drugs, curcumin is poorly incorporated in the body. Furthermore, its rapid biotransformation and elimination from the body limit its therapeutic effects.

This PhD work consisted in the development of a drug delivery device for hydrophobic drugs like curcumin using carrageenans which are polysaccharide from seaweeds. For this, carrageenans were first extracted from seaweeds of the Mascarene Islands by implementing and optimizing an eco-extraction protocol. After their characterization by NMR and these polysaccharides were then functionalized to form nanometric micelles. Our results showed that these biodegradable nanomicelles were non-toxic and allowed the enhancement of curcumin uptake by human endothelial cells and its anti-inflammatory properties. They thus potentially represent a promising device for drug delivery such as curcumin.

**Keywords:** seaweeds, alginates, carrageenans, micelles, curcumin, anti-inflammatory, diabetes, atherosclerosis





**POLE RECHERCHE**  
Ecoles Doctorales

### LETTRE D'ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT

Je, soussigné(e) .....Latufa YOUSOUF.....  
en ma qualité de doctorant(e) de l'Université de La Réunion, déclare être conscient(e) que le plagiat est un acte délictueux passible de sanctions disciplinaires. Aussi, dans le respect de la propriété intellectuelle et du droit d'auteur, je m'engage à systématiquement citer mes sources, quelle qu'en soit la forme (textes, images, audiovisuel, internet), dans le cadre de la rédaction de ma thèse et de toute autre production scientifique, sachant que l'établissement est susceptible de soumettre le texte de ma thèse à un logiciel anti-plagiat.

Fait à ....Sainte-Clotilde....., le (date) ...11 novembre 2016.....

Signature :

**Extrait du Règlement intérieur de l'Université de La Réunion**  
(validé par le Conseil d'Administration en date du 11 décembre 2014)

**Article 9. Protection de la propriété intellectuelle – Faux et usage de faux, contrefaçon, plagiat**

L'utilisation des ressources informatiques de l'Université implique le respect de ses droits de propriété intellectuelle ainsi que ceux de ses partenaires et plus généralement, de tous tiers titulaires de tels droits.

En conséquence, chaque utilisateur doit :

- utiliser les logiciels dans les conditions de licences souscrites ;
- ne pas reproduire, copier, diffuser, modifier ou utiliser des logiciels, bases de données, pages Web, textes, images, photographies ou autres créations protégées par le droit d'auteur ou un droit privatif, sans avoir obtenu préalablement l'autorisation des titulaires de ces droits.

**La contrefaçon et le faux**

Conformément aux dispositions du code de la propriété intellectuelle, toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle d'une œuvre de l'esprit faite sans le consentement de son auteur est illicite et constitue un délit pénal.

L'article 444-1 du code pénal dispose : « Constitue un faux toute altération frauduleuse de la vérité, de nature à causer un préjudice et accomplie par quelque moyen que ce soit, dans un écrit ou tout autre support d'expression de la pensée qui a pour objet ou qui peut avoir pour effet d'établir la preuve d'un droit ou d'un fait ayant des conséquences juridiques ».

L'article L335\_3 du code de la propriété intellectuelle précise que : « Est également un délit de contrefaçon toute reproduction, représentation ou diffusion, par quelque moyen que ce soit, d'une œuvre de l'esprit en violation des droits de l'auteur, tels qu'ils sont définis et réglementés par la loi. Est également un délit de contrefaçon la violation de l'un des droits de l'auteur d'un logiciel (...) ».

**Le plagiat** est constitué par la copie, totale ou partielle d'un travail réalisé par autrui, lorsque la source empruntée n'est pas citée, quel que soit le moyen utilisé. Le plagiat constitue une violation du droit d'auteur (au sens des articles L 335-2 et L 335-3 du code de la propriété intellectuelle). Il peut être assimilé à un délit de contrefaçon. C'est aussi une faute disciplinaire, susceptible d'entraîner une sanction.

Les sources et les références utilisées dans le cadre des travaux (préparations, devoirs, mémoires, thèses, rapports de stage...) doivent être clairement citées. Des citations intégrales peuvent figurer dans les documents rendus, si elles sont assorties de leur référence (nom d'auteur, publication, date, éditeur...) et identifiées comme telles par des guillemets ou des italiques.

Les délits de contrefaçon, de plagiat et d'usage de faux peuvent donner lieu à une sanction disciplinaire indépendante de la mise en œuvre de poursuites pénales.