



HAL
open science

**Formulation, développement et validation de systèmes
particulaires d'insuline en vue de leur administration
par voie orale**
Mouhamadou Diop

► **To cite this version:**

Mouhamadou Diop. Formulation, développement et validation de systèmes particuliers d'insuline en vue de leur administration par voie orale. Pharmacie galénique. Université de Strasbourg, 2015. Français. NNT : 2015STRAJ081 . tel-01681651v2

HAL Id: tel-01681651

<https://theses.hal.science/tel-01681651v2>

Submitted on 11 Jan 2018

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

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

Université de Strasbourg

Ecole doctorale Sciences de la vie et de la santé

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

Soutenue publiquement le 18 décembre 2015 par

DIOP Mouhamadou

Formulation, développement et validation de systèmes particuliers d'insuline en vue de leur administration par voie orale.

Membres du jury

Mme Séverine SIGRIST	Centre européen d'étude du Diabète	Directrice de thèse
M. Yves FRERE	Institut Charles Sadron (CNRS UPR 22)	Co-directeur de thèse
M. Gilles PONCHEL	Institut Galien Paris-Sud-UMR-CNRS 8612	Rapporteur externe
M. Denis PONCELET	GEPEA UMR CNRS 6144	Rapporteur externe
M. Emmanuel ANDRES	Service de médecine interne CHRU de STRASBOURG	Examineur interne
M. Igor CLAROT	CITHEFOR EA 3452	Examineur externe

Remerciements

Je tiens tout d'abord à adresser un ENORME MERCI à Séverine SIGRIST pour sa confiance, son implication, les centaines d'heures passées à l'encadrement de ce travail de thèse. Au-delà d'être ma directrice de thèse, tu es un modèle et une référence pour moi. Tu as toujours été présente dans tous les moments difficiles que ce soit professionnel ou personnel. J'ai toujours pu trouver une oreille attentive et des conseils judicieux. Le fait de t'avoir côtoyé toutes ces années m'a donné envie de marcher dans tes pas tant sur le plan professionnel qu'humain. « *Quand je serai grand, je veux être comme toi 😊* »

J'adresse mes remerciements à Yves FRERE pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir fait découvrir le domaine de la chimie. Je tiens à te remercier pour ton implication et ton apport à la progression de cette thèse sans oublier les nombreux conseils prodigués pour la rédaction de ce manuscrit ainsi que des rapports et présentations antérieurs.

Un grand merci au Professeur Michel Pinget pour son accueil dans le laboratoire mais surtout pour les encouragements régulièrement adressés à mon égard.

Je remercie le Professeur Gilles PONCHEL (Institut Galien Paris-Sud-UMR-CNRS 8612), le Professeur Denis PONCELET (GEPEA UMR CNRS 6144), le Professeur Emmanuel ANDRES (Service de médecine interne CHRU de STRASBOURG) et le Docteur Igor CLAROT (CITHEFOR EA 3452) d'avoir accepté de siéger au jury et d'évaluer ce travail de thèse.

J'adresse aussi mes remerciements à Christine Vauthier (Université Paris-Sud 11), Khalid Zahouily (Photon & Polymers) et toute l'équipe de Catalent (Etienne, Laurent, Guillaume) pour leur implication et leurs expertises dans l'élaboration de ce projet.

Un grand merci à mon frère Richard qui m'a toujours accompagné, soutenu, guidé et surtout accompagné dans l'élaboration de mon projet professionnel toujours avec enthousiasme. Merci frerot !

Merci Elisa (sœurette) pour ton soutien, ton aide précieuse et tes conseils pour l'amélioration de mes communications afin de me faire comprendre par le commun des mortels.

J'adresse de chaleureux remerciements aux stagiaires Sarah Mevorah et Aurélien Virciglio. Votre implication, votre motivation ainsi que vos personnalités respectivement ont permis d'effectuer de grands pas dans l'avancée du projet dans une atmosphère conviviale.

Un grand merci à Nathalie Auberval et Akkiz Bekel pour votre accueil, votre gentillesse, votre soutien ainsi que pour votre disponibilité. Au-delà de m'avoir formé à de nombreux techniques, vous avez agrémenté mon séjour à l'ICS.

Je remercie Claude (mon Claudio) pour ton aide, ton soutien et surtout ton amitié. De par ton humanité et ton altruisme, tu fais partie des rares personnes dont on a la chance de rencontrer qu'une seule fois dans une vie. Ta bonne humeur communicative est un moteur et une motivation supplémentaire à aller au travail :-D

Spéciale dédicace à ma Harzo « Zabo ». J'ai toujours pu compter sur toi autant pour le travail que pour la vie de tous les jours. Tu es une amie fidèle. Je te remercie infiniment pour tout « you rock ma Zabo ». Tu fais partie des personnes qui m'ont le plus marqué et influencé, tu es un modèle de courage.

Un ENORME merci à Anais (Nanais) pour les franches tranches de rigolades et surtout pour ton amitié.

Merci à Aida pour ton amitié et surtout pour les super moments passés ensemble. Grâce à toi le bureau est toujours animé et surtout propre. ☺

Merci Elodie Czuby la « diva » pour ton amitié et les moments de délire. Je te souhaite plein de succès dans cette thèse qui démarre et espère que tu t'épanouiras dedans au moins autant je l'ai fait.

Je souhaite plein de succès également à Mamadou et Sahla pour leur thèse.

Un grand merci à Romain « Romano » pour tes conseils, ton soutien et de m'avoir aidé à définir mon projet professionnel et de surtout d'avoir soutenu ma candidature au master IPI.

Allan, (dit le beau blond), merci à toi man pour la joie et la bonne humeur que tu distilles dès le matin. Même à 5 heures du matin tu as toujours eu la banane et la volonté de nous faire passer une très bonne journée même si celle-ci était très longue avec peu d'heures de sommeil. Merci encore pour ton soutien et tes encouragements surtout quand les études *in vivo* ne marchaient pas.

Un grand merci à Willis, dit le sauveur, j'ai toujours pu compter sur toi pendant les moments de détresse. Tu m'as lancé la bouée de sauvetage en fin de thèse et ton aide a permis de finir dans les temps.

Un grand merci à Carole « Carolo » également. Tu es un soutien précieux et une amie. Tu m'a toujours apporté ton aide et avec joie. C'est toujours un plaisir de travailler avec toi et de boire un verre après le boulot.

Merci beaucoup à Cynthia « Cynthiti » pour son amitié et son implication dans le projet. Merci beaucoup pour les moments passés pendant les très longs suivis glycémiques.

Un grand merci à Stephanie « Stéphy », merci pour les super moments passés pendant les soirées du CeeD, pour ton soutien, tes encouragements, ta gentillesse et l'intérêt que tu portes au caractère humain de ma personne.

Un grand merci à Elo pour son aide pendant les manips ainsi que pour sa bonne humeur.

Merci beaucoup à Carine pour ta gentillesse et ton sourire.

Merci à Claudine Ebel pour son assistance, sa patience pour la réalisation des études en cytométrie en flux.

Merci beaucoup à Nathalie pour la bonne humeur, les encouragements et à qui j'ai laissé un super souvenir en emboutissant sa voiture 2 jours après l'obtention de mon permis. ☺

Un grand merci à l'équipe Defymed (Aladin, Jordan, Fred, Charles Thibaut) pour leur gentillesse et la bonne humeur qu'ils nous amènent tous les jours au laboratoire.

Un grand merci à Thierry et Claude Seyller pour leur gentillesse et leur disponibilité à chaque fois que j'ai fait appel à eux.

Je remercie également toute l'équipe ASDIA, ETP et REDOM pour leur sourire et leur bonne humeur.

Un grand merci à Éric Marchioni et son équipe (Diane et Minjie) pour leur accueil et surtout pour leur aide précieuse à la réalisation des dosages de l'insuline par HPLC.

Merci beaucoup à Christian Blanck qui a réalisé les clichés au MET pour moi. Merci pour ta disponibilité, ta patience et ta bonne humeur.

Merci beaucoup au Dr Schoessler qui m'a apporté son aide pendant que le chitosane me rendait fou.

Un grand merci à Jean Marc c'est toujours un plaisir d'être accueilli par un sourire et un petit mot gentil.

Un grand merci à tous mes amis (Saliou, Aliou, Mayel, Coumba, Nogaye, Dorine, Fabien, Paule, Arnaud, Karine, Thomas, Anne Laure, Philippe, Chantal, Malick, Mathilde, Adrien, Salima, Marouane, Hajer, Théo, Mbayang, Pauline et Remmelt) qui m'ont toujours soutenu et m'ont toujours donné le moral et la volonté d'avancer.

Puis un grand merci à mes sœurs et frères c'est dans votre soutien, votre présence (même à plus de 6000 km) et vos encouragements que je puise l'énergie et la volonté d'avancer.

Un grand merci à tante Khady, à mon oncle Karim, à Daouda et à Bamba Sourang sans qui je n'aurais pas pu venir étudier en France.

Je n'oublie pas de témoigner ma gratitude à Seynabou qui a partagé cette aventure avec moi et qui a toujours été présente pour les moments de joie comme de peine.

J'adresse toute ma gratitude et toutes mes pensées à mes parents, vous qui aurez aimé assister à l'aboutissement de ce travail. Je dédie cette thèse à votre mémoire.

SOMMAIRE

Liste des figures	I
Liste des tableaux	V
Liste des abréviations	VI
I. Introduction générale.....	1
II. Introduction bibliographique.....	6
1. Insuline, pancréas et insulinosécrétion.....	6
1.1. Physiologie et régulation de la glycémie.....	6
1.2. L'insuline.....	7
1.2.1. Biosynthèse et sécrétion.....	7
1.2.2. Mécanisme d'action.....	10
1.3. Profil de sécrétion physiologique de l'insuline.....	12
2. Diabète.....	13
2.1. Définition et épidémiologie.....	13
2.2. Types de diabète.....	14
2.2.1. Le diabète de type 1.....	14
2.2.2. Le diabète de type 2.....	15
2.2.3. Le diabète gestationnel.....	17
2.3. Les complications du diabète.....	18
3. La prise en charge du diabète.....	19
3.1. Mise en place de mesures hygiéno-diététiques.....	19
3.2. Les antidiabétiques oraux.....	19
3.2.1. Les sulfamides hypoglycémiants et les glinides.....	19
3.2.2. Les biguanides : exemple de la metformine (Glucophage®).....	21
3.2.3. Les inhibiteurs des α -glucosidases.....	22
3.2.4. Les incrétinomimétiques.....	22
3.3. Insulinothérapie.....	25
3.3.1. Schéma de l'insulinothérapie.....	25
3.3.2. Insulines développées par l'industrie pharmaceutique.....	26
3.3.3. Les dispositifs d'administration de l'insuline.....	31
3.3.4. Les techniques d'insulinothérapie.....	33
3.4. Voies d'administration de l'insuline.....	34

3.4.1.	La voie buccale / sublinguale	35
3.4.2.	La voie pulmonaire.....	37
3.4.3.	La voie nasale.....	42
3.4.4.	La voie rectale	44
3.4.5.	La voie transdermique	44
3.4.6.	La voie orale.....	49
3.4.7.	Bilan des voies d'administration	50
3.5.	Limites de l'administration orale d'insuline	51
3.5.1.	Les contraintes chimiques	52
3.5.2.	Les contraintes physiques.....	52
3.5.3.	Les méthodes permettant de surmonter les contraintes physico-chimiques	54
3.5.4.	La coacervation complexe.....	60
3.5.5.	La double émulsion évaporation de solvant	69
3.5.6.	Limite des systèmes nanoparticulaires à l'administration orale.....	74
3.5.7.	Nanotechnologie et affaires réglementaires	74
4.	Encapsulation de l'insuline pour administration <i>per os</i>	76
4.1.	Solution proposée dans la littérature	77
4.2.	Solution proposée par dans le consortium ORAIL	77
5.	Objectif de la thèse	78
III.	Matériel et méthode.....	79
1.	Préparation des nanoparticules de chitosane	79
1.1.	Matériel	79
1.2.	Formation d'un polyélectrolyte complexe	80
1.3.	La réticulation	81
1.4.	La lyophilisation.....	82
1.5.	Combinaison des deux approches	83
2.	Préparation des particules par double émulsion évaporation de solvant	84
2.1.	Matériel	84
2.2.	Double émulsion évaporation de solvant	84
3.	Caractérisation	88
3.1.	Mesure de la taille	88
3.2.	Mesure de la charge globale de surface	89
3.3.	Analyse au MET (Microscope Electronique à Transmission)	90
3.4.	Détermination de l'efficacité d'encapsulation	90
3.5.	Profil de libération de l'insuline encapsulée	92
3.6.	Profil de libération dans les milieux simulés	92

3.7.	Vieillessement dans le temps	93
3.8.	Purification des nanoparticules	93
4.	Formulation du vecteur pharmaceutique complexe.....	93
5.	Validation <i>in vitro</i>	94
5.1.	Matériels.....	94
5.2.	Modèles cellulaires.....	95
5.3.	Evaluation de l'internalisation	95
5.4.	Evaluation de la résistance transépithéliale.....	97
6.	Validation <i>in vivo</i>	98
6.1.	Matériel	98
6.2.	Modèle animal.....	98
6.3.	Implantation de cathéters	99
6.4.	Administration par gavage	101
IV.	Résultats	102
1.	Coacervation complexe	102
1.1.	Introduction	102
1.2.	Discussion générale et conclusion.....	111
2.	Double émulsion évaporation de solvant.....	115
2.1.	Introduction	115
2.2.	Discussion générale et conclusion.....	135
3.	Augmentation de l'échelle de production des nanoparticules de PLGA.....	139
3.1.	Introduction	139
3.2.	Résultats	141
3.2.1.	Augmentation d'échelle	141
3.2.2.	Première phase de synthèse des lots précliniques	142
3.2.3.	Seconde phase de synthèse des lots précliniques	144
3.3.	Conclusion et discussion	148
4.	Validation du vecteur pharmaceutique complexe	150
4.1.	Introduction	150
4.2.	Résultats	151
4.3.	Conclusion.....	154
V.	Conclusion & perspectives	156
VI.	Valorisation des compétences « Nouveau Chapitre de la thèse » NCT®	162
VII.	Bibliographie	181

Listes des figures

Figure 1 : Représentation schématique de la molécule de glycogène.

Figure 2 : Autorégulation physiologique de la glycémie.

Figure 3 : Structure primaire de la molécule d'insuline.

Figure 4 : Représentation schématique de la biosynthèse de l'insuline.

Figure 5 : Mécanisme de l'insulinosécrétion.

Figure 6 : Structure du récepteur à activité tyrosine kinase de l'insuline.

Figure 7 : Voies de signalisation associées au récepteur à activité tyrosine kinase de l'insuline.

Figure 8 : Profil de l'insulinosécrétion chez un sujet sain.

Figure 9 : Prévalence du diabète dans le monde en 2014 par région géographique et projection pour 2035.

Figure 10 : Cycle de destruction des cellules β des îlots de Langerhans par auto immunité.

Figure 11 : Installation progressive du diabète de type 2.

Figure 12 : Schéma récapitulatif des complications liées à l'hyperglycémie chronique.

Figure 13 : Mécanisme d'action des sulfamides hypoglycémiantes (SNH) sur l'insulinosécrétion.

Figure 14 : Mécanisme d'action de la metformine.

Figure 15 : Mécanisme d'action du GLP-1 et de ses analogues.

Figure 16 : Schéma récapitulatif des modalités d'action des antidiabétiques oraux sur le marché.

Figure 17 : Illustration d'une insulinothérapie simple par injection d'insuline exogène.

Figure 18 : Action hypoglycémiante et durée d'action des différents types d'insulines.

Figure 19 : zones de modification sur la séquence d'insuline.

Figure 20 : Représentation schématique d'oligomères d'insuline.

Figure 21 : Comparaison des insulines humaine et ultra lente dégludec.

Figure 22 : Vue éclatée d'un stylo injecteur d'insuline.

Figure 23 : Pompes à insuline disponible sur le marché.

Figure 24 : Insulinothérapie à une injection associée à un hypoglycémiant oral.

Figure 25 : Insulinothérapie à injection pluriquotidienne.

Figure 26 : Voies d'administration des médicaments.

Figure 27 : Représentation schématique de la muqueuse buccale.

Figure 28 : Oral-LynTM (Generex BiotechnologyTM).

Figure 29 : Dispositif Exubera® (Nektar Therapeutics Inc., Pfizer).

Figure 30 : Dispositif TechnosphereTM Insuline (Pharmaceutical discovery corporation Mankind biopharmaceuticals).

Figure 31 : Dispositif AirTM Insuline.

Figure 32 : Dispositif AERX®.

Figure 33 : Dispositif AerodoseTM.

Figure 34 : Histologie de la muqueuse nasale.

Figure 35 : Structure de la peau.

Figure 36 : Perméabilisation de la peau par iontophorèse : exemple du Mesodermil P. ®.

Figure 37 : Perméabilisation de la peau par sonophorèse exemple du Dermafocus 30.

Figure 38 : Exemple d'un dispositif à microaiguille.

Figure 39 : Comparaison de la biodistribution après administration par voie sous-cutanée vs orale.

Figure 40 : pH et composition enzymatique du tractus gastro-intestinal.

Figure 41 : Histologie de l'intestin.

Figure 42 : Voies d'absorption transépithéliale.

Figure 43 : Structures de nanoparticules.

Figure 44 : Schéma récapitulatif des différents types de particules permettant l'encapsulation de principes actifs.

Figure 45 : Principe de la coacervation complexe.

Figure 46 : Structure d'un coacervat complexe entre la gomme arabique et β -lactoglobuline.

Figure 47 : Encapsulation par coacervation complexe entre polyélectrolytes de charges opposées.

Figure 48 : Schématisation de la formation de coacervat complexe.

Figure 49 : Charge globale de l'insuline en fonction du pH.

Figure 50 : Structure primaire du chitosane.

Figure 51 : Protocole de synthèse par double émulsion eau/huile/eau.

Figure 52 : Formule chimique du PLGA.

Figure 53 : Principe de la double encapsulation (brevet CNRS/CeeD WO2004096172).

Figure 54 : Schéma de la molécule du chlorure de chitosane (CL 113).

Figure 55 : Schéma de la molécule d'insuline.

Figure 56 : Représentation schématique de la molécule d'insuline couplée au groupement FITC.

Figure 57 : Schéma de la molécule du tripolyphosphate de sodium.

Figure 58 : Protocole de synthèse des nanoparticules de chitosane/insuline par coacervation complexe.

Figure 59 : Protocole de synthèse des nanoparticules de chitosane/insuline réticulées par coacervation complexe.

Figure 60 : Protocole de lyophilisation des nanoparticules de chitosane/insuline.

Figure 61 : Protocoles de formulation des nanoparticules de chitosane/insuline.

Figure 62 : Représentation schématique de la chaîne de PLGA.

Figure 63 : Protocole de formulation des nanoparticules par double émulsion évaporation de solvant.

Figure 64 : Protocole de recouvrement des nanoparticules avec du chitosane par interaction électrostatique.

Figure 65 : Protocole de synthèse des nanoparticules à l'échelle préindustrielle.

Figure 66 : Principe de la diffusion dynamique de la lumière.

Figure 67 : Principe de base de la mesure du potentiel zêta.

Figure 68 : Principe de la mesure du potentiel zêta.

Figure 69 : Protocole d'évaluation de l'efficacité d'encapsulation.

Figure 70 : Principe de la chromatographie liquide haute performance (CLHP).

Figure 71 : Protocole de formulation des vecteurs pharmaceutique complexe par gélation ionotropique.

Figure 72 : Protocole de mise en place des modèles et culture cellulaire.

Figure 73 : Protocole d'évaluation de l'internalisation par cytométrie en flux.

Figure 74 : Protocole d'extinction de la fluorescence extérieure aux cellules.

Figure 75 : Protocole d'évaluation de la résistance électrique transépithéliale.

Figure 76 : Animal après implantation et tunnélisation.

Figure 77 : Schématisation de l'implantation du cathéter dans le duodénum

Figure 78 : Administration des vecteurs pharmaceutique complexe par gavage chez le rat insulino-pénique.

Figure 79 : Schéma récapitulatif des travaux sur les nanoparticules de chitosane « *Design, characterisation, and bioefficiency of insulin-chitosan nanoparticles after stabilisation by freeze-drying or cross-linking, International Journal of pharmaceutics, 2015.* »

Figure 80 : Schéma récapitulatif des travaux sur la bioadhésion des nanoparticules de PLGA « *Mucoadhesion as a strategy to improve Insulin loaded PLGA particles bioavailability* »

Figure 81: Les phases d'augmentation de l'échelle de production des nanoparticules PLGA/Insuline

Figure 82 : Résumé des étapes prédominantes de l'augmentation de l'échelle de production des nanoparticules.

Figure 83 : Vidange du Becomix après synthèse des nanoparticules encapsulant de l'Insuman®

Figure 84 : Cliches au microscope électronique à transmission des nanoparticules après 4 heures d'évaporation de l'acétate d'éthyle.

Figure 85 : Influence de la quantité de tensioactif sur les propriétés physicochimiques des nanoparticules (évaporation sous flux d'air).

Figure 86 : Influence de la quantité de tensioactif sur l'internalisation des nanoparticules sur les différents modèles in vitro : [A] sur le modèle caco-2 [B] sur le modèle coculture.

Figure 87 : Suivi de l'évolution des nanoparticules PLGA/Insuman en cours de synthèse dans le Becomix.

Figure 88 : Morphologie d'un vecteur pharmaceutique complexe renfermant des nanoparticules.

Figure 89 : Cliché au microscope électronique à transmission des véhicules contenant les nanoparticules formulées grâce au Becomix®

Figure 90 : Etude de stabilité des véhicules renfermant des nanoparticules dans les milieux gastrique et intestinal simulés.

Figure 91 : validation du vecteur complet renfermant les nanoparticules issues de l'augmentation d'échelle.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Récapitulatif des avantages et inconvénients des différentes voies d'administration pour l'insuline.

Tableau 2 : Comparaison des différentes voies d'administration possibles de l'insuline.

Tableau 3 : Récapitulatif des approches développées pour permettre l'administration de l'insuline par voie orale.

Tableau 4 : Comparatif des différentes méthodes de formulation de particules encapsulant des composés bioactifs.

Liste des abréviations

ABAM : antibiotique-antimycotique
ADN : acide désoxyribonucléiques
ADP : adénosine diphosphate
AMPK : AMP-activated protein kinase
ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament
ARN : acide ribonucléique
ATP : adénosine triphosphate
CaCO₃ : carbonate de calcium
CeeD : Centre européen d'étude du Diabète
CL113 : chlorhydrate de chitosane
CLHP : chromatographie liquide haute performance
C_{max} : concentration maximale
CNRS : Centre National de Recherche Scientifique
CO₂ : dioxyde de carbone
CS : chitosane
D1 : première dispersion
D2 : deuxième dispersion
Da : Dalton
DCCT : Diabetes Control and Complications Trial
IFN-β : interféron- β
DL₅₀ : Dose létale 50
DLS : *dynamic light scattering* (diffusion dynamique de la lumière)
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DPP-4 : dipeptidyl peptidase-4
EGTA : ethylene glycol tetra acetic acid
eIF2 / eIF4F : Eukaryotic Initiation Factor 2
EMA : European Medicines Agency
ERK : extracellular signal-regulated kinases
FDA : Food and Drug Administration
FITC : isothiocyanate de fluorescéine
GIP : Gastric inhibitory peptide
GLP-1 : Glucose-Like Peptide 1

Glut2 : Glucose transporter 2
Grb2 : Growth factor receptor-bound protein 2
HbA1c : hémoglobine glyquée
HBSS : Hank's Balanced Salt Solution
HGPO : hyperglycémie provoquée par voie orale
HLB : Hydrophilic-Lipophilic Balance
IADPSG : International Association of Diabetes Pregnancy Study Group
ICS : Institut Charles Sadron
ID : intraduodénale
IFN- α : interféron- α
IMC : indice de masse corporel
IP : intrapéritonéale
IRS : Insulin Receptor Substrate
K_{ATP} : canaux potassium ATP dépendant
L'ICH: International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
LKB1 : Liver kinase B1
MAP : Mitogen-activated protein
MDR : Multi Drug Resistant protein
mTOR : mammalian Target Of Rapamycin
Na₂SO₄ : sulfate de sodium
NaCl : chlorure de sodium
NaHCO₃ : bicarbonate de sodium
NP : Nanoparticules
NPH : Neutral protamine Hagedorn
OCT1 : organic cation transporter 1
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PBS : Phosphate-Buffered Saline
PDI : indice de polydispersité
PDX-1: pancreatic and duodenal homeobox 1
PEG : polyéthylène glycol
P-gp : P-glycoprotéine
PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase

PIP3 : phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate
PLA : l'acide poly lactique
PLGA : acide poly (lactique-co-glycolique)
PnP : Photon & Polymers
ppm : particules par million
PVA : alcool polyvinylique
SAPK2 : Stress Activated protein kinase 2
Shc : Src homology 2/ α collagen-related
SNH: sulfamides hypoglycémiants
SOS: Son Of Sevenless
STZ : streptozotocine
SVF : sérum de veau foetal
TEER : résistance électrique transépithéliale
TNF- α : facteur de nécrose tumoral alpha
TPP : Tripolyphosphate
tr/min : tours par minute
U.K.P.D.S : United Kingdom Prospective Diabetes Study
UI : unité internationale
UV : ultraviolet
ZP : Potentiel Zêta

I. Introduction générale

Les travaux de thèse décrits dans ce manuscrit ont été réalisés entre le Centre européen d'étude du diabète (DIATHEC EA 7294) et l'Institut Charles Sadron (CNRS UPR 22). Cette thèse dont le titre est «Formulation, développement et validation de systèmes particuliers d'insuline en vue de leur administration par voie orale. » vise à développer une nouvelle formulation d'insuline administrable par voie orale afin d'améliorer le contrôle glycémique et la qualité de vie du patient diabétique.

Le fonctionnement optimal de l'organisme requiert un apport constant et régulier d'énergie. Le métabolisme du glucose apporte cette énergie grâce aux glucides apportés par l'alimentation. Cependant, l'organisme doit maintenir une homéostasie glycémique autour de 0.8 gramme par litre de sang. Cette autorégulation pendant l'alternance des phases alimentées et de jeûne se fait grâce au tandem de deux hormones : l'insuline (hypoglycémiante) et le glucagon (hyperglycémiante). Le dérèglement de cette homéostasie est responsable de l'apparition d'un trouble métabolique caractérisé par une concentration importante du glucose circulant : le diabète.

Le diabète est une maladie chronique qui apparaît lorsque le pancréas ne produit pas suffisamment d'insuline ou que l'organisme n'utilise pas correctement l'insuline produite.

L'organisation mondiale de la santé (OMS) définit l'état diabétique chez un patient si sa glycémie à jeun est supérieure à 7 mM (1.26 g/L) ou à 11 mM (2g/L) deux heures après une hyperglycémie provoquée par voie orale. Selon l'OMS, la prévalence du diabète en 2014 à l'échelle mondiale était de 9 % chez les adultes âgés de plus de 18 ans avec plus de 387 millions de personnes touchées. L'organisme estime également que plus d'un million et demi de décès dans le monde sont directement liés au diabète dont 80% dans les pays émergents. Le nombre de personnes touchées dans le monde ne cessent de croître d'année en année. En 2030, le diabète sera la septième cause de mortalité. Cette pathologie se décline sous plusieurs sous types dont les majeurs sont ceux du type 1, du type 2. Le diabète de type 1 apparaît le plus souvent dans l'enfance et concerne 10 % des patients. Cette forme de la pathologie est dite insulino-dépendante. Elle est caractérisée par une abolition totale de production d'insuline à la suite de la destruction auto-immune des cellules β des îlots de Langerhans. Sa prise en charge exige une administration quotidienne d'insuline exogène. Le diabète de type 2 résulte d'une mauvaise utilisation de l'insuline par l'organisme. C'est un diabète dit non insulino-dépendant. Le diabète de type 2 représente 90% des diabétiques rencontrés dans le monde. Il est en grande partie le résultat d'une surcharge pondérale due à la sédentarité et à des facteurs génétiques. La conséquence majeure de l'hyperglycémie chronique liée au diabète est une glucotoxicité qui se traduit par des atteintes vasculaires (micro-et macro angiopathies) et nerveuses (neuropathies).

Chez le patient atteint de diabète, le maintien de la glycémie à des valeurs les plus proches possible des valeurs seuils permet de prévenir l'apparition des complications liées à la glucotoxicité. La prise en charge du diabète se fait par la combinaison de mesures hygiéno-diététiques, de traitements médicamenteux et/ou d'une insulinothérapie.

L'administration de l'insuline est indispensable pour les personnes souffrant de diabète de type 1 et fait partie de l'arsenal thérapeutique des patients atteints de diabète de type 2. L'insulinothérapie a pour objectif d'être le plus proche possible de la sécrétion physiologique d'insuline en respectant le schéma basal/bolus. Ce schéma se base sur un apport basal en insuline qui permet de maintenir une glycémie aussi proche que possible de la normale entre les repas (0,7 à 1,1 g/l) associé à un apport d'insuline rapide au moment des repas (bolus) qui permet d'assimiler les glucides apportés par l'alimentation et d'éviter les pics d'hyperglycémie postprandiaux. Pour parvenir à cet objectif glycémique, plusieurs moyens permettent une insulinothérapie optimisée: la formulation d'insulines à durée d'action modulable et le développement de moyens d'administration comme les pompes à insulines (internes et externes) et les injecteurs parentéraux (stylos, seringues...) permettant une délivrance pluriquotidienne d'insuline. Contraignante pour le mode de vie, l'insulinothérapie par injection n'est pas le traitement le plus confortable pour les patients. En effet, malgré les développements technologiques mis en jeu pour améliorer l'administration de l'insuline (diminution de la taille des aiguilles, stylo injecteurs ...), celle-ci demeure contraignante pour le patient. Cette contrainte peut devenir une limite lors de la prise en charge du patient diabétique (douleurs, réticence aux auto-injections, manque d'autonomie...). Des études ont ainsi été conduites pour développer des modes d'administration par voie non-injectable avec pour but l'amélioration de la qualité de vie du patient et l'optimisation du contrôle glycémique. Ces modes d'administration doivent répondre à un certain nombre de critères comme une simplicité d'utilisation, l'absence de matériel d'injections et enfin permettre le métabolisme de premier passage hépatique de l'insuline administrée plus physiologique. La voie orale est la seule voie d'administration qui répond à l'ensemble de ces critères. Cependant, de par sa nature peptidique, l'administration orale d'insuline est un défi majeur car les contraintes imposées par le tractus gastro-intestinal doivent être surmontées. La première contrainte est de nature chimique : l'acidité de l'estomac, l'activité enzymatique se produisant à la fois dans l'estomac et dans entraînent sa dégradation rapide. La seconde contrainte est de nature physique : l'épithélium intestinal tapissé par du mucus présente la propriété d'être imperméable aux macromolécules. De nombreuses méthodes ont été développées pour surmonter ces contraintes physico-chimiques : les promoteurs d'absorption, les inhibiteurs enzymatiques, les systèmes

mucoadhésifs à base de polymère ou l'encapsulation du principe actif sous forme nanoparticulaire. L'encapsulation est aujourd'hui considérée comme étant l'approche la plus adaptée pour administrer per os des composées labiles comme les protéines. Elle permet de pallier aux contraintes physico-chimiques du tractus gastro-intestinal tout en conservant l'activité biologique du principe actif. Il existe plusieurs méthodes d'encapsulation mais les seules approches qui permettent aujourd'hui d'encapsuler des principes actifs comme des protéines sans risquer de les endommager sont la coacervation complexe et la double émulsion évaporation de solvant. Bien que ces techniques présentent des inconvénients, elles sont les seules à permettre une libération contrôlée du principe actif avec, pour la coacervation complexe une formulation douce sans ajout de tensioactif ou autre stabilisant. De plus, les formulations sont réalisées en milieu aqueux et il est notamment possible pour la double émulsion de retirer le solvant par évaporation ce qui rend ces deux approches d'intérêt en vue d'une utilisation à des fins cliniques.

Cependant, les systèmes nanoparticulaires seuls ne peuvent pas prétendre à la fois de résister au pH acide de l'estomac et au pH plus basique de l'intestin. C'est dans ce contexte que le centre européen d'étude du Diabète en collaboration avec l'Institut Charles Sadron ont déposé en 2002 un brevet concept de double encapsulation. Il s'agit de protéger l'insuline dans l'intestin dans des nanoparticules qui passeront la barrière intestinale et de protéger ces nanoparticules dans l'estomac grâce à une gélule gastrorésistante.

Ce projet a déjà fait l'objet de trois thèses de doctorat. En 2009, Madame Nathalie REIX a développé des systèmes nanoparticulaires d'environ 200 nm en PLGA (acide poly (lactique-co-glycolique)) par double émulsion eau/huile/eau. Cependant, cette formulation offre une biodisponibilité de l'insuline encapsulée assez faible une fois administrée par voie intraduodénale chez un modèle streptozotocine de rat diabétique (Reix et al, 2010). Elle a également pu développer une gélule gastrorésistante qui a permis de faire la preuve de concept du double système d'encapsulation (Reix et al, 2012).

En parallèle, Madame Adeline CALLET a en 2010 mis au point une formulation de nanoparticules par coacervation complexe entre l'insuline et le chitosane. Ces nanoparticules sont cependant instable en milieu biologique ce qui empêche toute validation in vitro et in vivo.

Enfin, en 2012, Madame Pauline GUHMANN démontre la non toxicité des systèmes nanoparticulaires formulés par double émulsion in vitro et identifie la taille requise pour une internalisation optimisée de ces nanoparticules (<200nm). Elle identifie également clairement les modalités de passage de ces nanoparticules qui s'effectue par un mécanisme actif clathrine et caveoline dépendant. Cependant, la biodisponibilité de l'insuline doit encore être optimisée

et il est nécessaire de standardiser la formulation complète du vecteur pharmaceutique complexe.

Cette thèse s'intègre donc dans le cadre du projet Orail (ORal Administration of InsuLin), projet collaboratif qui associe des laboratoires publics (CNRS, Université Paris Sud), et privés (Centre européen d'étude du diabète, Photon & Polymers) ainsi qu'un industriel de la formulation de médicaments (Catalent). Ce projet vise à développer le vecteur pharmaceutique complexe permettant d'administrer l'insuline par voie orale. Il est nécessaire pour cela d'optimiser la biodisponibilité de l'insuline par la formulation de systèmes nanoparticulaires (NPs) soit par la méthode de double émulsion eau/huile/eau en présence de PLGA ou soit par la formation de coacervats en présence de chitosane (coacervation complexe) pour former des nanostructures appelées particules (NP). Ce système nanoparticulaire doit ensuite être lui-même encapsulé dans un véhicule gastrorésistant.

Les objectifs de ces travaux de thèse étaient donc d'une part de mettre en place une méthode permettant de formuler des systèmes nanoparticulaires ayant une biodisponibilité optimisée soit à partir de la technique de coacervation complexe entre l'insuline et le chitosane ou de la double émulsion eau/huile/eau en présence de PLGA et de sélectionner le système de plus pertinent. Pour la méthode de coacervation, il a été nécessaire de développer des approches chimiques stabilisation des coacervats (la réticulation et la lyophilisation ont été privilégiées) afin de valider leur fonctionnalité *in vitro* et *in vivo*. Pour les nanoparticules de PLGA, le travail s'est orienté sur la modification des propriétés de surface des nanoparticules pour potentialiser leur mucoadhésion et leur internalisation. La piste privilégiée a été de modifier la charge de surface de ces NP qui était proche de la neutralité pour les rendre négativement chargées ou positivement chargées. Enfin, afin de formuler le vecteur complexe, les nanoparticules ont été encapsulées dans des véhicules en vue de leur validation biologique et d'une étude toxicologique du système complet.

Les formulations des coacervats et des particules de PLGA mucoadhésives n'ont pas permis de potentialiser activité biologique des systèmes. A l'opposé, les NP présentant une charge de surface négative ont montré leur efficacité à la fois *in vitro* et *in vivo*, et représentent une formulation prometteuse pour l'administration d'insuline orale. Celles-ci doivent cependant être formulées avec une quantité minimale de PVA pour limiter leur agrégation tout en conservant leur propriété biologique.

Cette étape s'est poursuivie par un transfert de technologie chez l'industriel qui a permis d'obtenir des nanoparticules présentant les mêmes caractéristiques physicochimiques que celles synthétisées au laboratoire avec un taux d'encapsulation de 98%. La formulation du vecteur

pharmaceutique complexe (encapsulation dans un vecteur gastrorésistant des nanoparticules) a également permis d'obtenir une réduction de la glycémie chez le modèle streptozotocine de rats diabétique validant ainsi *in vivo* le système complet.

II. Introduction bibliographique

1. Insuline, pancréas et insulinosécrétion

1.1. Physiologie et régulation de la glycémie

Le fonctionnement optimal de l'organisme requiert un apport constant et régulier d'énergie. Cette énergie provient du métabolisme du glucose qui provient lui-même de la dégradation des glucides apportés par l'alimentation au niveau de l'intestin. Après son absorption par les entérocytes, il rejoint la circulation portale puis les hépatocytes au niveau du foie qui permettront son stockage sous forme de glycogène. Le glycogène est un polymère de glucoses liés en α (1-4) et ramifiés en α (1-6) tous les 8 à 12 résidus (Figure 1). Ce glucose stocké sous forme de glycogène peut être utilisé par les cellules requérant de l'énergie. C'est ainsi que l'organisme maintient une homéostasie glucidique autour de 0.8 gramme par litre de sang. Il doit donc s'autoréguler pendant les phases d'alternance de l'état alimenté à l'état de jeûne et ceci principalement grâce à deux hormones, l'insuline et le glucagon qui sont responsables du maintien permanent de cette homéostasie glucidique (Figure 2).

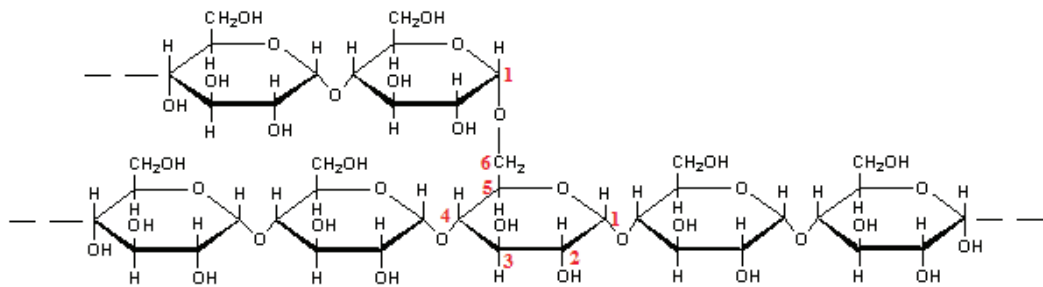


Figure 1 : Représentation schématique de la molécule de glycogène

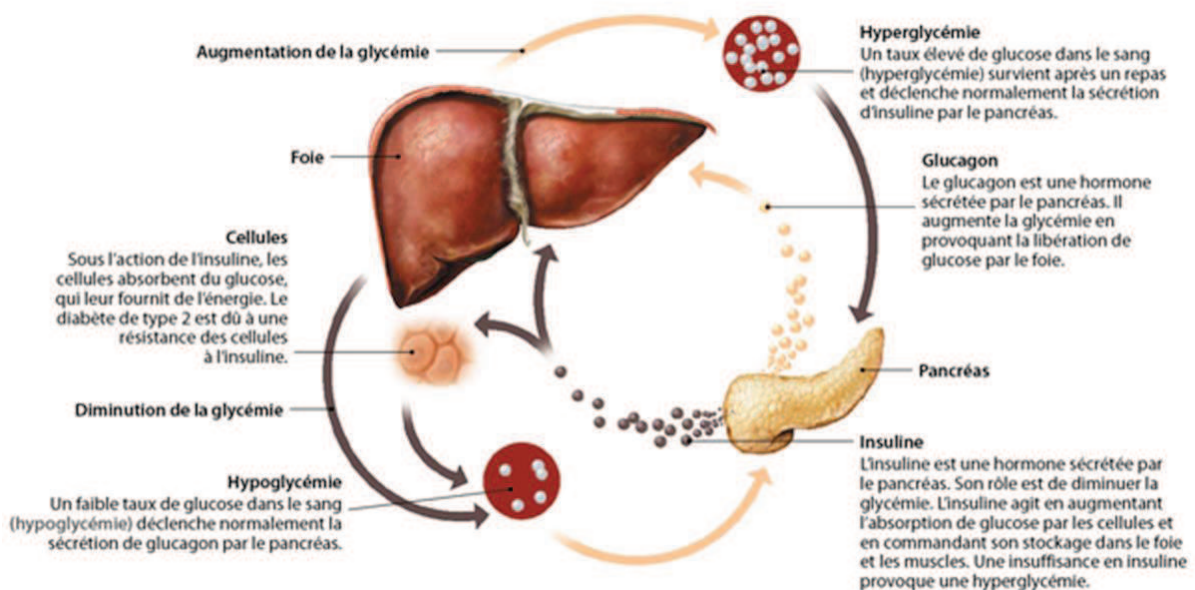


Figure 2 : Autorégulation physiologique de la glycémie (Source : ikonet.com)

L'insuline est l'hormone de la phase alimentaire. Elle est responsable de la régulation de la glycémie post prandiale. Chez l'individu sain, la normoglycémie (valeur basale) est rétablie trois heures après l'hyperglycémie postprandiale. Cette diminution de la glycémie est due à la glycogénogenèse qui se définit par la mise en stock du glucose au niveau du foie sous forme de glycogène.

Le glucagon est l'hormone dite du jeûne. Il est responsable de la compensation de la diminution progressive de la glycémie entre deux repas due à la consommation du glucose par les organes. Cette stabilisation de la glycémie est la conséquence de la glycogénolyse qui est une libération de glucose par le foie. Il est à noter que le système nerveux par la voie des catécholamines (adrénaline) influence le déstockage du glucose.

1.2. L'insuline

En 1920, les travaux de Frederick Grant Banting et de son équipe ont permis la découverte de l'insuline. La molécule d'insuline bioactive est un hétérodimère d'un poids moléculaire de 5,8 kDa composé de deux chaînes polypeptidiques, la chaîne α composée de 21 acides aminés et la chaîne β composée de 30 acides animés reliées toutes les deux par deux disulfures (Figure 3).

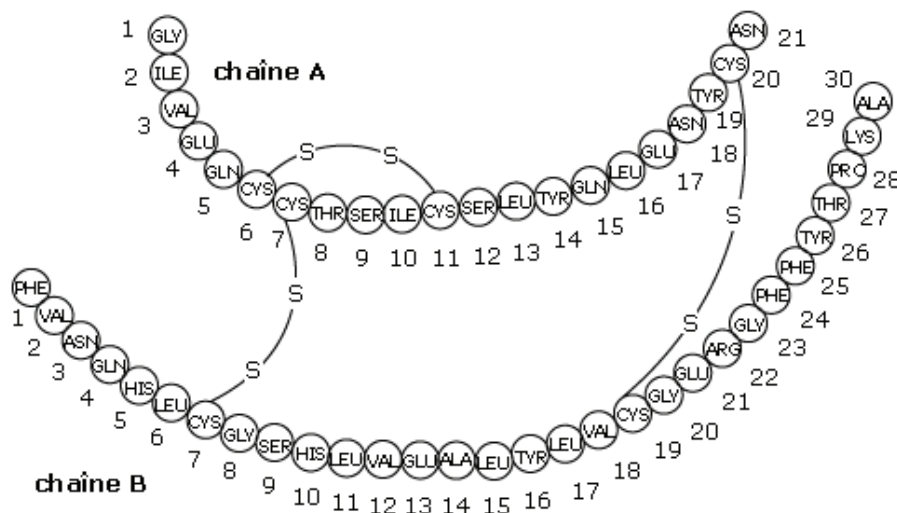


Figure 3 : Structure primaire de la molécule d'insuline

1.2.1. Biosynthèse et sécrétion

Le gène de l'insuline humaine est porté par le bras court du chromosome 11. La transcription en ARN messager de ce dernier et sa traduction dans le réticulum endoplasmique

rugueux induit la production d'un précurseur de haut poids moléculaire (11,5 kDa), la prépro-insuline. Cette dernière est convertie dans le réticulum endoplasmique en un peptide de poids moléculaire plus bas (9 kDa), la pro-insuline par clivage de la séquence signal. La pro-insuline est transportée du réticulum endoplasmique vers le *cis*-Golgi où s'amorce sa transformation en insuline mais sa maturation finale s'opère dans le *trans*-Golgi par le clivage du peptide-C (Figure 4). L'insuline est encapsulée depuis le Golgi dans des vésicules d'excrétion recouvertes de clathrine. Ces vésicules deviennent matures par co-précipitation de l'insuline avec des ions zinc pour former des microcristaux dans les vésicules d'excrétion. L'insuline et le peptide-C sont sécrétés de manière équimolaire car ils sont contenus dans les mêmes vésicules. Leur demi-vie peut aller de quelques heures à quelques jours.

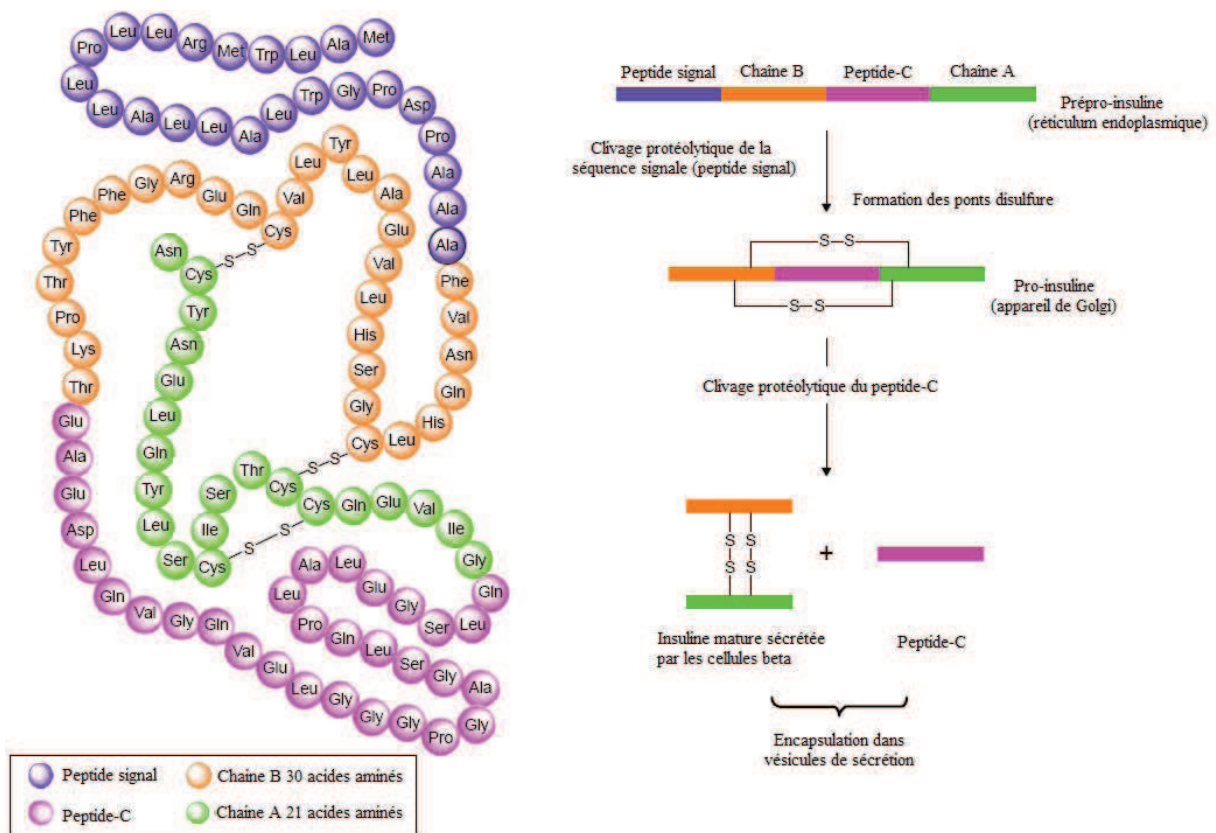


Figure 4 : Représentation schématique de la biosynthèse de l'insuline (modifié d'après Matteucci E. et al., 2015)

Le glucose stimule la biosynthèse et la sécrétion de l'insuline par les cellules β pancréatiques. Il est transporté dans les cellules à travers la membrane plasmique par des transporteurs spécifiques appelés GLUT2. Une fois dans la cellule, le glucose est phosphorylé puis métabolisé. Dans les cellules β (Figure 5), les métabolites du glucose influencent d'une part la sécrétion d'insuline [A] et d'autre part sa biosynthèse (transcription et traduction) [B]. L'insulinosécrétion stimulée par le glucose provient de l'augmentation du rapport ATP/ADP

résultant du cycle de Krebs qui a lieu dans la mitochondrie. L'ATP induit la fermeture des canaux potassium ATP dépendant (K_{ATP}). Il en résulte une dépolarisation de la membrane et l'ouverture de canaux calcium voltage dépendant. Leur ouverture engendre un influx de calcium extracellulaire qui va permettre l'exocytose de l'insuline par fusion des granules d'insuline avec la membrane plasmique. Le glucose induit la traduction de l'insuline en grande partie par la promotion de sa transcription. Le glucose favorise le recrutement du ribosome 40S afin d'obtenir de l'ARNm sous l'effet des facteurs d'initiation eIF2 et eIF4F. L'activation des kinases PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) et SAPK2 (Stress Activated protein kinase 2) par l'entrée du glucose dans la cellule induit l'activation du facteur de transcription PDX-1 (pancreatic and duodenal homeobox 1) localisé dans le cytoplasme. Ce dernier va se transloquer du cytoplasme vers le noyau où il se lie et active le promoteur du gène de l'insuline. Le glucose active également d'autres facteurs de transcription tels que Beta2 ou MafA qui agissent également en se liant à des régions promotrices du gène de l'insuline.

Les variations d'insulinémie observée sont liées à l'exocytose de l'insuline plutôt qu'à sa synthèse. La cellule β a une capacité importante de stockage de l'insuline avec une nette séparation du contrôle de la biosynthèse et de la sécrétion de l'hormone. Les substrats énergétiques comme le glucose ou certaines hormones comme le GLP-1 (Glucose-Like Peptide 1) peuvent stimuler la sécrétion d'insuline et avoir une influence sur sa biosynthèse. Ainsi, toute molécule capable d'influencer la sécrétion d'insuline est, par définition, une molécule qui agira en modulant le processus d'exocytose.

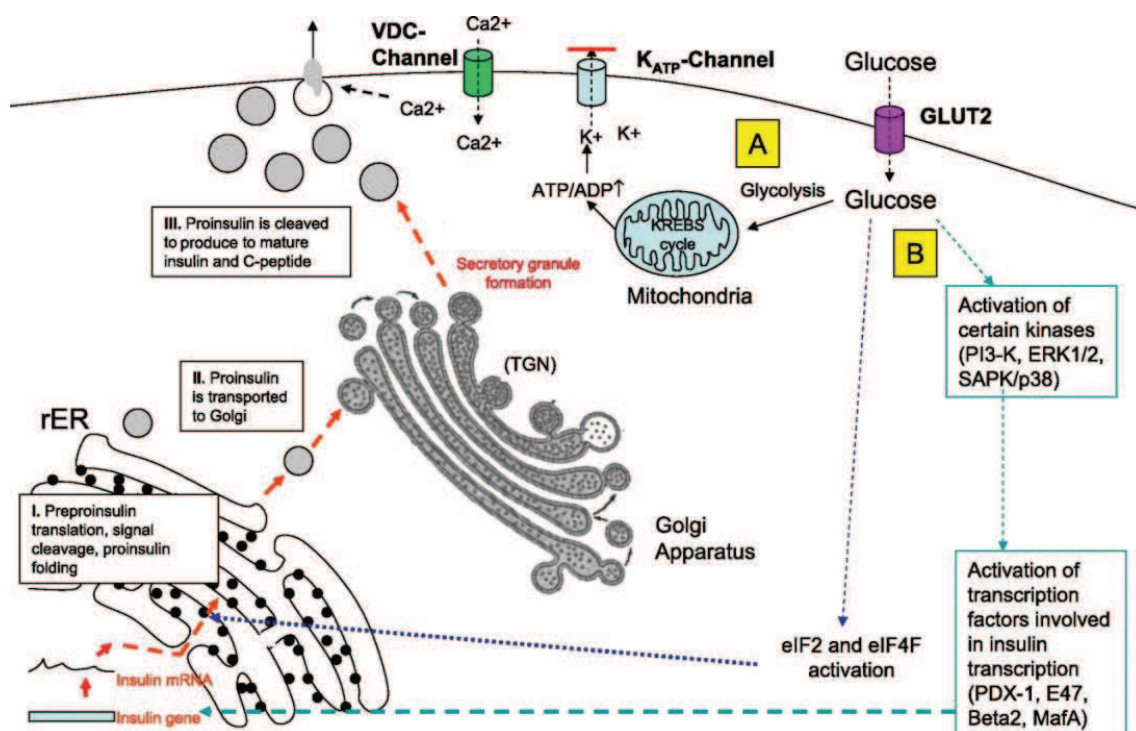


Figure 5 : Mécanisme de l'insulinosécrétion (Taila Hartley, 2009)

1.2.2. Mécanisme d'action

1.2.2.1. Récepteur de l'insuline

Le récepteur de l'insuline est une glycoprotéine tétramérique de 400 kDa, formé de 2 sous-unités α extracellulaires de 120 kDa qui assurent la fixation de l'hormone grâce à leur partie glucidique et de 2 sous-unités β transmembranaires de 80 kDa contenant un domaine enzymatique à activité tyrosine-kinase. Les sous unités sont reliés par des ponts disulfures (Figure 6).

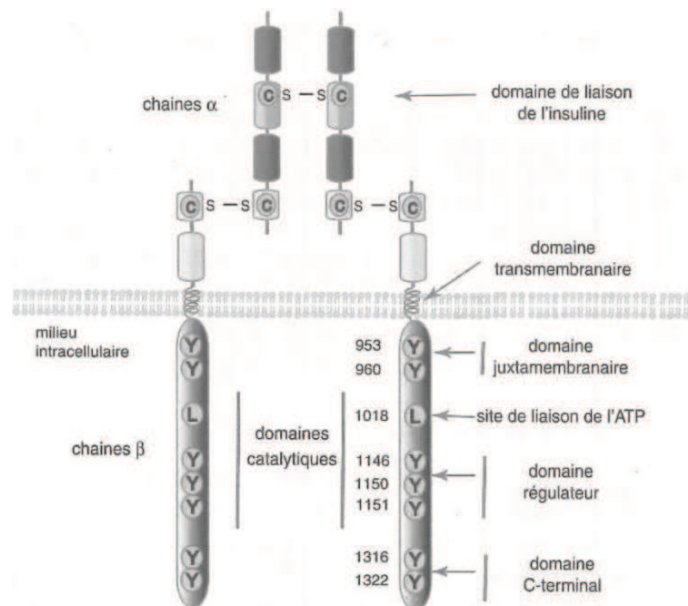


Figure 6 : Structure du récepteur à activité tyrosine kinase de l'insuline (Landry et Gies, 2009)

La partie intracellulaire de la sous-unité β contient des résidus tyrosine essentiels à l'activité biologique du récepteur, repartis dans les trois régions juxta membranaire, catalytique et C-terminale. En absence d'insuline, les sous-unités α exercent une inhibition de type allostérique sur l'activité kinase portée par les sous-unités β . La liaison de l'insuline induit des modifications conformationnelles des 2 sous-unités, qui permettent ainsi l'accès aux sites catalytiques et la trans-phosphorylation des résidus tyrosine. La phosphorylation de ces résidus est nécessaire à l'activation du récepteur, qui va alors pouvoir phosphoryler ses substrats intracellulaires. L'activation de 10 % des récepteurs suffit pour observer les effets maximaux de l'insuline, ceci grâce à l'existence d'un mécanisme d'amplification du signal par trans-phosphorylation des récepteurs libres par les récepteurs activés.

1.2.2.2. Voies de signalisation du récepteur de l'insuline

La stimulation par l'insuline induit la phosphorylation des résidus tyrosine du récepteur à l'insuline (Figure 7). Deux grandes voies de signalisation sont alors initiées par cette phosphorylation : l'activation des protéines IRS (Insulin Receptor Substrate) et Shc (Src homology 2/ α collagen-related). Il s'agit respectivement de la voie des MAP (Mitogen-activated protein) kinases et de la PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) qui conduisent respectivement aux effets mitogéniques et métaboliques de l'hormone. La phosphorylation des Shc, suite à l'interaction avec le résidu phosphotyrosine du récepteur, induit le recrutement de Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2), une protéine adaptatrice de la transduction du signal, et de la protéine SOS (Son Of Sevenless) qui lui est constitutivement associé. SOS favorise l'activation des Ras qui est à l'origine de la cascade d'activation des ERK (Extracellular signal-regulated kinases). Les protéines ERK 1 et 2 phosphorylées se trouvent dans le noyau où elles phosphorylent des facteurs de transcription, conduisant alors les cellules vers un processus de prolifération ou de différenciation. La phosphorylation par le récepteur de l'insuline de résidus tyrosine des IRS permet de recruter la PI-3 kinase à proximité de la membrane plasmique. La PI-3 kinase va alors catalyser la phosphorylation de phosphoinositides membranaires, induisant une augmentation rapide de phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3). Les PIP3 vont ensuite activer différents effecteurs dont le principal est la protéine kinase Akt. Après activation, Akt se détache de la membrane plasmique et phosphoryle des substrats cytosoliques et nucléaires induisant la synthèse de glycogène par activation du glycogène synthase et une stimulation de la synthèse protéique. Des facteurs de transcription sont aussi la cible d'Akt ce qui a pour conséquence d'inhiber la transcription de certains gènes comme celui codant pour le glucose 6-phosphatase. Une autre voie de signalisation passe par la protéine mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) qui est importante pour certaines actions de l'insuline, notamment la croissance et la synthèse protéique.

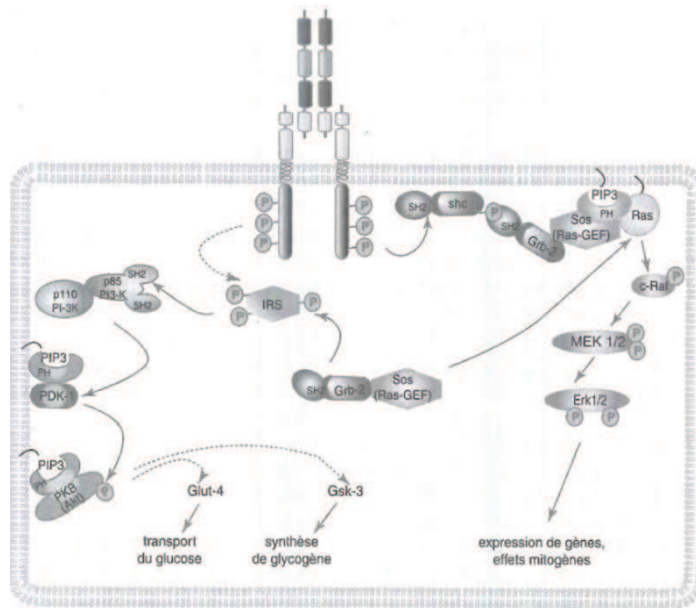


Figure 7 : Voies de signalisation associées au récepteur à activité tyrosine kinase de l'insuline (Landry et Gies, 2009)

1.3. Profil de sécrétion physiologique de l'insuline

Chez le sujet sain, l'insuline est sécrétée à des quantités variables au cours de la journée en fonction de l'alimentation et de l'activité (Figure 8).

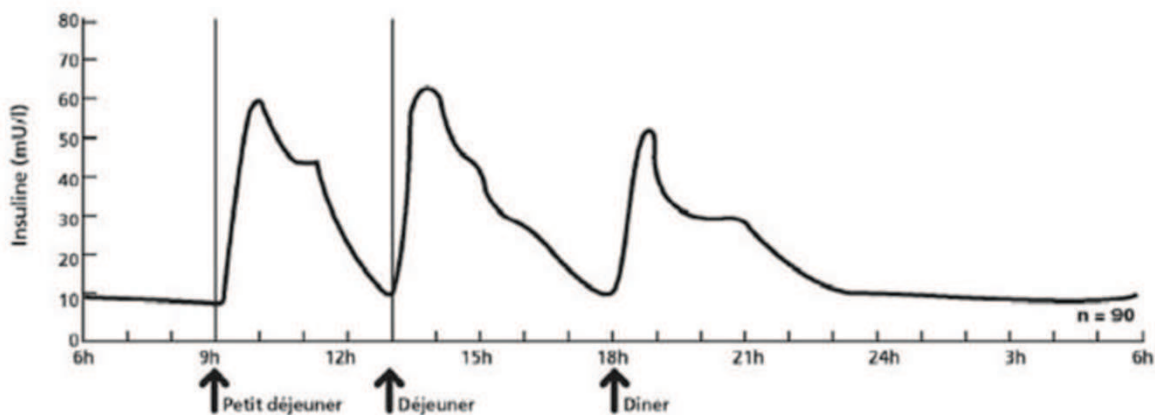


Figure 8 : Profil de l'insulinosécrétion chez un sujet sain (Marc UZAN, 2005)

Une portion comprise entre 30 et 40% de l'insuline est sécrétée de manière continue (insulinémie basale) afin de contrôler la production de glucose par le foie (en cas de carence en insuline, la production hépatique de glucose est augmentée expliquant l'hyperglycémie à jeun chez le patient diabétique). La plus grande quantité de l'insuline est sécrétée de manière ponctuelle en fonction de la glycémie (phase postprandiale). Ainsi, il existe à la fois une sécrétion basale et une sécrétion postprandiale permettant de maintenir une homéostasie de la glycémie tout au long de la journée.

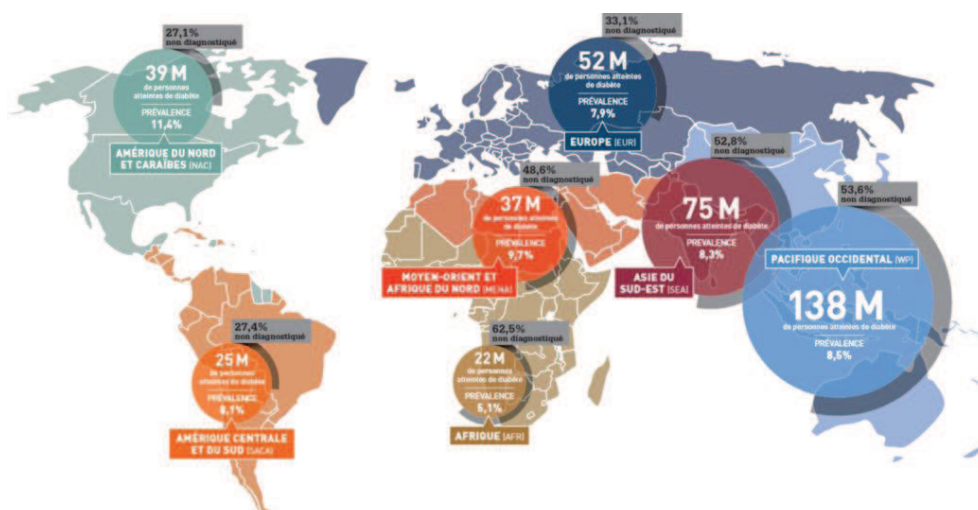
Le dérèglement de cette homéostasie est responsable de l'apparition d'un trouble métabolique caractérisé par une concentration importante du glucose circulant : le diabète.

2. Diabète

2.1. Définition et épidémiologie

Le diabète a été identifié dans l'Égypte ancienne pour la première fois autour de 1500 avant Jésus Christ. Il a été décrit comme étant une maladie rare dans laquelle l'individu affecté urinait excessivement et perdait du poids. Le terme de diabète sucré, reflétant le fait que l'urine des personnes touchées avait un goût sucré, a été d'abord utilisé par le médecin grec Aretaeus (entre 80 à 138 avant Jésus Christ). Il fallut attendre 1776 pour réaliser les premières mesures de glucose dans les urines sur ses patients par Matthew Dobson.

Le diabète est une maladie chronique qui apparaît lorsque le pancréas ne produit pas suffisamment d'insuline ou que l'organisme n'utilise pas correctement l'insuline produite. L'insuline est l'hormone hypoglycémiante qui en tandem avec le glucagon (hormone hyperglycémiante) régule la concentration de glucose dans le sang. L'organisation mondiale de la santé (OMS) définit l'état diabétique chez un patient si sa glycémie à jeun est supérieure à 7 mM (1.26 g/L) ou à 11 mM (2g/L) deux heures après une hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO). Selon l'OMS, la prévalence du diabète en 2014 à l'échelle mondiale était de 9 % chez les adultes âgés de plus de 18 ans avec plus de 387 millions de personnes touchées (Figure 9).



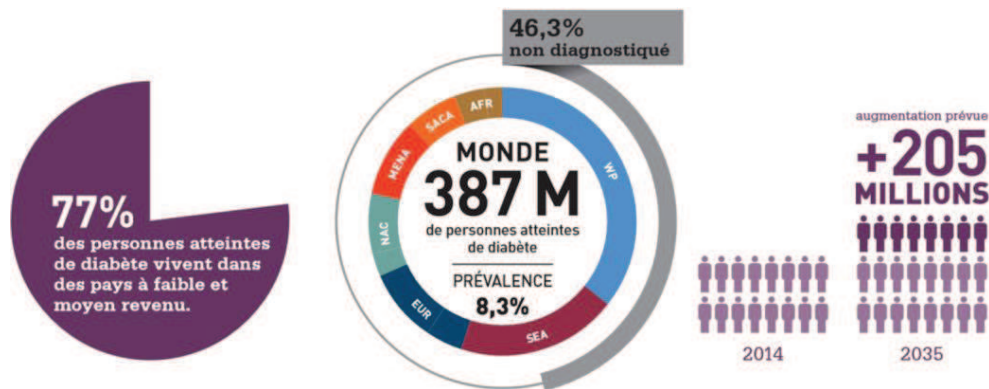


Figure 9 : Prévalence du diabète dans le monde en 2014 par région géographique et projection pour 2035 (Source : Fédération internationale du diabète, 2014).

L'organisme estime également que plus d'un million et demi de décès dans le monde sont directement liés au diabète dont 80% dans les pays émergents. Le nombre de personnes touchées dans le monde ne cesse de croître d'année en année. En 2030, le diabète sera la septième cause de mortalité. Il s'agit d'une pathologie silencieuse, cliniquement asymptomatique qui se décline sous plusieurs sous types et dont les complications sont d'autant plus sévères que la prise en charge est faite tardivement.

2.2. Types de diabète

Le diabète est une pathologie qui appartient à la classe des troubles métaboliques chroniques résultant d'une dérégulation de l'assimilation des glucides apportés par l'alimentation. Ce trouble a pour origine le dysfonctionnement du système de régulation de la glycémie dans lequel intervient l'insuline, l'hormone pancréatique hypoglycémisante. Il en résulte une concentration anormalement élevée du glucose circulant chez les personnes touchées. Cette pathologie se décline sous plusieurs sous types dont les majeurs sont ceux du type 1, du type 2 et du diabète gestationnel qui survient lors de la grossesse.

2.2.1. Le diabète de type 1

Le diabète de type 1 était anciennement connu sous le nom de diabète juvénile ou diabète « maigre ». Il apparaît le plus souvent dans l'enfance et concerne 10 % des patients. Cette forme de la pathologie est dite insulino-dépendante. Il est caractérisé par une abolition totale de production d'insuline à la suite de la destruction auto-immune des cellules β des îlots de Langerhans. Sa prise en charge exige une administration quotidienne d'insuline exogène. La cause de diabète de type 1 n'est pas totalement connue mais il est démontré une importante composante auto-immune. Des travaux ont mis en évidence le rôle des lymphocytes T auto-

réactifs dans la mort des cellules β pancréatiques. Au cours du développement du diabète de type 1, les cellules T tueuses infiltrent le pancréas et ciblent les cellules β productrices d'insuline (Coppieters Ken T. et al., 2012). Cependant, les cellules T ne représentent qu'une des possibilités des phénomènes immunitaires impliqués dans la perte des cellules β pancréatiques. Il est décrit dans la littérature l'implication des cellules dendritiques plasmacytoïdes dans la destruction auto-immune des cellules β pancréatiques. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes sont des médiateurs de l'immunité de par leur capacité à produire de grandes quantités d'interféron- α (IFN- α) et d'IFN- β (Diana Julien et al., 2012). L'expression de l'IFN- α dans les cellules β de souris transgéniques engendre un diabète auto immun (T.A. Stewart et al., 1993). Alba A. et al. (2004) ont également montré que l'IFN- β accélère l'apparition de la maladie chez des souris diabétiques non obèses.

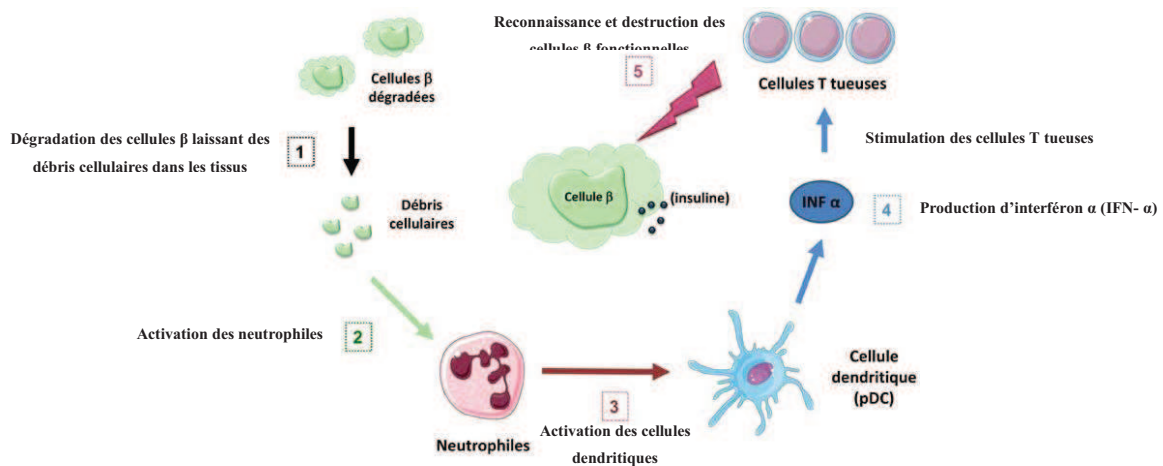


Figure 10 : Cycle de destruction des cellules β des îlots de Langerhans par auto immunité (Diana Julien et al., 2012).

Les symptômes du diabète de type 1 sont la polyurie (miction fréquente et abondante), la polydipsie (sensation de soif), une faim constante, une perte de poids, l'altération de la vision et la fatigue. Ces symptômes peuvent apparaître brutalement.

2.2.2. Le diabète de type 2

Le diabète de type 2 autrefois désigné comme diabète de la maturité ou diabète « gras » résulte d'une mauvaise utilisation de l'insuline par l'organisme. C'est un diabète dit non insulino-dépendant. Le diabète de type 2 représente 90% des diabétiques rencontrés dans le monde. Il est en grande partie le résultat d'une surcharge pondérale due à la sédentarité (un individu en situation d'obésité a trois fois plus de risque de développer un diabète de type 2) et à des facteurs génétiques (Cynthia M. Ripsin et al., 2009; Frank B. Hu and al., 2001). Le diabète

de type 2 présente une forte composante héréditaire. En effet, la corrélation est de 100% chez des jumeaux homozygotes et de 25% pour les individus ayant des cas de diabète dans la famille. Des travaux ont permis d'identifier des gènes impliqués dans le développement du diabète de type 2, en particulier des gènes codant pour les canaux potassium ATP dépendant (canaux K_{ATP}) intervenant dans l'insulinosécrétion de même que des facteurs de transcription (transcription factor 7-like 2) régulant l'expression du gène codant pour le pro-glucagon et donc la production du glucagon et du glucagon-like peptide-1 (GLP-1). Les individus en surpoids possèdent une grande masse adipeuse. Des études ont mis en évidence le rôle primordial du tissu adipeux dans le développement du diabète de type 2, donnant à ce type de diabète la terminologie de « diabésité ». En effet, celui-ci peut être considéré comme un organe endocrine sécrétant de nombreux adipocytokines (la leptine, le facteur de nécrose tumoral alpha ($TNF-\alpha$), la résistine et l'adiponectine) impliquées dans l'insulinorésistance et probablement dans le dysfonctionnement des cellules β (Olokoba Abdulfatai B. et al., 2012). Ces symptômes peuvent être les mêmes que ceux du diabète de type 1 mais sont souvent moins marqués. De ce fait, la maladie peut être diagnostiquée plusieurs années après son apparition, une fois les complications déjà présentes. Récemment encore, ce type de diabète n'était observé que chez l'adulte mais on le trouve désormais aussi chez l'enfant et ce sans distinction de la zone géographique.

Le diabète de type 2 apparaît progressivement (Figure 11). Celui-ci débute par l'apparition d'une intolérance au glucose résultant de la résistance du foie et des tissus à l'action de l'insuline. L'intolérance au glucose est marquée par une augmentation de l'insulinosécrétion pour réguler la glycémie ce qui par la suite induit un dysfonctionnement de l'homéostasie glycémique, on parle de diabète débutant. On observe un effet ciseau entre la sécrétion d'insuline qui baisse progressivement et la glycémie qui augmente. L'installation lente de l'état pathologique permet de mettre en place un traitement adapté en vue de prévenir l'apparition de la maladie. Cette prise en charge se fait en première intention par la mise en place de mesures hygiéno-diététiques (lors de la phase diabète débutant) puis par un traitement médicamenteux (antidiabétiques oraux) et enfin par la mise en place d'une insulinothérapie (Figure 11) dans le cas où le patient devient insulino-requérant.

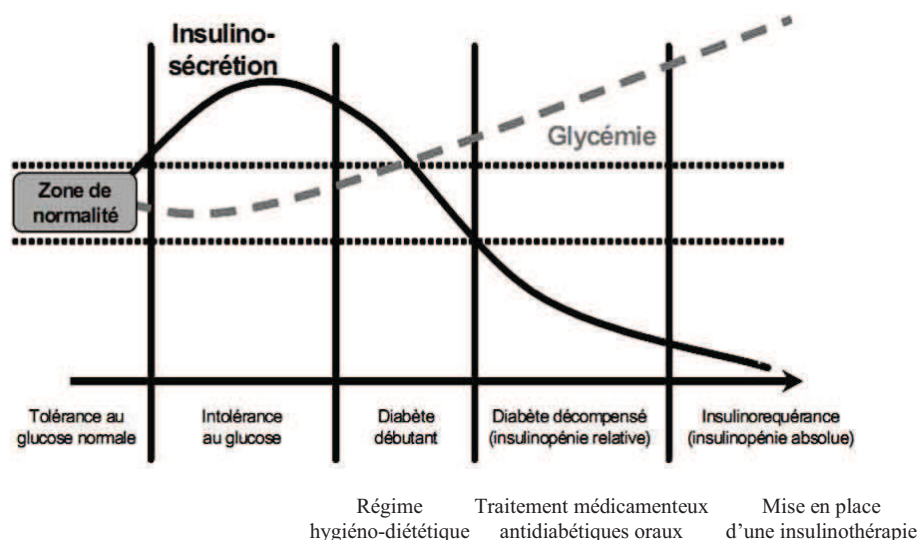


Figure 11 : Installation progressive du diabète de type 2 (Bliclé JF., 1999)

2.2.3. Le diabète gestationnel

Cette forme de la pathologie est particulière d'une part par son état transitoire durant la grossesse et d'autre part par son hyperglycémie présentant des valeurs supérieures à la normale mais inférieures à celles posant le diagnostic de diabète. L'IADPSG (International Association of Diabetes Pregnancy Study Group) définit les valeurs de glycémie permettant de diagnostiquer le diabète gestationnel. Selon cet organisme, le diabète gestationnel peut être diagnostiqué si la glycémie à jeun est supérieure à 0,92 g/L (5,1 mmol/L) et une glycémie supérieure à 1,80 g/L (10,0 mmol/L) une heure après une charge orale de 75 g de glucose et supérieure à 1,53 g/L (8,5 mmol/l) après 2 heures. Ce diabète est diagnostiqué lors des examens prénataux et rarement à la suite de l'apparition de symptômes. Selon l'IADPSG, la présence d'au moins un des critères cités ci-après chez la femme enceinte doit conduire à un dépistage à savoir : âge de la grossesse supérieur à 35 ans, un indice de masse corporel (IMC) supérieur à 25 kg/m², des antécédents familiaux de diabète (parents au premier degré), des antécédents personnels de diabète gestationnel. Les femmes ayant un diabète gestationnel ont un risque accru de complications pendant la grossesse et au cours de l'accouchement. Leur risque d'avoir un diabète de type 2 à un stade ultérieur de leur vie augmente également. Chez le rongeur, l'hyperglycémie *in utero* engendre une hyperplasie des îlots de Langerhans et une hyperactivité des cellules β (Franks Paul W. et al., 2006). La régulation de la glycémie se fait par la mise en place de mesures hygiéno-diététiques ou par une insulinothérapie.

2.3. Les complications du diabète

La conséquence majeure de l'hyperglycémie chronique liée au diabète est une glucotoxicité qui se traduit par des atteintes vasculaires (micro-et macro angiopathies) et nerveuses (neuropathies) (Figure 12) :

- le diabète augmente le risque de cardiopathie et d'accident vasculaire cérébral. Selon une étude conduite dans plusieurs pays, 50% des diabétiques meurent principalement de ces complications.
- la neuropathie qui touche les pieds augmente la probabilité d'apparition d'ulcères des pieds, d'infections et, d'amputation des membres antérieurs comme postérieurs. Elle est associée à une diminution du débit sanguin,
- la rétinopathie diabétique est une cause importante de cécité. Elle survient par suite des lésions des petits vaisseaux de la rétine qui s'accumulent avec le temps. Après plus de 20 ans de diabète, 2% des patients deviennent aveugles et environ 10% présentent des atteintes visuelles graves. Près de 1% de la cécité dans le monde peut être attribuée au diabète.
- parmi les principales causes d'insuffisance rénale figure le diabète. Le décès de 10 à 20% de diabétiques dans le monde survient à la suite d'une insuffisance rénale.

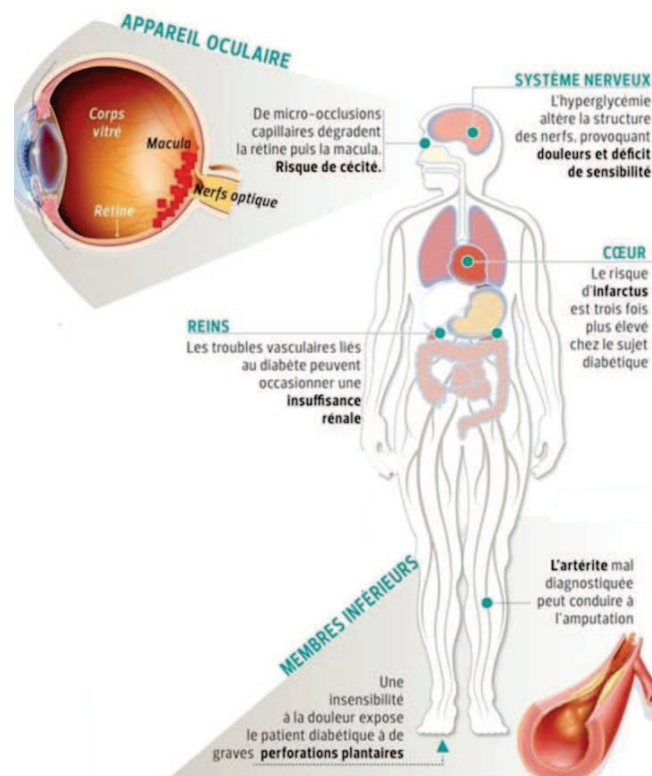


Figure 12 : Schéma récapitulatif des complications liées à l'hyperglycémie chronique (modifié d'après Le Figaro, 02/10/12)

Le risque général de décès chez les diabétiques est au minimum deux fois plus important que chez les non diabétiques.

3. La prise en charge du diabète

Chez le patient atteint de diabète, le maintien de la glycémie à des valeurs le plus proche possible de valeurs seuils permet de prévenir l'apparition des complications liées à la glucotoxicité. La prise en charge du diabète se fait par la mise en œuvre de moyens combinables comme la mise en place de mesures hygiéno-diététiques, d'un traitement médicamenteux et/ou d'une insulinothérapie.

3.1. Mise en place de mesures hygiéno-diététiques

La mise en place de mesures hygiéno-diététiques est valable pour tous les types de diabète mais est spécifiquement un traitement de première intention dans le cadre du diabète de type 2 avant toute prise en charge médicamenteuse. En effet, des études ont montré qu'il y avait une réduction significative de l'incidence du diabète de type 2 en combinant un maintien de l'indice de masse corporelle (IMC) à 25 kg/m² avec une alimentation riche en fibre, en acides gras insaturés et pauvre en acides gras saturés et en sucre (Chen Lei et al.,2011). Il faut ajouter au régime alimentaire une activité physique régulière, une abstinence vis-à-vis du tabac et une consommation modérée d'alcool.

3.2. Les antidiabétiques oraux

Les hypoglycémiantes oraux agissent sur la sécrétion de l'insuline, sur la sensibilité tissulaire à l'hormone et enfin sur l'absorption du glucose issu de l'alimentation. Ces composés bioactifs sont le second volet du traitement du diabète non insulino-dépendant après les mesures hygiéno-diététiques. Les hypoglycémiantes non insulino-sécréteurs sont utilisés en complément de l'insulinothérapie et des mesures hygiéno-diététiques dans la prise en charge du diabète de type 1. Le choix d'un hypoglycémiant oral repose sur différents critères comme la réduction des taux d'HbA1c sur le long terme, la tolérance, l'observance thérapeutique du patient, son efficacité vis-à-vis des complications micro- et macrovasculaires.

3.2.1. Les sulfamides hypoglycémiantes et les glinides

Les sulfamides hypoglycémiantes sont des molécules utilisées empiriquement depuis des décennies dans le traitement du diabète non insulino-dépendant. Les carbutamides (Glucidoral®, Servier) sont les sulfamides de première génération. Ils étaient disponibles

depuis les années 1950 mais ont été retirés du marché en 2012. Entre les années 1970 et 1990 sont apparus les sulfamides de seconde génération largement prescrits actuellement comme les gliclazides (Diamicon®, Servier), les glimépirides (Amarel®, Sanofi Aventis), les glipizides (Minidiab®, Flexpharma ; Glibenese®, Laphal ; Ozidia®, Pfizer). Plus récemment est apparue sur le marché une seconde classe de molécule, les glinides (NovoNorm®, NovoNordisk). Cette classe de médicaments a des modalités d'action comparables aux sulfamides. Ils agissent en stimulant l'insulinosécrétion. Ils ont un effet semblable à celui de l'ATP en fermant les canaux potassium ATP dépendant (K_{ATP}) membranaire ce qui entraîne la sécrétion d'insuline et l'utilisation du glucose par tous les tissus engendrant la baisse corrélative de la glycémie. Les sulfamides stimulent l'insulinosécrétion en se liant à un récepteur membranaire spécifique (SUR1) sur la cellule β . Le récepteur SUR1 est associé au canal K_{ATP} dont l'activité est étroitement liée au ratio ATP/ADP. La fixation des sulfamides sur le récepteur SUR1 ferme les canaux ATP dépendant, ce qui entraîne une dépolarisation de la membrane plasmique, l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants, l'influx du calcium et l'exocytose des vésicules d'insuline.

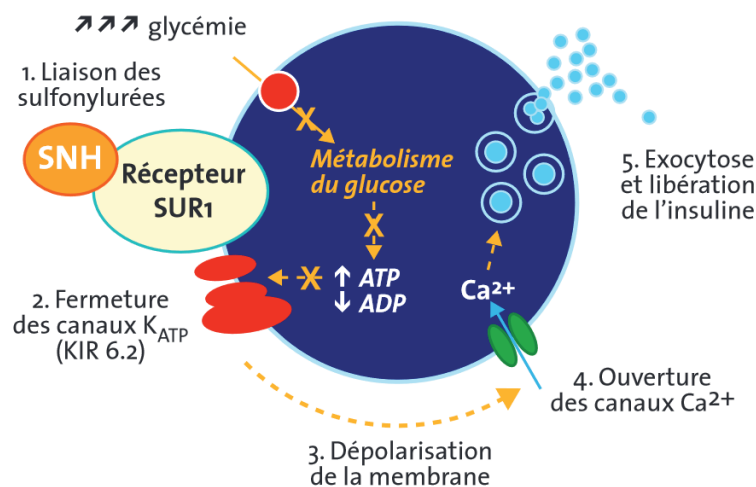


Figure 13 : Mécanisme d'action des sulfamides hypoglycémisants (SNH) sur l'insulinosécrétion (tiré de P.J. Guillausseau,)

L'excrétion des sulfamides est essentiellement urinaire et leur demi-vie plasmatique est variable et peut aller de 4 à 10 heures en fonction du composé. Les sulfamides présentent pour effets secondaires majeurs une prise de poids et un risque d'hypoglycémie. Ils peuvent de façon exceptionnelle provoquer une allergie cutanée allant d'un simple urticaire au syndrome de Lyell (nécrose épidermique toxique), une thrombopénie auto-immune, une agranulocytose ou enfin une hépatite cytolytique.

3.2.2. Les biguanides : exemple de la metformine (Glucophage®)

Ils sont utilisés en France depuis plus de 60 ans. Ils agissent en luttant contre l'insulinorésistance et favorisent l'utilisation périphérique du glucose en améliorant la réponse des tissus à l'insuline. L'effet hypoglycémiant de la metformine résulte d'une réduction de la néoglucogénèse hépatique. Yong Deuk kim et al., (2008) ont démontré un mécanisme d'action de la metformine impliquant une kinase, l'AMPK (AMP-activated protein kinase) qui joue un rôle primordiale dans l'expression des gènes de la néoglucogénèse hépatique. L'AMPK est une sérine/thréonine kinase ubiquitaire dont l'activation dépend de l'augmentation de la balance AMP/ATP reflétant une dépression énergétique. Benoit Viollet et al. (2012) décrivent que cette activation est secondaire aux effets mitochondriaux de la metformine. En effet, la metformine inhibe le complexe 1 de la chaîne respiratoire ce qui réduit la disponibilité de l'ATP intracellulaire (Figure 14). L'augmentation du ratio AMP/ATP cellulaire induit une réduction de la lipotoxicité, une amélioration de la sensibilité des tissus à l'insuline par la diminution de la lipogénèse et par l'activation de la β -oxydation. L'action essentielle des biguanides se situe donc au niveau des tissus hépatique et musculaire dont ils augmentent l'insulino-sensibilité. Contrairement aux sulfamides hypoglycémiant, les biguanides n'ont aucune action insulino-sécrétrice, et leur action hypoglycémiante s'effectue uniquement en présence d'insuline. Ils sont excrétés par voie urinaire et biliaire.

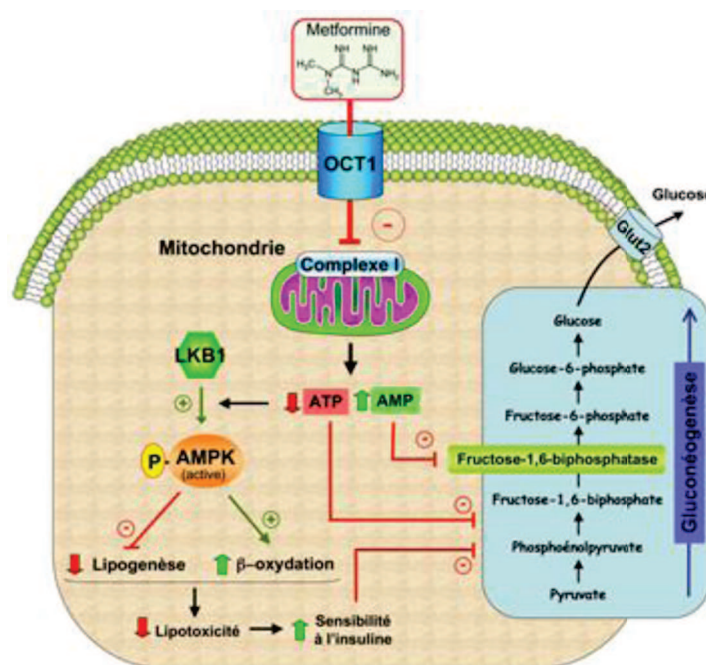


Figure 14 : Mécanisme d'action de la metformine (d'après Benoit Viollet et al.2012)

AMPK: AMP-activated protein kinase; Glut2: Glucose transporter 2; LKB1: Liver kinase B1; OCT1: organic cation transporter 1

Un des risques majeurs mais exceptionnel des biguanides est l'acidose lactique qui est létale. D'autres propriétés bénéfiques sont attribuées à la metformine comme sa propriété antioxydant (Maaroufi A. et al., 2006), sa potentialisation de l'efficacité des lymphocytes T du système immunitaire et donc de l'efficacité des vaccins antiviraux et anticancéreux (Monica Buzzai et al., 2007 ; Jones et Thompson 2009 ; Jones et al., 2009 ; Heiichiro Udono et al., 2015). Ces propriétés rendent aujourd'hui son utilisation intéressante pour le traitement du diabète de type 1, de type 2 mais aussi du diabète gestationnel. La limite majeure à son utilisation dans le diabète gestationnel est le manque de recul sur sa tératogénicité.

3.2.3. Les inhibiteurs des α -glucosidases

L'alpha glucosidase est l'enzyme qui permet de dégrader les polysaccharides en monosaccharides. Seuls les monosaccharides sont en mesure de traverser la barrière intestinale. De ce fait, les glucides issus de l'alimentation sont dégradés d'une part par les amylases salivaires et pancréatiques en disaccharides (saccharose, lactose) puis en monosaccharides au niveau de la brosse intestinale par les alpha-glucosidases comme la maltase, la lactase, la saccharase. L'inhibition des α -glucosidases au niveau de la bordure en brosse intestinale retarde alors la dégradation des polysaccharides réduisant ainsi l'hyperglycémie postprandiale. Les inhibiteurs des α -glucosidases comme l'acarbose (Glucor[®], Bayer) et le Miglitol (Diastabol[®], Sanofi Aventis) peuvent donc être employés dans le traitement des diabètes de type 1 et de type 2. L'inconvénient majeur est la stagnation et la fermentation des sucres non digérés dans l'intestin, responsables de flatulences, de douleurs digestives ou de diarrhées.

3.2.4. Les incrétinomimétiques

Le terme effet incrétine désigne l'augmentation de l'insulinémie observée à la suite d'un repas, médiée par deux hormones (incrétines) : le GLP-1 (Glucagon like peptide 1) sécrété par les cellules entéro-endocriniennes L de l'iléon et du colon, et le GIP (Gastric inhibitory peptide) sécrété par les cellules K du duodénum. Le GLP-1 stimule l'insulinosécrétion en présence de glucose (pas de sécrétion si glycémie normale), diminue la production de glucagon et réduit la prise alimentaire. Ces propriétés en font un candidat d'intérêt pour le traitement du diabète de type 2. Cependant, après sa sécrétion, le GLP-1 est rapidement inactivé par la dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) par clivage de deux acides aminés en N-terminal.

Deux voies thérapeutiques sont développées pour exploiter les bénéfices des incrétines dans la gestion du diabète de type 2. La première consiste à inhiber la DPP-4 afin d'augmenter la concentration plasmatique du GLP-1 endogène et la seconde consiste à augmenter la durée

d'action du GLP-1 sur ses récepteurs (formulation d'analogues). Les produits formulés dans ces deux approches sont nommés incrétino-mimétiques.

3.2.4.1. Les inhibiteurs de la DPP-4 : les gliptines

La dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) est responsable de la dégradation des incrétines tel que le GLP-1. L'inhibition de la DPP-4 par une gliptine entraîne une augmentation importante de la concentration de GLP-1 qui provoque une augmentation de la sécrétion d'insuline et une diminution de la sécrétion de glucagon. Ce produit se présente sous forme de comprimés pour une prise orale et peut s'administrer en association avec un autre antidiabétique oral comme la metformine dans le traitement du diabète de type 2. La gliptine a les mêmes effets bénéfiques que le GLP-1 car elle augmente sa concentration en inhibant sa dégradation. Ses effets secondaires à long terme ne sont pas connus mais on observe fréquemment des hypoglycémies, des maux de tête ou de gorge, de l'arthrose ou encore des douleurs aux membres supérieurs et inférieurs.

3.2.4.2. Analogues du GLP-1

Les incrétines sont une nouvelle famille d'hormones peptidiques dont le GLP-1 (Glucose-Like Peptide 1) qui est produit au niveau de l'intestin et qui stimule la sécrétion d'insuline en inhibant la sécrétion de glucagon. Le GLP-1 est un peptide de 31 acides aminés codé par le même gène que le glucagon mais son effet est différent de celui du glucagon car il agit sur ses propres récepteurs (récepteurs aux GLP-1). Les analogues du GLP-1 sont des agonistes de ce récepteur mais ils possèdent une durée d'action plus longue et sont plus résistants à leur dégradation catalysée par la DPP-4. Ces analogues comme l'exénatide (BYETTA®, Lilly), le premier des analogues du GLP-1, le lixisenatide (Lyxumia®, Sanofi) ou le liraglutide (Victoza®, NovoNordisk) sont administrés par voie systémique (injection sous cutanée).

Contrairement aux sulfamides hypoglycémifiants, ils entraînent une perte de poids et répriment l'apparition des hypoglycémies. Les effets à long termes de ces produits ne sont pas encore connus mais des pancréatites ont été décrites. Les autorités de santé européennes évaluent actuellement les résultats d'une étude qui va dans ce sens. Cette étude suggère une augmentation du risque d'effets indésirables pancréatiques (pancréatite, métaplasie des canaux pancréatiques) dus aux incrétinomimétiques. A court terme, des nausées accompagnées de vomissements sont fréquentes.

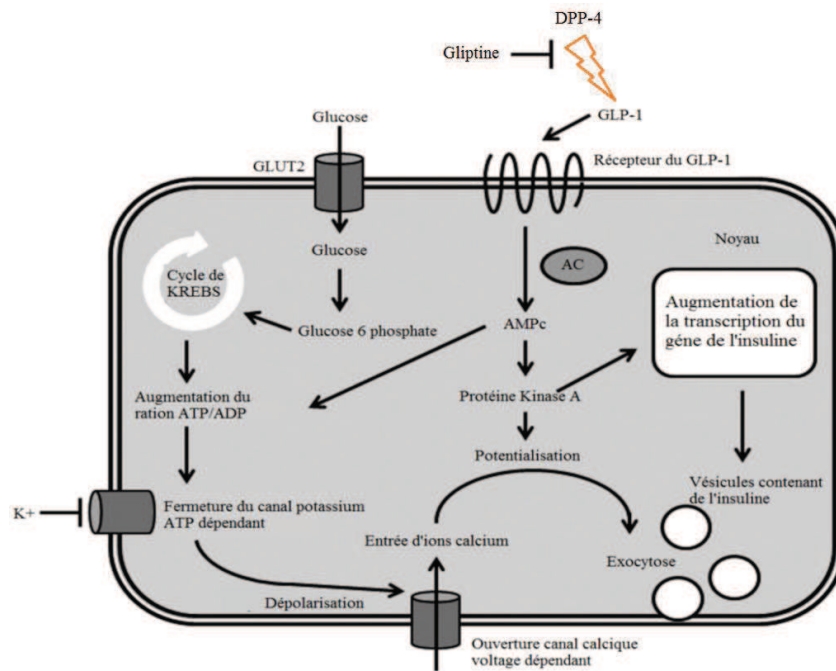


Figure 15 : Mécanisme d'action du GLP-1 et de ses analogues (Modifié à partir de Society for Endocrinology)

En résumé, afin de réguler la glycémie chez le patient diabétique de type 2, plusieurs médicaments sont disponibles sur le marché (Figure 16). Ces produits peuvent agir sur l'insulinosécrétion (sulfamides et incrétinomimétiques), sur la sensibilisation des tissus à l'action de l'insuline (biguanides) ou encore sur l'absorption du glucose apporté par l'alimentation (inhibiteur α -glucosidase). En fonction de l'évolution de la pathologie, les antidiabétiques oraux peuvent être combinés. L'échec de la metformine en monothérapie conduit à son utilisation en bithérapie puis en trithérapie avec les autres antidiabétiques oraux. L'échec du traitement médicamenteux traduit l'insulino-requérance du patient et oblige la mise en place de l'insulinothérapie.

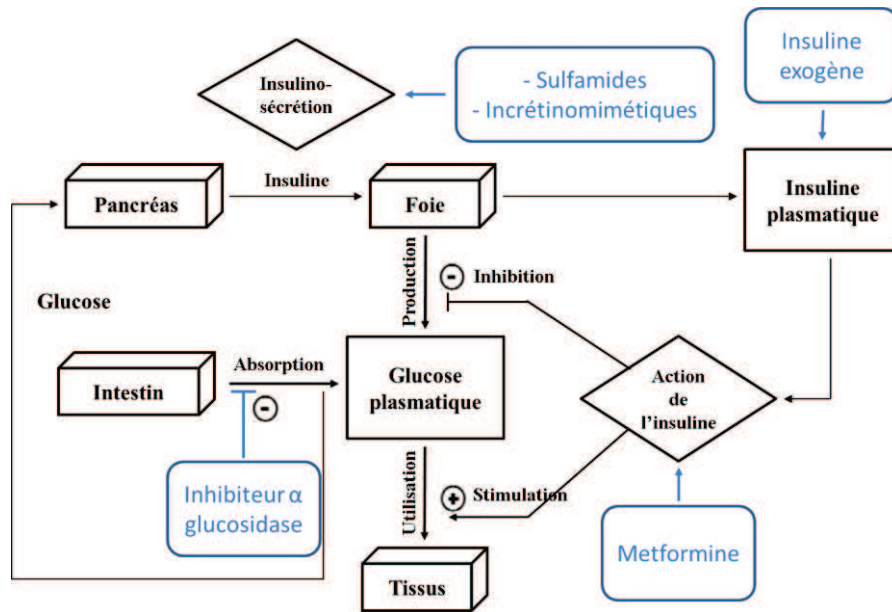


Figure 16 : Schéma récapitulatif des modalités d'action des antidiabétiques oraux sur le marché.

3.3. Insulinothérapie

3.3.1. Schéma de l'insulinothérapie

L'administration de l'insuline est indispensable pour les personnes souffrant de diabète de type 1 mais fait également partie de l'arsenal thérapeutique dans la prise en charge du patient diabétique de type 2. Le schéma d'insulinothérapie idéal est celui qui reproduit l'insulinosécrétion physiologique de l'insuline tel que décrit sur la figure 7. Celui-ci se base donc sur un apport basal en insuline qui permet de maintenir une glycémie aussi proche que possible de la normale entre les repas (0,7 à 1,1 g/l). A l'insuline basale est associée un apport supplémentaire d'insuline au moment des repas, dit apport bolus, qui permet d'assimiler les glucides apportés par l'alimentation et d'éviter les pics d'hyperglycémies postprandiaux (1 à 1,4 g/l) (Figure 17).

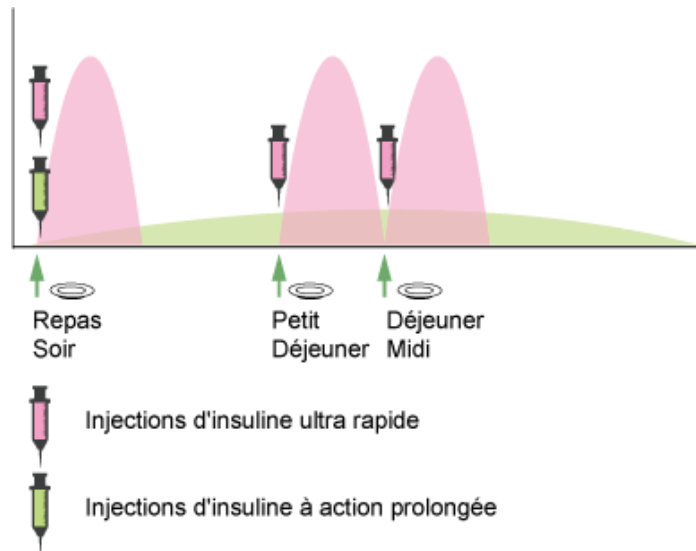


Figure 17 : Illustration d'une insulinothérapie simple par injection d'insuline exogène

Les études DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) et U.K.P.D.S (United Kingdom Prospective Diabetes Study) (Paromita King et al., 1999) ont montré que l'obtention d'un équilibre glycémique aussi proche que possible de celui du sujet normal permet de réduire à terme l'incidence des complications micro- et macrovasculaires chez le patient diabétique. Elle fait appel à un schéma d'insulinothérapie qui sépare l'apport basal en insuline (pour normaliser la glycémie inter prandiale) et les apports supplémentaires (bolus) au moment des repas. Ce schéma basal-bolus est le fondement de l'insulinothérapie fonctionnelle adaptée au patient. Celle-ci nécessite une sensibilisation du patient sur le plan diététique et la réalisation d'un autocontrôle quotidien de la glycémie capillaire. Le but est de faire varier les doses d'insuline en fonction des besoins en tenant compte des apports alimentaires, de l'activité physique. Pour parvenir à cet objectif glycémique, plusieurs moyens permettent une insulinothérapie optimisée : la formulation d'insulines à durée d'action modulable et le développement de moyens d'administration comme les pompes à insulines (internes et externes) et les injecteurs parentéraux (stylos, seringues...) permettant une délivrance pluriquotidienne d'insuline.

3.3.2. Insulines développées par l'industrie pharmaceutique

3.3.2.1. Historique de l'insuline industrielle

Jusqu'en 1923, l'insuline était obtenue à partir de pancréas d'animaux : bœuf et surtout porc. En 1935, Hagedorn et Fischer mettent au point la première insuline à action lente (insuline protamine zinc). En 1946 est mise au point de l'insuline associée à un antagoniste de l'héparine afin d'en ralentir l'action (Neutral protamine Hagedorn ou NPH). Celle-ci est encore largement

utilisée comme insuline à action intermédiaire. Cependant, il faut attendre 1955 pour que Frederick Sanger décrive la structure chimique de l'insuline. La qualité de l'insuline d'extraction s'améliore avec les années, et en 1978, les laboratoires Eli Lilly mettent au point le clonage du gène de l'insuline en vue d'une production industrielle par génie génétique. L'arrivée des techniques de génie génétique a permis d'incorporer dans des cellules vivantes les séquences d'ADN humain codant pour l'insuline et de produire cette insuline à l'échelle industrielle.

Des modifications sur la molécule d'insuline ont également été développées pour que celle-ci acquière des caractéristiques particulières. Il s'agit d'analogues de l'insuline humaine. Il existe plusieurs types d'insuline qui dépendent essentiellement de leur rapidité de passage dans la circulation sanguine ainsi que de leur durée d'action.

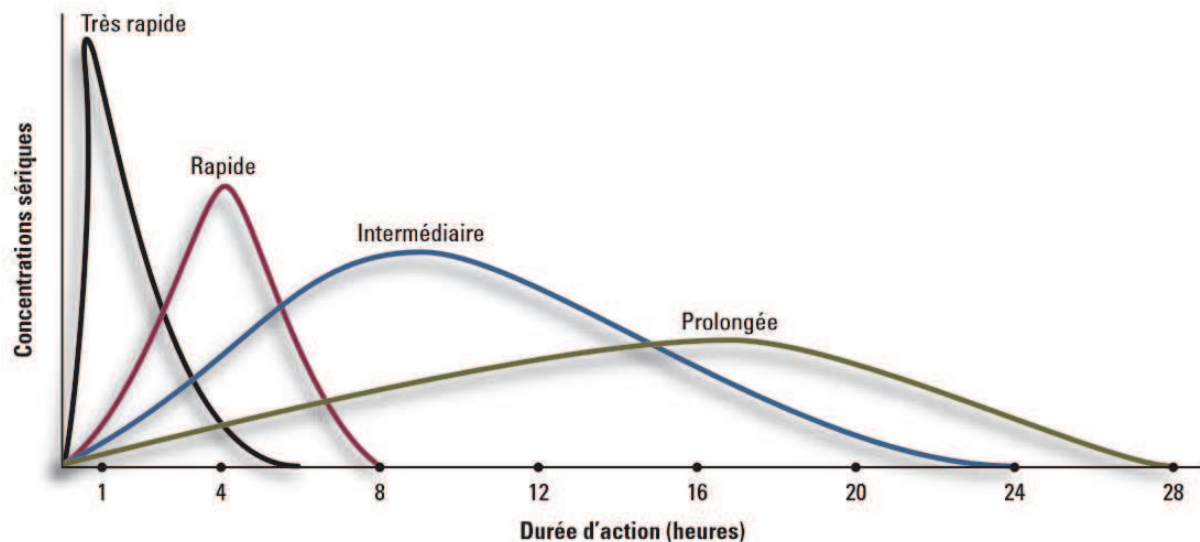


Figure 18 : Action hypoglycémiant et durée d'action des différents types d'insulines.

3.3.2.2. Insuline humaine ordinaire ou rapide

Il s'agit de l'insuline naturelle utilisable par toutes les voies d'administration (intraveineuse, intramusculaire, sous-cutané et intra péritonéal). Son profil d'action dépend de la voie d'administration. Injectée par voie sous-cutanée, son effet débute 15 à 20 minutes après injection, culmine entre 2 et 4 heures et se termine après 6 heures. Elle se présente sous la forme d'une solution limpide pouvant être utilisée en toutes circonstances dans tous les systèmes d'injections : seringues, stylos et pompes. Elle est cependant moins stable que les analogues ultrarapides dans les pompes externes. En utilisation courante, elle est administrée en sous-cutanée, en plusieurs injections quotidiennes seule ou le plus souvent associée à d'autres injections d'insulines d'action prolongée (analogues de l'insuline à action lente).

3.3.2.3. L'insuline NPH

L'insuline NPH (Neutral Protamine Hagedorn), du nom de son découvreur est l'insuline humaine biogénétique additionnée de sulfate de protamine, destinée à retarder et augmenter sa durée d'action. Cette insuline est encore largement utilisée sous les dénominations commerciales Umuline® NPH (Eli Lilly) ou Insulatard® (NovoNordisk) comme insuline à action intermédiaire. Elle se présente sous forme d'une suspension injectable en flacon ou en stylo. La durée d'action de l'insuline NPH se prolonge pendant 14 à 18 heures. Cette durée est dite intermédiaire car elle se situe entre celle de l'insuline rapide et celle des insulines lentes au zinc.

3.3.2.4. Analogues de l'insuline

Un analogue de l'insuline est une forme modifiée de l'insuline humaine mais toujours fonctionnelle sur le patient pour effectuer la même action que l'insuline humaine en termes de contrôle glycémique. Par génie génétique, la séquence d'acides aminés de l'insuline peut être changée pour modifier ses caractéristiques d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'excrétion. Ces modifications ont été utilisées pour créer deux types d'analogues de l'insuline:

- ceux qui sont libérés lentement sur une période comprise entre 8 et 24 heures. Ils sont utilisés pour maintenir une insulïnémie basale tout au long de la journée,
- ceux qui sont plus facilement absorbés à partir du site d'injection et donc agissent plus rapidement. Ils sont destinés à un usage de bolus prandial.

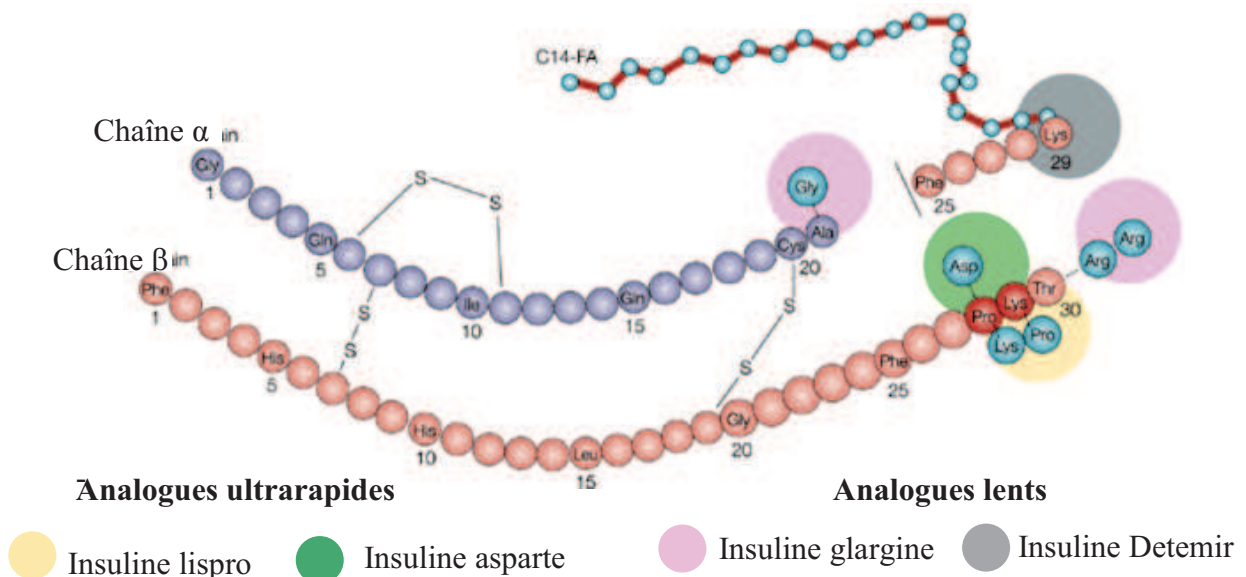


Figure 19 : Zones de modification sur la séquence d'insuline.

3.3.2.4.1. Analogues lents de l'insuline

Les analogues lents de l'insuline peuvent être obtenus en modifiant la conformation spatiale de l'insuline. En effet, en présence de zinc, celle-ci forme un hexamère : trois dimères situés autour d'un axe ternaire passant par 3 atomes de zinc. Ainsi, leur diffusion est ralentie, ce qui contribue à augmenter la durée d'action de l'insuline (Figure 20).

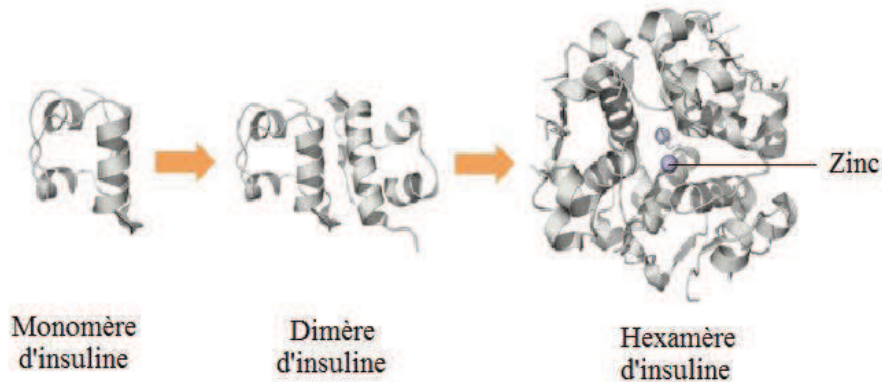


Figure 20 : Représentation schématique d'oligomères d'insuline.

Ces analogues lents résultent d'une modification de la structure de l'insuline humaine, mais cette modification est destinée à augmenter leur durée d'action. Leur libération se fait de façon plus constante ce qui réduit le risque d'hypoglycémie. Il existe deux analogues lents :

- l'insuline glargine ou Lantus® (Sanofi-Aventis) est soluble à pH 4 et se présente sous forme d'une solution limpide. Une fois injectée dans le tissu sous-cutané, elle précipite en microcristaux qui permettent sa libération progressive. Son action débute en 2 à 4 heures et se prolonge de façon régulière et constante, sans pic, jusqu'à 25 heures. Cette cinétique permet le plus souvent de ne faire qu'une seule injection quotidienne à heure fixe,
- l'insuline détémir ou Levemir® (NovoNordisk) se présente sous forme d'une solution limpide neutre. Elle se lie dans le tissu sous-cutané ce qui lui confère son effet retard. Elle commence à agir 2 à 4 heures après injection. Son action se poursuit sans pic jusqu'à 14 heures après injection.

Un nouvel analogue d'insuline ultra lente dégludec ou Tresiba® (NovoNordisk) vient également d'être développé. Il présente une structure semblable à celle de l'insuline humaine, hormis la suppression d'une thréonine en position B30 et la liaison sur la lysine d'un acide gras C16 (hexadécanoyle). Cette structure permet à l'insuline après injection sous-cutanée de former des multi-hexamères qui se libèrent en continu dans la circulation. La liaison de l'acide gras à l'albumine garantit une prolongation de la demi-vie estimée à 42 heures.

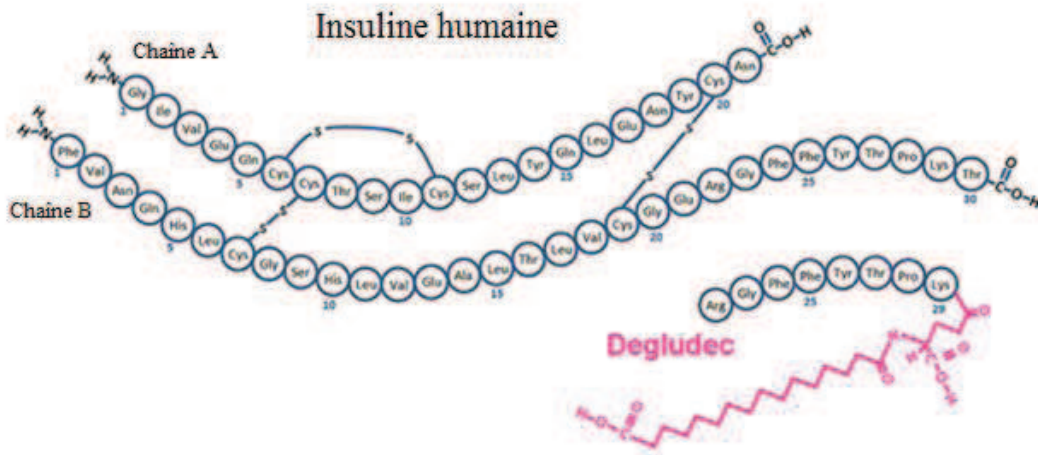


Figure 21 : Comparaison des insulines humaine et ultra lente dégludec.

3.3.2.4.2. Analogues ultrarapides de l'insuline

Lorsqu'ils sont injectés par voie sous-cutanée, les analogues de l'insuline d'action ultrarapide commencent à agir plus rapidement que l'insuline humaine soluble, dans les 10 minutes qui suivent l'injection. Ils maintiennent une glycémie plus basse dans les 4 heures qui suivent le repas, avec un effet maximal apparaissant 1 à 3 heures après l'injection. Leur durée d'action est inférieure à celle de l'insuline humaine soluble et on assiste à une remontée des glycémies à distance des repas au-delà de 4 heures après injection. Ces analogues remplacent généralement l'insuline ordinaire rapide en traitement d'urgence et dans les schémas multi-injections. Ils sont administrés juste avant les repas alors que l'insuline humaine doit l'être 30 minutes avant. Ils permettent de mieux réduire les élévations glycémiques postprandiales et d'éviter les épisodes d'hypoglycémies à distance des repas. Les analogues ultrarapides sont parfaitement stables dans les pompes externes mais pas dans les pompes implantables.

Il existe trois analogues ultrarapides (Figure 19) :

- celui issu de l'inversion des deux avant-derniers acides aminés sur la chaîne β , la lysine prenant la position $\beta 28$ et la proline la position $\beta 29$ pour donner l'insuline lispro ou Humalog commercialisée par Eli Lilly,
- celui obtenu par remplaçant de la proline en position $\beta 28$ par un aspartate pour donner l'insuline asparte ou Novorapid développer par les laboratoires NovoNordisk,
- le dernier analogue ultra rapide provient du remplacement de l'aspartate en position $\beta 3$ par la lysine et de la lysine en $\beta 29$ par un glutamate pour donner l'insuline glulisine ou Apidra (Sanofi-Aventis).

3.3.2.4.3. Mélanges d'insuline

Les différentes formulations d'insuline humaine peuvent être utilisées pré-mélangées afin de réduire le nombre d'injections quotidiennes nécessaires dans la prise en charge du diabète de type 2. Ceci permet de couvrir les besoins basal et postprandial à la fois. Dans cet objectif, des préparations contenant de l'insuline ou un analogue rapide et de l'insuline NPH ont été développées. Deux mélanges avec des analogues rapides sont disponibles : la lispro protamine neutre (Humalog®, Eli Lilly) et l'aspartate protamine cristalline (NovoLog®, NovoNordisk). La composante protamine de ces deux molécules a des propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques similaires à la NPH.

3.3.2.4.4. Développement d'une insuline concentrée

Sous sa forme commerciale, l'insuline est généralement dosée à 100 unités par millilitre (UI/mL) (3,5mg/mL) pour permettre une administration aisée et réduire les volumes injectés. Ce dosage est issu d'un long processus d'évolution de la préparation de l'insuline permettant une augmentation de la concentration au fil des années. Une formulation à 400 UI/mL (Insuman®, Sanofi-Aventis) ultra stabilisée a été développée spécifiquement pour être utilisée dans les pompes à insuline internes munies d'un cathéter intrapéritonéal. L'Insuman est une insuline humaine d'action rapide et courte, obtenue par modification enzymatique de l'insuline porcine. Cette insuline présente une concentration quatre fois supérieure aux autres insulines et a été formulée de façon à minimiser la perte d'efficacité dans les conditions de stress mécanique et thermique rencontrées dans les pompes. Plus récemment, Eli Lilly a développé et commercialisé la spécialité la plus concentrée sur le marché sous la dénomination Humulin® R Regular U-500. Il faut noter que l'Humulin® U-500 a été développée pour une administration par injection afin de réduire les volumes administrés pour les sujets obèses et/ou présentant une forte insulino-résistance.

3.3.3. Les dispositifs d'administration de l'insuline

A l'instar de leur préparation, de nouveaux modes d'administration de l'insuline doivent être développés. Ces dispositifs d'administration devraient permettre aux patients d'opter pour les équipements les plus adaptés à leur mode de vie, conduisant ainsi à une amélioration de leur compliance et à prévenir les complications cliniques de leur maladie. Ainsi, des stylos pré-remplis et des pompes (internes et externes) sont développés.

3.3.3.1. Les stylos injecteurs

L'insuline est classiquement administrée à l'aide d'une aiguille et d'une seringue. Depuis plus de 30 ans, différents types de stylos injecteurs ont été développés dont le premier mis sur le marché en 1985 était le NovoPen® (NovoNordisk). Ces stylos peuvent être soit pré-remplis (jetables), soit réutilisables et présentent les avantages de permettre un dosage simple (par des moyens analogiques ou numériques), d'être légers et faciles à transporter (discrétion et suivi du traitement), et de s'adapter à toutes sortes d'aiguilles hypodermiques ce qui améliore l'efficacité des injections et limite la douleur (Figure 22).

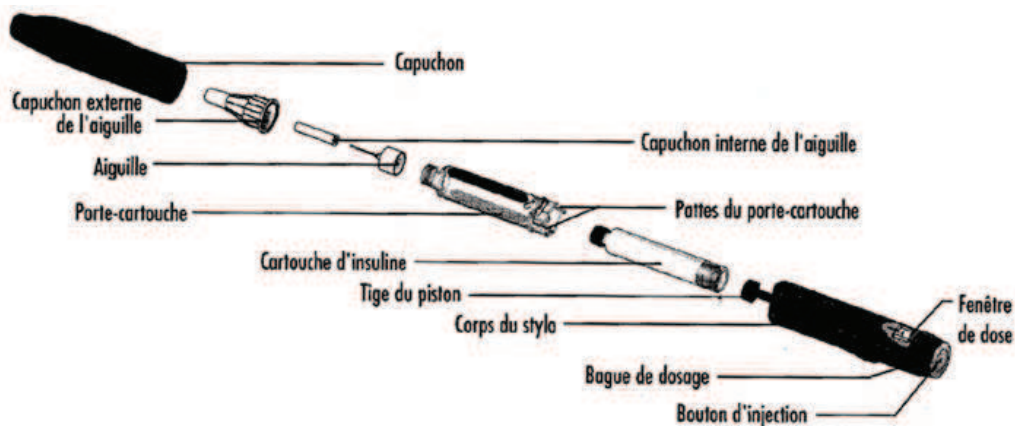


Figure 22 : Vue éclatée d'un stylo injecteur d'insuline (source : Agence Nationale de Sécurité du Médicament)

3.3.3.2. Les pompes à insuline

La possibilité de perfuser en continu de l'insuline en sous-cutané existe déjà depuis quelques années et rencontre un succès croissant chez les patients. Cette approche se pose en alternative aux injections sous-cutanées discontinues d'insuline humaine ou de ses analogues. Ces dispositifs se composent d'un réservoir-pompe externe et d'une interface de contrôle informatisée. Le dispositif est apposé au niveau de l'abdomen du patient et permet de perfuser en continu une faible quantité d'insuline humaine en sous-cutané par l'intermédiaire d'un cathéter (Figure 23 B). Dans ce type de dispositif, les insulines aspartate et lispro (analogues rapides) sont utilisées. Les dispositifs de perfusion peuvent aussi se présenter sous une autre forme (interne) où le réservoir de diffusion est implanté en sous cutané avec toujours le système informatisé de contrôle à l'extérieur (Figure 23 A). Pour ce type de dispositif, une insuline a été spécialement développée pour résister au stress mécanique et à la température à laquelle elle est exposée pendant 6 semaines dans la pompe: il s'agit de l'Insuman (Sanofi-Aventis). Ces

pompes ne dispensent pas le patient de mesures régulières de leur glycémie afin d'établir la quantité d'insuline à perfuser.

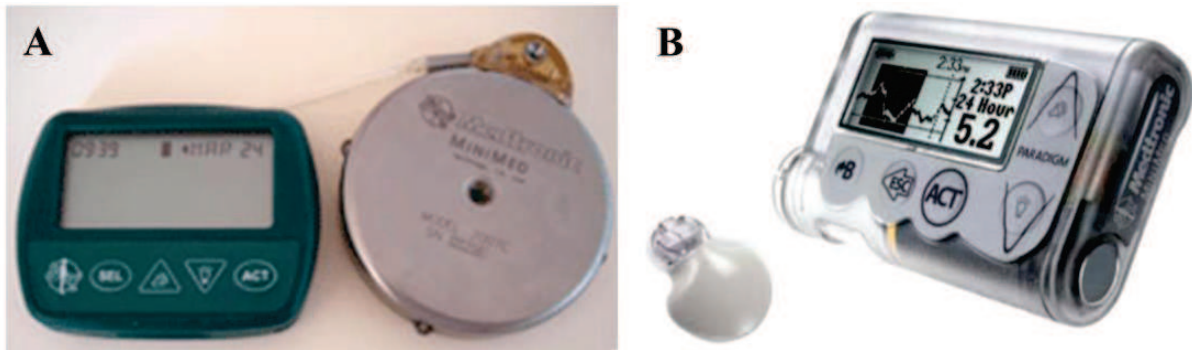


Figure 23 : Pompes à insuline disponible sur le marché. (A) pompe implantable Medtronic Minimed, (B) pompe externe Medtronic Paradigm VEO.

Bien que ce type de système soit très efficace dans la prise en charge du diabète, le but de l'insulinothérapie est de développer un mécanisme en circuit fermé, autorégulé par rétrocontrôle. Celui-ci pourra automatiquement réagir à toute modification de la glycémie en ajustant la quantité d'insuline administrée. Des dispositifs innovants visant à recréer un «pancréas artificiel» sont en cours de développement. Ils intègrent un système d'administration d'insuline par pompe externe couplé à un détecteur de glycémie en continu.

3.3.4. Les techniques d'insulinothérapie

Les analogues lents de l'insuline injectés par voie sous-cutanée sont libérés régulièrement sans pic. Ils sont utilisés comme insuline basale dans l'insulinothérapie fonctionnelle en association avec un bolus d'analogue ultrarapide avant chaque repas (diabète de type 1 ou diabète insulino-requérant) ou en association avec des hypoglycémiant oraux dans le diabète de type 2 (Figure 24).

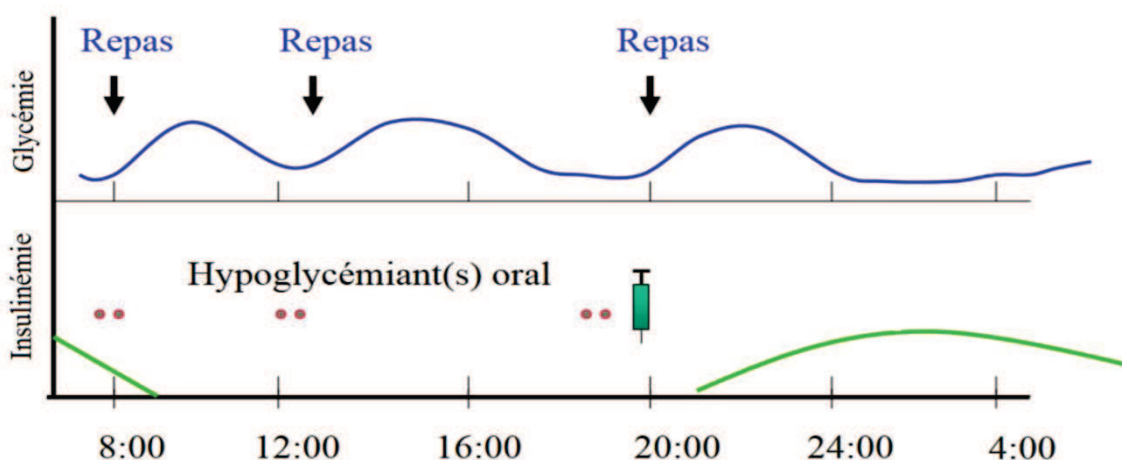


Figure 24 : Insulinothérapie à une injection associée à un hypoglycémiant oral

Dans le cadre d'une insulinothérapie par injection pluriquotidienne (cas du diabète de type 1), un analogue ultrarapide de l'insuline est injecté 10 minutes avant les repas (matin, midi et soir), qui n'ont ainsi pas besoin d'être pris à heure fixe. Un analogue lent de l'insuline est injecté à un moment quelconque de la journée mais toujours à la même heure. Le schéma d'injections varie d'un patient à l'autre notamment lorsque les besoins de base en insuline sont très différents le jour et la nuit (Figure 25).

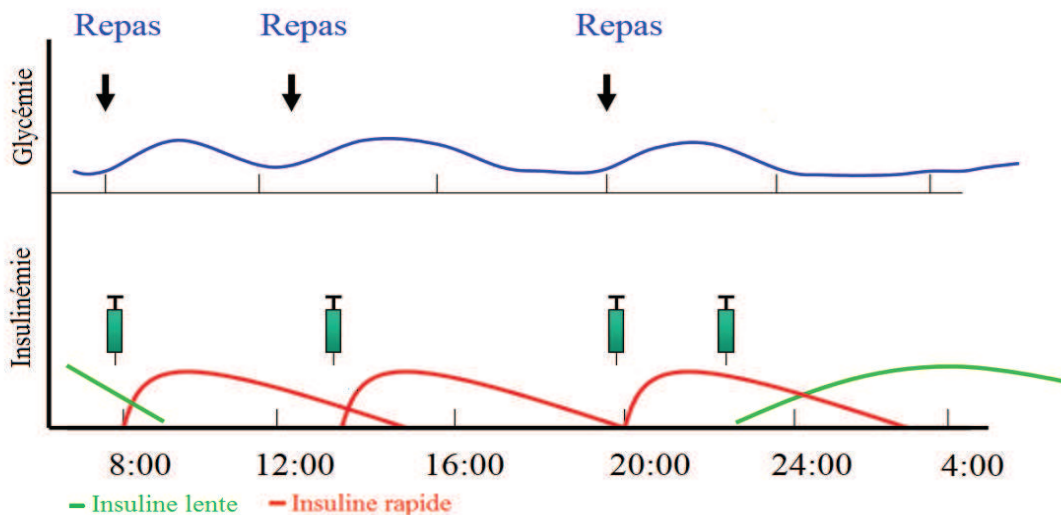


Figure 25 : Insulinothérapie à injection pluriquotidienne

3.4. Voies d'administration de l'insuline

Après sa découverte en 1921 par Banting et Best, l'insuline s'est présentée comme une réelle valeur ajoutée pour les patients souffrant de diabète. Dès lors, la question de son administration s'est posée et les voies intramusculaires, intraveineuses et sous-cutanées ont été utilisées pour administrer l'insuline. Contraignante pour le mode de vie, l'insulinothérapie par injection n'est pas le traitement le plus confortable pour les patients. En effet, malgré les développements technologiques mis en jeu pour améliorer l'administration de l'insuline (diminution de la taille des aiguilles, stylo injecteurs ...), celle-ci demeure contraignante pour le patient et devient par conséquent une limite dans la prise en charge du patient. Des études ont ainsi été conduites pour développer des méthodes d'administration par voie non-injectable comme les voies sublinguale, nasale, pulmonaire, rectale, transdermique... (R. I Henkin et al., 2009) (Figure 26).

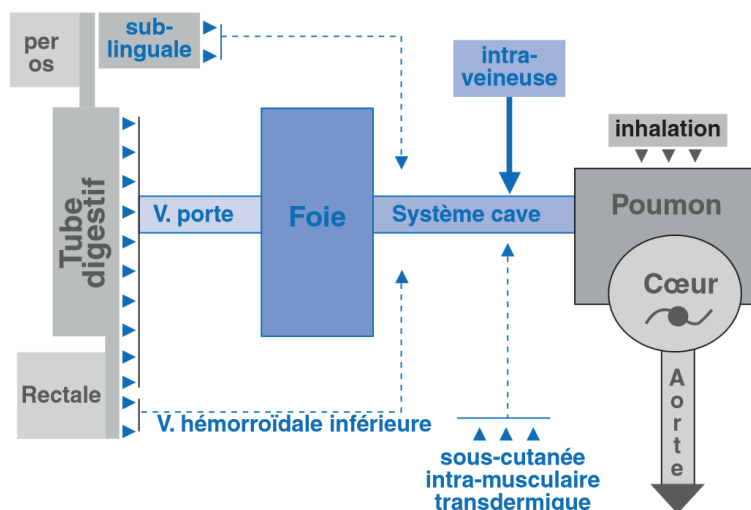


Figure 26 : Voies d'administration des médicaments

3.4.1. La voie buccale / sublinguale

La voie buccale présente de nombreux avantages pour l'administration d'insuline dont le non usage de dispositifs médicaux spécifiques, une absorption accrue du principe actif grâce à l'absence de couches kératinisées, le non passage au travers de la barrière intestinale et les risques de dégradation qui y sont associés. Du point de vue de la physiologie, la muqueuse buccale est richement vascularisée (sang et lymph) et permet un accès direct à la circulation systémique via la veine jugulaire. Ceci permet de contrecarrer le métabolisme du premier passage hépatique et d'offrir une meilleure biodisponibilité. D'autres avantages comprennent une faible activité enzymatique, une administration indolore, la facilité d'inclure un promoteur d'absorption/inhibiteur enzymatique ou un modificateur de pH dans la formulation et la multiplicité dans la conception de systèmes de libération pour une action locale ou systémique. La muqueuse qui tapisse la cavité orale est une voie d'intérêt pour l'administration de protéines et de peptides thérapeutiques. Les muqueuses buccales et les tissus muqueux dans la surface ventrale de la langue comptent pour environ 60% de l'aire de la muqueuse orale et sont constitués à près d'un tiers de cellules épithéliales étroitement compactés (figure 27).

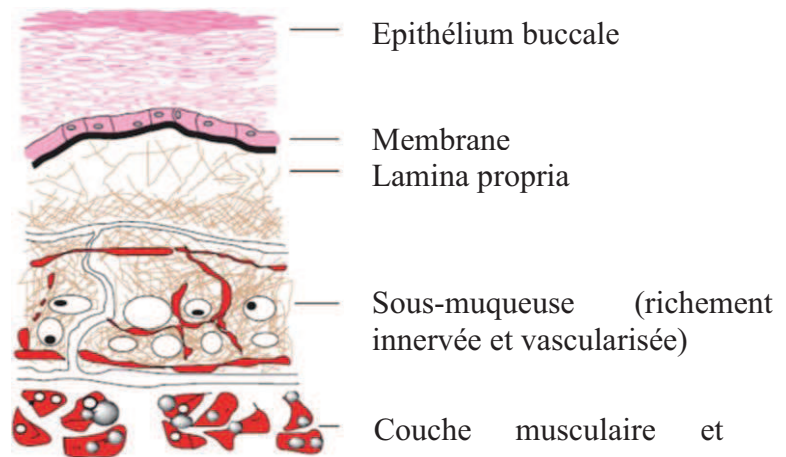


Figure 27 : Représentation schématique de la muqueuse buccale (Patel Viralkumar F. et al., 2011)

L'environnement de la cavité buccale présente des défis importants pour une administration systémique du médicament. Le médicament doit être libéré depuis la forme pharmaceutique au site d'administration (par exemple la zone buccale ou sublinguale) et passer à travers les couches muqueuses et entrer dans la circulation systémique. Certains aspects physiologiques de la cavité buccale jouent un rôle important dans ce processus, y compris le pH, le volume de fluide, l'activité enzymatique et la perméabilité de la muqueuse buccale. Pour les systèmes d'administration de médicaments destinés à une libération prolongée dans la cavité buccale (par exemple les systèmes mucoadhésifs), la structure et le renouvellement de la surface de la muqueuse sont également des facteurs déterminants pour leur performance. La voie buccale fournit une concentration de médicament prévisible et constante dans le sang. Des études ont montré que le transport de peptides à travers la muqueuse buccale se fait par diffusion passive (Khafagy El-sayed et al., 2007). De ce fait, l'usage de promoteurs d'absorption pour améliorer la perméabilité de l'insuline prend tout son sens. La majorité des formulations disponibles dans le commerce sont des formes pharmaceutiques solides telles que des comprimés et des pastilles. Des compagnies ont réussi la formulation de films ou de patches visant à obtenir une libération du médicament et une réponse clinique rapide. D'intenses recherches sont menées pour le développement de systèmes mucoadhésifs. Des études ont montré que cette forme pharmaceutique est un candidat prometteur pour l'administration de l'insuline par la voie buccale par le développement d'un film à base de chitosane renfermant de l'insuline (Morales Javier O. et al., 2014). Khafagy El-sayed et al. (2007) font référence à une formulation à base d'un gel de polymère (Pluronic F-127) contenant de l'insuline et des acides gras insaturés (acide oléique (18:1), acide eicosapentanoïque (20:5), acide docosahexaénoïque (22:6)) comme promoteurs d'absorption. Cette formulation permet de maintenir une

hypoglycémie continue chez le rat après une administration buccale. Les limites associées à ce type de formes posologiques comprennent une déglutition incontrôlée qui entraîne une libération du médicament dans le tube digestif et des difficultés à maintenir la forme posologique au site d'absorption. En 2003, un brevet est déposé par Generex Biotechnology (WO 2003013589 A1) pour protéger un dispositif permettant une administration de l'insuline par la voie buccale (Figure 28). Ce dispositif se présente sous forme de spray de nanoémulsions d'insuline d'une taille de 200 nm en utilisant la lécithine de soja comme promoteur d'absorption. Ce dispositif a montré des résultats encourageant en 2015 (Generex Biotechnology) lors de sa validation clinique de phase III et fait l'objet aujourd'hui d'une amélioration de sa biodisponibilité.



Figure 28: *Oral-Lyn™ (Generex Biotechnology™)*

3.4.2. La voie pulmonaire

L'appareil respiratoire offre un site d'échange idéal entre le milieu extérieur et le compartiment sanguin avec une superficie d'échange de plus de 120 m², dont plus de 95 % sont des zones d'absorption. La surface alvéolaire est faite d'une monocouche de cellules épithéliales d'une épaisseur de 0,1 à 0,5 µm et est fortement vascularisée, permettant aux molécules d'être transportées vers la circulation sanguine en un laps de temps court. Ce transport à travers la membrane alvéolaire se fait par transcytose pour des molécules de 40 kDa et par passage paracellulaire pour des molécules plus petites comme l'insuline (5,7 kDa). Adjei A. et al., (1997) ont identifié les paramètres essentiels de l'absorption pulmonaire (taille adéquate des particules, caractéristiques ventilatoires adaptées, dépôt pulmonaire profond). En effet, les médicaments administrés par cette voie doivent se présenter sous forme d'aérosol permettant l'obtention de particules de taille inférieure à 5µm pour une absorption efficace. Wigley et al., 1971 ont démontré pour la première fois que la nébulisation d'insuline porcine augmente les concentrations plasmatiques d'insuline et que celles-ci sont corrélées à l'action hypoglycémisante obtenue. L'insuline inhalée présente de nombreux avantages justifiant les efforts de recherche dans ce domaine. En effet, elle est absorbée au moins aussi vite que par

voie sous-cutanée, l'effet hypoglycémiant de l'insuline est plus rapide sous sa forme inhalée et son effet métabolique maximal est au moins égal à sa forme injectable, cette voie évitant le métabolisme du premier passage hépatique. La durée d'action de l'insuline inhalée est d'environ 6 heures avec des épisodes d'hypoglycémies moins fréquents qu'avec l'insuline injectable mais plus fréquents qu'avec les antidiabétiques oraux. La biodisponibilité de l'insuline inhalée est de 80% par rapport à celle administrée en sous-cutanée (Henkin R. I et al., 2009). Partant de ces avantages, des dispositifs à l'étude pour pulvériser l'insuline ont fait l'objet de nombreuses publications issues d'une recherche active de l'industrie pharmaceutique pour développer de nouvelles technologies : en effet, ces systèmes doivent à la fois générer des particules de taille adéquate, assurer une inhalation optimale et délivrer la substance médicamenteuse intacte aux alvéoles de manière reproductible pour éviter les épisodes d'hypo- ou d'hyperglycémie.

La formulation médicamenteuse utilisée est soit:

- Une poudre d'insuline :
 - Exubera® (Nektar Therapeutics Inc., Pfizer, États-Unis)

En 2006, la FDA (Food and Drug Administration) aux États-Unis donne les autorisations de mise sur le marché de l'Exubera® pour le compte des laboratoires Pfizer pour une administration intrapulmonaire de l'insuline (Figure 29). C'est une poudre sèche d'insuline humaine recombinante, présentée en blister s'insérant dans un inhalateur. Ce dispositif permet de nébuliser l'insuline sans gaz et ne requiert pas d'énergie. L'efficacité de l'Exubera a été démontrée. Elle permet l'obtention d'une concentration maximale (C_{max}) d'insuline en une heure en comparaison à l'insuline ordinaire administrée par voie sous-cutanée dont le C_{max} apparaît au bout d'une heure et demie (M.H. Becquemin et al., 2008). L'Exubera® s'est vu retirer du marché pour des raisons qui demeurent encore mal connues mais le manque d'efficacité semble être la raison principale (Lutz Heinemann 2008). Une autre raison de son retrait sur le marché est le risque de cancer du poumon accrue. En effet, l'insuline est un facteur de croissance et son exposition dans l'épithélium pulmonaire à long terme sous sa forme particulière pourrait s'avérer délétère.



Figure 29 : *Dispositif Exubera® (Nektar Therapeutics Inc., Pfizer)*

Le dispositif Nektar semble néanmoins avoir encore un avenir prometteur car le groupe Sanofi-Aventis vient d'acquérir une licence d'exploitation.

- Technosphere™ Insuline (Pharmaceutical discovery corporation mankind biopharmaceuticals, États-Unis)

Il s'agit de poudre cristalline d'insuline dont le diamètre est de l'ordre de 3 μm , contenue dans des gélules. L'aérosol, constitué de particules d'insuline, est produit grâce à un inhalateur dont l'activation est déclenchée par l'inhalation du patient (Figure 30). Les études sur des sujets sains et diabétiques de type 2 lui ont montré une action intermédiaire entre l'insuline administrée en intraveineuse et celle administrée en sous-cutanée. Sous cette formulation, la durée d'action de l'insuline est brève (inférieure à 3 heures).



Figure 30: *Dispositif Technosphere™ Insuline (Pharmaceutical discovery corporation Mankind biopharmaceuticals)*

Le dispositif Technosphere™ a été autorisé par la FDA en 2014 pour une administration bolus dans le traitement des diabètes de type 1 et de type 2. L'effet pharmacologique obtenu avec ce dispositif est moins important que celui observé avec les insulines rapides administrées en sous-cutanée, mais engendre moins d'hypoglycémie (Nuffer W. et al., 2014). La cinétique d'absorption offerte par ce dispositif est supérieure à toutes celles obtenues avec les insulines disponibles sur le marché et présente un profil d'action semblable à celle de la lispro. Du fait

de son lieu d'administration, les effets indésirables sont d'ordre respiratoire. En effet, la toux semble être l'effet négatif prédominant associé à une réduction du volume d'expiration forcée. L'usage de ce dispositif implique un contrôle régulier des fonctions respiratoires du patient.

- Air™ (Eli Lilly, États-Unis)

Le système Air™ utilise des particules poreuses d'un diamètre de 5 µm approximativement (Figure 31). Le caractère poreux des particules minimise les phénomènes d'agrégation, facilite leur dispersion et permet une meilleure absorption. Des données obtenues chez le rat et chez l'Homme montrent une pharmacocinétique comparable à celle de l'insuline en sous-cutanée.

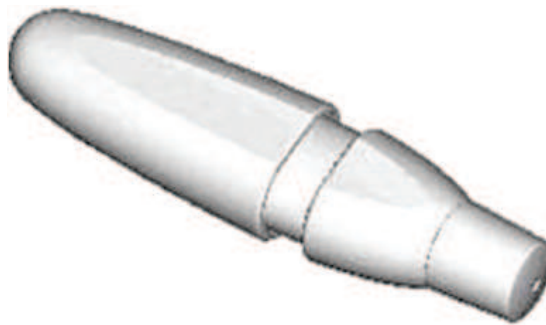


Figure 31: Air™ Insuline (Eli Lilly, États-Unis)

Les données pharmacocinétiques et pharmacodynamiques obtenues lors de la phase 1 des essais cliniques ont démontré que l'insuline AIR™ est rapidement absorbé avec une exposition et une durée d'action plus longues en comparaison à l'insuline lispro. Une étude de phase 2 a montré une préférence des patients pour l'insuline administrée par le dispositif Air™ par rapport à l'administration par injection sous-cutanée, et une étude récente a indiqué que le système est facile d'utilisation. En 2008, Eli Lilly annonce l'arrêt de son programme de développement de son dispositif Air™. Le programme de développement a été jusqu'en phase III d'étude clinique pour une prise en charge des diabétiques de type 1 et de type 2. Mais la compagnie indique que cette décision n'est pas liée à un défaut de sécurité du dispositif observé lors des études mais à des incertitudes d'ordres réglementaires et commerciaux.

- Une solution d'insuline nébulisée
- AERX® (Novo Nordisk A/S, Danemark)

Ce système délivre un nébulisat d'insuline dont le diamètre des particules est compris entre 1 et 3 µm (Figure 32). Un microprocesseur permet le déclenchement automatique de l'aérosol et est capable de mémoriser les doses, ainsi que les paramètres ventilatoires pour chaque inhalation réalisée par le patient, facilitant la compliance et la surveillance de ce traitement.

Une étude réalisée chez 18 patients diabétiques de type 1 a confirmé une absorption et un délai d'action plus court que l'insuline en sous-cutanée.



Figure 32 : AER_x® (Novo Nordisk A/S, Danemark)

Ce système a montré son efficacité lors d'études (Schuster J. et al., 1997) en montrant son aptitude à générer des particules de tailles homogènes compris dans l'intervalle d'absorption défini avec une dispersion homogène dans les poumons. Moses R. G. et al. (2009), ont publié une étude évaluant l'efficacité et la sécurité d'utilisation du dispositif AER_x démontrant que ceux-ci étaient similaires aux autres systèmes d'administration par voie pulmonaire. Il ressort de cette étude que NovoNordisk doit encore améliorer l'AER_x® afin de réduire les hypoglycémies nocturnes observées lors des phases cliniques. Cependant, en janvier 2008, NovoNordisk annonce l'arrêt du développement du système AER_x® dans un communiqué de presse en indiquant que la stratégie commercial de développement d'un tel dispositif était trop risquée.

- Aerodose™ (Aerogen Inc., États-Unis).

Ce système est un générateur électronique à piles qui délivre de l'insuline liquide nébulisée (3 µm) (Figure 33). Chez le sujet sain, le pic d'insulinémie est plus rapide que par la voie sous-cutanée.



Figure 33: Aerodose™ (Aerogen Inc., États-Unis)

Dennis Kim et al.,(2003) ont démontré que l'insuline administrée par le dispositif Aerodose™ présente des courbes dose/réponse semblables à celles de l'injection en sous cutanée ainsi qu'une biodisponibilité relative constante. En partenariat avec Dance Biopharm Inc. (Etats-Unis), Aerogen Inc. conduit actuellement les études cliniques de phase II du dispositif Aerodose™ (Adagio™). Les premiers résultats dévoilés en 2013 font état d'une efficacité et d'une innocuité de l'insuline administrée par la voie pulmonaire par le biais de l'Adagio™.

3.4.3. La voie nasale

La voie nasale a été largement étudiée en vue d'en faire une voie alternative à la sous-cutanée pour l'administration d'insuline dans le traitement du diabète. L'intérêt d'une administration intranasale est multiple. En effet, cette voie d'administration offre une large surface d'absorption compte tenu du fait que l'épithélium nasale est couvert de microvillis et d'une couche sous muqueuse richement vascularisée (Figure 34). La vascularisation se déverse directement dans la circulation générale avec un important apport sanguin qui permet d'empêcher le catabolisme du principe actif en évitant le métabolisme de premier passage hépatique. De par sa physiologie, cette voie permet donc une posologie faible, un effet pharmacologique rapide et un faible risque d'apparition d'effets secondaires.

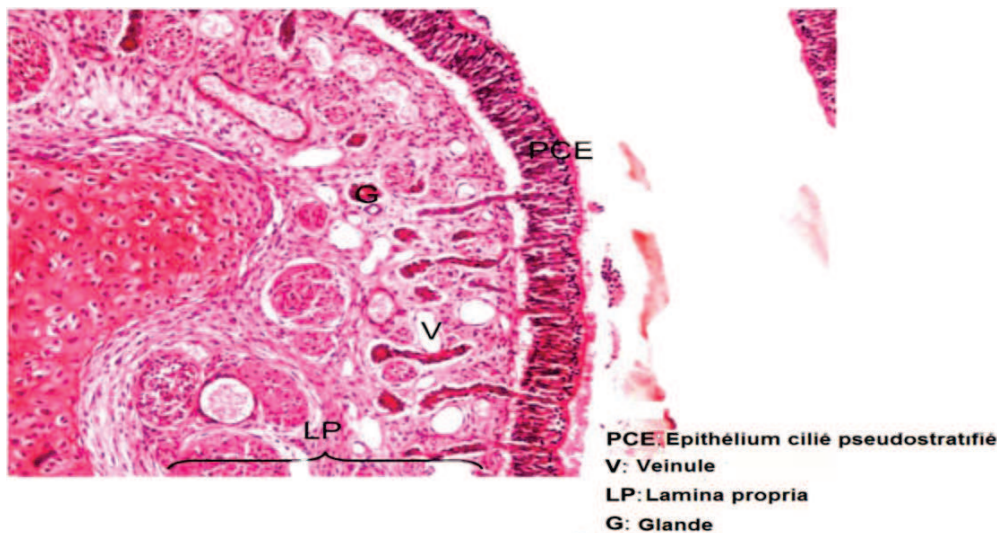


Figure 34 : Histologie de la muqueuse nasale (modifié d'après kmu.edu.tw)

Michael Hinchcliffe et Lisbeth Illum (1999) ont démontré que l'insuline intranasale présente le même profil pharmacocinétique que l'insuline administrée en intraveineuse. Néanmoins, beaucoup des problèmes d'absorption rencontrés dans l'administration intrapulmonaire concernent également la voie intranasale. La limite majeure à l'administration d'insuline par la voie intranasale est d'ordre physiologique incluant la présence du mucus et de

son épaisseur, la clairance mucociliaire, la présence d'enzymes et l'activité des macrophages qui peuvent représenter une barrière à son absorption. L'utilisation de promoteurs d'absorption, d'inhibiteurs enzymatiques ainsi que la formulation de formes pharmaceutiques adéquates (systèmes mucoadhésifs ou pulvérisateurs de poudre) peut être une solution pour contourner cet obstacle et permettre une augmentation de la biodisponibilité de l'insuline administrée par cette voie.

La taille optimale des particules d'insuline à administrer n'est pas clairement définie mais on peut supposer qu'elle doit être du même ordre que celle d'une administration par voie pulmonaire. De ce fait, les dispositifs utilisés pour une administration intranasale doivent être similaires à ceux employés pour l'administration intra pulmonaire (voir 3.4.2). Des études ont montré que cette voie d'administration permet d'obtenir un contrôle efficace de la glycémie sur le long terme. L'insuline intranasale offre une absorption rapide et une biodisponibilité de 9% par rapport à la voie sous-cutanée (Parmar Harshad et al., 2010). L'emploi des promoteurs d'absorption pour augmenter la perméabilité de l'insuline délivré par voie intranasale a déjà fait ses preuves (Zhang Yi et al., 2001; Khafagy E.-S et al., 2007). Les systèmes mucoadhésifs sont une alternative intéressante pour augmenter la biodisponibilité. Ces systèmes de délivrance nasale de médicaments absorbent l'eau, gonflent et forment une couche de type « gel » au contact de la muqueuse nasale, qui est éliminée lentement de la cavité nasale. Par conséquent, l'absorption se produit rapidement, souvent avec une biodisponibilité élevée. Les polymères muco-adhésifs exercent un effet direct sur la muqueuse en absorbant l'eau à partir du mucus. En gonflant, les cellules épithéliales sont déshydratées, ce qui provoque l'ouverture des jonctions serrées, entraînant une augmentation de l'absorption des médicaments transportés par voie paracellulaire. La formulation de gel contenant de l'insuline produit une réponse hypoglycémique chez le lapin significativement supérieure à celle obtenue avec une injection sous cutanée (El-Dakrouri WA et al. 2010). Ces résultats suggèrent que le gel peut être considéré comme une technologie intéressante pour une administration nasale de macromolécules. L'administration intranasale d'un gel à base de chitosane permet l'augmentation de l'absorption du principe actif et une réduction de la glycémie de 46% par rapport à celle induite par une injection intraveineuse. Par conséquent, les nanoparticules d'insuline à base de chitosane peuvent être utilisées en tant que système d'administration de médicament par voie nasale (Varshosaz J. et al., 2006). Malgré les résultats prometteurs, le développement de systèmes d'administration d'insuline par voie nasale est en proie à des problèmes qui exigent une approche rationnelle. À ce jour, l'expérience clinique relativement

limitée avec de l'insuline intranasale indique un besoin d'utiliser des doses élevées et répétées pour obtenir un contrôle glycémique.

3.4.4. La voie rectale

La voie rectale peut être considérée comme une voie alternative intéressante pour l'administration d'insuline. En effet, cette voie est indépendante du système digestif et permet donc d'échapper à la dénaturation de l'insuline par les enzymes digestives. De par son irrigation par le système circulatoire, les principes actifs administrés par cette voie échappent au métabolisme de premier passage hépatique. L'absorption d'insuline par voie rectale nécessite l'utilisation de promoteurs incorporés dans des suppositoires ou des gels. Des études ont montré que l'insuline en co-administration avec un promoteur d'absorption comme l'acide biliaire désoxycholique permet de réduire efficacement la glycémie chez le modèle de lapin diabétique induit par l'alloxane (Khafagy E.-S et al., 2007). L'utilisation des promoteurs d'absorption est une limite majeure à l'administration d'insuline par voie rectale compte tenu de la présence d'éléments toxiques (flore bactérienne) dans la lumière de même que la douleur, la compliance des patients et l'absence de reproductibilité de la biodisponibilité.

3.4.5. La voie transdermique

La peau est le plus gros organe de l'organisme possédant une large surface d'échange (2 m²) et est une alternative intéressante à la voie sous-cutanée en offrant une meilleure compliance au patient, une libération prolongée de médicament en évitant la dénaturation du principe actif se produisant dans le tractus gastro-intestinal et lors du métabolisme de premier passage hépatique. Malgré les avantages qu'elle offre, la peau est une barrière très efficace et est imperméable aux molécules étrangères et plus particulièrement aux larges molécules hydrophiles. La perméabilité faible de la peau est en grande partie due à la couche cornée qui est la couche la plus superficielle (Figure 35).

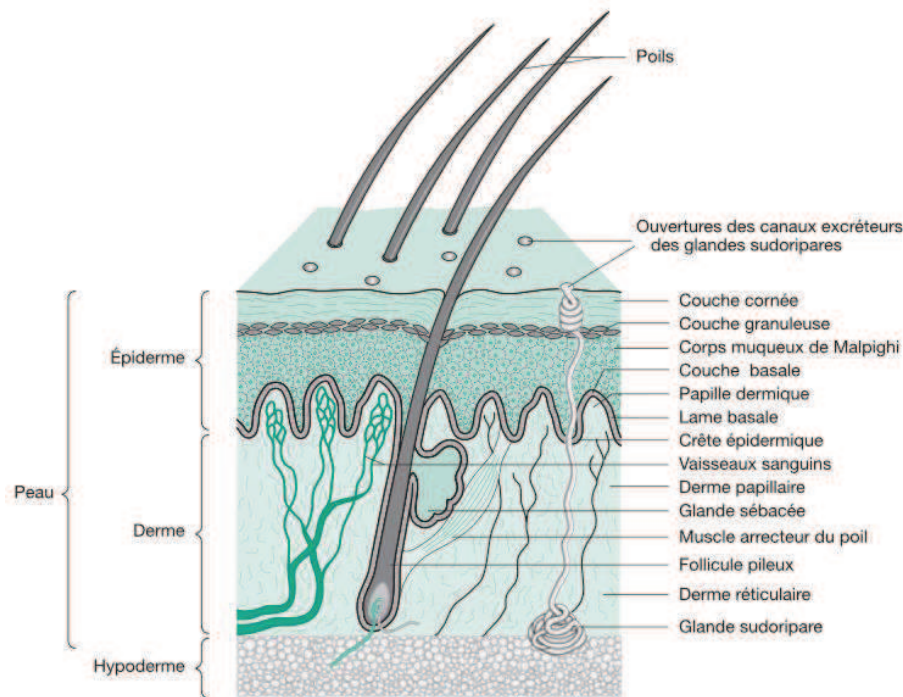


Figure 35 : Structure de la peau

Le développement d'approches sophistiquées pour permettre de pallier à l'imperméabilité du tissu cutané inclut l'usage de promoteur d'absorption, l'utilisation de micro-aiguilles ou de techniques comme l'iontophorèse ou encore l'ultrason.

3.4.5.1. Promoteurs d'absorption

Les promoteurs d'absorption se définissent comme étant des composés qui facilitent l'absorption d'un principe actif en augmentant la diffusion de celui-ci au travers d'une barrière biologique. Comme décrit dans les autres voies d'administration ou l'augmentation de la biodisponibilité du principe actif nécessite le recours à l'utilisation de promoteurs d'absorption, ces derniers sont des agents de surface, des acides gras ou des esters gras. Ils agissent sur la perméabilité cutanée en modifiant la structure de la kératine, en dénaturant les lipides intercellulaires. Les limites majeures à l'usage de promoteurs d'absorption sont liées aux irritations de la peau qu'ils engendrent (dénaturation des lipides intercellulaires) et à leur inaptitude à transporter efficacement des macromolécules dont la masse moléculaire est supérieure à 4.5 KDa au travers de la peau. Le peptide TD-1 utilisé comme promoteur d'absorption (Jin PP et al. 2014) en co-administration avec l'insuline permet d'augmenter la perméation de l'insuline à travers la peau et donc sa biodisponibilité et de potentialiser son activité pharmacologique (Chang Mingming et al., 2013). Des études rétrospectives ont montré que les petits peptides utilisés comme promoteur d'absorption créent une ouverture transitoire

des jonctions cellulaires pour permettre le passage des macromolécules de la surface cutanée vers la circulation systémique.

3.4.5.2. Systèmes d'administration transdermique

Pour pallier l'imperméabilité de la peau aux macromolécules, des stratégies ont été développées dont l'encapsulation du principe actif dans des nanovecteurs (dispersion colloïdale). Guo et al., (2000) ont montré l'efficacité de ces systèmes nanoparticulaires (nanovecteurs en lécithine et encapsulant de la cyclosporine A) de par leur taille (inférieure à 100 nm), leur efficacité d'encapsulation et leur activité biologique. En effet, cette étude menée chez la souris a démontré que l'application topique d'une dose d'insuline encapsulée permet d'obtenir un effet pharmacologique de l'insuline par réduction de la glycémie.

Megumu Higaki et al., (2006) montrent que la formulation de nanoparticules de carbonate de calcium (CaCO₃) encapsulant de l'insuline (Romuald Babou-Kammoe et al., 2012) permettent d'induire une diminution de la glycémie et une augmentation de la biodisponibilité de l'insuline chez la souris.

Ces études montrent la faisabilité d'un système d'administration d'insuline par la voie transcutanée par le biais de nanoparticules encapsulant de l'insuline.

3.4.5.3. La technique de l'iontophorèse

L'iontophorèse est un procédé visant à accroître la perméabilité de la peau aux macromolécules à visée thérapeutique en utilisant un faible courant électrique (Figure 36). L'iontophorèse transdermale est une technique prometteuse et est considérée comme une approche intéressante pour un contrôle et une augmentation de la perméabilité lors de l'administration de protéines ou peptides. Sur le modèle de rat diabétique par injection de streptozotocine, l'iontophorèse sur peau nue permet d'obtenir une réduction de la glycémie. Pillai et al., (2004) montrent que cette perméabilité de l'insuline à travers la peau par iontophorèse est d'autant plus importante que le temps d'exposition et l'intensité du courant sont faibles. Il est donc possible de moduler la perméabilité des macromolécules au travers de la barrière cutanée. Des études ont montré que le prétraitement de la peau avant l'application de l'iontophorèse accroît la perméabilité de l'insuline à travers la peau (E. H. Choi et al., 1999 ; Khafagy E.-S et al., 2007). En effet, le promoteur d'absorption employé permet de dilater l'espace intercellulaire de la couche cornée réduisant ainsi son impédance électrique et augmentant le passage de macromolécules. Des résultats similaires sont obtenus en utilisant des acides gras. La forme pharmaceutique la plus adéquate est le gel pour co-administrer le principe actif avec un agent de surface avant l'iontophorèse. Des gels à base de polymère (poloxamer

P407) ont montré leur efficacité mais la limite majeure de cette technique est l'irritation de la peau qu'elle engendre.



Figure 36 : Perméabilisation de la peau par iontophorèse : exemple du Mesodermil P. ®
(Mesodermil Plus®, LASER3X)

3.4.5.4. La technique de la sonophorèse (ultrasons)

La sonophorèse est une technique basée sur l'application cutanée d'ultrasons pour perméabiliser la peau aux macromolécules (Figure 37). Cette technique a déjà montré son efficacité en permettant le transport transcutané de principes actifs de diverses natures incluant du matériel génétique ou des protéines. Cette méthode peut être couplée avec des promoteurs d'absorption, mais cette combinaison n'a pas révélé de gain notable en termes d'efficacité pharmacologique. La fréquence des ultrasons doit être faible pour permettre l'incorporation efficace des produits dans la peau. La sonophorèse est supposée provoquer de façon réversible l'ouverture de canaux à travers les couche cornée et lipidique afin d'offrir à l'insuline un trajet direct vers les couches inférieures du derme puis vers la circulation systémique. Des études ont montré que cette méthode permet chez le rat d'obtenir un effet pharmacologie comparable à une injection sous cutanée d'insuline (A. Boucaud et al., 2002). Cette étude a également montré que l'effet pharmacologique de l'insuline transdermique n'est observable que lorsque la sonophorèse et l'insuline sont appliquées extemporanément sur la peau. Une présonophorèse suivi d'une apposition d'insuline ne donne donc aucun résultat.

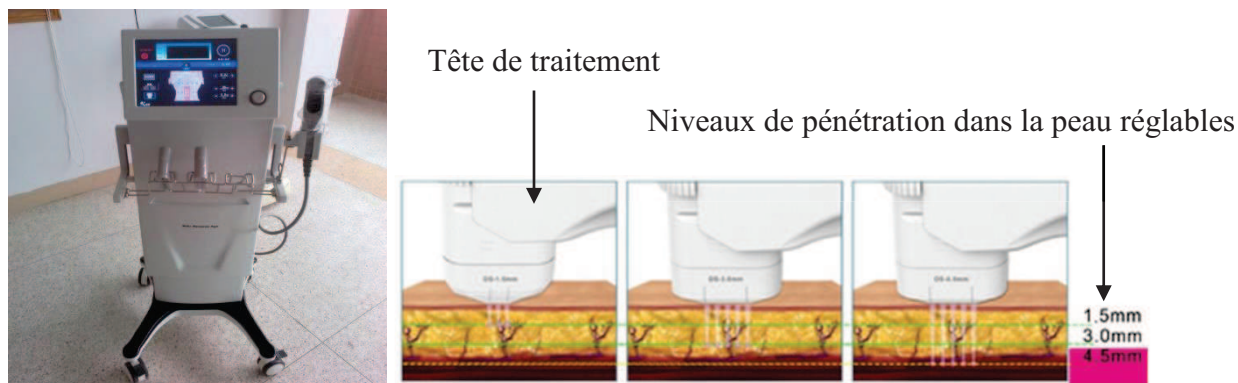


Figure 37 : Perméabilisation de la peau par sonophorèse exemple du Dermafocus 30
(Dermafocus 30®, Nuovolaser, LASER3X)

3.4.5.5. L'usage des micro-aiguilles

L'administration transdermique utilisant la technologie basée sur les micro-aiguilles est en pleine expansion. Cette technologie se base sur une multitude d'aiguilles disposées sur un support (Figure 38) permettant de créer de manière transitoire des micro-ouvertures dans les couches superficielles de la peau pour permettre le passage des macromolécules. Le diamètre des aiguilles est suffisamment large pour permettre le passage de macromolécules, de nanoparticules etc... mais suffisamment petit pour éviter toute douleur lors de son application sur la peau. Il est possible de fabriquer des micro-aiguilles de différentes géométries et matériaux (métal, silicone, polymère biotoléré). Des études ont montré l'efficacité de cette technique pour augmenter la perméabilité de l'insuline au travers de la peau. Martanto W. et al. (2004) ont montré que l'utilisation de micro-aiguilles permet d'obtenir un effet pharmacologique de l'insuline similaire à une administration sous cutanée d'insuline (0.5 UI).

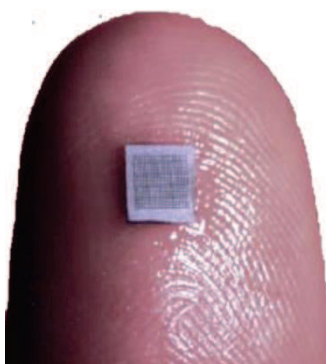


Figure 38 : Exemple d'un dispositif à microaiguille (source : futura-santé)

Malgré les nombreuses stratégies employées pour augmenter la délivrance transdermique d'insuline, le succès reste limité compte tenu de la faible biodisponibilité qu'offre cette voie

comparée à une administration sous-cutanée, de la réactivité immunitaire de la peau et de son imperméabilité.

3.4.6. La voie orale

Chez l'individu sain, en état postprandial, le pancréas sécrète de l'insuline suite à l'augmentation de la glycémie. L'insuline est alors déversée dans la veine porte pour rejoindre le foie où est son premier site d'action. L'injection sous cutanée d'insuline de même que les autres voies d'administration développées ci-dessus (buccale, nasale, pulmonaire, transdermique...) rejoint la circulation générale avant de passer par le foie et échappe donc au métabolisme de premier passage hépatique. L'insuline orale à l'instar des autres voies d'administration présente l'avantage de suivre la voie de sécrétion physiologique de l'insuline en subissant le métabolisme de premier passage hépatique avant d'être distribuée dans tout l'organisme (Figure 39). Ce premier passage hépatique est un point de contrôle avant l'accès à l'organisme des xénobiotiques mais également des substances physiologiques comme par exemple, les sels biliaires ou l'insuline. Pour assurer cette fonction, la totalité du sang issu du tube digestif est drainée par la veine porte. Celui-ci représente près de 80 % du débit sanguin hépatique. Ainsi l'insulinosécrétion physiologique peut être mimée par une administration par voie orale (Figure 39).

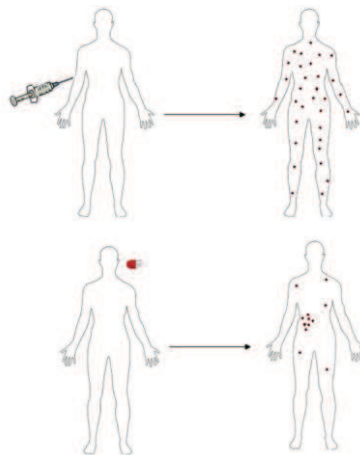


Figure 39 : Comparaison de la biodistribution après administration par voie sous-cutanée vs orale

Pour développer une insuline orale, il est indispensable de prendre en considération les barrières biologiques que celle-ci doit franchir pour arriver dans la veine porte. De la bouche à la veine porte, l'insuline doit traverser tout le tractus gastro-intestinal. L'estomac est l'organe de digestion du corps humain, l'intestin joue également un rôle primordial dans la digestion et a le rôle d'absorption des nutriments et des molécules thérapeutiques. L'épithélium intestinal

assure aussi la fonction de protection de l'organisme contre l'entrée de toxines et de microorganismes.

A l'heure où l'administration orale d'insuline est potentiellement attirante, cette voie d'administration se développe sans pour autant avoir rencontré de succès jusqu'à présent. De nombreuses stratégies individuelles et combinées ont été développées afin d'augmenter l'absorption d'insuline. Ceux-ci incluent la co-administration d'insuline avec des inhibiteurs d'enzymes et/ou l'utilisation de promoteurs de pénétration, la modification de la stabilité chimique de l'insuline et l'utilisation de composés mucoadhésifs, de liposomes, d'émulsions et systèmes polymériques (Reix et al., 2012).

3.4.7. Bilan des voies d'administration

La revue des différentes voies d'administration de l'insuline révèle que celles-ci présentent toutes à la fois des avantages et des inconvénients. Ceux-ci sont listés ci-dessous :

	Avantages	Inconvénients
Voie buccale	Dégradation limitée (pH neutre, activité enzymatique faible)	Faible perméabilité, faible surface d'absorption
Voie pulmonaire	Grande surface d'échange, alvéoles pulmonaire richement vascularisées	Risque important d'affection respiratoire et de cancer
Voie nasale	Grande surface d'échange, muqueuse richement vascularisées avec une bonne perméabilité	Faible temps de contact (clairance mucociliaire)
Voie rectale	Indépendante du système digestif, présent peu d'activité enzymatique et permet l'évitement (en partie) du métabolisme de premier passage hépatique	Nécessite l'utilisation de promoteurs d'absorption
Voie transdermique	Grande surface d'échange, facile d'accès et permet une libération prolongée du principe actif sans dénaturation de celui-ci.	Faible perméabilité aux molécules hydrophiles
Voie orale	Libération de l'insuline dans le sang sous contrôle hépatique	Présence de nombreuses contraintes chimiques et physiques

Tableau 1 : Récapitulatif des avantages et inconvénients des différentes voies d'administration pour l'insuline

La recherche de voies alternatives à l'injection sous cutanée est motivée par le souhait de simplifier le traitement, d'améliorer la qualité de vie et l'observance des patients diabétiques. Le choix d'une nouvelle voie d'administration outre tout l'aspect physiologique doit aller dans le sens de la simplification du traitement en répondant à des critères comme une utilisation la plus simple et la plus discrète possible, l'absence d'injection, la limitation des hypoglycémies sévères et enfin permettre à l'insuline exogène le métabolisme de premier passage hépatique (plus physiologique).

	Utilisation simple, rapide et discrète	Ne nécessitant pas d'injections	Limitation des hypoglycémies	Permettant le métabolisme de premier passage hépatique
Voie buccale	✓	✓		
Voie pulmonaire	✓	✓		
Voie nasale	✓	✓		
Voie rectale		✓		✓
Voie transdermique	✓	✓		
Voie orale	✓	✓	✓	✓

Tableau 2 : Comparaison des différentes voies d'administration possibles de l'insuline

La voie orale est la seule voie qui permet de répondre à l'ensemble de ces critères. Cette voie d'administration permet de reproduire la sécrétion physiologique de l'insuline par le biais de son passage par la veine porte pour rejoindre le foie. Ceci représente un avantage thérapeutique indéniable dans la gestion du diabète. Mais de par sa nature peptidique, l'administration orale d'insuline est un défi majeur car les contraintes imposées par la physiologie du tractus gastro-intestinal doivent être surmontées.

3.5. Limites de l'administration orale d'insuline

Malgré tous les avantages décrits, l'administration orale d'insuline présente des limites. En effet, de par sa nature protéique, l'insuline est sensible aux conditions rencontrées dans le tractus gastro-intestinal. La première barrière est de nature chimique : l'acidité de l'estomac, l'activité enzymatique s'y produisant ainsi que dans l'intestin peuvent entraîner sa dégradation.

La seconde barrière est de nature physique : l'épithélium intestinal tapissé par du mucus présente la propriété d'être imperméable aux macromolécules.

3.5.1. Les contraintes chimiques

La limite majeure de l'administration orale de protéine est d'ordre protéolytique (Figure 40). Dans l'estomac, la protéolyse est opérée majoritairement par la pepsine alors que dans l'intestin, plusieurs enzymes dont la trypsine, la chymotrypsine et la carboxypeptidase sont présentes. Cette activité protéolytique réduit la biodisponibilité des principes actifs de nature peptidique administrés par la voie orale.

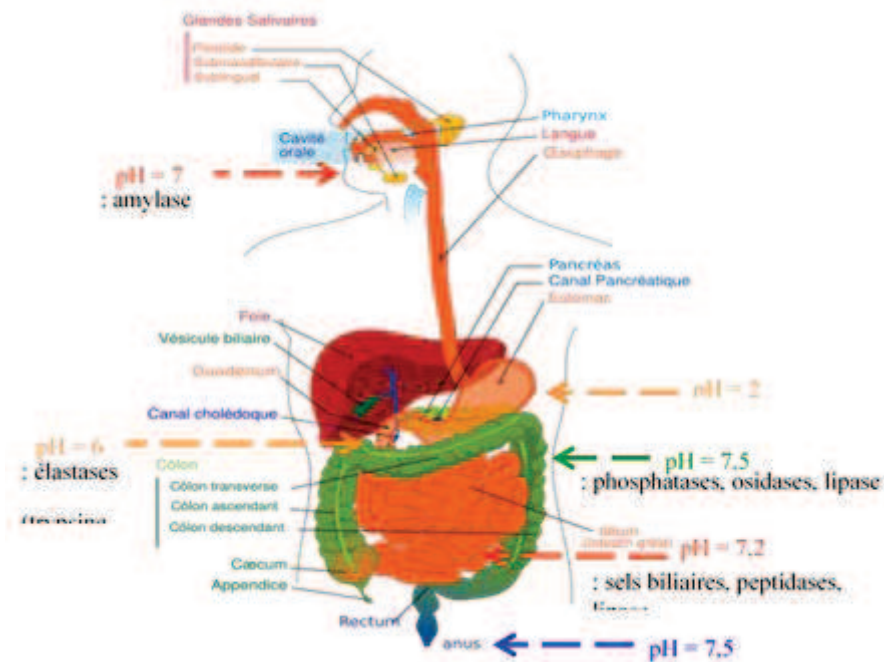


Figure 40 : pH et composition enzymatique du tractus gastro-intestinal

3.5.2. Les contraintes physiques

La couche de mucus est composée de glycoprotéines et est sécrétée par les cellules caliciformes. Cette couche de mucus, de par sa fonction de barrière physiologique, joue un rôle important dans la variation de l'absorption et de la biodisponibilité des principes actifs administrés par la voie orale. Aoki et al. (2005) ont démontré l'existence d'une activité enzymatique dans le mucus impliquant une absorption limitée de l'insuline. Cette étude visait à comparer la perméabilité apparente de l'insuline sur des segments d'intestin avec mucus ou sans mucus. Cette couche de mucus tapisse l'épithélium intestinal qui est lui-même une barrière physique à l'absorption de macromolécules. La barrière intestinale est composée du côté séreux par des couches musculaires et de son côté luminal de structures digitiformes richement vascularisées se projetant dans la lumière et correspondant aux villosités intestinales (Figure

41). Ces villosités sont elles-mêmes constituées de repliements appelés microvillosités permettant à l'intestin d'offrir une grande surface d'échange (200 m²). La couche directement en contact avec le milieu extérieur est l'épithélium intestinal et est constituée d'une monocouche continue d'entérocytes (80%), de cellules caliciformes (sécrétrices de mucus, 15%) et de cellules M jointes par des jonctions de trois sortes uniformisant la surface de l'épithélium intestinale.

- Les jonctions « serrés » ou « zonula occludens » qui sont étanches et imperméabilisent la membrane,
- Les jonctions d'ancrage, « zonula adherens » et « desmosomes » qui assurent la liaison intercellulaire
- Les jonctions communicantes, «jonctions de type gap » qui permettent de véhiculer les signaux chimiques et électriques entre les cellules.

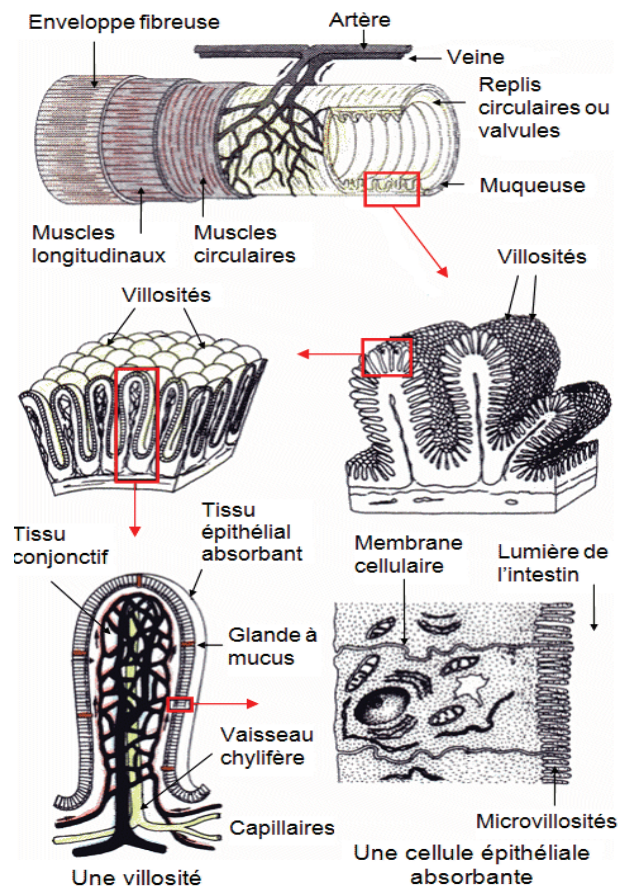


Figure 41 : Histologie de l'intestin

De par la structure de cet épithélium, l'absorption des molécules pour rejoindre la circulation générale se fait globalement par deux voies : la voie transcellulaire et la voie paracellulaire (Figure 42).

Par la voie transcellulaire, l'absorption impliquant des mécanismes actifs ou passifs a lieu au travers des entérocytes de l'épithélium intestinale et des cellules M des plaques de Peyer. La surface d'absorption offerte par le passage transcellulaire est largement supérieure à celle du passage paracellulaire qui s'effectue entre l'espace intercellulaire. La diffusion passive à travers les cellules épithéliales de l'intestin se produit par des voies de perméabilité non spécifiques. Ce type de transport transcellulaire se différencie du transport facilité, qui se produit via des canaux ou transporteurs spécifiques associés à la membrane.

La voie paracellulaire représente 1% de la surface de l'épithélium intestinal. C'est la voie préférentielle pour le passage des molécules hydrophiles. Cette voie n'est adaptée qu'aux petites molécules, aux ions et à l'eau. Cette sélection fait intervenir les jonctions serrées.

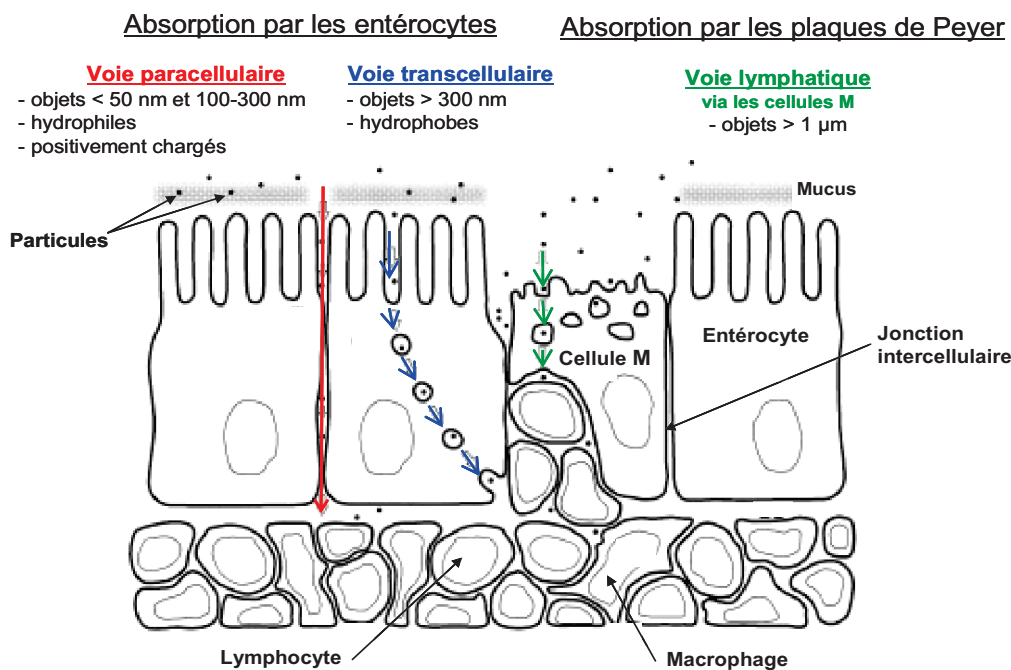


Figure 42 : Voies d'absorption transépithéliale (Reix et al., 2012)

3.5.3. Les méthodes permettant de surmonter les contraintes physico-chimiques

3.5.3.1. Les promoteurs d'absorption

La perméabilité des cellules de l'épithélium intestinal peut être modifiée en ciblant la bicouche lipidique. Afin d'accroître la perméabilité à travers la bicouche, les sels biliaires, les surfactants, les chélateurs de calcium et les acides gras sont les plus majoritairement employés. Il existe néanmoins des limites à l'usage de ces promoteurs d'absorption. En effet, l'altération de l'intégrité membranaire offre l'opportunité aux pathogènes et toxines résidents de l'intestin de rentrer dans la circulation générale (Whitehead et al., 2008). Des études ont montré que la co-administration de l'insuline avec de l'acide palmitique par voie orale permet de réduire la glycémie chez le lapin. Par contre, l'administration d'insuline avec des acides gras insaturés

n'a aucun effet. L'usage d'un chélateur de calcium est une approche permettant d'augmenter l'absorption paracellulaire des médicaments en jouant sur l'ouverture des jonctions serrées (Ichikawa and Peppas, 2003). Les polymères avec une fonctionnalité cationique qui reste protonée à pH intestinal est une autre approche intéressante. Le groupement amine chargé positivement peut se lier à des protéines de la zone pellucide de l'assemblage des jonctions serrées menant à la signalisation qui aboutit finalement à l'ouverture des jonctions serrées. En dehors de toutes ces approches, l'utilisation de la toxine zonula occludens a également été testée pour son effet sur la perméabilité des jonctions serrées. *Vibrio cholerae*, une bactérie qui infecte le tractus intestinal et provoque le choléra est la source de la toxine zonula occludens (Fasano et al., 1995). Il est rapporté que la toxine zonula occludens agit spécifiquement sur les filaments d'actine du zona occludens sans compromettre l'intégrité ou la fonction intestinale. L'ensemble est efficace surtout au niveau des récepteurs dans le jéjunum et l'iléon (Fasano et al., 1995). *In vivo*, la toxine zonula occludens augmente l'absorption de l'insuline dans l'iléon et le jéjunum de lapin mais n'a aucun effet dans le côlon. L'effet de la toxine est réversible, non toxique et est localisé dans une petite région intestinale. En effet, la plupart de la flore microbienne intestinale étant présente dans la région du côlon, si l'intégrité des jonctions serrées était compromise, elle pourrait conduire à l'entrée de ces microbes dans la circulation.

3.5.3.2. Les inhibiteurs enzymatiques

L'activité protéolytique se produisant dans le tractus gastro-intestinal est la limite majeure à l'administration d'insuline par voie orale. Initialement, les travaux menés avaient pour but d'employer des inhibiteurs enzymatique en co-administration pour palier au problème. Des études ont montré l'efficacité de la co-administration d'inhibiteurs enzymatiques avec des principes actifs peptidiques (Yamamoto et al., 1994). La co-administration de cinq inhibiteurs enzymatiques (sodium glycocholate, aprotinine, bacitracine, inhibiteur de la trypsine et camostat mesilate) et de l'insuline sur des segments d'intestin de rat permet d'augmenter l'absorption de l'insuline. Agarwal et al. (2001) ont décrit une nouvelle classe d'inhibiteur enzymatique issue du blanc d'œuf (poule et canard) et évalué son influence sur l'absorption de l'insuline en présence de trypsine et d' α chymotrypsine. Les résultats ont montré que l'augmentation de la biodisponibilité de l'insuline est due à l'inactivation de l' α chymotrypsine qui est l'enzyme responsable de la dégradation de l'insuline. D'autres études (Liu Chen et al. 2003) ont confirmé le potentiel intéressant de la co-administration de l'insuline avec des inhibiteurs enzymatiques. Cette piste est aujourd'hui exploitée par de grands laboratoires pharmaceutiques pour administrer de l'insuline par la voie orale (Oramed Pharmaceuticals Inc.

Israël). Cette formulation est aujourd'hui en phase 2b d'essai clinique. La multiplicité de la co-administration d'insuline avec des inhibiteurs enzymatiques peut cependant entraîner de sérieux effets délétères sur le métabolisme chez l'Homme.

3.5.3.3. Les systèmes mucoadhésifs à base de polymères

Le terme «mucoadhésion» fait référence à l'adhérence entre des supports polymères et des muqueuses et se manifeste par certains polymères qui deviennent adhésifs lors de l'hydratation. Ainsi, les objectifs des systèmes de délivrance de médicaments muco-adhésifs sont de prolonger le temps de résidence au niveau du site d'absorption du médicament, d'intensifier le contact avec le mucus pour augmenter le gradient de concentration du médicament, afin d'assurer une absorption immédiate sans dilution ou dégradation dans le fluide luminal, et de localiser le système de délivrance de médicament pour un certain site. Les systèmes d'administration contenant des polymères muco-adhésifs fournissent un contact intime avec la muqueuse, ce qui réduit la dégradation du médicament entre le système d'administration et la membrane absorbante. Les systèmes polymériques de petite taille chargés d'insuline ont montré une libération et une absorption rapide de l'insuline par rapport aux systèmes de plus grandes tailles, entraînant un effet hypoglycémiant sans dommage détectable sur la muqueuse (Khafagy El Sayed et al., 2007).

3.5.3.4. L'encapsulation

L'encapsulation vise à protéger une substance, et à en contrôler sa libération sur son site. Quel que soit la méthode employée, elle génère globalement deux types de structures particulières : les nano capsules (Figure 43A) et les nano sphères (Figure 43B).

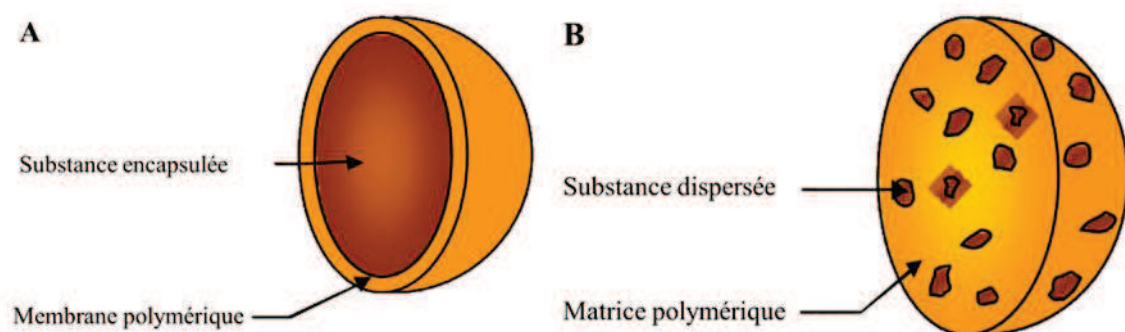


Figure 43 : Structures de nanoparticules (A) nanocapsule, (B) nanosphère.

L'encapsulation est considérée comme étant la technique la plus adaptée pour administrer *per os* des composés de nature protéique car elle permet de pallier aux contraintes physico-chimiques du tractus gastro intestinale tout en conservant l'activité biologique du principe actif. Plusieurs méthodes permettent de générer des nanovecteurs encapsulant des composés

bioactifs. Les propriétés de ses vecteurs dépendent de la nature des composants utilisés pour la formulation ainsi que des méthodes de fabrication utilisées.

3.5.3.4.1. Les systèmes particuliers d'administration

La plupart des stratégies de formulation d'insuline se basent sur des supports particuliers pour contourner les obstacles de l'administration d'insuline par voie orale. Ils protègent efficacement les principes actifs peptidiques contre la dégradation enzymatique dans l'environnement hostile du tractus gastro-intestinal, fournissent un haut transfert de médicaments à travers la muqueuse épithéliale, contrôlent la vitesse de libération, et ciblent des sites spécifiques de libération du principe actif. L'entrée de particules submicroniques au travers de l'intestin se fait par l'intermédiaire des entérocytes, des cellules M et par des voies paracellulaires. L'évaluation histologique de coupes de tissus a montré que les particules de 100 nm diffusent à travers la couche sous-muqueuse, tandis que les particules plus grosses (10 µm) sont localisées principalement dans la muqueuse épithéliale. Des études similaires avec des cellules Caco-2 ont montré que l'absorption des particules dépendant de leur taille (Guhmann P., 2013).

Oral insulin delivery systems		
System	Application	Observation
<i>Absorption enhancers</i>		
Bile salt/fatty acid mixed micellar system	<i>In vivo/rats</i>	Improved paracellular absorption
Insulin solution/ <i>N</i> -lauryl-β-D-maltopyranoside	<i>In vitro</i> /Ussing chamber	Enhanced colon permeability
W/O/W emulsion/DHA or EPA	<i>In situ/rat intestine</i>	PA ^a was 43.2%
Enteric-coated capsule/Witepsol W35 + NaSal	<i>In vivo/dogs</i>	PA ^a was 12.6%
Insulin solution/AP, SGC, SC or Na ₂ EDTA	<i>In situ/rat intestine</i>	PA ^b was 0.1%–5.5%
<i>Enzyme inhibitors</i>		
Drug-carrier matrix/BBi and elastinal	<i>In vitro</i> /artificial intestinal fluid	Significant reduction in enzymatic degradation
Insulin solution/AP, SGC, STI, CM or BAC	<i>In situ/rat intestine</i>	PA ^b was 0.1%–5.1%
Insulin solution/SGC, BTT, LPT, CTT or BAC	<i>In situ/rat intestine</i>	PA ^b was 0.1%–2.3%
Insulin solution/CkOVM or DkOVM	<i>In vitro</i> /diffusion chamber	Two fold increase in insulin stability and flux values
Insulin solution/hyaluronidase	<i>In situ/rat intestine</i>	Significant reduction in blood glucose levels
<i>Mucoadhesive polymeric systems</i>		
P(MAA-g-EG) hydrogel microparticles	<i>In vivo/rats</i>	PA ^a was 9.5%
Lectin-conjugated alginate microparticles	<i>In vivo/rats</i>	Hypoglycemic effect lasted for ~8 h
Chitosan NPs	<i>In vivo/rats</i>	PA ^a was 14.9%
Chitosan-TBA-insulin tablets	<i>In vivo/rats</i>	PA ^a was 1.69%
<i>Particulate carrier delivery systems</i>		
Lecithin-based microemulsion	<i>In vivo/rats</i>	30% reduction in blood glucose levels
Double liposomes	<i>In vivo/rats</i>	PA ^b was 0.39%–5.5%
Fusogenic liposomes	<i>In situ/rat intestine</i>	PA ^a was 10.1%–15.7%
Eudragit S100 microspheres	<i>In vivo/rabbits</i>	24% reduction in blood glucose levels
Insulin-phospholipid complex NPs	<i>In vivo/rats</i>	PA ^a was 7.7%
<i>Targeted delivery systems</i>		
Colon-targeted delivery system (CODES™)	<i>In vivo/dogs</i>	BA was 0.5%
Colon-targeted delivery system (Azopolymer-coated pellets)	<i>In vivo/rats</i>	PA ^b was 0.89%–3.38%
Insulin-transferrin conjugate	<i>In vivo/rats</i>	70% reduction in blood glucose levels

Abbreviations: DHA, docosahexanoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; PA, pharmacological availability; NaSal, sodium salicylate; RH, relative hypoglycemia; AP, aprotinin; SGC, sodium glycocholate; SC, sodium caprate; Na₂EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt; BBi, Bowman-Birk inhibitor; STI, soybean trypsin inhibitor; CM, camostat mesilate; BAC, bacitracin; BTT, bestatin; LPT, leupeptin; CTT, cystatin; CkOVM, chicken ovomucoid; DkOVM, duck ovomucoid; P(MAA-g-EG), poly(methacrylic acid-g-ethylene glycol); NPs, nanoparticles; chitosan-TBA-insulin, chitosan-4-thiobutylamide insulin conjugate; BA, absolute bioavailability. PA of insulin systems was determined based on the extent of the hypoglycemic response relative to that achieved with subcutaneous^a or intravenous^b insulin injection.

Tableau 3 : Récapitulatif des approches développées pour permettre l'administration de l'insuline par voie orale (E.-S Khafagy et al., 2007)

3.5.3.5. Méthodes d'encapsulation

L'encapsulation est considérée comme étant l'approche la plus adaptée pour administrer *per os* des composés labiles comme les protéines. Elle permet de pallier aux contraintes physico-chimiques du tractus gastro intestinale tout en conservant l'activité biologique du principe actif. Il existe une multitude de particules permettant d'encapsuler ces principes actifs (Figure 44).

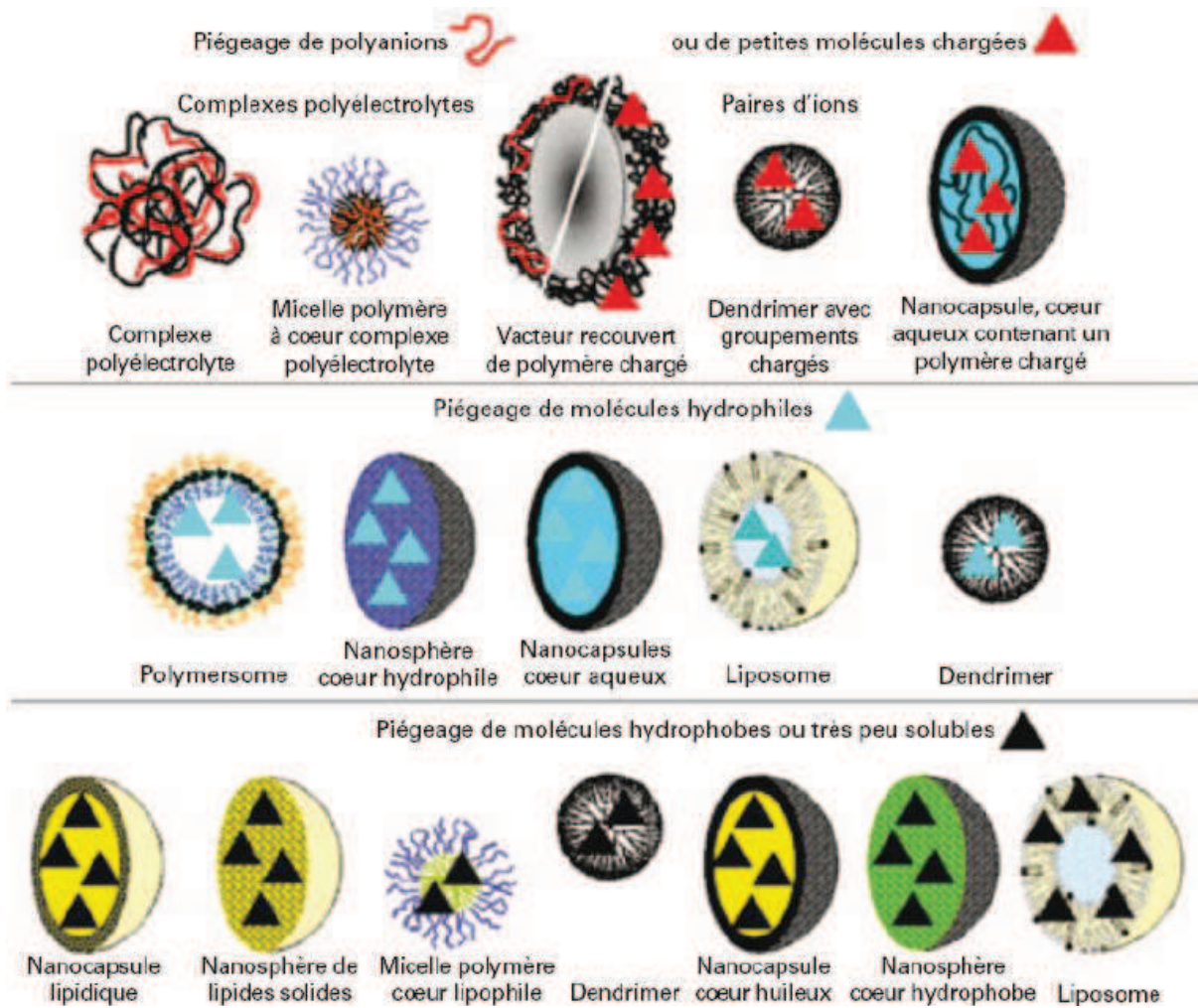


Figure 44 : Schéma récapitulatif des différents types de particules permettant l'encapsulation de principes actifs (Vauthier, C. and Couvreur, P., 2008 (tiré de la thèse de Callet A., 2010))

Plusieurs méthodes permettent de générer des nano vecteurs encapsulant des composés bioactifs. Les propriétés de ses vecteurs dépendent de la nature des composants et des méthodes de fabrication utilisées dont quelques exemples sont listés ci-dessous (tableau 4) :

Technique	Exemple de Polymère	Avantages	Limites
Gélation ionotropique	Alginate	Formation des particules dans des conditions douces (sans solvant) permettant la préservation de l'activité biologique du composé encapsulé. Cette méthode est simple à mettre en œuvre et est industrialisable	La libération du principe actif à partir de ce type de particule n'est pas contrôlable sur la durée.
Atomisation de séchage « <i>Spray-drying</i> »		Elle offre une large gamme d'applications. Des polymères hydrophiles comme hydrophobes (choix du solvant) peuvent être employés	Une adaptation de la pression de formation des gouttelettes est nécessaire en fonction de la viscosité de la solution de polymère sinon il y a risque d'agrégation des particules formées.
Polymérisation interfaciale	Dichlorures, diamines,...	Elle permet l'utilisation de divers monomères pour former une multitude de membranes polymériques. Les particules formulées par cette méthode ont tendance à sédimenter permettant une récupération aisée, une suppression des solvants résiduels et donc sont rentable industriellement	Les particules obtenues par cette technique sont souvent fragiles, ce qui les rend difficile à travailler. L'acide chlorhydrique produit par la réaction entre le chlorure d'acide et l'amine peut dénaturer le composé à encapsuler
Double émulsion évaporation de solvant	PLA (Acide polylactique),	Cette technique permet d'encapsuler efficacement dans des micro/nanosphères de polymère des composés	Libération des composés encapsulés par le phénomène de « <i>burst release</i> », celui-ci

	PLGA (acide poly (lactique- co- glycolique)) ,...	de petites tailles et d'en contrôler la cinétique de libération (utilisation de polymère biodégradable) en jouant sur le processus de synthèse et de dégradation. Possibilité d'utiliser des solvants approuvés et ne dégradant pas le principe actif	engendre des pertes de principe actif dans le tractus gastro-intestinal ou des réponses biologiques inappropriées si celui-ci se produit dans le sang.
Coacervation complexe	Chitosane, alginate, gélatine, gomme d'acacia...	Elle permet d'encapsuler des protéines dans une seule phase aqueuse. Cela évite toute forme de dégradation du principe actif. Ce procédé permet de formuler des particules avec un contrôle de la taille des particules associé à une efficacité d'encapsulation élevée.	La complexation entre deux polyélectrolytes de charges opposées se fait dans une fenêtre étroite de pH. Les complexes ne sont pas stable en milieu biologique et nécessite des étapes de durcissement comme l'ajout d'agents réticulant.

Tableau 4 : Comparatif des différentes méthodes de formulation de particules encapsulant des composés bioactifs

Parmi ces techniques, la coacervation complexe et la double émulsion évaporation de solvant permettent l'encapsulation de principes actifs fragiles comme les protéines sans risquer de l'endommager. Bien que ces techniques présentent des inconvénients, elles sont les seules à permettre une libération contrôlée du principe actif et ce, sans ajout de tensioactif ou d'autre stabilisant dans le cas de la coacervation complexe. De plus, le fait de les formuler en milieu aqueux (possibilité de retirer le solvant par évaporation dans le cas de la double émulsion) en fait des approches intéressantes pour une utilisation à des fins cliniques.

3.5.4. La coacervation complexe

La coacervation complexe se définit comme une séparation en deux phases liquide dans un système colloïdal (de Kruif et al., 2004), séparation induite par des interactions électrostatiques

entre polyélectrolytes de charges opposées. La phase la plus concentrée est dite coacervat et la phase dite d'équilibre est l'autre phase (D. J. Burgess, 1990). La désolvatation simultanée des deux polyélectrolytes hydrosolubles portant des charges opposées est le plus souvent provoquée par une modification de pH du milieu aqueux (Figure 45).

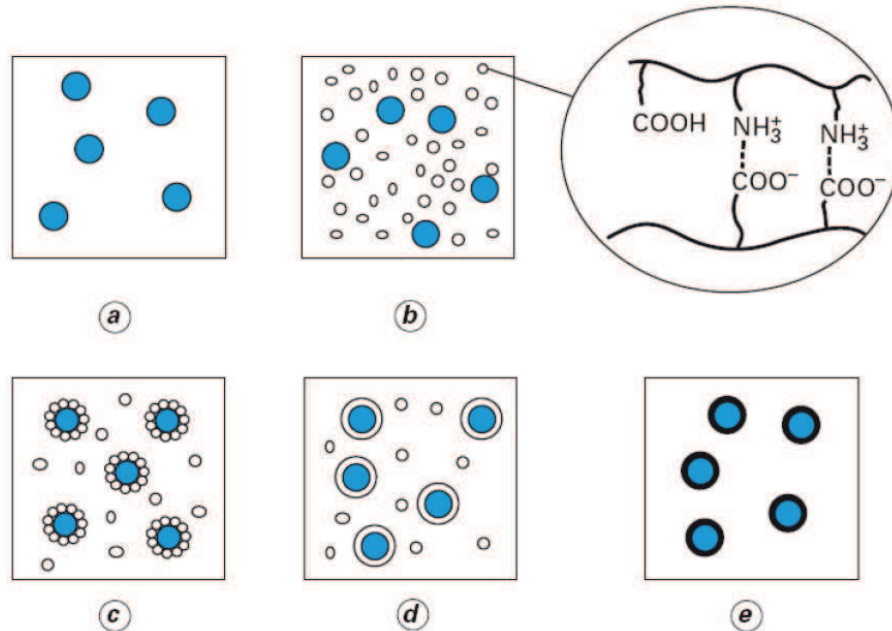


Figure 45 : Principe de la coacervation complexe (Benoît J. P. and Richaud J., 2000)

(a) le composé (sous forme liquide ou solide) est dispersé dans une solution aqueuse contenant les deux polymères. (b) la coacervation est induite par un ajustement du pH de la solution, de façon à ce que les charges positives du premier polymère équilibrent les charges négatives du second polymère. L'attraction électrostatique des deux polyélectrolytes provoque l'apparition d'un coacervat mixte. (c) les gouttelettes de coacervat formées viennent s'adsorber à la surface de la matière active à encapsuler et (d) former un enrobage continu. (e) Cet enrobage est consolidé par réticulation des macromolécules constitutives du coacervat.

Les particules obtenues selon le procédé décrit dans la Figure 44 sont des capsules (exemple Figure 43A). La taille de ses particules peut être très variable, de quelques dizaines de nanomètres à quelques micromètres. Elle dépend essentiellement de la taille initiale des gouttelettes dispersées de matière active. Seuls les principes actifs lipophiles peuvent être encapsulés selon ce procédé avec des taux d'encapsulation élevés de l'ordre de 80 %. Une méthode dérivante de celle décrite permet d'encapsuler des composés hydrosolubles. Cela consiste à préformuler une émulsion inverse eau/huile puis à encapsuler cette émulsion. La difficulté de cette approche réside dans la formulation d'une émulsion double eau/huile/eau (e/h/e) stable, condition nécessaire à une bonne encapsulation. Une des limitations du procédé concerne le choix limité de matériaux puisque seul un couple de polyélectrolytes portant des charges opposées peut convenir.

Tiebackx (1911) est le premier à avoir décrit la coacervation complexe. Mais Bungenberg de Jong et al. (1929) ont largement étudié la coacervation complexe entre la gélatine et la gomme arabique. Ils démontrèrent que la coacervation complexe dépend des masses moléculaires, de la concentration, du ratio des polyélectrolytes ainsi que du pH et de la température du milieu réactionnel. De ces études découlent les premiers modèles théoriques développés par Overbeek et Voorn (1957). Ceux-ci supposent qu'il existe une configuration aléatoire en bobine des polyions dans les deux phases, que les interactions solvant-soluté sont négligeables, et que les forces électrostatiques interactives sont de nature distributive. Si les polyions étaient complètement dépliés, plutôt que dans la configuration de bobine, il serait difficile pour piéger l'eau à l'intérieur des écheveaux de polyions et la coacervation ne serait pas susceptible de se produire (Figure 46). Les interactions électrostatiques distributives permettent une neutralité électrique globale dans le coacervat. Cependant, les molécules sont libres de se déplacer à l'état liquide.

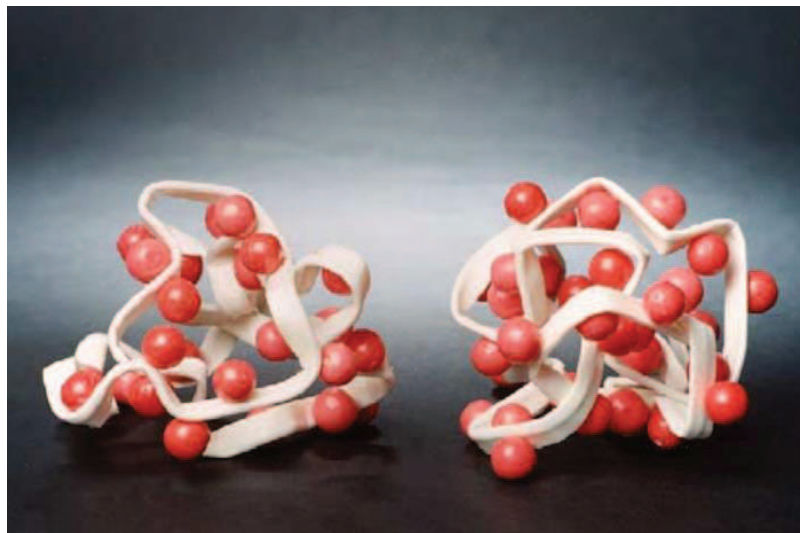


Figure 46 : Structure d'un coacervat complexe entre la gomme arabique (ruban blanc) et β -lactoglobuline (sphères rouges) selon C.G. de Kruif et al., 2004

Un second modèle dit « modèle global en phase diluée » est décrit par (Veis et Aranyi, 1960) à partir d'un cas pratique de coacervation complexe de gélatine. Ce modèle considère la coacervation comme étant un procédé s'opérant en deux phases contrairement à ce que décrit le modèle de Voorn et Overbeek. Selon ce modèle, la première phase est une agrégation spontanée des gélatines de charges opposées lors de l'agitation produisant des agrégats de faible entropie. Puis ces agrégats se réorganisent progressivement pour former la phase de coacervat. Cette réorganisation se produit lentement dans le temps et est entraînée par le gain en entropie.

Sur la base des travaux de Veis, Tainaka (1980) décrit que les polyanions et polycations forment des agrégats en phase diluée sans aucune spécificité d'appariement des charges. Dans

la phase de coacervat, les agrégats se chevauchent l'un l'autre avec pour résultat un gain d'énergie électrostatique découlant de l'augmentation de la densité des ions dans le domaine de chevauchement. La séparation de phase est entraînée par des forces d'attraction entre les agrégats, qui ont les masses moléculaires les plus hautes et plus de densité de charge de polyions. Nakajima and Sato (1974) ont conduit une étude sur des polymères à forte densité de charge et modifié la théorie de Voorn en y incorporant les paramètres d'interaction d'Huggins. Ils confirmèrent ainsi la répartition des charges dans les deux phases comme le décrit Voorn et Overbeek (1957) mais conclurent que le terme électrostatique calculé selon Voorn était beaucoup trop faible.

3.5.4.1. Encapsulation de l'insuline par coacervation complexe

La formation de nanoparticules par coacervation complexe se fait dans des conditions douces à température ambiante et sous une agitation lente (pas d'ultrasons). Elle ne requiert pas de solvants organiques ni de stabilisants comme c'est le cas dans la majorité des techniques décrites dans la littérature. La technique de coacervation complexe est donc idéale pour encapsuler des composés peptidiques fragiles comme l'insuline. La formation du complexe est gouvernée par l'attraction électrostatique entre les groupements de charges opposées présents sur les chaînes de polyélectrolytes. La mise en présence de deux polyélectrolytes de charges opposées, conduit sans aucun apport d'énergie extérieure, à la formation d'un coacervat complexe stable. La stabilité du complexe sera d'autant plus grande que les masses des deux polyélectrolytes mis en présence seront différentes. Ainsi, il sera plus favorable d'ajouter le polyélectrolyte de faible masse dans celui de plus grande masse afin d'optimiser la stabilité des liaisons électrostatiques formées (Figure 47). De plus, les solutions de polyélectrolytes doivent être diluées de façon suffisante afin d'éviter toute agrégation macroscopique des composés présents en solution.

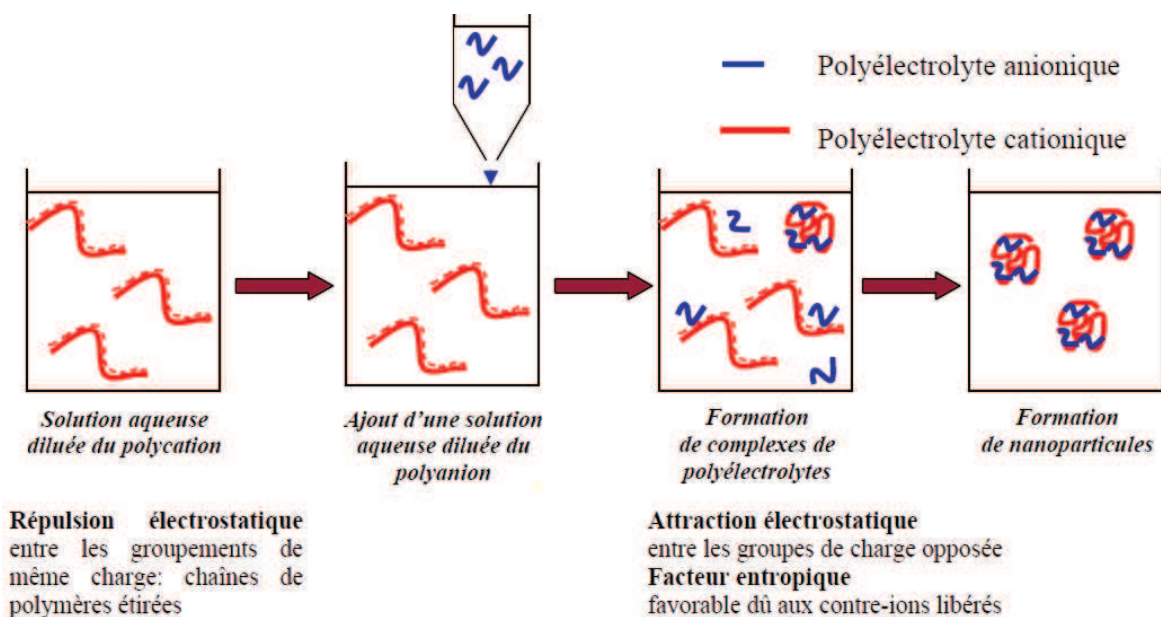


Figure 47 : Encapsulation par coacervation complexe entre polyélectrolytes de charges opposées (d'après Callet A. 2010)

Les coacervats formés sont des structures homogènes dont les cœurs sont généralement globalement neutres (neutralisation de charge par appariement de charges) et la surface est fortement chargée. Les complexes arborent la charge du polyélectrolyte de plus haut poids molaire (Figure 48). Cette charge de surface permet à la fois une répulsion électrostatique des complexes et le maintien d'une dispersion homogène et stable de la suspension colloïdale.

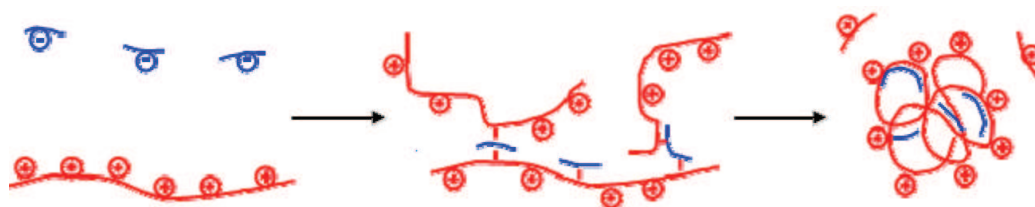


Figure 48 : Schématisation de la formation de coacervat complexe (D'après Callet A. 2010)

Comme le décrivent Bungenberg de Jong et al. (1929), plusieurs facteurs comme la masse moléculaire, la concentration, le ratio de polyélectrolytes ainsi que du pH et de la température du milieu réactionnel influencent la formation des coacervats. La théorie développée par Tainaka (1980) explique le fait qu'une forte concentration en sel inhibe la formation des complexes par masquage des charges présentes sur les polyélectrolytes ou induit la déstabilisation des complexes.

3.5.4.2. Les propriétés physicochimiques de l'insuline

L'insuline est un polypeptide disposant de groupements ionisables portés par les résidus de certains acides aminés. L'insuline peut arborer de ce fait une charge globale dépendante du pH.

Un point isoélectrique est défini pour une valeur de pH pour laquelle une électro-neutralité de la molécule est observée. Li et al. (1954) ont déterminé le point isoélectrique de l'insuline par électrophorèse dans une gamme de pH comprise entre 5,3 et 5,4. En fonction du pH, l'insuline peut être considérée comme un polyélectrolyte soit chargé positivement soit chargé négativement (Figure 49).

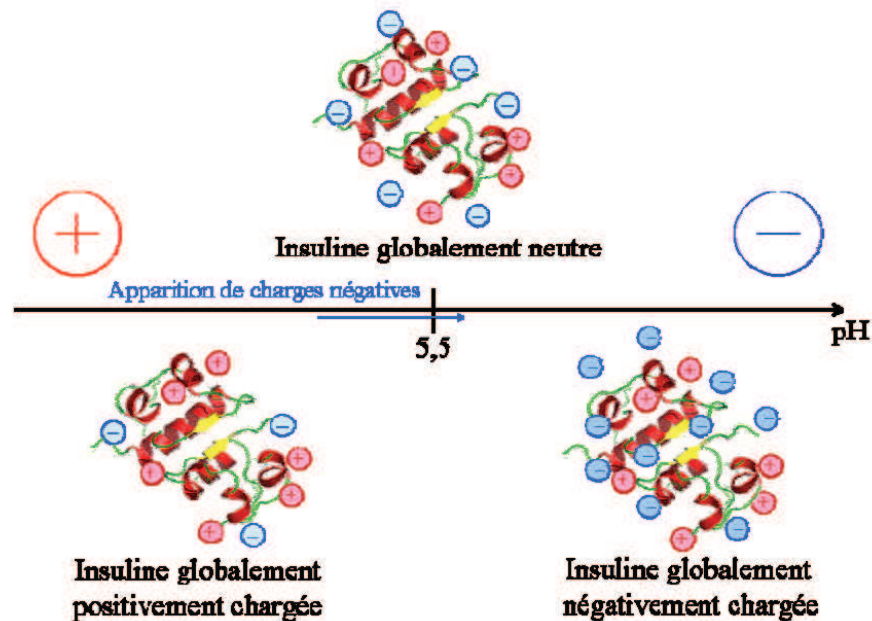


Figure 49 : Charge globale de l'insuline en fonction du pH

Les conditions idéales permettant la formation de nanoparticules d'insuline par coacervation complexe correspondent à une valeur de pH où l'insuline est à la fois biologiquement active et chargée soit à la valeur du pH physiologique (pH 6,2). L'insuline peut donc être complexée idéalement avec un polyélectrolyte de charge positive.

3.5.4.3. Le choix du chitosane

Le chitosane est un polymère naturel, dérivé de la chitine, présentant des propriétés particulièrement intéressantes qui en font un matériau fréquemment utilisé dans le domaine des biomatériaux. Le chitosane présente une structure similaire à celle de la cellulose, sa structure moléculaire consiste en un enchaînement linéaire d'unités de β -D-glucosamine liées en (1 \rightarrow 4) (Figure 50).

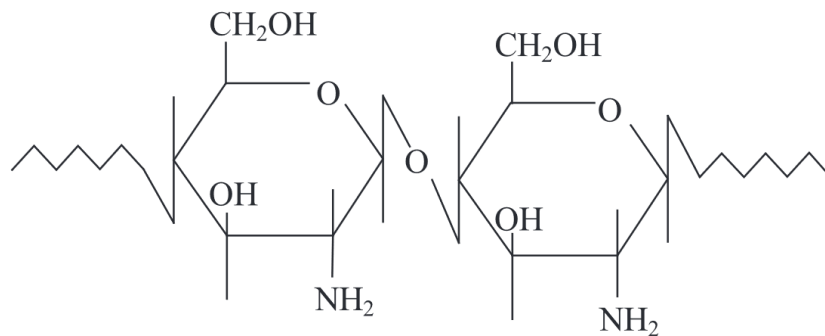


Figure 50 : Structure primaire du chitosane (Agnihotri S.A. et al., 2004)

Les groupes amines primaires confèrent au chitosane des spécificités particulières qui le rendent particulièrement intéressant pour des applications pharmaceutique : régénération des tissus, reconstruction osseuse ou encore la vectorisation de molécules actives (Agnihotri S.A. et al., 2004). Le chitosane est obtenu à partir de la désacétylation de la chitine, un polysaccharide biocompatible d'origine naturelle et disponible en abondance (crustacés). Toutefois, les applications de la chitine sont limitées en comparaison au chitosane. En effet, la chitine est structurellement similaire à la cellulose mais elle est chimiquement inerte. Les groupements d'acétamide de la chitine peuvent être convertis en groupements amines pour donner le chitosane; cette conversion s'effectue par traitement alcalin de la chitine. La chitine et son dérivé, le chitosane sont des polymères à longue chaîne ayant des masses moléculaires pouvant aller jusqu'à plusieurs millions de daltons. Le chitosane est un polysaccharide cationique dans des conditions de pH neutre ou basique, contenant des groupements amines libres. Par conséquent, il est insoluble dans l'eau. Dans un pH acide, les groupements amines peuvent subir une protonation le rendant soluble dans l'eau. Le chitosane se dégrade sous l'action de la flore bactérienne. Il est non toxique et est facilement éliminé de l'organisme sans provoquer de réactions indésirables. Le chitosane possède des propriétés antimicrobiennes et absorbe les métaux lourds comme le mercure, le cadmium, le plomb, etc... (Agnihotri S.A. et al., 2004). Sa toxicité est nulle, le DL_{50} du chitosane est proche de celui de composés comme le sel ou le sucre (Arai K. et al., 1968). Le fait que le degré de désacétylation et le poids moléculaire du chitosane puissent être contrôlés en fait un matériau de choix pour le développement de micro / nanoparticules. En effet, le chitosane offre une possibilité de contrôle de la libération des agents actifs encapsulés. Il évite l'utilisation de solvants organiques dans la fabrication de particules, car il est soluble dans une solution aqueuse acide. Le chitosane est une polyamine linéaire contenant un nombre de groupements amines libres qui sont facilement disponibles pour une réticulation avec des anions polyvalents. Il présente de plus d'un caractère muco-adhésif, permet d'augmenter son temps résiduel au niveau du site d'absorption.

3.5.4.4. Formulation de micro/nanoparticules à base de chitosane

Les systèmes colloïdaux polymériques ont montré une efficacité dans l'administration orale de protéines thérapeutiques. De nombreux efforts sont en cours pour améliorer la biodisponibilité orale de macromolécules bioactives en utilisant ces systèmes de vectorisation. Les nanoparticules formulées à partir de polymères naturels, tels que le chitosane, sont d'intérêt en tant que porteurs de protéines (Sarmiento et al., 2007). Le chitosane présente de nombreux avantages pour le développement nanoparticulaire, dont la biocompatibilité, la biodégradabilité, et une faible immunogénicité et toxicité (Agnihotri et al., 2004; Pandey et al., 2005). Les propriétés mucoadhésives du chitosane sont liées à sa densité élevée de charges positives (Plapied et al., 2010). Par conséquent, le chitosane est un candidat idéal pour l'administration de médicaments ciblant les tissus muqueux (Sayin et al., 2009) comme la lumière intestinale.

Avantages

Les nombreux groupements amines libres sur le squelette du chitosane se traduisent par des propriétés intéressantes, permettant une utilisation étendue dans des applications de délivrance de médicaments. Dans un environnement acide, les nanoparticules se forment spontanément, dues à l'établissement de liens intra et intermoléculaires entre les espèces chargées positivement et négativement (Veis Arthur, 2011), qui forment les complexes de polyélectrolytes ou coacervats. Les nanoparticules formées par appariement d'ions et les interactions électrostatiques conservent l'intégrité des polymères. L'absorption gastro-intestinale des protéines, y compris l'insuline, peut être améliorée par inclusion de cette dernière dans les nanoparticules, qui la protègent contre la dégradation enzymatique. Ces transporteurs ont amélioré les rendements d'administration de peptides par la voie orale (Xue et al., 2015), en raison de leur rétention prolongée dans le tractus gastro-intestinal et de leur excellente pénétration dans la couche de mucus (Jwala Renukuntla et al., 2013) médiée par les groupes amines libres. La charge positive peut réagir avec de nombreuses surfaces chargées négativement, y compris les membranes cellulaires, l'acide sialique dans le mucus et les polymères anioniques. Ces systèmes particuliers montrent également une forte affinité pour les macromolécules chargées négativement (Mohammadpourounighi et al., 2010), telles que la mucine sur la surface de la muqueuse. En outre, ils sont absorbés par les cellules intestinales, ce qui représente la voie principale d'absorption.

Limites

Toutefois, il est bien connu que les coacervats complexes sont instables dans des milieux contenant du sel Tainaka et al. (1980). Ainsi, ces complexes doivent être stabilisés pour utilisation en tant que vecteurs de médicaments (Jiexiu Chen et al., 2015 ; Xue et al., 2015).

3.5.4.5. Stabilisation

La réticulation avec du tripolyphosphate de sodium (TPP) ou la lyophilisation peuvent être des solutions intéressantes pour augmenter la stabilité de ces nanoparticules.

3.5.4.5.1. La réticulation

La stabilité des nanoparticules de chitosane peut être améliorée par la réticulation en utilisant des agents de réticulation tel que le glutaraldéhyde (Ko J.A. et al., 2002), mais ce composé chimique ne peut être employé dans le cadre d'un développement pharmaceutique à cause du risque accru de toxicologie. Le tripolyphosphate, le sulfate de dextran et l'acide poly-D-glutamique permettent de stabiliser les nanoparticules à base de chitosane (Raja MA et al. 2015) et sont utilisables compte tenu de leurs propriétés biodégradables. Le sodium tripolyphosphate est l'agent réticulant le plus couramment utilisé, celui-ci est un anion polyvalent avec trois groupes de phosphate et est donc chargé négativement. Cette propriété permet la réticulation du chitosane (Rekha MR et al., 2009). Les nanoparticules se forment spontanément en mélangeant du sodium tripolyphosphate, du chitosane, et de l'insuline par le biais de liaisons inter et intramoléculaires entre phosphates et groupes amines du chitosane (Wu Y. et al., 2005). Le sodium tripolyphosphate a été utilisé pour améliorer la stabilité des nanoparticules en augmentant la qualité de l'interaction électrostatique. Choisi comme agent de réticulation polyanionique, il présente l'avantage d'être non-toxique et de s'associer instantanément au chitosane (de Moura et al., 2009). A des concentrations suffisantes, l'agent de réticulation améliore la qualité des interactions électrostatiques qui se produisent au cours de la coacervation. Cette qualité d'interaction au sein du coacervat garantit la stabilité de celui-ci en réduisant la distance intermoléculaire, ce qui ne se produit pas dans les coacervats non-réticulés.

3.5.4.5.2. La lyophilisation

La lyophilisation est une méthode bien établie pour préserver des molécules instables sur de longues périodes de temps, y compris les médicaments biotechnologiques, telles que les protéines et les peptides (Sameti et al., 2002). La lyophilisation est un procédé de déshydratation réalisé à basse température. Celle-ci consiste à éliminer l'eau contenue dans une préparation préalablement surgelée par sublimation. La lyophilisation présente les avantages de produire

des produits finaux de très bonne qualité avec conservation des propriétés des composés lyophilisés et leur permet une réhydratation (dispersion) aisée. La lyophilisation peut stabiliser les colloïdes intrinsèquement instables, mais peut induire l'agrégation des nanoparticules. L'ajout de molécules pour réduire l'énergie de surface reste avantageux. Le saccharose a été utilisé pour inhiber l'agrégation des nanoparticules de méthoxy-poly (oxyde d'éthylène) -poly (acide lactique) pendant lyophilisation (Zambaux et al., 1999). Le mannitol est un autre produit qui peut être employé. Il s'agit d'un polyol et d'un glucide quasiment non métabolisable. Il est éliminé de l'organisme par les glomérules rénaux. Il est employé dans des produits pharmaceutiques comme excipient dans la lyophilisation (Beheti A. et al., 2010).

3.5.5. La double émulsion évaporation de solvant

La double émulsion eau/huile/eau (e/h/e) est une méthode couramment utilisée pour formuler des systèmes nanoparticulaires biodégradables. La méthode classique de la double émulsion (e/h/e) évaporation de solvant est réalisée en quatre étapes (Figure 51) :

(a) une première émulsion est réalisée ; une solution aqueuse (phase aqueuse) dans laquelle le principe actif est solubilisé (cœur aqueux) est émulsionnée (agitation, ultrasons...) dans une phase organique dans laquelle le polymère constituant la membrane de la capsule est dissout.

(b) La dispersion de la première émulsion (e/h) est réalisée dans une seconde phase aqueuse pour donner l'émulsion complète (e/h/e).

(c) La solidification : par extraction/évaporation du solvant permet la stabilisation des particules (par précipitation du polymère).

(d) les particules sont purifiées le cas échéant ou lyophilisées en fonction de leur application.

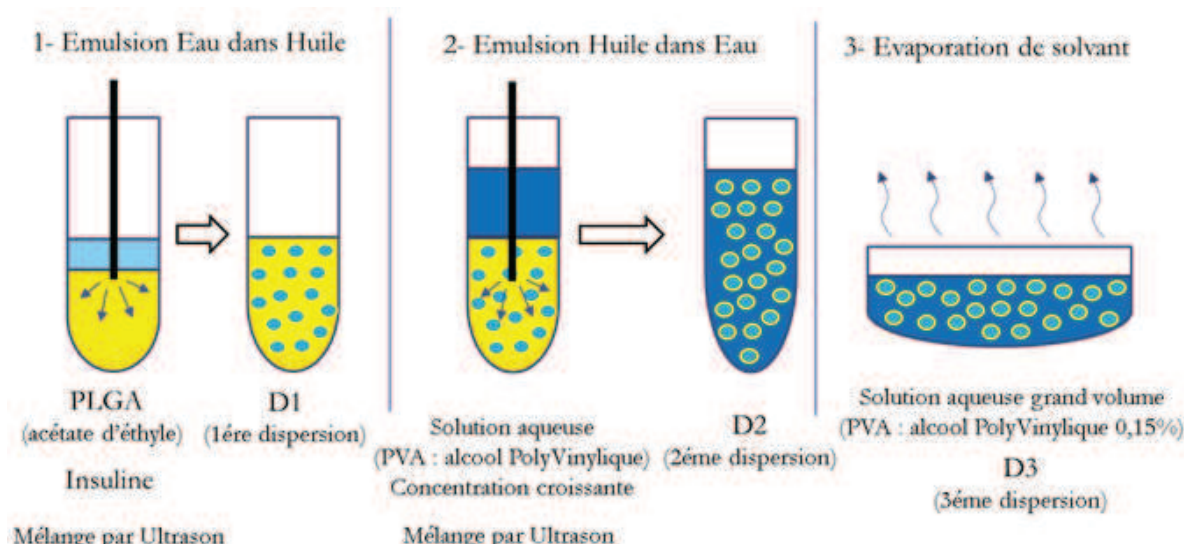


Figure 51 : Protocole de synthèse par double émulsion eau/huile/eau

Cette méthode de formulation permet d'obtenir des particules de tailles contrôlées et un haut rendement d'encapsulation. Mais cette méthode d'encapsulation présente une limite majeure pour les composés bioactifs labiles comme les protéines. En effet, l'émulsion risque de dénaturer la protéine et de la rendre biologiquement inactive due aux forces de cisaillement, à l'interaction protéines-solvant lors du procédé et d'induire des effets secondaires (Meng F.T. et al., 2003). Les solvants les plus utilisés pour solubiliser les polymères pour cette méthode sont le chlorure de méthylène, l'acétate d'éthyle, le dichlorométhane etc... Il est rapporté que parmi les solvants les plus hydrophobes, l'acétate d'éthyle est celui qui possède le moins d'effets délétères sur les protéines encapsulées. De plus, la solubilité de l'acétate d'éthyle dans l'eau et son haut point d'ébullition est à la fois un avantage est un inconvénient à l'utilisation de ce solvant dans la double émulsion évaporation de solvant. En effet, sa solubilité relative dans l'eau (8,7% m/v) permet une extraction efficace du solvant des particules en solution par évaporation et facilite la précipitation du polymère dans la membrane en formation. Son point d'ébullition (76°C) quant à lui rallonge le délai d'évaporation du solvant et donc la précipitation du polymère résultant en un temps de contact prolongé entre le principe actif et le solvant. Une double émulsion est un système thermodynamiquement instable, une solidification rapide peut réduire efficacement la coalescence des gouttelettes aqueuses internes au sein de gouttelettes d'huile. Ainsi, un moindre phénomène de « *burst release* » (Reix et al., 2012) et une libération constante peuvent être attendus.

Afin de formuler des particules stables par le biais de ce procédé, il est important de prendre en compte un certain nombre de paramètres. L'utilisation d'agents de stabilisation (tensioactifs) peut notamment s'avérer nécessaire. En effet, ceux-ci ont un rôle important dans la production

de nanoparticules car ils réduisent la tension interfaciale entre les phases lipophiles et hydrophiles de la nano-émulsion et simplifient la formation de nanoparticules en stabilisant celles-ci pendant l'émulsion. Les tensioactifs sont classés comme anionique (charge négative), cationique (charge positive), zwitterionique ou amphotère (chargé en fonction du pH du milieu) et non ionique (non chargé). Les tensioactifs non ioniques sont couramment utilisés dans des formulations pharmaceutiques pour améliorer la biodisponibilité après administration orale de principes actifs hydrophobes. Ces tensioactifs non chargés ont plusieurs avantages: (a) ils sont plus hydrophobes que les tensioactifs ioniques, (b) ils possèdent une meilleure capacité à dissoudre les médicaments insolubles dans l'eau, (c) ils sont, de façon générale, moins toxiques pour les membranes biologiques et (d) plusieurs tensioactifs non ioniques se sont avérés influencer la pharmacocinétique des médicaments en modulant l'efflux de pompes membranaires telles que la P-glycoprotéine (P-gp) ou la protéine MDR (Multi Drug Resistant protein). Les tensioactifs sont à la fois hydrophiles et lipophiles, et sont caractérisés par l'équilibre de ces deux propriétés rapportées par la valeur HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balance). Le système HLB est le rapport entre les portions hydrophiles et la partie lipophile du tensioactif. Cette propriété décrite des tensioactifs impacte la qualité des particules. En effet, un tensioactif à haute valeur de HLB peut entraîner la déstabilisation de l'émulsion alors qu'un tensioactif de basse valeur de HLB crée une instabilité entre les objets. Les Pluronic (oxyde-b-oxyde de polypropylène-b-polyéthylène copolymère oxyde tri bloc polyéthylène) et l'alcool polyvinylique (PVA) sont classés parmi les tensio-actifs non-ioniques et ont diverses applications dans divers domaines biomédicaux allant de l'administration de médicaments à l'imagerie médicale en passant par la gestion des maladies et des troubles vasculaires. L'utilisation d'un tensioactif (alcool polyvinylique (PVA)) peut être nécessaire pour permettre la stabilisation des émulsions formées. Celui-ci maintient la structure de la membrane polymérique.

Les polymères biodégradables employés dans la double émulsion sont l'acide poly lactique (PLA), la polycaprolactone, l'acide poly (lactique-co-glycolique) (PLGA).

3.5.5.1. Le PLGA

Les matériaux biodégradables sont soit naturels ou d'origine synthétique et sont dégradés *in vivo*, que ce soit par voie enzymatique ou non enzymatique voire les deux. Les sous-produits sont ensuite éliminés par les voies métaboliques. Depuis quelques années, on note une recrudescence du nombre de parutions faisant référence aux biomatériaux employés soit comme adjuvant soit comme composant majeur dans la formulation de dispositifs à libération

prolongée/contrôlée de médicaments. Ces biomatériaux peuvent être classés comme étant (a) des polymères synthétiques biodégradables, qui comprennent des matériaux relativement hydrophobes tels que les acides alpha-hydroxy (une famille qui comprend le PLGA), les poly anhydrides, etc., et (b) des polymères d'origine naturelle, tels que des sucres complexes (le chitosane) et inorganiques (hydroxyapatite). Parmi tous ces biomatériaux, le PLGA (Figure 52) a montré un immense potentiel en tant que vecteur de médicament et comme structure pour l'ingénierie tissulaire. Le PLGA appartient à la famille de polymères biodégradables approuvés par la FDA (Food and Drug Administration) qui sont biocompatibles et ont été largement étudiés en tant que vecteur de médicaments, de protéines et divers autres macromolécules telles que l'ADN, l'ARN et des peptides. Le polyester PLGA est un copolymère d'acide poly lactique (PLA) et d'acide poly glycolique (PGA) (Figure 52).

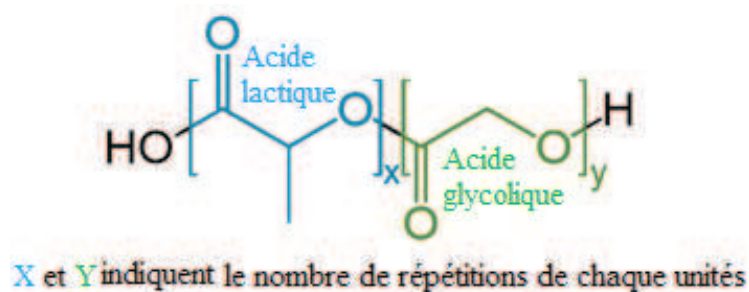


Figure 52 : Formule chimique du PLGA.

La dégradation du PLGA peut être utilisée pour la libération prolongée du médicament à des doses souhaitables par implantation sans procédure chirurgicale. En outre, il est possible d'ajuster les propriétés physiques globales de la matrice polymère-médicament en contrôlant les paramètres pertinents tels que le poids moléculaire du polymère, le rapport acide lactique/ acide glycolique et la concentration du médicament pour obtenir une dose et un intervalle de relargage souhaité en fonction du type de médicament encapsulé.

3.5.5.2. Connaissances sur les NPs de PLGA

Les particules en PLGA sont des vecteurs de médicaments courants et très efficaces, en général conçus comme une capsule creuse encapsulant un principe actif, enveloppé d'une membrane en polymère jouant le rôle de protection (Figure 43A). Elles présentent des diamètres d'environ 200 nm et peuvent être entourées d'un stabilisant comme l'alcool polyvinylique (PVA) par exemple qui est un stabilisant couramment utilisé et qui détermine la charge de surface de ces particules (-5mV). Il est rapporté dans la littérature l'efficacité des nanoparticules de PLGA comme transporteurs de médicaments. En effet, celles-ci augmentent le passage des médicaments au travers des barrières biologiques tels que la barrière hémato-encéphalique

(Costantino Luca et al., 2006) ou la muqueuse gastro-intestinale (Alf Lamprecht et al., 2001), mais Reix et al., (2012) ont démontré que les particules de PLGA chargées d'insuline présentent une biodisponibilité faible, inférieure à 20%, lorsqu'elles sont administrées par voie intraduodénale chez le modèle de rats diabétiques. Ceux-ci suggèrent l'intérêt d'une modification des propriétés de surface des nanoparticules pour les rendre mucoadhésives afin d'améliorer leur biodisponibilité.

3.5.5.3. La mucoadhésion

Les caractéristiques colloïdales, la taille des particules et leur charge de surface sont considérées comme les déterminants les plus importants dans la capture cellulaire et le trafic des particules. La mucoadhésion est une autre approche de formulation prometteuse pour améliorer la biodisponibilité de l'insuline encapsulée (Yu QIAN et al. (2013) (US 2013/0034602) ; Fei Yu et al (2015)). L'intérêt de la mucoadhésion est de créer une interaction entre les particules et la couche de mucus intestinal de manière à augmenter le temps de résidence des particules au contact des entérocytes et donc de favoriser l'absorption et l'augmentation de la biodisponibilité de l'insuline encapsulée. Afin de créer une interaction mucus/particules, les particules de PLGA doivent être modifiées; la stratégie couramment utilisée consiste à revêtir les particules d'un manteau fait d'un polymère possédant des propriétés mucoadhésives (Noha Nafee et al., 2007). Le chitosane présente de nombreux avantages dans le développement de particules (Diop et al., 2015), y compris la biocompatibilité, la biodégradabilité, et une faible immunogénicité. Les propriétés mucoadhésives du chitosane sont liées à la densité de charges positives élevées (Plapied et al., 2010). Les particules de PLGA revêtues de chitosane sont générées par une approche physique, basée sur une interaction électrostatique comme le décrivent Yue Yu Zhou et al., (2010). La simplicité de ces complexes de polyélectrolytes auto-assemblés est un avantage et un inconvénient. En effet, les complexes sont faciles à produire mais sont toujours caractérisés par une large distribution de tailles pouvant influencer leur absorption cellulaire.

Le greffage de motifs polyéthylène glycol (PEG) à la surface des particules de PLGA est une autre stratégie intéressante (Park Jason et al., 2011). En effet, la modification chimique d'un polymère comme le chitosane avec du PEG augmente la biocompatibilité de celui-ci (Zhang et al., 2002) et réduit son adsorption sur les protéines plasmatiques circulantes. L'enrobage de particules avec le PEG s'est avéré avoir un grand potentiel dans la protection des particules en raison de la répulsion stérique résultant d'une perte d'entropie de configuration des chaînes de PEG liée à leur mouvement rapide dans des milieux aqueux. En outre, les PEG hydrophiles

peuvent former une coque extérieure hydratée protégeant ainsi les particules, permettant une absorption rapide, une extension de la demi-vie de la molécule encapsulée, une meilleure distribution tissulaire (Parveen Suphiya et al., 2011) et enfin générant des particules hautement chargées négativement.

3.5.6. Limite des systèmes nanoparticulaires à l'administration orale

Afin de mettre à l'insuline de rejoindre la circulation générale après son administration par voie orale, son encapsulation dans des systèmes nanoparticulaires représente un atout majeur. En effet l'encapsulation de l'insuline dans une matrice polymérique l'isolait de l'environnement empêchant ainsi la dégradation du principe actif par hydrolyse. Les nanoparticules sont cependant sensibles au pH et ne résiste pas au pH acide de l'estomac ce qui a pour conséquence la libération du principe actif encapsulée et sa dégradation dans le milieu stomacal. L'encapsulation de l'insuline dans des systèmes nanoparticulaires est un moyen majeur vers l'obtention d'une efficacité biologique de l'insuline administrée par voie orale mais celle-ci doivent être protégé tout au long de leur temps de résidence dans l'estomac contre le pH et l'activité enzymatique.

3.5.7. Nanotechnologie et affaires réglementaires

L'Agence européenne du médicament (European Medicines Agency, EMEA) définit la nanotechnologie comme la production et l'application de structures, de dispositifs et de systèmes caractérisés par la forme et la taille de matériaux à l'échelle nanométrique, de 0.2 à 100 nm. L'application des nanotechnologies dans le but de traiter, de prévenir les maladies ou encore d'établir un diagnostic médical, définit la nano médecine. De nos jours, les principales utilisations des nano-objets dans le domaine médical sont essentiellement la vectorisation des médicaments, l'imagerie médicale, la thérapie génique, la délivrance des vaccins et le traitement hyperthermique des tumeurs. Les nano-objets peuvent être de nature biodégradable ou non biodégradable. Les nanoparticules biodégradables comprennent les liposomes et les nano-émulsions. Ceux-ci sont des systèmes colloïdaux vésiculaires, biocompatibles et biodégradables, composés d'une ou de plusieurs bicouches de phospholipides. Ils sont utilisés comme vecteurs permettant d'améliorer l'efficacité et la sécurité des principes actifs. Parmi les nano-objets biodégradables, on trouve ceux à base de polymères. On distingue de plus les micelles, les nanosphères, les nanocapsules et les polysomes. Ces systèmes se caractérisent par leurs structures et leurs propriétés physico-chimiques et permette une libération progressive des principes actifs au fur et à mesure que le polymère se dégrade dans l'organisme. Les nano-

objets non biodégradables sont principalement de nature métallique possédant souvent des propriétés magnétiques. Ces nanostructures en métal ont été développées pour des applications comme la réparation des tissus, la vectorisation des médicaments, l'imagerie en résonance magnétique et dans l'hyperthermie des tumeurs malignes. De par son potentiel en terme médical, la production et l'administration de ses nanostructures doit s'inscrire dans un cadre réglementaire. Cette réglementation est la source de «*guidelines*» définissant leur critère de pureté, leur toxicité (principe actif sous forme de nanoparticule), les solvants à utiliser et à proscrire ainsi que leur taux dans la formulation finale.

3.5.7.1. Solvant résiduels

L'ICH (*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) définit les limites de teneur en solvants pouvant subsister dans le produit fini des principes actifs, des excipients et des médicaments. La pharmacopée européenne indique la nécessité de rechercher dans l'ensemble des produits pharmaceutiques d'éventuelles traces de solvants qui subsisteraient après le processus de fabrication. Les solvants employés ainsi que les taux résiduels doivent être consignés dans le dossier de demande de mise sur le marché. En effet, ceux-ci n'ayant aucun avantage thérapeutique, il est nécessaire de les éliminer autant que possible pour satisfaire aux exigences de qualité (Jean Yves Pabst, 2007). La classification des solvants tient compte de leur toxicité. Ainsi les solvants de classe 1 (acide acétique, acétone, butanol...) sont à proscrire dans la fabrication de médicaments sauf si leur utilisation s'avère indispensable au regard du rapport bénéfice sur risque. Les solvants de classe 2 (acétonitrile, cyclohexane, chlorobenzène...) doivent avoir une utilisation limitée dans les préparations pharmaceutiques et enfin les solvants de classe 3 (acétate d'éthyle, acétate de propyle, éthanol...) qui doivent être utilisés en priorité dans la fabrication de composés pharmaceutiques.

La pharmacopée européenne décrit les modèles analytiques permettant de les identifier en décrivant la préparation des solutions à analyser (concentration, diluants...) et les taux résiduels acceptables dans les échantillons (1000 ppm ou 0,1% dans le cas de l'acétate d'éthyle).

3.5.7.2. Toxicité nanoparticulaire

La taille des nanoparticules leur confère des propriétés physiques, chimiques ou biologiques. Comme toute substance administrée, leur devenir dans l'organisme ainsi que leur toxicité potentielle dépend de ces propriétés physico-chimiques et doivent faire l'objet d'une analyse approfondie. Cependant, en raison notamment des propriétés spécifiques liées à leur taille, les connaissances scientifiques sur les substances classiques ne sont pas directement

transposables aux formes nanoparticulaires. Si l'absence de toxicité du principe actif vectorisé est connu, la structure dans laquelle il est encapsulé risque d'en modifier la toxicité. D'un point de vue réglementaire, les nanoparticules sont considérées comme un nouveau principe actif lors des études toxicologiques. En effet, la forme nanoparticulaire peut engendrer des risques spécifiques (formation d'agglomérats), véhiculer par adsorption des impuretés, générer par dégradation ou solubilisation des matériaux qui les constituent, des produits toxiques, franchir des barrières physiologiques (hémato-encéphalique, foeto-placentaire, membranes cellulaires et nucléaires, etc.). Ces nouveaux systèmes constituent ainsi un nouveau domaine d'évaluation toxicologique. Malgré la progression des connaissances scientifiques, les incertitudes restent importantes quant aux effets des nanoparticules sur la santé. Les effets d'une exposition chez l'homme peuvent être très divers et complexe à appréhender (r-nano, nanogenotox). Malgré le défaut de textes réglementaire spécifique aux nanoparticules, il est possible de se référer au document « Technical Guidance Documents for New and Existing Substances for Assessing the Risks of Nanomaterials » de la commission européenne publié en 2007 (AFSSAPS, 2008) qui sans être spécifique aux nanoparticules renferme des éléments qui leur sont applicables. Ainsi, il est nécessaire de mettre au point et de valider des méthodes *in vitro* permettant de se renseigner par exemple sur la cytotoxicité, la génotoxicité, la reprotoxicité, l'immunotoxicité, et le risque de formation d'agrégats des nanoparticules. De plus, des études *in vivo* devront être conduites en y incluant l'évaluation de paramètres biologiques, hématologiques et anatomopathologiques après une seule administration ou en administration répétée des nanoparticules chez le modèle animal.

L'évaluation de la sécurité des nanoparticules se base sur les stratégies conventionnelles d'évaluation de la sécurité des médicaments. Elle doit se conformer aux critères comme celui d'évaluer le caractère adéquat des méthodes d'évaluation de la sécurité, de l'efficacité et de la qualité des produits sous forme nanoparticulaire mais également de promouvoir le développement de nouvelles méthodes de caractérisation, d'évaluer le comportement et le devenir *in vitro* et *in vivo* des produits sous forme nanoparticulaire.

4. Encapsulation de l'insuline pour administration *per os*

Pour rejoindre son site d'absorption, l'insuline doit être protégée tout au long de son trajet dans le tractus gastro-intestinal. Il lui faut être protégée d'une part du pH acide et de l'activité enzymatique de l'estomac, d'autre part du pH basique et de l'activité enzymatique de l'intestin et enfin lui permettre de traverser l'épithélium intestinal pour rejoindre la circulation portale.

Pour permettre une administration de l'insuline par voie orale, il faut que la solution proposée puisse permettre à l'insuline d'échapper à toute forme de dégradation le long de son trajet et lui permettre de passer dans le système circulatoire.

4.1. Solution proposée dans la littérature

Des solutions sont proposées dans la littérature permettant une double encapsulation de l'insuline en vue de son administration par voie orale basée sur la formulation de nanoparticules. En effet, Yu QIAN et al. (2013) déposent un brevet d'invention (US 2013/0034602) sur cette approche. Ce brevet protège un concept de double encapsulation de l'insuline lui permettant de franchir le tractus gastro intestinal sans risque de dénaturation en vue de son administration *per os*. Les inventeurs ont développé des nanoparticules mucoadhésives (afin d'augmenter leur absorption intestinal) à base de PLGA par double émulsion évaporation de solvant. Les nanoparticules sont ensuite encapsuler dans un vecteur gastrorésistant. Ainsi l'insuline administrée par voie orale réduit la glycémie chez le modèle streptozotocine de rat diabétique. Fei Yu et al (2015) ont publié des travaux portant sur une triple encapsulation de l'insuline. En effet, les auteurs ont formulé des nanoparticules en PLGA par double émulsion évaporation de solvant encapsulant l'insuline. Celles-ci sont ensuite encapsulées dans des microparticules puis dans un véhicule gastrorésistant à base d'alginate. Les résultats obtenus par Yu Qian et al. (2013) sont confirmés par ceux de Fei Yu et al. (2013) en obtient une réduction de la glycémie après administration orale de l'insuline encapsulée. Ces données montrent l'intérêt d'une double encapsulation de l'insuline en vue de son administration orale de l'insuline. Cette multiplicité de niveau d'encapsulation offre une protection du principe actif au niveau de chaque segment du tube digestif.

4.2. Solution proposée par dans le consortium ORAIL

Le Centre européen d'étude du Diabète en collaboration avec l'Institut Charles Sadron ont développé un vecteur pharmaceutique complexe (brevet Ceed/CNRS : WO2004096172) en vue d'administrer l'insuline par voie orale. Celui-ci est basé sur le double encapsulation (2 niveaux) de l'insuline (Figure 53):

- Dans le premier niveau d'encapsulation, l'insuline peut être encapsulée dans une enveloppe polymérique (formulation par la méthode de double émulsion eau/huile/eau en présence de PLGA (acide poly (lactique-co-glycolique)) ou par la formation de coacervats en présence de chitosane (coacervation complexe) pour former des nanostructures appelées particules (NP). Ces nanoparticules doivent être obtenues à

partir de polymères bio tolérés, d'une formulation ne nécessitant pas de solvant, présentant une taille inférieure à 500 nm permettant leur passage à travers la barrière intestinale. Elles ont pour objet d'encapsuler efficacement l'insuline, d'être suffisamment stable en milieu intestinal pour y protéger le principe actif et lui permettre d'être transporté de la lumière intestinale vers le sang.

- Dans le deuxième niveau d'encapsulation, les NP sont encapsulées dans un vecteur gastro résistant. Celui-ci est composé d'un dispersant lipophile dans lequel les nanoparticules d'insuline sont dispersées, encapsulées/recouvertes d'une tunique gastro résistante qui a pour objectif de protéger les particules dans le milieu gastrique et permettre leur libération dans le milieu intestinal site cible d'absorption du principe actif.

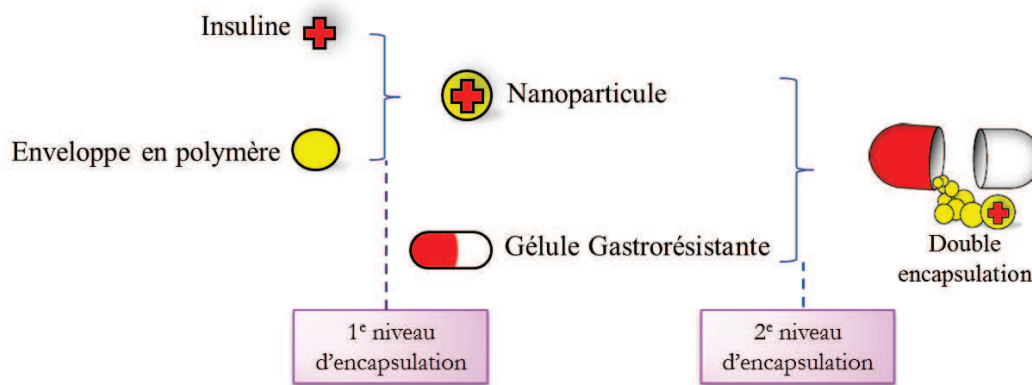


Figure 53 : Principe de la double encapsulation (brevet CNRS/CeeD WO2004096172).

5. Objectif de la thèse

Les objectifs poursuivis lors des travaux réalisés au cours de cette thèse étaient dans une première phase de mettre en place une méthode permettant de formuler un système nanoparticulaire par coacervation complexe entre l'insuline et le chitosane. Cette méthode de formulation doit générer des nanoparticules stables permettant leur caractérisation, leur validation *in vitro* sur des modèles d'épithélium intestinal et *in vivo* sur un modèle de rat insulino-pénique. La seconde phase était de transposer les connaissances acquises dans le développement des nanoparticules à base de chitosane sur les nanoparticules de PLGA obtenues par double émulsion évaporation de solvant afin d'en modifier les propriétés de surface. La modification de surface a pour but de les rendre mucoadhésives pour augmenter la biodisponibilité de l'insuline encapsulée. La troisième partie était enfin d'optimiser le protocole de synthèse des nanoparticules à l'échelle préindustrielle. La dernière partie de la thèse

consistait à optimiser le vecteur pharmaceutique complexe renfermant les nanoparticules d'insuline optimisées et à valider son efficacité biologique après administration par voie orale chez le rat.

III. Matériel et méthode

1. Préparation des nanoparticules de chitosane

1.1. Matériel

Le chlorhydrate de chitosane (CL113) (*Figure 54*) présente un degré de désacétylation de 75 à 90% et une masse moléculaire comprise entre 70 000 et 150 000 Da (Protasan UP CL113). Ce chitosane hydrosoluble a une production standardisée et est commercialisé par Nova Matrix (FMC BioPolymer, Norvège). De par ses propriétés, le chitosane (CL113) est un candidat de choix pour la formulation de nos nanoparticules.

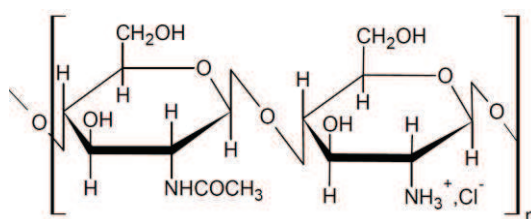


Figure 54 : Schéma de la molécule du chlorure de chitosane (CL 113)

La solution mère d'insuline utilisée peut être préparée soit à partir d'insuline cristalline (Sigma Aldrich, Etats-Unis) (*Figure 55*) dissoute dans de l'acide chlorhydrique (HCl) (Sigma Aldrich, Etats-Unis) à 10 mM avec réajustement du pH à 7,2 avec de l'hydroxyde de sodium pour une concentration finale de 3,5 mg/mL, soit à partir d'insuline couplée à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (Sigma Aldrich, Etats-Unis) (*Figure 56*) soluble dans l'eau pour la formulation de nanoparticules fluorescentes, ou encore l'insuline commerciale Umuline® (Umuline®100 IU/ml, Eli Lilly Pharma, Etats-Unis). Le mannitol est fourni par Sigma Aldrich (Etats-Unis)

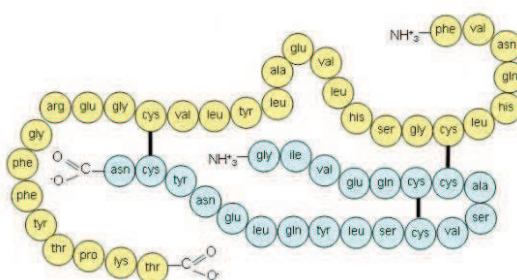


Figure 55 : Schéma de la molécule d'insuline

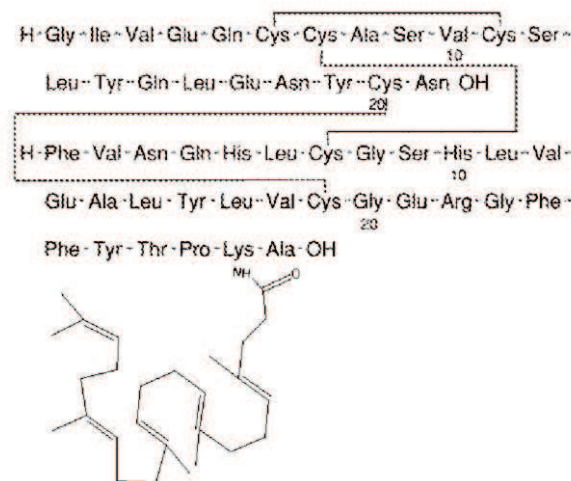


Figure 56 : Représentation schématique de la molécule d'insuline couplée au groupement FITC

Le sodium tripolyphosphate d'une masse molaire de 367 g/mol (Figure 57) se présente sous forme de poudre blanche et est commercialisé par Sigma Aldrich (Etats-Unis).

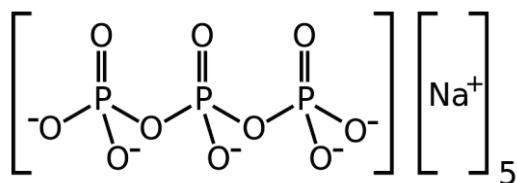


Figure 57 : Schéma de la molécule du tripolyphosphate de sodium

L'eau déminéralisée ultra pure (MilliQ) utilisée dans ces études est obtenue par un dispositif d'ultra filtration de paillasse développé par Millipore (Millipore, Etats-Unis).

1.2. Formation d'un polyélectrolyte complexe

Une solution mère de chitosane à la concentration de 1 mg/mL est préparée en dissolvant le polymère dans de l'eau déminéralisée. La solution de chitosane est maintenue sous agitation (300 tr/min) à température ambiante (20°C) pendant 24 heures pour permettre une dissolution et une homogénéisation de la solution.

Dans un tube à essai de 12 mL, un volume de 500 µL de la solution de chitosane est placé sous agitation (300 tr/min). Une solution d'insuline y est ajoutée goutte à goutte manuellement grâce à une seringue surmontée d'une aiguille 27G à une vitesse de 2 gouttes par seconde (environ 5 min de temps d'ajout). Le mélange est maintenu sous agitation pendant 30 minutes pour permettre la formation et la stabilisation des nanoparticules (figure 58). Du fait de la présence du groupement FITC sur l'insuline, celle-ci ne peut être complexée seule avec le chitosane pour former des nanoparticules. Un ratio 1/9 d'insuline FITC/insuline non marquée

est requis pour encapsuler efficacement l'insuline et ainsi formuler des nanoparticules fluorescentes pour les besoins des études *in vitro*.

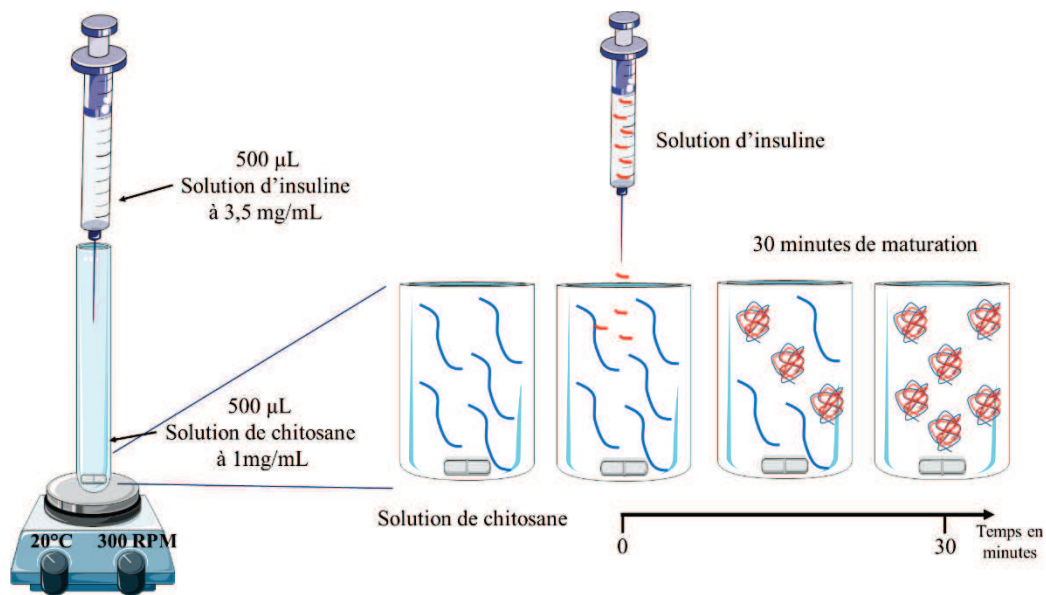


Figure 58 : Protocole de synthèse des nanoparticules de chitosane/insuline par coacervation complexe

1.3. La réticulation

La réticulation consiste en l'introduction de charges négatives supplémentaires dans le coacervat afin d'y ajouter des liaisons supplémentaires et ainsi améliorer la stabilité des nanoparticules.

Une solution mère de tripolyphosphate de sodium est préparée dans de l'eau déminéralisée à une concentration de 27 mmol/L. Une fois les particules formées (Figure 58), 50 µL de la solution de tripolyphosphate sont ajoutés manuellement gouttes à gouttes grâce à une seringue et une aiguille 27G. Les complexes sont gardés sous agitation (300 tr/min) pendant 30 minutes supplémentaires après l'ajout de la solution de tripolyphosphate de sodium (Figure 59).

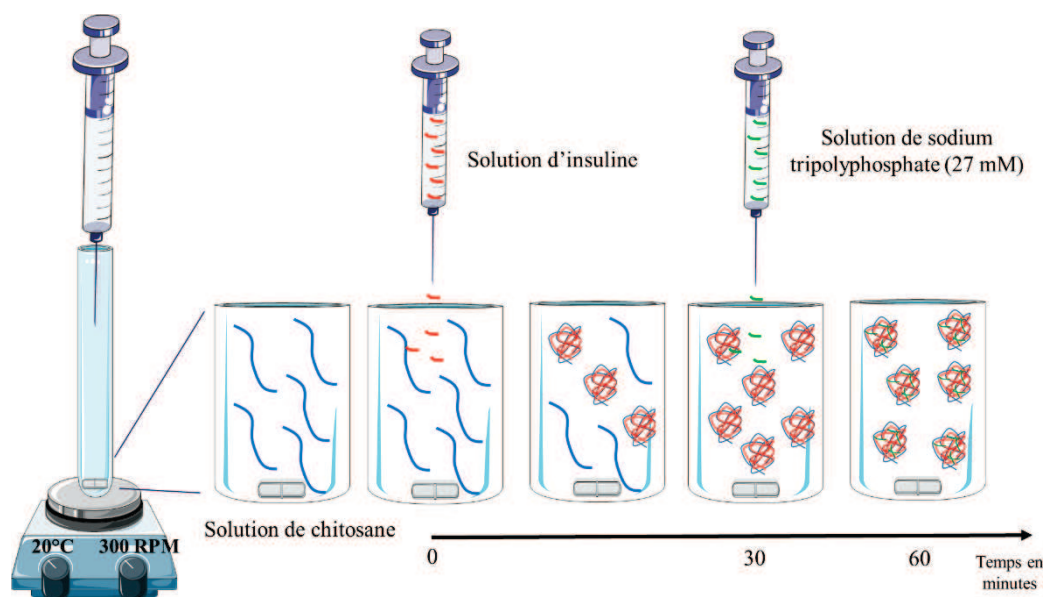


Figure 59 : *Protocole de synthèse des nanoparticules de chitosane/insuline réticulées par coacervation complexe*

1.4. La lyophilisation

La lyophilisation consiste en la sublimation du solvant dans laquelle les nanoparticules sont dispersées. Cette approche permet de faire passer l'eau de son état liquide à gazeux tout en préservant la structure des nanoparticules et la biofonctionnalité du principe actif encapsulé. Cette lyophilisation peut s'opérer en présence ou non de cryoprotecteur comme le mannitol (Sigma Aldrich).

Un bain de carboglace/isopropanol permet la surgélation de la suspension colloïdale dans un ballon de lyophilisation d'un volume de 100 mL. Une fois surgelé, le ballon est raccordé au lyophilisateur de paillasse Freeze-one (Labconco, Etats-Unis) qui permet de maintenir le vide dans le ballon (0,036mbar), à une température de -50°C et pendant 12 heures.

L'introduction du cryoprotectant s'effectue avant la phase de surgélation. Après plusieurs essais, la quantité de mannitol à introduire est déterminée. Une masse de 5 mg de D-mannitol est dissoute dans chaque millilitre de suspension nanoparticulaire (5 mg/mL); ceux-ci sont surgelés avant la lyophilisation. Une fois le lyophilisat récupéré, celui-ci est dispersé dans de l'eau déminéralisée en fonction de la concentration finale souhaitée (Figure 60).

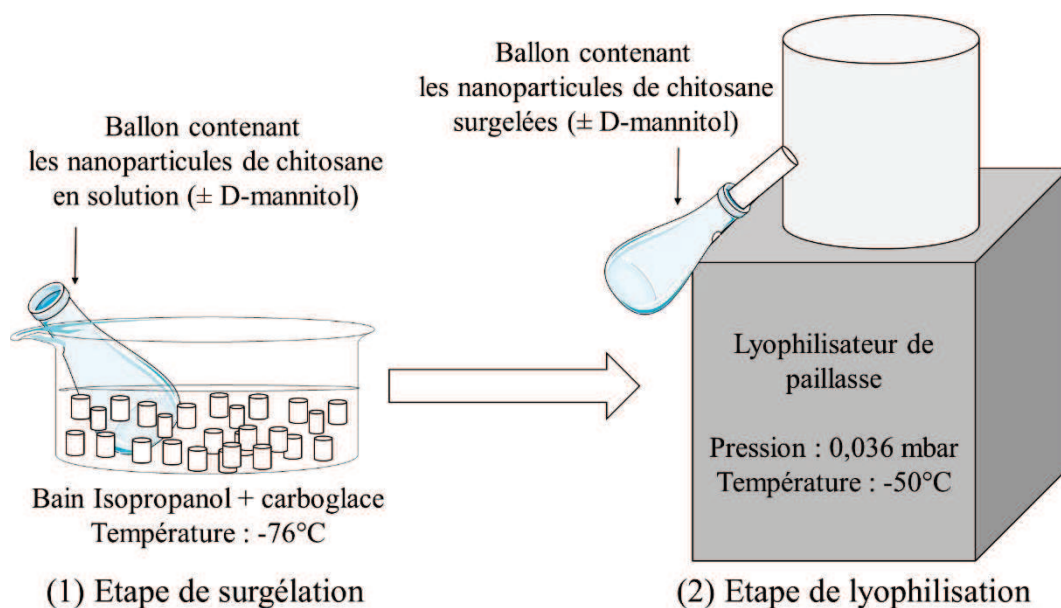


Figure 60 : Protocole de lyophilisation des nanoparticules de chitosane/insuline.

1.5. Combinaison des deux approches

La coacervation complexe est une méthode qui permet la combinaison de la réticulation et de la lyophilisation en vue d'augmenter la stabilité des nanoparticules de chitosane. Afin de bénéficier des avantages des deux approches, celles-ci peuvent être combinées (Figure 61). Les nanoparticules une fois obtenues par coacervation peuvent être réticulées et lyophilisées selon les deux protocoles décrits ci-dessus.

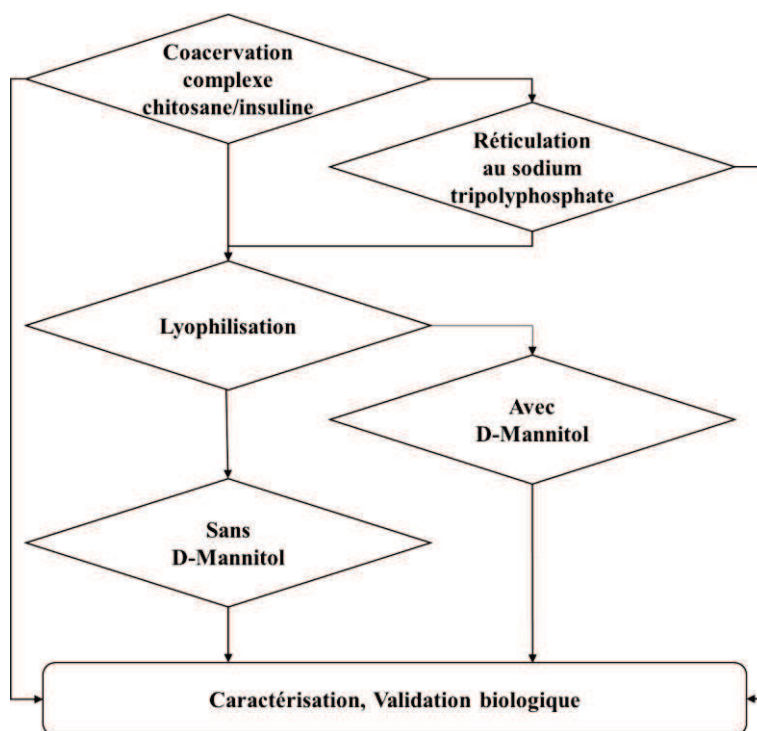


Figure 61 : Protocoles de formulation des nanoparticules de chitosane/insuline.

2. Préparation des particules par double émulsion évaporation de solvant

2.1. Matériel

Le PLGA (Resomer® RG 502H) de masse moléculaire 14 000 Da est fourni par Boehringer Ingelheim (Allemagne) (Figure 62). Le Pluronic® F68 est en provenance de BASF (Etats-Unis). L'acétate d'éthyle de grade pharmaceutique est fourni par Carlo Erba (France). Le PLGA-Pegylé (PEG-Block) de masse moléculaire de 9 000 Da est synthétisé sur demande par Specific polymers (France). Le chlorhydrate de chitosane (CL113) (Figure 54) d'un degré de désacétylation de 75 à 90% et d'une masse moléculaire de 70 000 à 150 000 Da (Protasan UP CL113) est fourni par Nova Matrix (FMC BioPolymer, Norvège). Le PVA 18-88 d'une masse moléculaire de 130 000 Da, l'insuline cristalline, l'insuline FITC, le D-mannitol, le chlorure de sodium (NaCl), le sulfate de sodium (Na₂SO₄), l'acétonitrile, le bicarbonate de sodium (NaHCO₃) et carbonate de calcium (CaCO₃) proviennent de Sigma Aldrich (Etats-Unis). L'Umuline® et l'Insuman® sont gracieusement fournis respectivement par Eli Lilly (Etats-Unis) et Sanofi Aventis (Allemagne). Nous nous sommes procuré de l'alginate de sodium auprès d'Alfa Aesar (Etats-Unis) et de l'huile pharmaceutique Mygliol 812 auprès de Caesar & Loretz GmbH (Allemagne).

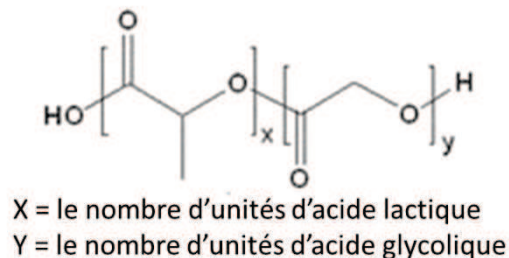


Figure 62 : Représentation schématique de la chaîne de PLGA.

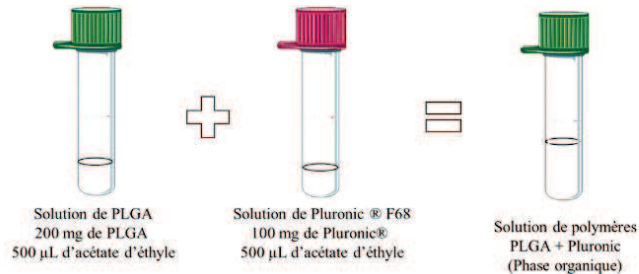
2.2. Double émulsion évaporation de solvant

2.2.1. Synthèse à l'échelle du laboratoire

Une masse de 200 mg de PLGA et 100 mg de Pluronic F68 sont dissouts séparément dans 500 µL d'acétate d'éthyle dans des contenants en verre hermétiquement fermés à 37°C. La solution de Pluronic est transvasée dans la solution de PLGA et celles-ci sont homogénéisées. Le tube en verre contenant la solution de polymère est placé dans un bain de glace. 400 µL de phase aqueuse (solution d'insuline) sont ensuite introduits dans la solution de polymères (phase organique). Une première dispersion correspondant à la D1 est réalisée par ultrason (66W)

pendant 15s. Puis un volume de 2 mL d'une solution aqueuse de PVA à 2,5% (m/v) est ajouté à la première dispersion. La seconde dispersion (D2) est alors réalisée par ultrason (66W) pendant 10s. La dispersion obtenue est alors transvasée dans un cristallisateur contenant 10 mL d'une solution aqueuse de PVA à 0,15% (m/v) sous agitation (130 tr/min) permettant l'extraction du solvant par évaporation (Figure 63).

Préparation des solutions



Préparation des nanoparticules

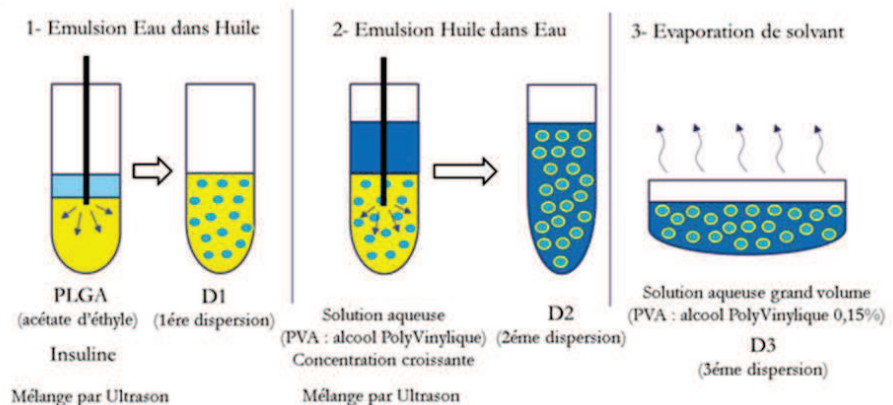


Figure 63 : Protocole de formulation des nanoparticules par double émulsion évaporation de solvant.

2.2.2. La modification de surface

2.2.2.1. La formulation de nanoparticules PEGylées ou sans tension actif par double émulsion évaporation de solvant

La formulation de particules sans tensioactif (sans PVA) ou avec du PLGA-Pegylé suit le même protocole (Figure 63) en remplaçant la solution de PVA par l'eau déminéralisée et le PLGA par du PLGA-Pegylé.

2.2.2.2. Recouvrement des nanoparticules de PLGA par du chitosane

Le recouvrement des particules de PLGA se base sur le principe d'une interaction électrostatique entre le polyélectrolyte de charge positive et la nanoparticule de charge négative. Une solution mère de chitosane (CL 113) est préparée à la concentration de 7 mg/mL dans de l'eau déminéralisée. Un volume de 1,5 mL de la solution de chitosane est mélangé avec 400 µl

de suspension de nanoparticules dans un tube à centrifuger de 50 mL. Ce mélange est placé sous agitation pendant 1 heure pour permettre un recouvrement optimal des nanoparticules. Une étape de centrifugation (20 000 g à 25°C) permet d'enlever le chitosane en excès. Les nanoparticules sont ensuite remises en suspension dans 400 µL d'eau déminéralisée (Figure 64).

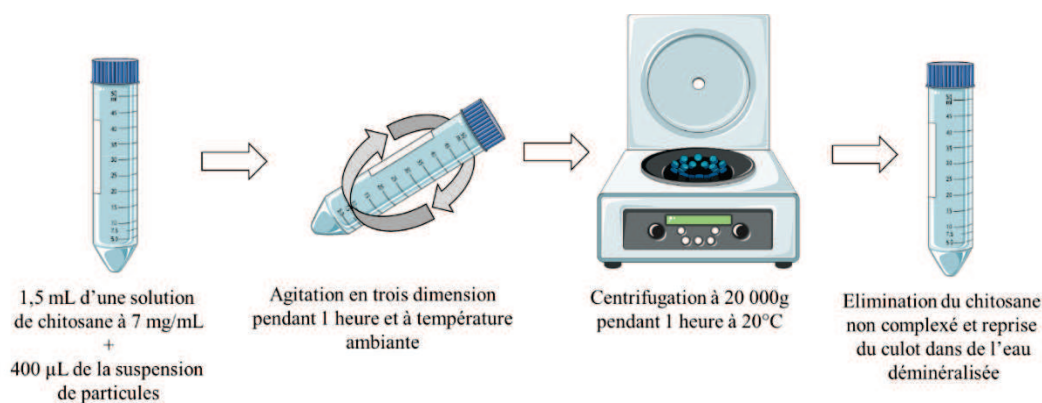


Figure 64 : *Protocole de recouvrement des nanoparticules avec du chitosane par interaction électrostatique.*

2.2.3. Synthèse à l'échelle préindustrielle

Une masse de 120 g de PLGA et une masse de 60 g de Pluronic® F68 sont dissouts séparément dans 300 mL d'acétate d'éthyle dans des erlenmeyers hermétiquement fermés à température ambiante (25°C) pendant 48 heures sous agitation (300 tr/min). La solution de Pluronic est réchauffée pendant 25 minutes à 75°C, la solution de PLGA pendant 10 minutes à 45°C. La solution de Pluronic est transvasée dans la solution de PLGA et celle-ci sont homogénéisées. La solution organique est déversée dans la cuve du Becomix® (A. Berents GmbH & Co. KG, Allemagne), un mélangeur rotor-stator industriel d'une capacité de 5 litres, dont la température est préalablement réglée 25°C. Après un temps de refroidissement 20 minutes pour que la solution de polymères atteigne 30°C, un volume de 240 mL d'insuline (Umuline® ou Insuman®) y est introduit. Après fermeture du Becomix®, la première dispersion (D1) est réalisée à la vitesse de 22 m/s pendant 5 minutes. La seconde dispersion est réalisée en ajoutant dans le réacteur un volume de 1200 mL de solution aqueuse (eau déminéralisée ou solution de PVA à 1% (m/v)). L'homogénéisation est réalisée à 22 m/s pendant 5 minutes. Afin d'extraire le solvant, la cuve du Becomix est mise sous vide (110 mbar) et les particules sont maintenues sous agitation grâce à une pâle tournant à une vitesse de 1 m/s. La température de la cuve est augmentée de 5 degrés toutes les 30 minutes pour atteindre 35°C en une heure. Toutes les heures à compter du début de l'évaporation et ce pendant 5 heures, un

prélèvement est réalisé afin de suivre la cinétique d'évaporation du solvant et des paramètres granulométriques (Figure 65).

Après synthèse, les particules sont caractérisées (mesure de taille, de potentiel zêta et de l'efficacité d'encapsulation) et validées en *in vivo* par administration orale des particules soit libres, soit encapsulées dans le vecteur complexe.

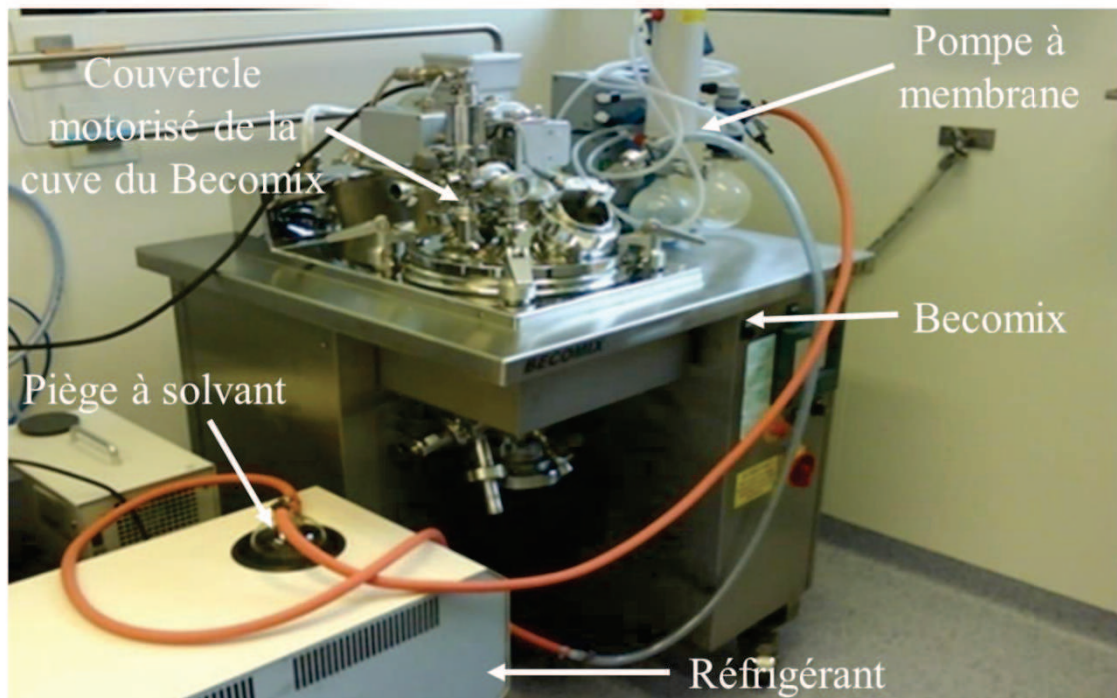
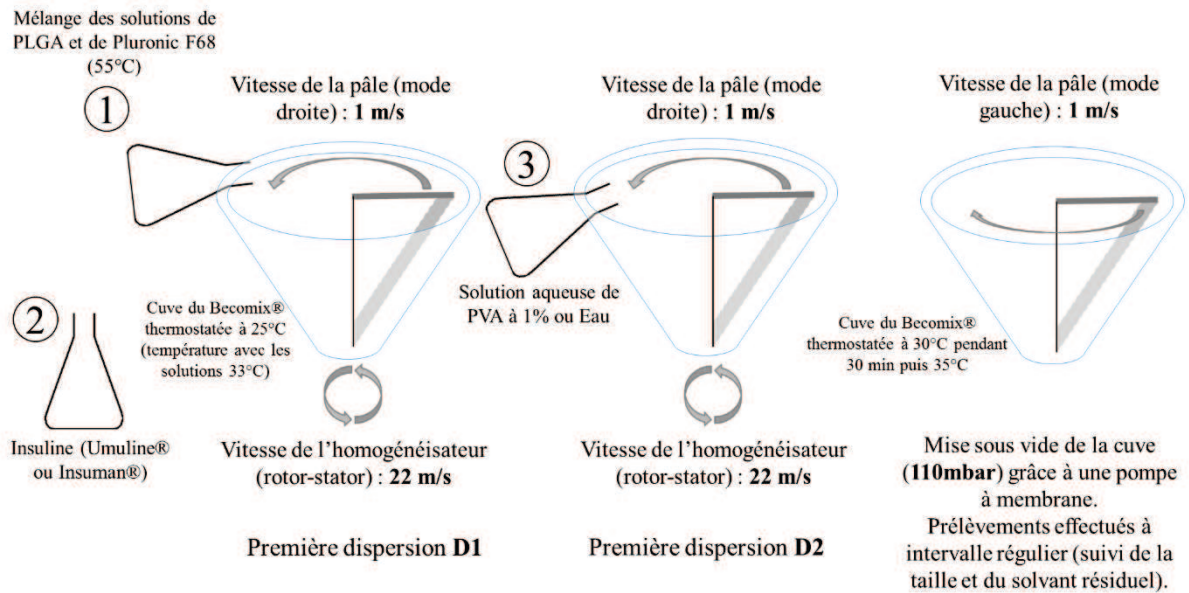


Figure 65 : Protocole de synthèse des nanoparticules à l'échelle préindustrielle

3. Caractérisation

3.1. Mesure de la taille

La taille des particules est mesurée par diffusion dynamique de la lumière ou DLS pour *dynamic light scattering*. Cette technique permet de déterminer la taille des nanoparticules en suspension par mesure des variations aléatoires d'intensité de la lumière diffusée (Figure 66).

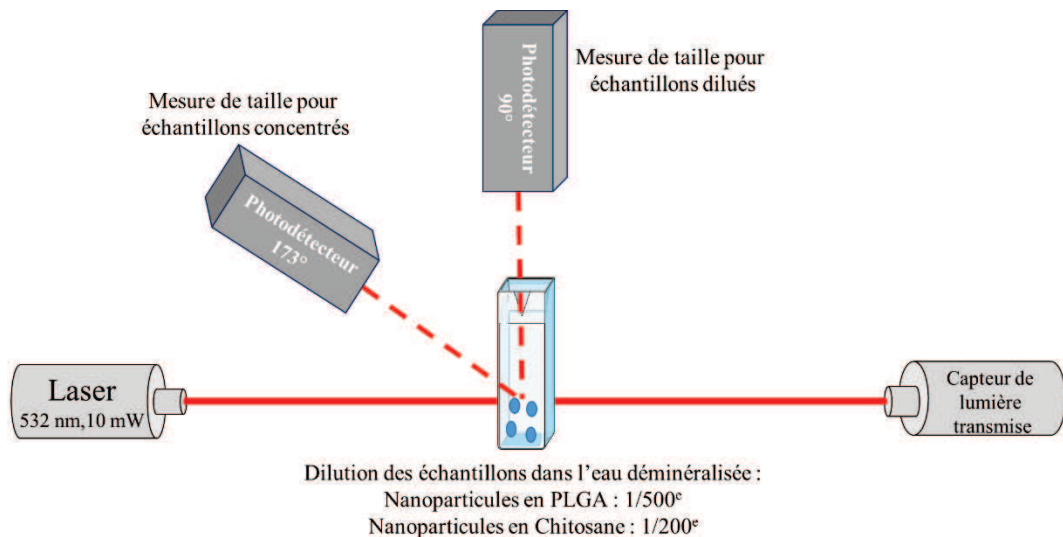


Figure 66 : Principe de la diffusion dynamique de la lumière.

Cette technique est fondée sur la mesure du mouvement brownien des particules (mouvement aléatoire des particules provoqué par les impacts des molécules du solvant sur la surface des particules). La fréquence et l'amplitude de ce mouvement brownien dépendent de la taille des particules et de la viscosité du solvant. La vitesse de déplacement des particules définie par le coefficient de diffusion translationnel (D_t) qui, selon la loi de Stokes-Einstein, est en relation avec le diamètre hydrodynamique des particules (taille des particules).

$$\text{Equation de Stokes-Einstein : } D_h = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_t}$$

Avec :

- D_h le diamètre hydrodynamique, donc la taille des particules en suspension,
- D_t le coefficient de diffusion transversal obtenu par la diffusion dynamique de la lumière,
- K_B la constante de Boltzmann,
- T la température (contrôlée par système Peltier),
- η la viscosité du solvant.

Cette technologie permet d'obtenir la taille moyenne des nanoparticules en dispersion. La mesure s'effectue dans un environnement dilué, dans un volume utile de mesure de 1 mL d'eau déminéralisée. Dans une cuve, sont respectivement dilués 2 μL de suspension de nanoparticules de PLGA ou 20 μL de suspension de nanoparticules de chitosane. Après homogénéisation, la mesure est réalisée trois fois pour chaque échantillon grâce au granulomètre Horiba Nanopartica SZ100 (Horiba, Japon). Ce granulomètre permet de mesurer la taille des particules selon deux angles de mesure en fonction de la concentration des échantillons. Pour un échantillon concentré, la mesure s'effectue à 173° (positionnement du photodétecteur) et à 90° pour les échantillons dilués (Figure 66).

La mesure de taille permet aussi de renseigner l'homogénéité de distribution des tailles dans la synthèse, celle-ci est fournie par la valeur du PDI (indice de polydispersité). Cette valeur de PDI est d'autant plus petite que la distribution des tailles est monodisperse (toutes les particules en présence ont des tailles très proches).

3.2. Mesure de la charge globale de surface

La dispersion et la stabilité d'une émulsion ou d'une suspension au cours du temps dépend de l'équilibre entre les forces attractives de Van der Waals et répulsives électrostatiques. Le potentiel zêta est le potentiel électrostatique des particules en solution. Ce dernier est la charge qu'une particule acquiert quand elle est mise en solution. Le potentiel zêta est proportionnel à la densité de charge à la surface de la particule. L'apparition d'une charge à la surface d'une particule affecte la distribution ionique dans la région interfaciale entre la particule et le solvant de dispersion (Figure 67).

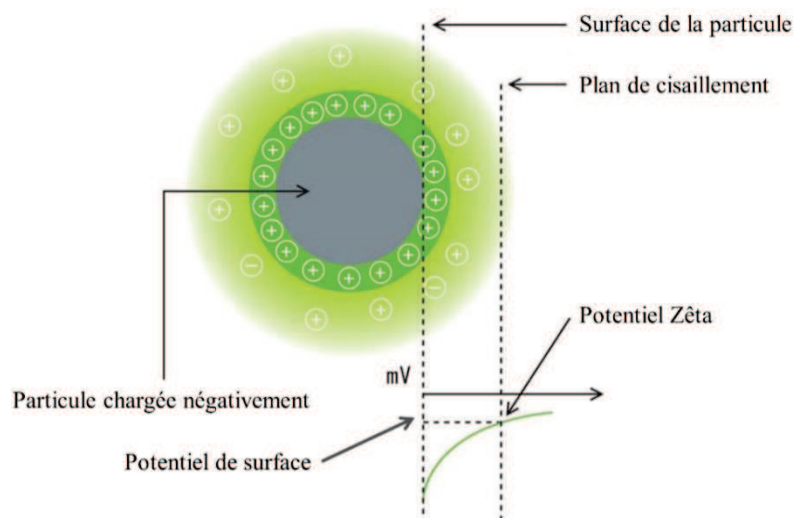


Figure 67 : Principe de base de la mesure du potentiel zêta

Dans une solution mère de chlorure de sodium (NaCl) d'une concentration de 1 mM, les suspensions de nanoparticules sont diluées ($1/50^e$ pour les nanoparticules de PLGA et $1/10^e$ pour les nanoparticules de chitosane). Les nanoparticules diluées sont introduites dans une cuve dotée d'électrodes et disposées dans le granulomètre Horiba Nanopartica SZ100 (Horiba, Japon). Celui-ci grâce à l'application d'un champ électrique permet de mesurer la mobilité électrophorétique des nanoparticules en dispersion. L'application du modèle mathématique (modèle de Smoluchowski) permet de calculer la valeur du potentiel zêta.

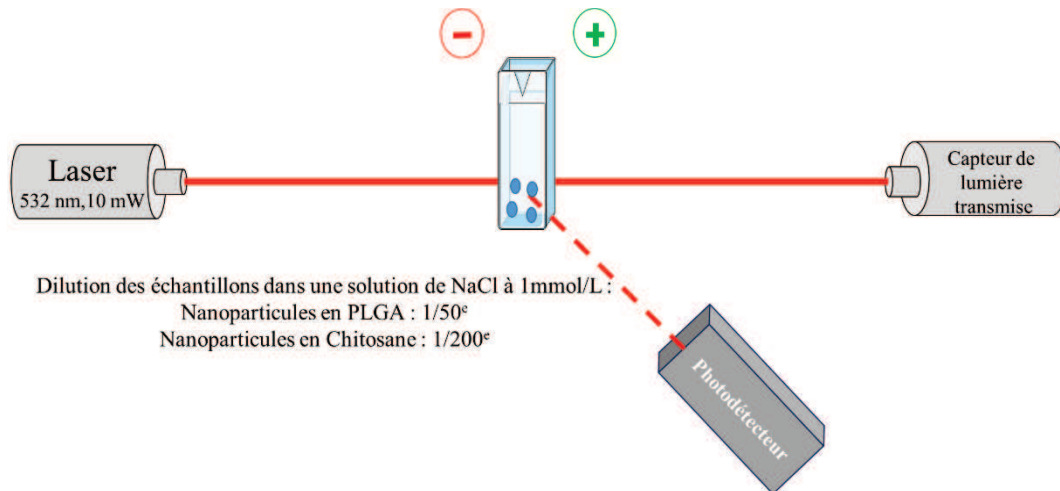


Figure 68 : Principe de la mesure du potentiel zêta

La valeur de cette charge de surface permet de comprendre et de prédire les interactions entre particules en suspension. Sa manipulation permet d'en améliorer leur stabilité et leur absorption cellulaire.

3.3. Analyse au MET (Microscope Electronique à Transmission)

Une tranche de mica a été rendue hydrophile grâce au dépôt d'une fine couche de carbone à partir d'un segment de graphite à l'aide d'une impulsion électrique réalisée sous vide. Un volume de 2 μ L de suspension de nanoparticules a été déposé sur ce support pendant 1 min. L'excès de suspension est éliminé grâce à un papier absorbant Whatman®. Une solution d'acétate d'uranyle à 1% est ajoutée puis retirée après une minute de contact avec l'échantillon. Les échantillons ont été analysés par un microscope électronique à transmission modèle Tecnai G2 Sphera (FEI Company, Hillsboro, États-Unis).

3.4. Détermination de l'efficacité d'encapsulation

L'efficacité d'encapsulation est déterminée soit par la méthode indirecte, soit par une méthode directe. La méthode indirecte consiste en une centrifugation des dispersions de nanoparticules (20 000 g pendant 1 heure à 4°C) et la quantification du principe actif non

encapsulé dans le surnageant par chromatographie liquide haute performance (CLHP). La méthode directe consiste en une désencapsulation de l'insuline contenue dans les nanoparticules. Après une étape de centrifugation des nanoparticules (20 000 g pendant 1 heure à 4°C), le surnageant est collecté pour le dosage en indirect. Le culot quant à lui est repris dans un volume d'acétonitrile et incubé à 37°C sous agitation douce pendant 25 heures. A la suite de l'incubation, une centrifugation est réalisée (20 000 g pendant 1 heure à température ambiante) et le surnageant est éliminé (l'insuline est précipité par l'acétonitrile). Le culot obtenu est repris dans du PBS (solubilisation de l'insuline), une dernière centrifugation est réalisée dans les mêmes conditions et le surnageant contenant l'insuline est analysée en CLHP (Figure 69).

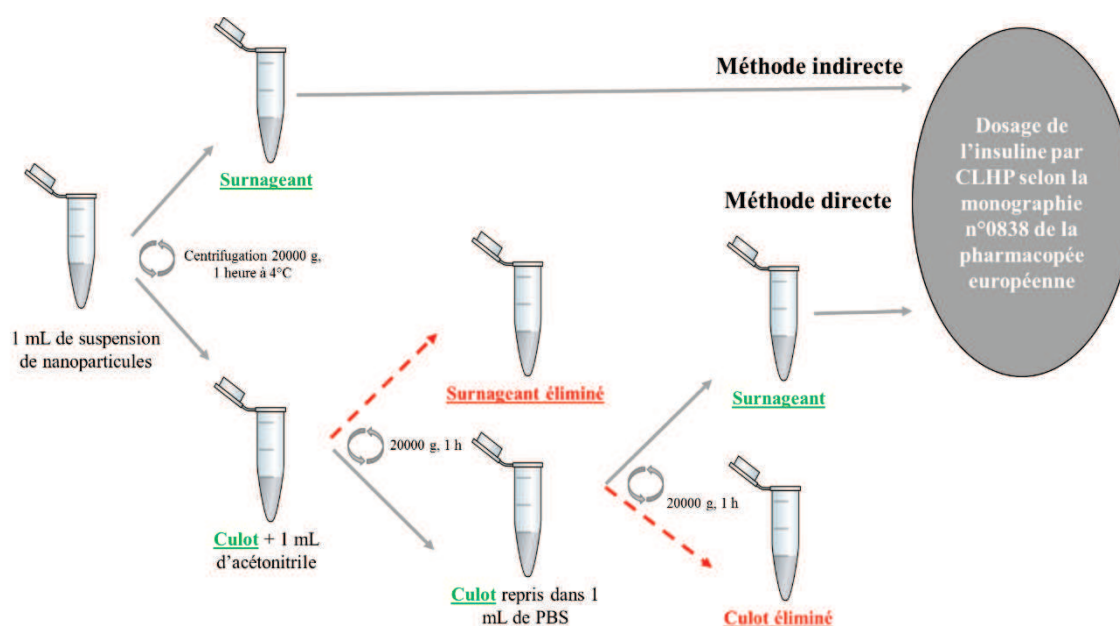


Figure 69 : Protocole d'évaluation de l'efficacité d'encapsulation

Les analyses sont effectuées selon la méthode de la Pharmacopée Européenne (monographie n°0838) sur une chaîne de chromatographie liquide modèle Varian (Agilent Technologies, Les Ulis, France). Le système comprend une pompe ProStar 210, un Injecteur ProStar 410, un détecteur ProStar 330 à barrette d'iode et une colonne C18 Symmetry 4.6 mm × 250 mm, 5 µm, 300 Å (Waters, Milford, Etats-Unis). L'exploitation des résultats est réalisée par le logiciel Star Chromatography Workstation version 6.14.

La phase mobile A est composée d'une solution aqueuse de sulfate de sodium (Na_2SO_4) à 0,2 mol/L et à pH 2,3. La phase mobile B est un mélange de la phase mobile A et de l'acétonitrile (55:45, v/v). La proportion de phase mobile lors de l'analyse est composée d'un mélange de phase A / phase B (42:58, v/v) avec un débit d'injection de 1 mL/min. La température de la colonne est maintenue à 40 °C, et la longueur d'onde de détection est de 214 nm (Figure 70). L'efficacité d'encapsulation (EE) a été calculée en utilisant l'équation suivante:

$$EE_1 (\%) = ((\text{quantité d'insuline non encapsulée} - \text{quantité totale théorique d'insuline}) / \text{quantité totale théorique d'insuline}) * 100$$

$$EE_2 (\%) = (\text{quantité d'insuline encapsulée} / \text{quantité totale théorique d'insuline}) * 100$$

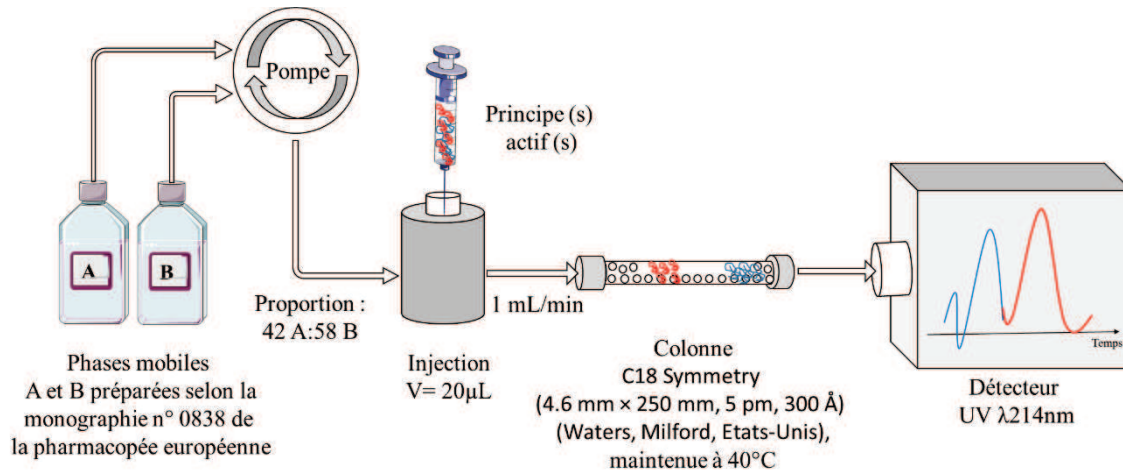


Figure 70 : Principe de la chromatographie liquide haute performance (CLHP).

3.5. Profil de libération de l'insuline encapsulée

Les nanoparticules ont été incubées avec du PBS à 37 ° C sous agitation douce pendant le temps prédéterminé: $T_x = 0, 0,25, 0,5, 1, 2$ et 4 h. La quantité d'insuline libérée par nanoparticules a été mesurée par UV à une longueur d'onde λ_{280nm} . Les résultats ont été exprimés en pourcentage de l'augmentation de la concentration de l'insuline dans le liquide de dispersion de la manière suivante:

$$\text{Quantité d'insuline libérée} = ([\text{Insuline}]_{T_0} / [\text{Insuline}]_{T_x}) * 100.$$

3.6. Profil de libération dans les milieux simulés

Les milieux gastrique (NaCl 35 mmol/L, HCl 80 mmol/L à pH 1,2) et intestinale (KH₂PO₄ 50 mmol/L, NaOH 15 mmol/L à pH 6,8) ont été préparés selon les directives de la pharmacopée européenne. Les nanoparticules ont été incubées avec les différents milieux à température ambiante et à 37°C pour des valeurs de temps prédéterminés: $T_0 = 0$ h, $T_x = 0,5, 1, 1,5, 2, 4,$ et 7 h. La densité optique des échantillons a été mesurée à une longueur d'onde λ_{500nm} (absorbance). Les résultats ont été exprimés en pourcentage de diminution de la densité optique, comme suit:

$$\text{Stabilité en milieux simulés} = (\text{Abs.}T_x / \text{Abs.}T_0) * 100.$$

Cette approche est appliquée aux nanoparticules obtenues par coacervation complexe. Pour les nanoparticules formulées par double émulsion évaporation de solvant, l'insuline libérée est quantifiée par la méthode CLHP décrite précédemment.

3.7. Vieillessement dans le temps

Les nanoparticules de PLGA après purification sur colonne Sephadex (paragraphe 3.8) sont aliquotées dans des tubes à centrifuger et conservées soit dans l'eau soit diluée au ½ dans du PBS (Phosphate-Buffered Saline, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) à 4°C pendant 21 jours. Tous les 7 jours, une mesure de la taille et du potentiel zêta est effectuée par granulométrie.

3.8. Purification des nanoparticules

Après évaporation de l'acétate d'éthyle, les nanoparticules sont purifiées sur une colonne Sephadex G-25. Avant la purification des nanoparticules, un volume de 25 mL d'eau est élué de la colonne par fraction de 2,5 mL. Un volume de 2,5 mL de synthèse est disposé sur la colonne et est élué avec deux fois 2,5 mL d'eau. Puis la colonne est rincée avec 10 mL d'eau et la procédure est répétée cinq à six fois pour purifier une synthèse (une colonne utilisée par synthèse).

4. Formulation du vecteur pharmaceutique complexe

Le vecteur pharmaceutique complexe est formulé par gélification ionotropique de l'alginate avec des ions calcium. Une solution aqueuse d'alginate à 4% (m/v) est préparée dans un milieu basique (bicarbonate de sodium (NaHCO_3) à 0,1 mol/L) 48 heures avant la synthèse. Celle-ci est maintenue sous agitation (300 tr/min) et à 20°C pour permettre une dissolution homogène du polymère. Dans la solution d'alginate, du carbonate de calcium (CaCO_3) est dispersé à 1% (m/v). Un volume de 10 mL de suspension de nanoparticules est mélangé à 30 mL de la solution d'alginate. Grâce à un pousse seringue, le mélange est introduit dans un volume de 100 mL d'huile pharmaceutique (Mygliol 812) sous agitation (1200 tr/min) à un débit de 2 mL par minute. Après injection, le milieu est maintenu sous agitation à la même vitesse pendant 1 heure à température ambiante (20°C) pour permettre la formation des gouttelettes d'eau de taille homogène dans l'huile. Un mélange d'huile pharmaceutique (Mygliol 812) et d'acide acétique (20/2 ; v/v) introduit au même débit et sous la même intensité d'agitation permet de former la couche interne des billes d'alginate par réticulation du polymère par libération du calcium à partir de CaCO_3 . Après une heure sous agitation, 160 mL d'une solution aqueuse de chlorure de calcium à 5% (m/v) sont ajoutés au même débit. Une heure après, la vitesse d'agitation est réduite à 300 tr/min et maintenue pendant 12 heures. Une ampoule à décanter permet une séparation de phase huile/eau pour récupérer les billes encapsulant les nanoparticules. Les

microparticules sont lavées sur un tamis d'une porosité de $0,2 \mu\text{m}$ avec du tween 80 à 2% (m/v) (Figure 71).

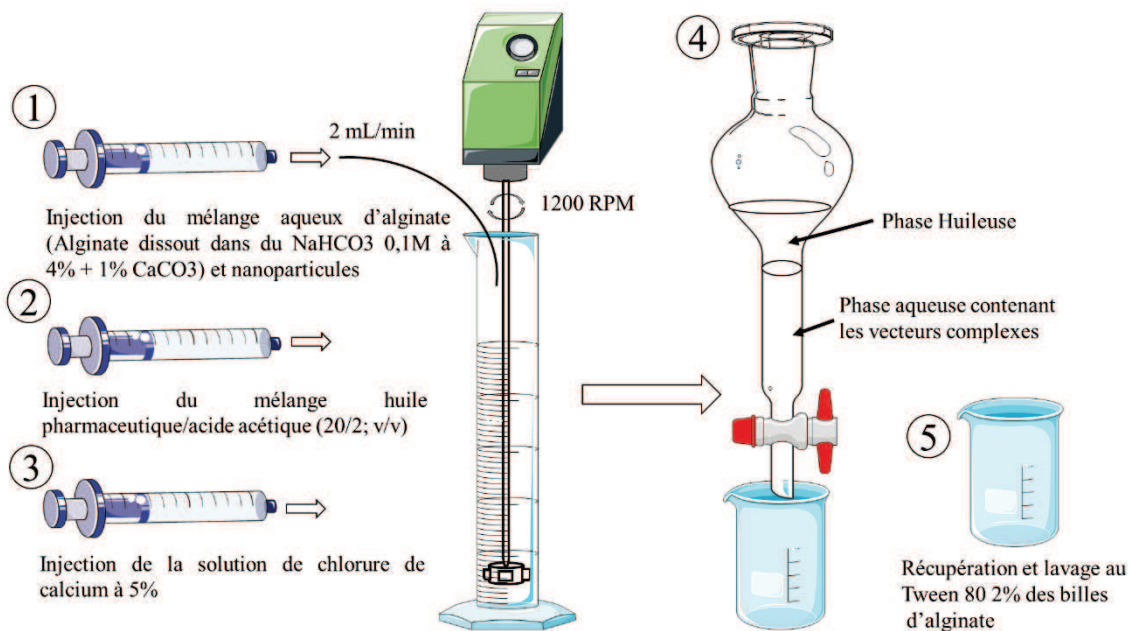


Figure 71 : Protocole de formulation des vecteurs pharmaceutique complexe par gélation ionotropique.

Après la synthèse, les billes formées sont observées au microscope optique et sont administrées par voie orale chez le rat.

5. Validation *in vitro*

5.1. Matériels

Nous nous sommes procuré les cellules Caco-2 auprès de l'ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, Etats-Unis) et les RevHT29MTX nous sont généreusement fournies par le Dr. Thécla Lesuffleur (INSERM U505, Villejuif, France). Les plaques de culture (24 et 96 puits) sont obtenues auprès de Falcon® (Etats-Unis), les inserts thincert® $33,6 \text{ mm}^2$ d'une porosité de $1 \mu\text{m}$ auprès de Greiner Bio-One (Etats-Unis). Le DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), l'HBSS (Hank's Balanced Salt Solution), le PBS (phosphate buffered saline), l'ABAM (antibiotique-antimycotique) sont fournis par Invitrogen (France), le SVF (sérum de veau foetal) par Gibco® (Etats-Unis) et le kit Annexin-V + iodure de propidium par Millipore (Etats-Unis).

5.2. Modèles cellulaires

Deux modèles de culture de cellules ont été utilisés: les cellules Caco-2 seules et une coculture avec 75% de cellules Caco-2 et 25% de RevHT29MTX pour obtenir un modèle d'épithélium intestinal *in vitro*, comme le décrivent Nollevaux et al. (2006). La culture cellulaire a été réalisée comme décrit par Reix et al. (2012). Brièvement, les cellules (passage entre 30 et 60) ont étéensemencées à hauteur de 73000 cellules/cm² pour une culture en plaques (plaque 24 puits traitées de 1,9cm²/puits) et 200 000 cellules/cm² pour une culture sur insert (thincert® 33,6 mm² d'une porosité de 1µm) dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) supplémenté avec 20% de SVF (sérum de veau foetal), une solution antibiotique-antimycotique (1%), et 1% de solution d'acides aminés non essentiels (solution stock à 10 mM). Les cellules ont été cultivées pendant 21 jours à 37°C dans atmosphère contenant 5% de CO₂, afin qu'elles acquièrent un phénotype entérocytaire (Figure 72).

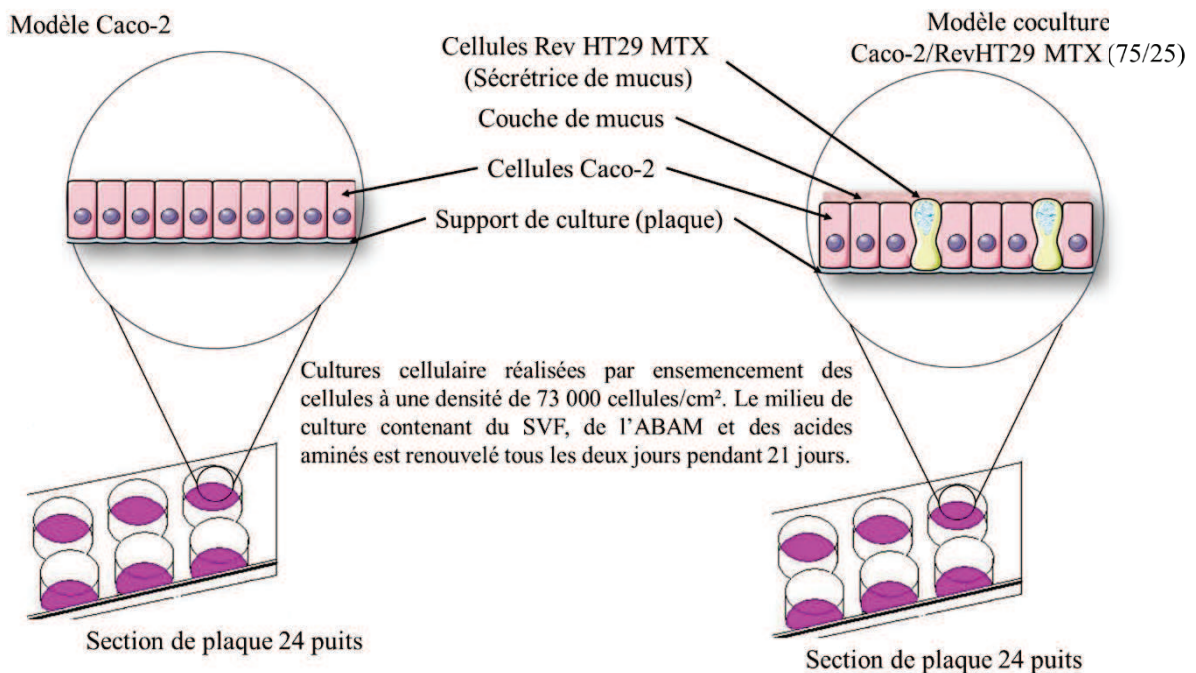
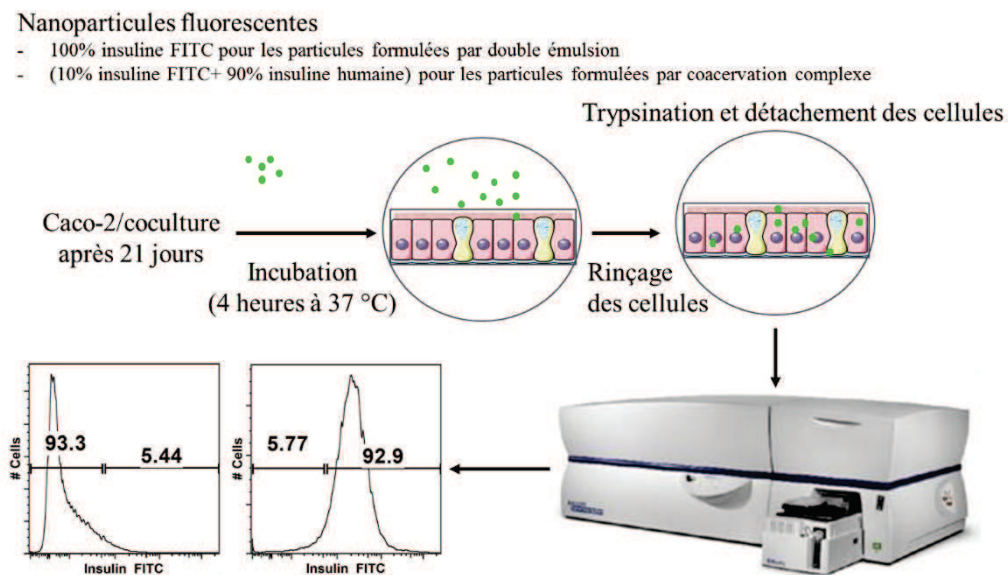


Figure 72 : Protocole de mise en place des modèles et culture cellulaire

5.3. Evaluation de l'internalisation

Afin d'étudier l'absorption des nanoparticules par les cellules, la cytométrie en flux est choisie car elle permet de quantifier l'association cellules-nanoparticules. Celle-ci est réalisée comme décrit par Reix et al. (2012). Après 21 jours de culture dans des plaques de 24 puits traitées pour permettre une adhésion cellulaire, les cellules sont incubées, après rinçage au PBS, avec des nanoparticules fluorescentes (formulées avec de l'insuline FITC) à la quantité de 10

UI/ puits pour les nanoparticules de chitosane et 4 UI/puits (20 mg de PLGA) pour les nanoparticules en PLGA dans du milieu DMEM sans rouge de phénol et sans SVF pendant 4 heures. Après incubation, les cellules sont lavées 3 fois (10 min) avec de l'HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) sans calcium et sans magnésium. Les cellules sont détachées par trypsination, centrifugées, et remises en suspension dans de l'HBSS. Un volume de 200 μ L de suspension cellulaire est déposé dans une plaque 96 puits non traitée en triplicata pour lecture. La viabilité cellulaire est évaluée par l'ajout de 2 μ L d'iodure de propidium et 2 μ L d'annexin-V APC par puits avant lecture. Les échantillons ont été analysés en considérant 50000 événements par puits par un cytométrie en flux BD LSR II (Becton Dickinson and Company, Etats-Unis) (Figure 73). Les résultats sont exprimés comme la moyenne géométrique de l'intensité de fluorescence multipliée par le pourcentage de cellules positives au FITC.



Evaluation de la fluorescence associée aux cellules

Figure 73 : Protocole d'évaluation de l'internalisation par cytométrie en flux.

Le bleu de trypan permet de quencher la fluorescence extérieure et permet donc de distinguer la fluorescence associée et la fluorescence interne aux cellules (Nuutila Jari and Esamatti Lilius (2005)). Dans un volume de 400 μ L de suspension cellulaire, un volume de 100 μ L de bleu de trypan est introduit. Après homogénéisation (vortex), les cellules sont de nouveau centrifugées (pour supprimer le bleu de trypan) et reprises dans 400 μ L d'HBSS (Figure 74).

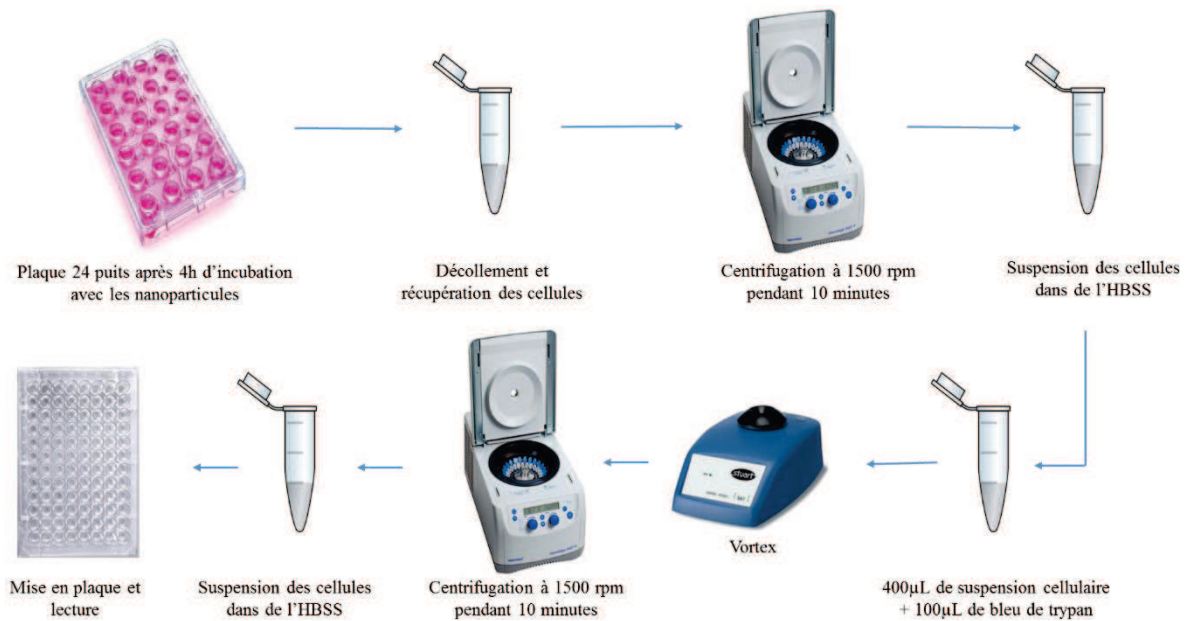


Figure 74 : Protocole d'extinction de la fluorescence extérieure aux cellules.

5.4. Evaluation de la résistance transépithéliale

Le principal paramètre pour évaluer l'intégrité d'une barrière tissulaire est sa résistance électrique transépithéliale (TEER). Une barrière tissulaire intacte est caractérisée par une haute résistance électrique transépithéliale traduisant une intégrité et le maintien des jonctions serrées. Pour mesurer la résistance transépithéliale, les voltmètres épithéliaux (Millicell® ERS, Millipore, Etats-Unis) sont employés, ceux-ci permettent de mesurer la différence de potentiel entre les côté apical et basolatéral grâce à une électrode dédiée (Figure 75). L'introduction de l'électrode dans un puits (de part et d'autre de l'insert) permet de mesurer la valeur de la résistance électrique de la monocouche cellulaire.

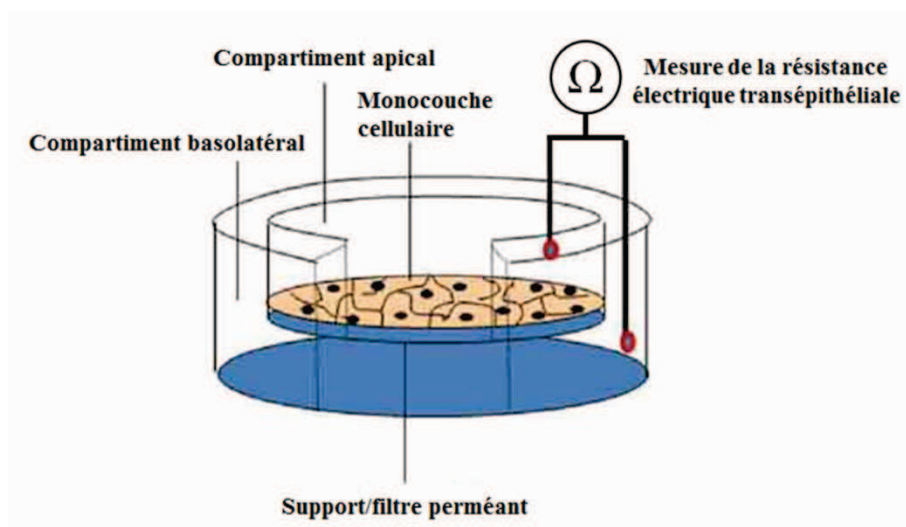


Figure 75 : Protocole d'évaluation de la résistance électrique transépithéliale.

La valeur de la TEER est exprimée Ohm.cm² puis représentée en pourcentage par rapport à la valeur initiale. Il est possible ainsi de suivre l'impact des nanoparticules (2 mg de PLGA/inserts), de l'insuline non encapsulée ou encore de l'EGTA utilisé comme contrôle positif d'ouverture des jonctions serrées et de diminution de la TEER. Cette valeur renseigne donc sur la toxicologie des nanoparticules étudiées.

6. Validation *in vivo*

6.1. Matériel

Les animaux sont en provenance de l'élevage Charles River (Saint-Germain-Nuelles, France), la streptozotocine est fournie par Sigma-Aldrich (Etats-Unis). Le Rompun, l'Imalgène et l'héparine Choay sont respectivement commercialisés par Bayer (France), Merial (France) et Sanofi Aventis. Le peptide-C est quantifié grâce à un Kit ELISA Rat C-peptide fourni par Mercodia (Suède) et la glycémie est mesurée grâce au glucomètre AccuChek[®] fourni par Roche Diagnostic (Suisse).

6.2. Modèle animal

Toutes les expériences sur les animaux ont été effectuées en conformité avec les directives des institutions européennes concernant les soins et l'utilisation d'animaux dans des procédures expérimentales (numéro d'agrément de l'animalerie du laboratoire: C67-482-28, numéro de saisine AL / 60/67/02/13). Des rats mâles Wistar (Charles River) de poids compris entre 120 et 140 g sont placés dans des cages collectives standards dans une salle à une température ambiante régulée ($23 \pm 1^\circ\text{C}$). Les rats sont maintenus dans un cycle circadien de 12 heures d'obscurité et 12 heures de lumière, et sont nourris avec un régime standard pour animaux de laboratoire sous forme de granulés (SAFE A04, Villemoisson-sur-Orge, France). Les animaux ont accès à la nourriture et à l'eau *ad libitum*. Le diabète est induit par une dose unique de streptozotocine (Sigma Aldrich) par voie intrapéritonéale à la dose de 100 mg/kg. Le diabète (statut insulino-pénique des animaux) est établi après 3 jours (glycémie > 6 g/L et C-peptide <100 pmol/L).

6.3. Implantation de cathéters

Les rats diabétiques subissent une chirurgie qui permet d'implanter des cathéters en intrapéritonéale (IP) qui est la voie de référence et intraduodénale (ID) qui est le site cible des nanoparticules.

Les rats diabétiques sont anesthésiés par injection intra-péritonéale d'un mélange xylazine / kétamine ; soit 2,7mL de Rompun 2% (Bayer) ajoutés à 10mL d'Imalgène 1000 (Merial), à une dose de 100 μ L/100g de masse corporelle. Après vérification du stade d'endormissement (vibrisses inertes, perte du reflexe palpébral, non réactivité à des stimuli externes), l'animal est placé en décubitus dorsal pour l'intervention chirurgicale.

L'abdomen des animaux endormis est aseptisé de façon modérée à l'aide d'éthanol 70% et est rasé à l'aide d'une lame de scalpel, d'une part au niveau de la nuque entre les deux oreilles et d'autre part au niveau supérieur de l'abdomen.

- Une incision longitudinale d'un centimètre environ des plans cutanés et musculaires jusqu'à péritoine est réalisée au milieu de la zone dégagée.
- Un cathéter, exempt de fuites et rincé avec une solution d'héparine à 1,5% (héparine Choay 2500UI) dans du sérum physiologique, comportant à son extrémité deux encoches successives, est délicatement introduit dans le péritoine de l'animal.
- Le cathéter est fixé sous une des berges du péritoine en faisant une ligature (point simple) sur la première encoche du cathéter, à l'aide de fil de suture 4-0. Puis, l'autre encoche du cathéter est fixée au-dessus de l'autre berge du péritoine de la même manière que précédemment.
- Les deux berges sont ensuite suturées par un surjet simple avec un fil de même type.
- Le cathéter est ensuite passé sous la peau par tunnélisation à l'aide d'une canule pour venir atteindre la nuque de l'animal, par laquelle le cathéter doit ressortir après une légère incision de la peau à cet endroit.
- Les berges de la tête sont ensuite suturées (1 ou 2 points) et celles de l'abdomen également (en surjet simple) à l'aide du fil 4-0.
- Un sparadrap est enroulé autour du cathéter afin qu'il reste droit. Un « bouchon » réalisé à l'aide de fil de pêche permet de fermer le cathéter (2 cm maximum de la base de la tête) (Figure 76).

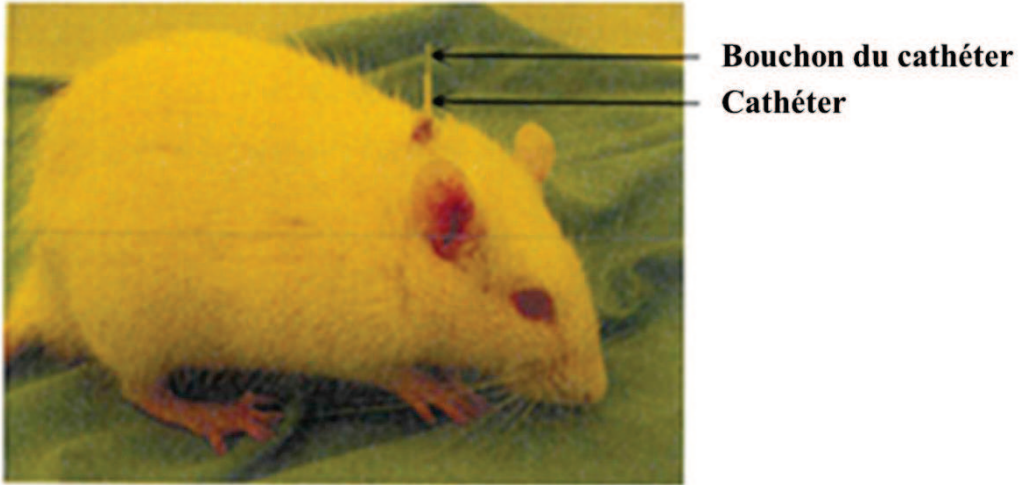


Figure 76 : *Animal après implantation et tunnélisation.*

L'animal est ensuite placé en cage individuelle et le suivi postopératoire de l'animal est assuré (fréquence cardiaque, respiration, température de l'animal, puis réveil). Après 48h, les rats vigiles reçoivent par ce cathéter du sérum physiologique, de l'insuline encapsulée ou en solution (2 UI/200 gramme de masse corporelle) directement dans le péritoine.

Afin d'implanter le cathéter en intraduodénale, le protocole d'anesthésie et de préparation de l'animal est identique à ce qui est décrit ci-dessus.

- Après avoir ouvert la paroi abdominale, et repéré le début du duodénum, une légère incision de celui-ci est réalisée sur 2 millimètres.
- Puis, un cathéter ayant à une de ses extrémités une olive, est inséré dans le duodénum et fixé grâce à une suture réalisée avec du fil de suture 6-0 (Figure 77).

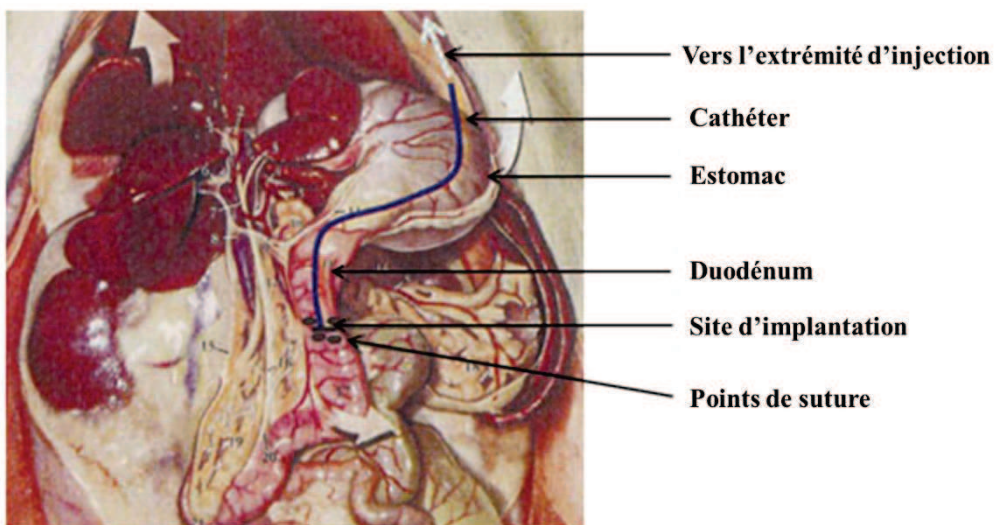


Figure 77 : *Schématisation de l'implantation du cathéter dans le duodénum*

- Le cathéter est ensuite glissé sous la peau par tunnélisation jusqu'à ressortir derrière la tête.
- Les différents plans de l'abdomen et les berges de la peau de la nuque sont refermés à l'aide de fil de suture 4-0.
- Un morceau de sparadrap et un bouchon en fil de pêche sont disposés comme précédemment écrit.

Quarante-huit heures après l'opération, les rats vigiles reçoivent par ce cathéter du sérum physiologique, de l'insuline encapsulée ou en solution (10 UI/200 grammes de masse corporelle). Le volume d'injection n'excède pas 200 μ L (nanoparticules purifiées/concentrées) et l'injection se fait de façon très lente afin d'une part, d'éviter une vidange gastrique chez l'animal et d'autre part, de permettre une meilleure absorption des nanoparticules.

La biofonctionnalité de l'insuline encapsulée est évaluée par mesure de la glycémie à jeun (AccuChek[®]) toutes les 30 min pendant 4 heures chez les rats traités en intrapéritonéale et toutes les heures pendant 12 heures pour ceux traités en intraduodénale.

6.4. Administration par gavage

Le but de cette manipulation est de vérifier la biofonctionnalité du vecteur pharmaceutique complexe sur des rats diabétiques. Une fois le diabète constaté, le véhicule complet (taille <200 μ m) est administré par gavage chez le rat à la dose souhaitée.



Figure 78 : Administration des vecteurs pharmaceutique complexe par gavage chez le rat insulinopénique.

Des nanoparticules libres ou encapsulées dans le vecteurs complexe ainsi que des vecteur contenant des nanoparticules vides sont administrées à la dose de 10 UI/200g de masse corporelle grâce à une aiguille de gavage. La biofonctionnalité de l'insuline encapsulée est évaluée par mesure de la glycémie à jeun (AccuChek[®]) toutes les heures pendant 24 heures.

IV. Résultats

1. Coacervation complexe

1.1. Introduction

La coacervation complexe définit la séparation en deux phases liquide se produisant dans un système colloïdal. Cette séparation est induite par des interactions électrostatiques entre polyélectrolytes de charges opposées, ce qui a pour résultat la formation de complexes dénommés coacervats complexes. La formation des dites coacervats est gouvernée par l'attraction électrostatique entre les groupements de charges opposées présentes sur les chaînes de polyélectrolytes. La stabilité des coacervats complexes sera d'autant plus importante que les masses des deux polyélectrolytes seront différentes. Le polyélectrolyte de plus haut poids moléculaire sert de matrice à celui de plus faible masse conférant ainsi ses propres propriétés aux complexes formés. En effet, ceux-ci arborent la charge du polyélectrolyte de plus haut poids moléculaire. La coacervation complexe se fait dans des conditions douces à température ambiante et sous une agitation lente. Contrairement à la majorité des techniques de formulation, elle ne requiert ni solvants organiques ni stabilisants. Elle représente de ce fait une approche intéressante pour l'encapsulation de principes actifs labiles comme l'insuline en vue de leur administration par voie orale. Ces systèmes colloïdaux polymériques ont montré une efficacité dans l'administration orale de protéines thérapeutiques et font l'objet d'une constante amélioration en vue d'une amélioration de la biodisponibilité des macromolécules bioactives administrées *per os*. Les nanoparticules formulées à partir de polymères naturels, tels que le chitosane, sont d'intérêt en tant que vecteurs de protéines. En effet, le chitosane présente de nombreux avantages qui en font un candidat idéal pour l'administration de médicaments dont la biocompatibilité, la biodégradabilité, une faible immunogénicité, et des propriétés mucoadhésives liées à sa densité élevée de charges positives. De par ses propriétés mucoadhésives, le chitosane permet la délivrance de médicament au niveau de tissus cibles de types muqueux comme la lumière intestinale. Il permet ainsi d'améliorer les rendements d'absorption des peptides après leur administration par voie orale, en raison de leur rétention prolongée dans le tractus gastro-intestinal et d'une excellente pénétration dans la couche de mucus médiée par les groupes amines libres. De par ce fait, les complexes sont absorbés par les cellules intestinales entérocytaires, ce qui représente la voie principale d'absorption. Toutefois, il est bien connu que les coacervats complexes sont instables dans des milieux contenant du sel comme le décrivent Tainaka et al., (1980). Ainsi, ces complexes doivent être stabilisés pour leur utilisation en tant que vecteurs de médicaments. La réticulation avec du tripolyphosphate de sodium (TPP) est une des approches choisies. Le sodium tripolyphosphate permet d'améliorer la stabilité des coacervats en se complexant avec le chitosane en liant des amines

libres sur sa chaîne (Emmanuel N. Koukaras et al., 2012). Ceci a pour conséquence une amélioration de la qualité d'interaction au sein du coacervat en réduisant la distance intermoléculaire (compaction plus importante). La lyophilisation est une autre solution intéressante. En effet, cette procédure largement décrite dans la littérature permet la conservation dans le temps de principes actifs ou la stabilisation de systèmes colloïdaux (Bohr A et al., 2015). Celle-ci consiste en l'extraction du solvant de dispersion des coacervats par sublimation dans l'objectif de leur conférer une rigidité structurelle.

Le développement de ces deux approches afin de stabiliser le coacervat complexe insuline/chitosane en vue de leur administration orale dans le traitement du diabète a fait l'objet d'une parution dans *International journal of pharmaceutics* en juin 2015.

1.2. Discussion générale et conclusion

Les résultats ont montré que la formulation de nanoparticules auto-assemblées chargées d'insuline est une approche simple, reproductible qui permet d'obtenir un haut rendement d'encapsulation. Cette méthode de formulation génère des nanoparticules dites natives d'une taille d'environ 400 nm, une polydispersité de 0,3, une charge de surface positive (+36 mV) et une efficacité d'encapsulation de près de 70%. Ces paramètres physicochimiques sont les mêmes que ceux obtenus par Abbad S. et al. (2015) qui formulaient des nanoparticules d'insuline à base de chitosanes modifiés (chitosane N-Arginine et chitosane N-histidine). Comme décrit précédemment, ce type de formulation présente l'inconvénient d'être peu stable dans les milieux biologiques rendant difficile la validation biologique de leur efficacité d'où l'introduction de deux approches distinctes ou combinées pour permettre leur validation. La réticulation permet d'obtenir des nanoparticules plus petites (346 nm) en comparaison aux non-réticulées, améliorant ainsi l'efficacité d'encapsulation sans modification de l'indice de polydispersité ni de la charge de surface. Dans une étude comparative de différents agents réticulant (comme le tripolyphosphate, le sulfate de dextran et l'acide poly-D-glutamique) pour stabiliser des nanoparticules de chitosane encapsulant des siRNA, Raja MA et al. (2015) ont montré que le tripolyphosphate permet d'obtenir de plus petites tailles et une meilleure efficacité d'encapsulation. La lyophilisation des nanoparticules natives induit une augmentation de leur taille (490 nm), une hétérogénéité de leur distribution et une augmentation de leur potentiel zêta (+44 mV). La lyophilisation n'a pas d'impact sur les nanoparticules réticulées mis à part une augmentation du potentiel de surface, sans modification des efficacités d'encapsulation. L'ajout d'un cryoprotecteur comme le mannitol permet de limiter l'augmentation de taille observée. Rodrigues S. et al. (2015) montrent que la lyophilisation en présence de glucose ou de sucrose permet de conserver les propriétés physicochimiques des nanoparticules obtenues par auto-assemblage (chitosane/tripolyphosphate/ carraghénane). Ces études corroborent également l'hypothèse formulée à partir des résultats physicochimiques d'une formulation plus efficace en combinant la réticulation et la lyophilisation. Les études de stabilité en milieux simulés gastrique et intestinal ont montré que les coacervats sont immédiatement détruits dans le milieu gastrique quel que soit la méthode de formulation, mettant en lumière le besoin de la seconde encapsulation gastrorésistante faisant l'objet du développement du vecteur pharmaceutique complexe. Ces mêmes études montrent que dans le milieu intestinal, les coacervats non lyophilisés (réticulés ou non) libèrent plus de 80% de leur contenu au bout de 7 heures, libération réduite à 20% lorsque ceux-ci sont lyophilisés. De

plus, la même cinétique de libération est observée dans le milieu salin (PBS). Le but poursuivi par la lyophilisation peut donc être considéré comme atteint car ce procédé réduit de manière importante la libération aspécifique de l'insuline encapsulée. La présence du mannitol pendant la lyophilisation permet de réprimer la déstabilisation des particules et réduit le phénomène de « *burst release* ». Les études de cytométrie en flux sur deux modèles cellulaires : caco-2 seules (cellules entérocytaires) et coculture (Caco-2 et RevHT29MTX (productrice de mucus)) évaluant l'aptitude des nanoparticules à traverser la barrière intestinale montrent que les nanoparticules indépendamment de la réticulation sont internalisées sur le modèle caco-2 et sur le modèle coculture (présence de mucus), mais que les nanoparticules réticulées sont les mieux internalisées. Des résultats similaires sont rapportés par Raja MA et al. (2015) et Abbad S. et al ; (2015). D'un point de vue physicochimique comme *in vitro*, les résultats mettent en évidence l'efficacité d'une combinaison de la réticulation et de la lyophilisation. Cependant, la présence de mannitol au cours du processus de lyophilisation semble inhiber l'internalisation des nanoparticules. Il a pourtant été montré par Malkov D. et al. 2005 que le mannitol peut traverser la monocouche de caco-2 en culture sans affecter la membrane plasmique ni l'intégrité des jonctions serrées. Cette inhibition n'est donc pas directe mais pourrait être attribuée à une interaction particulière du cryoprotecteur avec la nanoparticule qu'il reste à définir. La validation *in vivo* sur un modèle streptozotocine de rat diabétique par le biais de deux voies (intrapéritonéale et intraduodénale) montre que les coacervats complexes administrés par la voie intrapéritonéale sont en mesure d'induire une réduction de la glycémie équivalente à l'injection d'insuline non encapsulée à la même dose en 2 heures. De même, leur administration en intraduodénale induit une réduction de la glycémie plus importante quand les particules sont formulées par combinaison de la réticulation et de la lyophilisation. Les résultats montrent que les nanoparticules formulées par auto-assemblage entre l'insuline, le chitosane et le tripolyphosphate sont en mesure d'encapsuler efficacement l'insuline, de la protéger dans le milieu intestinal, et de la libérer dans les milieux biologiques et tout en conservant son activité biologique.

Cette étude a permis de montrer l'intérêt de la coacervation complexe pour formuler des nanoparticules d'insuline en vue de leur administration par la voie orale. La combinaison réticulation et lyophilisation est une approche prometteuse dans le développement de l'insuline orale car elle permet d'obtenir des nanoparticules stables dans les milieux biologiques en limitant les libérations indésirables et en offrant une meilleure efficacité biologique.

L'efficacité des nanovecteurs formulés par auto-assemblage peut être améliorée en utilisant des dérivés amphiphiliques du chitosane. En effet, Zhang ZH et al. (2013) et Abbad S. et al ;

(2015) ont montré que l'efficacité des nanoparticules d'insuline à base de chitosane N-arginine était améliorée *in vitro* et *in vivo*. Des résultats similaires ont été obtenus par Yu F. et al. (2014) lors de l'encapsulation de l'acide gambogique employé dans le traitement du cancer (inhibition de la croissance du glioblastome). Un autre dérivé, le chitosane N-histidine a montré son efficacité dans l'administration de principes actifs. En effet, Kai-Ling Chang et al. (2010) ont obtenu une amélioration de la transfection du plasmide grâce à sa complexation avec cette catégorie de chitosane. De même Park J.S. et al. (2006) ont amélioré la délivrance intracytosolique du paclitaxel grâce à son encapsulation par auto-assemblage avec le chitosane N-histamine.

La limite majeure de cette technologie est son manque de stabilité dans le milieu gastrique requérant son encapsulation dans un vecteur gastrorésistant en vue de son administration par voie orale. Malgré une simplicité de mise en œuvre dans le cadre d'une industrialisation, la stabilité limitée des coacervats qui rend difficile leur inclusion dans le véhicule gastro résistant tel qu'il est défini dans le concept du vecteur pharmaceutique complexe.

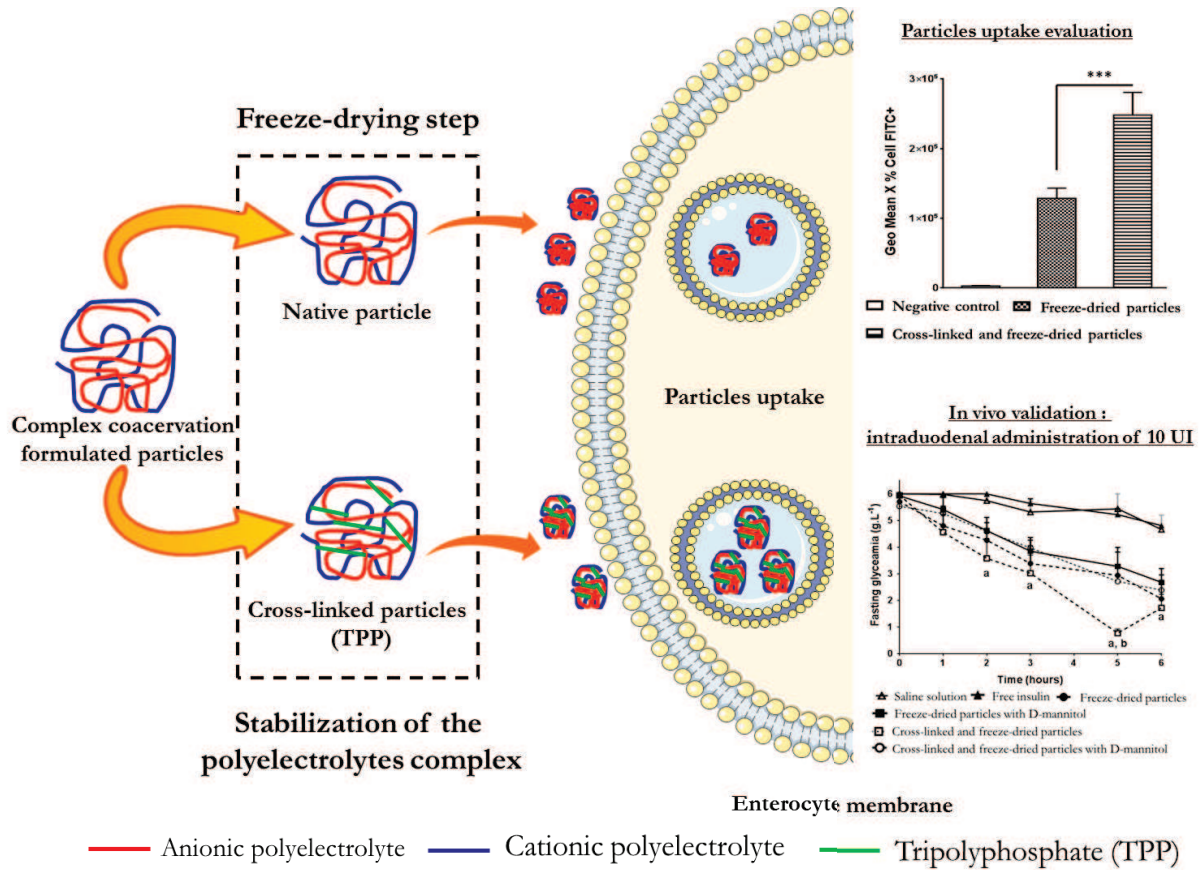


Figure 79 : Schéma récapitulatif des travaux sur les nanoparticules de chitosane
Design, characterisation, and bioefficiency of insulin-chitosan nanoparticles after stabilisation by freeze-drying or cross-linking, International Journal of pharmaceutics, 2015.

2. Double émulsion évaporation de solvant

2.1. Introduction

De nombreuses méthodes permettant l'encapsulation de composés bioactifs hydrosolubles dans des particules biodégradables ont été développées dont la double émulsion et évaporation de solvant. La double émulsion eau/huile/eau (e/h/e) est la méthode la plus répandue. Cette méthode de formulation permet d'obtenir des particules de taille contrôlée et un haut rendement d'encapsulation. L'acide poly (lactique-co-glycolique) (PLGA) appartient à la famille de polymères biodégradables approuvés par la FDA (Food and Drug Administration). Il est biocompatible et a été largement étudié en tant que vecteur de médicaments, de protéines et de diverses autres macromolécules telles que l'ADN, l'ARN. Il représente donc un candidat de choix pour la formulation de nanoparticules pour une administration orale d'insuline. La méthode d'encapsulation par double émulsion présente cependant une limite majeure pour les composés bioactifs labiles comme les protéines. En effet, les ultrasons utilisés pour formuler des émulsions de petite taille (<200 nm) risquent de dénaturer la protéine et de la rendre biologiquement inactive. De plus, l'interaction protéines-solvant obtenue lors du procédé de formulation peut induire des effets secondaires non prédictibles chez le patient (Meng F.T. et al., 2013). Pourtant, les particules en PLGA formulées par double émulsion (e/h/e) sont des vecteurs de médicaments courants et très efficaces. En général, elles sont conçues comme des capsules creuses encapsulant le principe actif, enveloppées d'une membrane en polymère et peuvent être entourées d'un stabilisant comme l'alcool polyvinylique (PVA). Ces vecteurs présentent en général un rayon hydrodynamique d'environ 100 nm, une charge de surface faiblement négative à neutre et sont biologiquement efficace (Reix et al., 2012). En effet, ils augmentent le passage des médicaments au travers des barrières biologiques tels que la barrière hémato-encéphalique (Costantino Luca et al., 2006) ou la muqueuse gastro-intestinale (Alf Lamprecht et al., 2001) mais n'offrent qu'une biodisponibilité faible pour l'insuline administrée par voie intraduodénale chez le rat. Les connaissances acquises sur les nanoparticules de chitosane ainsi que la littérature suggèrent qu'une approche mucoadhésive permettrait d'augmenter l'efficacité biologique de l'insuline. L'intérêt de la mucoadhésion est de créer une interaction entre les particules et la couche de mucus intestinal de manière à augmenter le temps de résidence des particules au contact des entérocytes et donc de favoriser l'absorption et l'augmentation de la biodisponibilité de l'insuline encapsulée. Afin de créer une interaction mucus/particules, les particules de PLGA décrites doivent donc être modifiées. La stratégie couramment utilisée consiste à revêtir les particules d'un manteau fait d'un polymère possédant des propriétés mucoadhésives comme le chitosane (Chronopoulou Laura et al., 2012 ; Guo M

et al., 2013). Le chitosane tire ses propriétés mucoadhésives de la densité de charges positives élevée sur son squelette. De ce fait, le recouvrement des nanoparticules s'effectue par un simple procédé physique d'interaction électrostatique entre les particules et les chaînes de chitosane. Le greffage de motifs polyéthylène glycol (PEG) à la surface des particules de PLGA est également une stratégie intéressante pour optimiser la bioadhésion (Semete B. et al., 2010). Il a été démontré que l'enrobage de particules avec PEG permet de protéger les particules grâce à une répulsion stérique (Makadia et al., 2012). Les motifs PEG peuvent ainsi protéger les particules et leur permettre une absorption rapide (Lin D. et al., 2013). Le développement et l'évaluation de cette approche mucoadhésive fait l'objet d'une soumission pour publication dans *International journal of pharmaceuticals* en novembre 2015.

Mucoadhesion as a strategy to improve Insulin loaded PLGA particles bioavailability

Diop M¹, Auberval N², Viciglio A¹, Mevorah S., Langlois A¹, Bietiger W¹, Mura C¹, Peronet C¹, Bekel A², Julien David D³, Zhao M³, Pinget M¹, Jeandidier N¹, Vauthier C⁴, Marchioni E³, Frere Y², Sigrist S¹.

¹Centre européen d'étude du Diabète (Ceed), Boulevard René Leriche 67200 Strasbourg

²Institut Charles Sadron (UPR 22 CNRS), 23 rue du Loess BP 84047 67034 STRASBOURG Cedex 2

³Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (UMR 7178 CNRS/CNRS), 74 route du Rhin 67400 Illkirch

⁴Institut Galien Paris-Sud UMR CNRS 8612, Université de Paris Sud Faculté de Pharmacie 92296 Chatenay-Malabry Cedex

Abstract

Encapsulation aims to protect insulin against gastrointestinal tract environment for its oral delivery. Poly (D, lactic-co-glycolic) acid (PLGA) particles (NP) are known to be effective drug carrier with a long acting profile, but have less than 20% of bioavailability. The aim of this work was to increase encapsulated insulin bioavailability modifying the surface properties of NPs to improve their interaction with the mucus layer. Particles were prepared in presence or not of polyvinyl alcohol (PVA), with PEGylated-PLGA or coated with chitosan chloride. *In vitro* internalization was tested on epithelial coculture (Caco-2/RevHT29MTX) by flow cytometry. NPs were then administrated *in vivo* intraperitoneally (2UI) and intraduodenally (10UI) in diabetic rats. Without PVA and PEGylated-PLGA NPs were smaller (154 ± 24 nm) than chitosan coated NP which size (236 ± 29 nm) is increased in comparison to the control (200 ± 9 nm). Compared to classical NPs (PLGA+PVA) cells uptake was improved by PEGylated-PLGA and without PVA, in contrast to chitosan coated NPs which adhered outside cells. Administration of NPs (2UI) by intraperitoneal route reduced glycaemia as fast as non-encapsulated insulin. Unlike of NPs, 10UI of no encapsulated insulin applied by the intraduodenal route had no effect. Mucoadhesive particles formulation is definitely not the good approach to improve the bioavailability of encapsulated insulin, negative NPs were the most efficient both *in vitro* and *in vivo*, and represent a promising formulation for oral insulin delivery.

1. Introduction

Oral route is the most promising method to deliver protein drugs as insulin; it involves no pain or trauma associated with injections. Oral administration of insulin results in a low pharmacological effect, due to the harsh conditions of the gastrointestinal tract, less than 0.1% of the orally dosed insulin reaches intact the blood stream (Aaron C. Foss and al., 2004). Encapsulation is a promising approach to protect insulin for its oral delivery. PLGA particles (NP) are common and efficient drug carriers, generally designed as a matrix-like core for drug encapsulation and protection with diameters ranging around 200 nm, surrounded by a stabilizer as Polyvinyl alcohol (PVA) e.g. which is a commonly used stabilizer and determines the NP surface charge (-5mV). PLGA NPs shown great efficiency as drug delivery vehicles, rising the drug amount crossing biological barriers such as the blood-brain barrier (Luca Costantino and al., 2006) or gastrointestinal mucosa (Alf Lamprecht and al., 2001), but Reix and al., 2012 demonstrated that insulin-loaded particles present a low bioavailability, less than 20%, when delivered intraduodenally on diabetic model rats. These ones suggested surface properties modification in order to improve bioavailability of encapsulated insulin. Depending on the stabilizer used in formulation, uptake and cytotoxicity profiles of particles can change (Nadège Grabowski and al., 2013). Fei Yu and al., 2015 showed that PLGA particles can be formulated without any stabilizer which provide them high negative surface charge and a biological efficiency. Several authors indicate that drug carrier's behaviour in biological environment is greatly influenced by their size and surface characteristics. The colloidal characteristics of the particle size and surface charge are considered the most significant determinants in the cellular uptake and trafficking of the particles. Formulating high negatively charged particles by double emulsion and solvent evaporating method described by Reix and al., 2012 has to be investigated to highlight their potential to improve bioavailability of encapsulated insulin. Mucoadhesion is another promising formulation approach to improve bioavailability of encapsulated insulin. The interest of mucoadhesion is to create interaction between particles and intestinal mucus layer in order to increase the time residence of particles in contact of enterocytes and therefore the uptake and bioavailability of encapsulated insulin. In order to create mucus-particles interaction, described PLGA particles should be modified; the commonly used strategy is to coat particles with a mucoadhesive polymer (Noha Nafee and al., 2007). Chitosan exhibits many advantages in the development of particles (Diop and al., 2015), including biocompatibility, biodegradability, and low-immunogenicity without any toxicity. Mucoadhesive properties of chitosan are related to the high positive charge density (Plapiéd

and al., 2010). Insulin-loaded PLGA particles coated with chitosan are generated by a physical approach, based on an electrostatic interaction as described by Yue-yu Zhou and al., 2010. The simplicity of these self-assembling polyelectrolyte complexes is an advantage and a drawback, such complexes are easy to generate and are always characterized by a broad size distribution compared to naked NPs. Grafting of polyethylene glycol (PEG) group patterns at the PLGA particle's surface is another interesting strategy to coat PLGA particles for bioadhesion (Jason Park and al., 2011). Chemical modification of polymer like chitosan with PEG increases the biocompatibility of chitosan (Zhang et al., 2002) and reduces the adsorption of circulating plasma proteins. PEG coated particles have been found to be a great potential in shielding particles due to steric repulsion resulting from a loss of configurational entropy of the bound PEG chains and their rapid motion in aqueous media. In addition, hydrophilic PEG can form a hydrated outer shell; thereby protecting the particles from being quickly up taken, extending the half-life of drugs and their tissue distribution (Suphiya Parveen and al., 2011) and generate highly negatively charged particles. Thus, we speculate that a PEG coating on PLGA particles, due to their unique properties could serve as an ideal carrier system for the delivery of insulin by enhancing permeability of the PLGA particles in mucus. We aimed to coat insulin loaded PLGA particles with hydrophilic polymers such as chitosan and PEG to improve their bioadhesion properties and therefore their cell uptake compared to described and negatively charged particles.

2. Materials and methods

2.1. Materials

PLGA (Poly (D,lactic-co-glycolic) acid) 50:50 Resomer® (RG 502H, M_w 14,000) was purchased from Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Germany). PEGylated-PLGA (Peg-Block 9000 Da) was purchased from Specific polymers (Castries, France). Rapid insulin (Umluline® 100 IU/mL) was generously supplied by Eli Lilly (Indianapolis, USA). Polyvinyl alcohol (PVA 18-88, M_w 130.000) was purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Pluronic® F68 was obtained from BASF Corporation (Mount Olive, USA). CL113 (Chitosan chloride M_w 70.000 to 150.000; DD 75 to 90%) was purchased from Nova Matrix (Sandvika, Norway). Human crystallin insulin, FITC labelled insulin, isopropanol, FBS (foetal bovine serum), trypsin, streptozotocin, 24 wells plates CELLSTAR® (organic Greiner) and ethyl acetate were provided by Sigma Aldrich (Saint-Louis, MO, USA). Chemicals used for HPLC were of LC grade. Acetonitrile was from VWR (Fontenay-sous-Bois, France), anhydrous sodium sulfate from SDS (Peypin, France). The cellular lineage of human adenocarcinoma (Caco-2) was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, USA) and the lineage RevHT29MTX was supplied by Dr Thécla Lesuffleur (INSERM U505, Villejuif, France). DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium), Antibiotic and Antimitotic, no essential amino acids glutamine, PBS (Phosphate Buffer Sodium), HBSS (Hank Buffered Salt Solution) was purchased from Invitrogen (France).

2.2. Particles preparation

NPs were prepared by double emulsion and solvent evaporation method as described by Vauthier and Bouchemal, 2009 and Reix and al., 2012. PLGA and Pluronic® F68 at the weight of 200mg and 100 mg respectively were dissolved separately in 500 μ L of ethyl acetate and mixed after dissolution. A volume of 400 μ L of insulin/FITC-labeled insulin (3.5 mg/mL) or deionized water was added in the organic phase and then emulsified under a 66 Watt sonication over 15 seconds in an ice-cold bath. A volume of 2 mL of a PVA aqueous phase (2.5%) was added to the resulting water-in-oil (w/o) emulsion, the mixture was sonicated additional 10 seconds. The double emulsion (w/o/w) obtained was then transferred into 10 mL of PVA aqueous solution (0.15%) and gently stirred overnight. Particles were coated with chloride chitosan by electrostatic interaction. A volume of synthesis (300 μ L) was mixed with a volume of chitosan (1.5mL) at 7mg/mL (w/v) under a gentle stirring. For PEGylated-PLGA

formulation, change based on substitution of PLGA by the PEGylated one in the described synthesis protocol.

2.3. Particles characterization

Size distribution of particles was determined by dynamic light scattering using Horiba NanoZS (Horiba, Japan) at 25 °C. NP characterization covered the measurement of three parameters: particles mean size (diameter is calculated from the cumulative function of particles light scattering intensity); surface charge (Zêta potential) and determination of polydispersity index (Pdi). The morphology was examined by transmission electron microscopy (TEM; Hitachi High Technologies Corporation, Tokyo, Japan). The entrapment efficiencies were determined after filtration of NP dispersions (4,000 × g, 4 °C for 0.5 h) and measurement of the drug amount using HPLC. The system consisted of two Prostar 210 solvent delivery systems, a Prostar 410 autosampler and a Prostar 330 Photodiode Array (PDA) UV/vis detector (Varian, Les Ulis, France) and a Water's Symmetry C18 5 µm, column (Milford, USA). Eluent A was composed of 0.2 M Na₂SO₄ in water at pH 2.3 and eluent B was a mix of eluent A/Acetonitrile (55:45, v/v). The mobile phase consisted of a mixture of eluent A/eluent B (42:58, v/v) at a flow rate of 1 mL/min. The column temperature was kept at 40°C and the detection wavelength was 214 nm. The entrapment efficacy (EE) was calculated using the following equations:

$$EE_1 (\%) = ((\text{theoretical total amount of insulin-free insulin}) / \text{theoretical total amount of insulin}) * 100$$

$$EE_2 (\%) = ((\text{encapsulated amount of insulin}) / \text{theoretical total amount of insulin}) * 100$$

2.4. Particles stability test

Particles were divided in aliquot and kept at 4°C, particles size and zêta potential were measured as previously described once a week during three weeks. The gastric and intestinal media were respectively prepared: 35 mM NaCl, 80 mM HCl at pH 1.2 and 50 mM KH₂PO₄, 15 mM NaOH adjusted at pH 6.8. Particles were incubated with media (v/v) at room temperature or 37°C and at predetermined time points, samples were centrifuged and the amount of free insulin were measured by HPLC. Results were expressed in percentage of insulin release.

2.5. Biological validation of particles

2.5.1. *In vitro* validation

2.5.1.1. Models and cell culture

Two models of culture were used: caco-2 and Coculture (75% caco-2 + 25% RevHT29MTX) as described in G. Nollevaux and al., 2006. Cell culture was performed as described by Reix and al., 2012. Briefly, cells were seeded at the density of 73.000 cells/cm² in DMEM containing 4.5 g/L glucose and l-glutamine. The medium was supplemented with 20% FBS, 1% antibiotic–antimycotic solution and 1% of non-essential amino acids solution 10 mM. Cells were grown over 21 days (to acquire enterocyte phenotype) at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ before testing and were used from passage 30 to 60.

2.5.1.2. Study of particles uptake by flow cytometry

To study the uptake of particles in cells, flow cytometry was realized as described by Reix and al., cells were cultured in 24-well plates. Cells were incubated with FITC-insulin loaded NPs (20 mg of PLGA/well) in DMEM without FBS for 4 hours. Cells were washed thrice (10 min) with calcium- and magnesium-free HBSS solution, detached by trypsinization, centrifuged and suspended in HBSS. Samples were analyzed by a flow cytometer BD (Becton Dickinson and Company) LSR II (New Jersey, USA) in triplicate, 50000 events were recorded per well first to have whole associated fluorescence. Trypan blue was used to quench the external fluorescence in the second hand before recording.

2.5.1.3. Transepithelial Electric Resistance (TEER) measurement

On 0.336 cm² insert disposal 200.000 cells were seeded and cultured as previously describe during 21 days. NPs were incubated with cells and TEER was measured each hour during 4 hours. EGTA was used as positive control of gap junction opening reflecting possible cell toxicity.

$$\text{TEER (Ohm.cm}^2\text{)} = (\Omega_{\text{cells}} - \Omega_{\text{empty insert}}) * 0.336$$

Results were expressed in percentage of decrease:

$$\text{TEER (\%)} = \text{TEER}@T_x / \text{TEER}@T_0$$

2.5.2. *In vivo* validation

All animal experiments were performed in accordance with European Institutes of Health Guidelines regarding the care and use of animals for experimental procedures, approval AL/60/67/02/13). Male Wistar rats (120-140 g) were placed in standard collective cages, they were kept under 12 h light/12 h dark cycles and were fed with a standard laboratory rodent diet in pellets form (Safe, France). Food and water were available *ad libitum*. Diabetes induced by an intraperitoneal injection of streptozotocin at the single dose of 75 mg/kg, it allowed leading a state of hyperglycemia in 3 days. Diabetic rats undergo a surgery to implant catheters in intraperitoneal (IP) and intraduodenal (ID) routes. The proximal end of the catheter was tunneled subcutaneously to exit at the back of the neck, and sutured. Two days after surgery; animals received treatments at the dose of 10UI of insulin in ID route and 2UI in IP route. The biofunctionality of particles was assessed by following the evolution of the fasting glycaemia (every 30 min during 4 hours in IP and each hour during 12 hours in ID).

2.6. Statistical analysis

Data were analyzed with Statistica version 10 (StatSoft, USA) and GraphPad prism 4 (USA). Results are expressed as means \pm SEM. All data were analyzed by one-way ANOVA with a Tuckey HSD post hoc test. For *in vivo* validation repeated measurement test was applied. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results

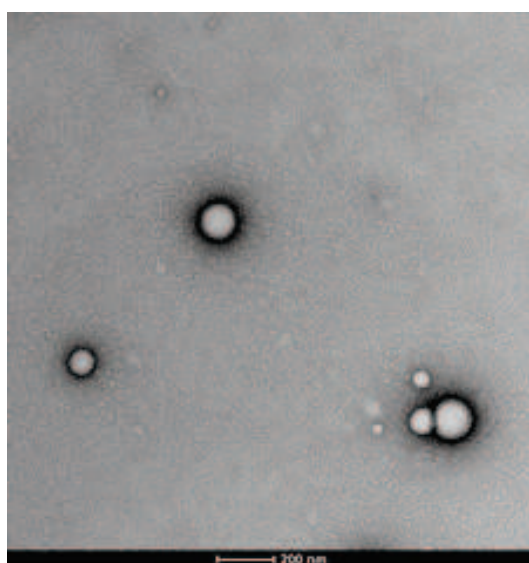
3.1. Particles characterization

Particles formulated with PVA (+ PVA particles) present a size of 203 ± 9 nm and a neutral zêta potential -1 ± 1 mV. Without PVA (- PVA particles) particles and those made with modified PLGA (PEGylated-PLGA particles) present sizes of 154 ± 24 nm and 150 ± 4 nm respectively and a zêta potential of -26 ± 2 mV for both formulations. Size was increased to 236 ± 29 nm for chitosan coated particles with a reversed zêta potential to $+53 \pm 3$ mV. Non coated particles present polydispersity index lower 0.2, and 0.3 for coated particles. TEM image revealed smooth and spherical NPs (Picture 1).

	+ PVA particles	- PVA particles	Pegyled PLGA particles	Chitosan coated particles
Size (nm)	203 ± 9	154 ± 24^a	150 ± 4^a	$236 \pm 29^{a, b}$
PDI	$0,14 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,02$	$0,20 \pm 0,01^a$	$0,29 \pm 0,04^{a, b}$
Zêta Potential	-1 ± 1	-26 ± 2^a	-26 ± 1^a	$53 \pm 3^{a, b}$

Table 1: Physicochemical characteristics of modified insulin-loaded PLGA particles

Dynamic light scattering measurement, data are presented in mean \pm SD. ANOVA one-way Tukey was applied to compare all groups ^a $p < 0.05$ vs + PVA particles; ^b $p < 0.05$ vs - PVA particles.



Picture 1: Transmission Electronic Microscopy picture of PLGA nanoparticles (natives)

HPLC quantifications indicated high encapsulation efficiency (100%) for each formulation (Fig.1 A and B)

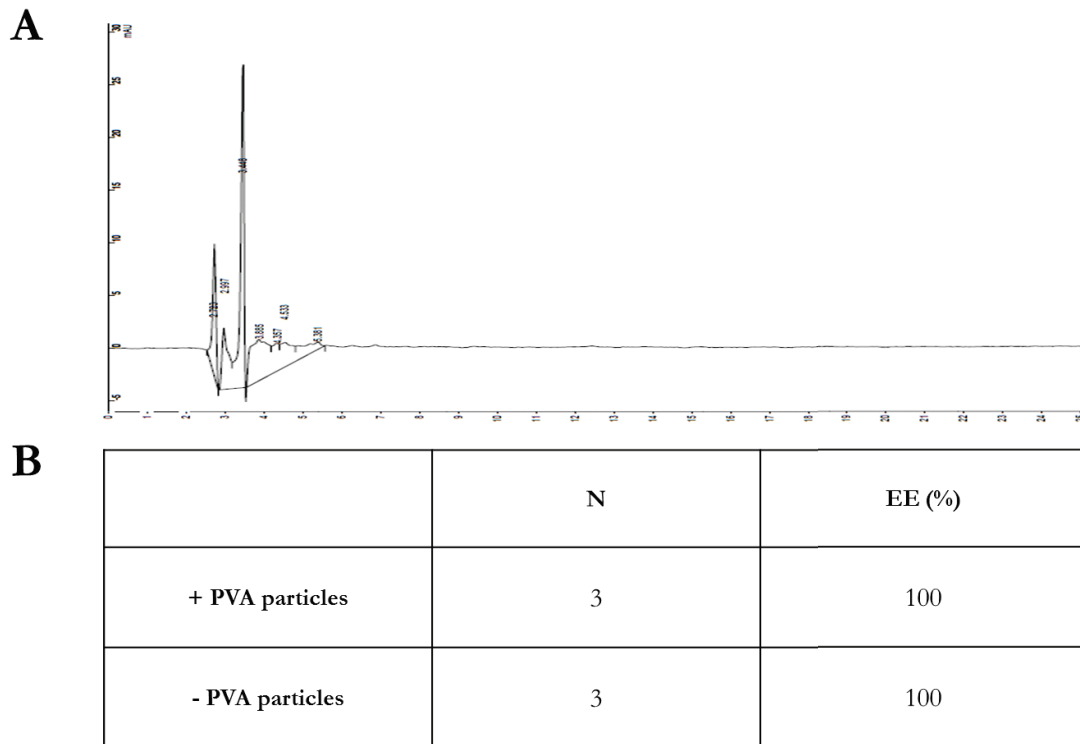


Fig.1: Encapsulation efficiency of insulin loaded PLGA particles

No encapsulated insulin was quantified by HPLC using the european pharmacopea monography. Data are presented in mean \pm SD, ANOVA Oneway Tukey was applied to compare all groups ^a $p < 0,05$ vs + PVA particles.

3.2. Particles stability test

Fig. 2 showed than all formulation of insulin loaded particles are stable in their synthesis media (A) and in PBS (B) at 4°C during 21 days. At room temperature (Fig. 3).

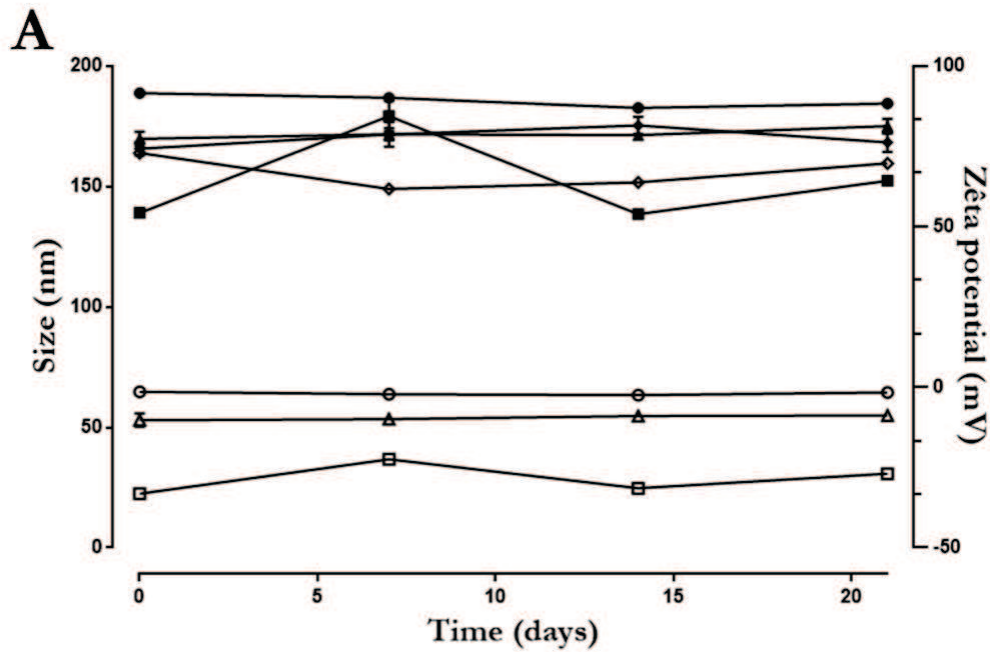


Fig.2: Stability of insulin loaded PLGA particles

Stability of insulin loaded PLGA particles were evaluated by following the physicochemical parameters : size (dark pattern) and ZP (clear pattern) during time. Stability were evaluated in synthesis environment (A) and in PBS (B) at 4°C. The pattern (●) for + PVA particles, (■) for - PVA particles, (▲) for PEGylated PLGA particles and (◆) for Chitosan coated PLGA particles. Data are presented in mean ± SEM, ANOVA Oneway Tukey was applied to compare all groups.

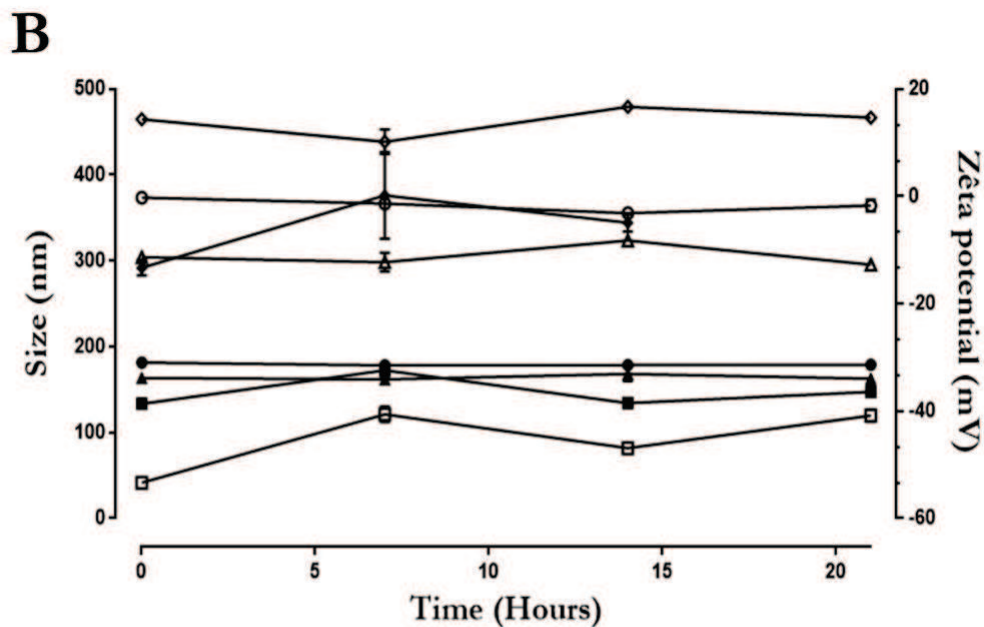


Fig.2: Stability of insulin loaded PLGA particles

Stability of insulin loaded PLGA particles were evaluated by following the physicochemical parameters : size (dark pattern) and ZP (clear pattern) during time. Stability were evaluated in synthesis environment (A) and in PBS (B) at 4°C. The pattern (●) for + PVA particles, (■) for - PVA particles, (▲) for PEGylated PLGA particles and (◆) for Chitosan coated PLGA particles. Data are presented in mean ± SEM, ANOVA Oneway Tukey was applied to compare all groups.

NPs did not release encapsulated insulin (less than 6%) neither in gastric or intestinal simulated media after 5 hours of incubation. Additionally, nanoparticles released 100% of encapsulated insulin in gastric medium at 37°C and 20% in gastric medium after 5 hours.

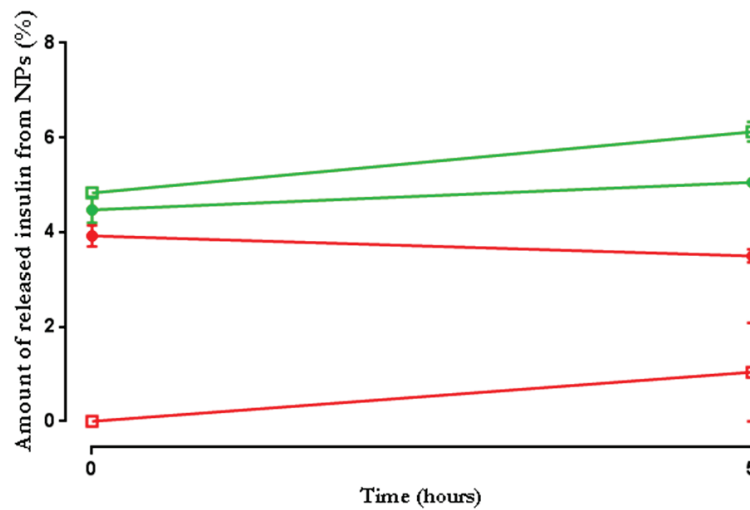


Fig.3: Stability of insulin loaded PLGA particles in simulated media

Released insulin was quantified by HPLC using the european pharmacopea monography. The pattern (●) for + PVA particles, (■) for - PVA particles. Red is for gastric environment and green for intestinal one. Data are presented in mean \pm SD (n=2).

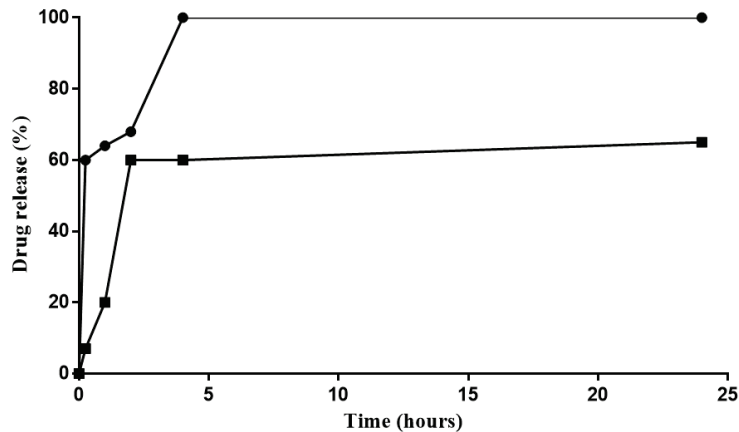


Fig. 5: Stability of insulin loaded PLGA particles in simulated media

Released insulin was quantified by HPLC using the european pharmacopea monography. The pattern (●) for + PVA particles (n=1), (■) for - PVA particles. Data are presented in mean \pm SD.

3.3. Particles uptake

Fig.5 showed that highest associated fluorescence was quantified on cells incubated with chitosan coated particles. After outside fluorescence quenched a huge decrease of associated fluorescence was observed for chitosan coated particles. Cells associated of without PVA particles were higher compared to with PVA and PEGylated-PLGA particles. The same

observation was made on coculture model (Fig.6). Without PVA particles were the most associated particles in both models in quenched environment.

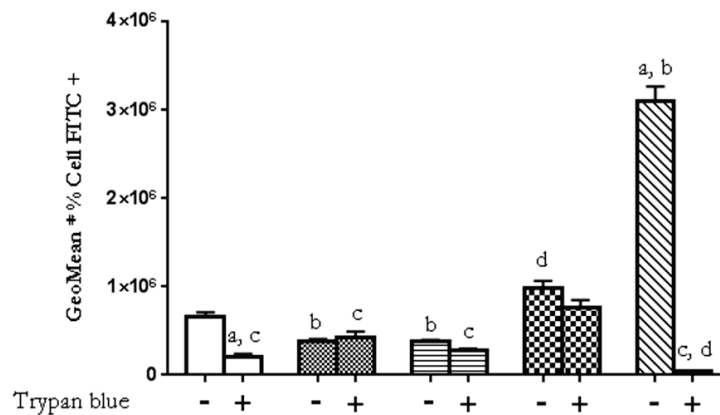


Fig.5: Uptake of insulin loaded PLGA particles on Caco-2 model

Associated fluorescence measurement were performed by flow cytometry, 50000 events were recorded per well and data were expressed by Geo mean multiplied by the percentage of fluorescent cells per each well N=3 (nine time measurement per N). The pattern (□) represent free FITC labeled insulin, (▨) for + PVA particles, (▩) for - PVA particles, (▧) for PEGylated PLGA particles and (▦) for chitosan coated PLGA particles. Data are presented in mean ± SEM, ANOVA Oneway Tukey was applied to compare all groups ^ap<0,001 vs free FITC labeled insulin, ^bp<0,001 vs - PVA particles, ^cp<0,001 vs quenched - PVA particles and ^dp<0,001 vs chitosan coated PLGA particles.

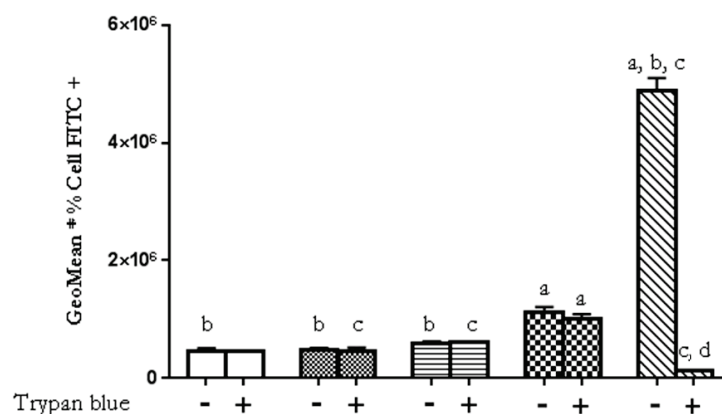


Fig.6: Uptake of insulin loaded PLGA particles on Caco-2/RevHT29 MTX coculture model

Associated fluorescence measurement were performed by flow cytometry, 50000 events were recorded per well and data were expressed by Geo mean multiplied by the percentage of fluorescent cells per each well N=3 (nine time measurement per N). The pattern (□) represent free FITC labeled insulin, (▨) for + PVA particles, (▩) for - PVA particles, (▧) for PEGylated PLGA particles and (▦) for chitosan coated PLGA particles. Data are presented in mean ± SEM, ANOVA Oneway Tukey was applied to compare all groups ^ap<0,001 vs free FITC labeled insulin, ^bp<0,001 vs - PVA particles, ^cp<0,001 vs quenched - PVA particles and ^dp<0,001 vs chitosan coated PLGA particles.

3.4. Transepithelial electric resistance

Fig.7 showed any significant TEER change when incubated with the different type of NPs formulation compared to cells without treatment. In contrast, there was a high difference

between cells incubated with particles and cells incubated with EGTA used as positive control of gap junction opening (toxicity).

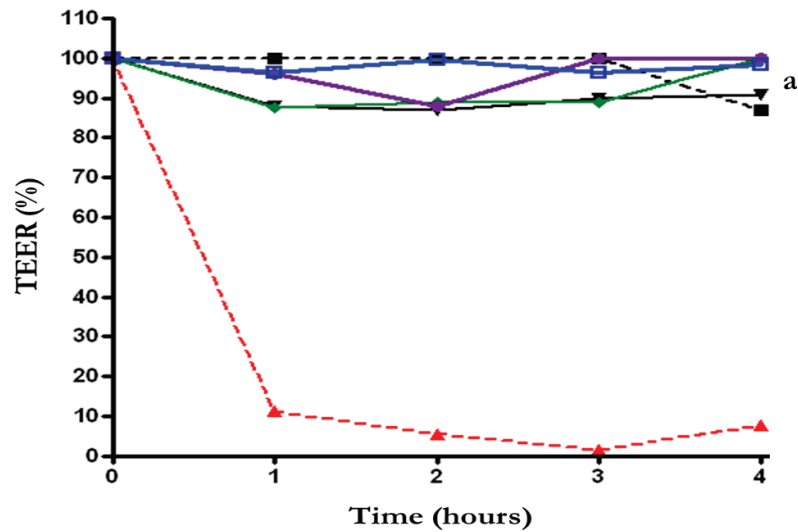


Fig.7: Trans epithelial electric resistance (TEER) of Caco-2/RevHT29 MTX coculture model in presence of particles

Trans epithelial electric resistance (TEER) were measured with an ohmmeter, 3 batches of NPs type were evaluated and results were expressed in percentage. The pattern (-■-) represent cells without treatment, (-▲-) for + PVA particles, (-▼-) for - PVA particles, (-●-) for PEGylated PLGA particles, (-▲-) for EGTA as positive control of gap junction opening and (-□-) for empty particles. Data are presented in mean \pm SEM, ANOVA Oneway Tukey was applied to compare all groups ^ap<0,001 vs EGTA .

3.5. *In vivo* validation

In intraperitoneal (Fig.8A) route empty particles did not have any effect on fasting glycaemia, otherwise, free insulin and encapsulated insulin induced a decrease of fasting glycaemia in 3 hours. Area under the curves representation (Fig.8B) showed a significant decrease of rat's glycaemia receiving free insulin and particles compared to empty particles. There is a statically difference between free insulin and PEGylated PLGA particles. By intraduodenal route (Fig.9A), a global decrease of fasting glycaemia was observed. At 4 hours a statistic difference was observed for without PVA particles compared to free insulin. Area under the curve representation (Fig.9B) any difference were observed compared insulin loaded particles with the empty one, free insulin or particles together. But there were a statistical trend between free insulin and without PVA particles.

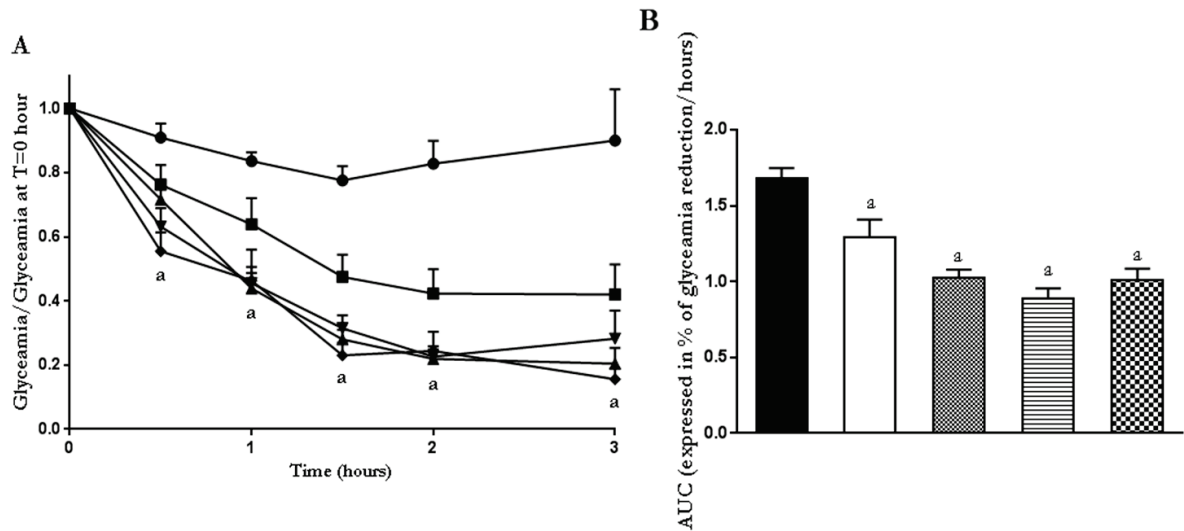


Fig.8: Intrapertitoneal administration of insulin loaded PLGA particles

A single dose of 2UI of free insulin or particles was administrated and rats glyceamia was measured at defined points. [A] is a representation of glyceamia evolution and [B] is a representation of AUC. Patterns (● ; ■) represents empty particles administration (n=11), (■ ; □) free insulin administration (n=11), (▲ ; ▨) for + PVA particles (n=13), (◆ ; ▩) for - PVA particles (n=9), (◆ ; ▨) for PEGylated PLGA particles (n=8). Results were expressed in mean ± SEM ANOVA Oneway (repeated measurement [A]) Tukey was applied to compare all groups ^ap<0,001 vs empty particles

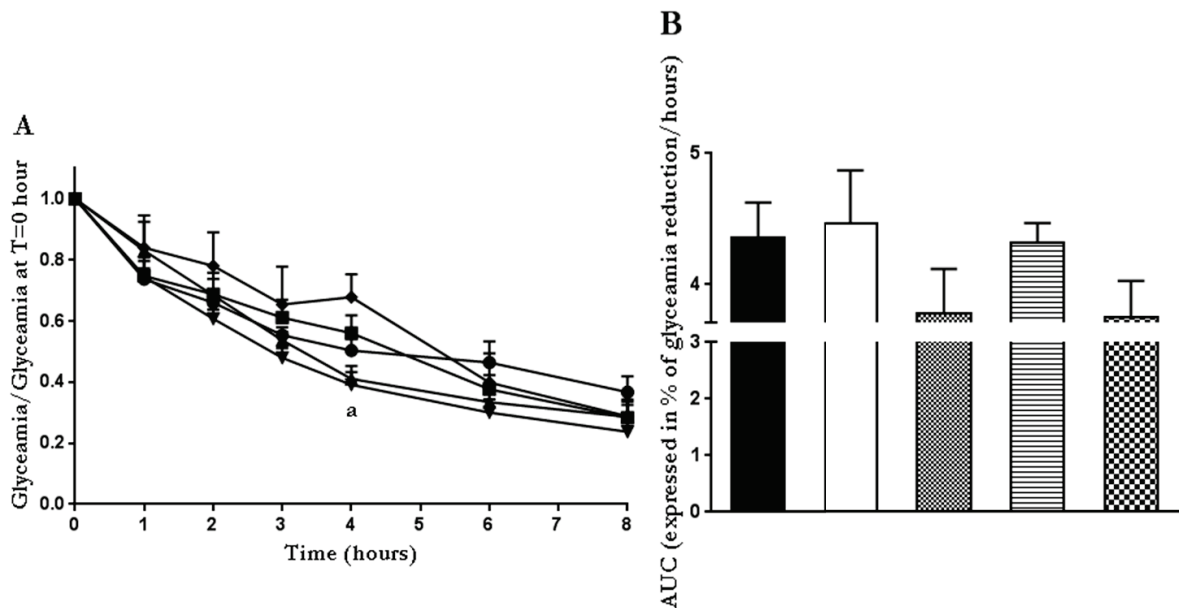


Fig.9: Intraduodenal administration of insulin loaded PLGA particles

A single dose of 10 UI of free insulin or particles was administrated and rats glyceamia was measured at defined points. [A] is a representation of glyceamia evolution and [B] is a representation of AUC. Patterns (● ; ■) represents empty particles administration (n=11), (■ ; □) free insulin administration (n=11), (▲ ; ▨) for + PVA particles (n=13), (◆ ; ▩) for - PVA particles (n=9), (◆ ; ▨) for PEGylated PLGA particles (n=8). Results were expressed in mean ± SEM ANOVA Oneway (repeated measurement [A]) Tukey was applied to compare all groups ^ap<0,05 vs empty particles

4. Discussion

PLGA particles (NP) are common and efficient drug carriers. They show great efficiency as drug delivery vehicles, rising the drug amount crossing biological barriers such as the blood-brain barrier or gastrointestinal mucosa, but insulin-loaded PLGA particles present a low bioavailability when delivered intraduodenally on diabetic model rats according to Reix et al. (2012). Nadège Grabowski and al. (2013) indicated that the colloidal characteristics of the particle size and surface charge are considered the most significant determinants in the cellular uptake and trafficking of the particles. Formulating high negatively charged particles (formulated without surfactant according to Fei Yu and al., 2015) and mucoadhesive (particles coated with mucoadhesives polymer chains as chitosan Noha Nafee and al., 2007 or polyethylene glycol (PEG) Park Jason and al., 2011) are promising formulation approaches to improve bioavailability of encapsulated insulin. In this study we aimed to formulate the cited nanoparticles, characterized them and further validate their bioefficiency *in vitro* and *in vivo*. Nanoparticles formulated by double emulsion in presence of PVA presented a size of 200 nm and a neutral zeta potential (-1 mV). By removing PVA, results showed that particles are smaller (150 nm) and negatively charged (-26 mV), in contrast to those made with PVA according to results obtained by Fei Yu and al. (2015). This negative charge allowed a greater recovery rate and thus a greater density of positive charge on the particle surface explaining the reverse of the zeta potential sign from -26mV to +53 mV. Mengshu Wang and al. (2013) observed a significant reversion of chitosan coated Exendin-4 loaded PLGA particles and considered it as the adhesion of polymer on particles surface. In fact, it was reported that chitosan can adhere to the surface of negatively charged PLGA nanoparticles by electrostatic attraction to form the first monomolecular adsorption layer. The hydrogen bond or van der Waal's force would be the dominant driving force for the further adsorption of chitosan. During the formation of the first few molecular adsorption layers, the chitosan density on the surface of PLGA nanoparticles increases with increasing concentrations of chitosan. But it seems to have a concentration limit of chitosan (chitosan solution) at 7 mg/mL (w/v) in our case, any difference in higher concentration were observed. Results obtained from high performance liquid chromatography (HPLC) showed that the encapsulation efficiency of PLGA nanoparticles is maximum (100%) independently of the presence of PVA. Double emulsion and evaporation allow a high encapsulation efficiency, it was reported a rate encapsulation of 100% for DNA sequences Kai Zhao and al. (2014) or over 90% for polypeptides Fei Yu and al. (2015). Stability studies showed that in a saline medium (PBS) as

in their synthesis environment, nanoparticles preserved their physicochemical properties during 21 days at 4°C. These studies showed also that nanoparticles did not release their content in gastric or intestinal simulated medium at room temperature but at 37°C 60% of encapsulated insulin is released after five hours in gastric medium against 20% in intestinal environment (Reix and al., 2012). *In vitro* validation performed on caco-2 and coculture intestinal epithelial tissue models (Diop and al., 2015) showed that, chitosan coated nanoparticles were more associated with cells than other formulation types and this on both culture models. However, since the cells external fluorescence were quenched carried out by trypan blue, there were a significant drop in their fluorescence highlighting that increasing the mucoadhesion is not associated with an increase of nanoparticles uptake. Marie Gaumet and al., 2009 evaluated the influence of surface hydrophilicity of biodegradable polymeric nanoparticles on cellular uptake using Caco-2 cells model and chitosan coated PLGA particles. They revealed a high association of coated particles with cells and confocal microscopy showed that only small particles were observed intracellularly and larger particles were associated with the apical membranes. This study supported our data, indicating that negatively charged particles were effectively internalized by cells, with higher uptake for particles without any pattern (without PVA). *In vivo* validation on streptozotocin diabetic model rats showed the ability of insulin loaded in nanoparticles to induce a decrease in blood glucose as unencapsulated one when administrated in intraperitoneal way, showing the preservation of insulin biological activity after encapsulation. In intraduodenal route, the biological efficiency of nanoparticles is difficult to highlight due to the fasting effect on the model, but it seems that without PVA nanoparticles are the most effective. The blood glucose level decreasing observed on control group is amazing, it is more logical to expect a holding of blood glucose level in high values over time. It is rare to see data in the literature indicating a decrease of blood glucose level in streptozotocin diabetic rat model. We had to search until 1994 to find a report on the subject. In fact, Takeuchi and al., (1994) observed this phenomenon without being able to give an explanation, but identified the involvement of gastric mucosal lesions following injection of streptozotocin. Goldin Eran and al. (1997) got the same results and highlight the involvement of glutathione (GSH) in the mucosal injuries on fasting streptozotocin rat model, but all involved mechanisms remain undetermined and represent a major technical lock to validate delivery systems on rat model. Mucoadhesion is the widely used approach to enhance the effectiveness of polymeric drug carriers, we demonstrated here that is definitively not the good way to manage the problem of the weakness of bioavailability offered by encapsulated system for oral delivery of insulin. There are new formulation approaches proposed to coat PLGA particles using modified chitosan

(chitosan N-Arginine and N-Histamine) to improve bioavailability of encapsulated drug. The PEG pattern on PLGA particles remain to be interesting to formulate muco-penetrating particles. The formulation of PLGA particles without surfactants is the simplest way to obtain efficient vector with a high potential for insulin delivery by oral route. In fact, it can lift all technological and regulatory locks in the high scale development of insulin orally administrable.

5. Conclusion

Results showed that formulating negatively charged particles is the simplest approach to formulate insulin loaded particles. These particles are smaller and more homogenous than our previous formulations. We show that the mucoadhesion strategy is definitely not the right way to improve the bioavailability of encapsulated insulin. Negatively charged particles are more efficient both in vitro and in vivo than the mucoadhesives one. This formulation is a promising approach for per os insulin delivery. The next step is scaling up formulation and the whole vehicle manufacturing process for preclinical trials.

2.2. Discussion générale et conclusion

Nous avons pu démontrer au cours de ce travail qu'en absence de tensioactif, les particules formulées par double émulsion sont plus petites (150 nm), sont chargées négativement (-26 mV) par rapport aux nanoparticules formulées en présence de 2,5% de PVA (200nm, -5mV). Fei Yu et al. (2015) ont formulé des nanoparticules de PLGA/insuline (polymère dissout dans le dichlorométhane) sans tensioactif présentant les mêmes caractéristiques. Cette charge de surface négative permet d'améliorer le recouvrement des nanoparticules par le chitosane comme l'atteste l'apparition de la charge positive (+53 mV) obtenu sur les nanoparticules recouvertes. L'augmentation de la charge de surface témoigne de l'adsorption du chitosane à la surface des nanoparticules de PLGA. Laura Chronopoulou et al. (2012) et Mengshu Wang and al. (2013) ont décrit des résultats semblables démontrant que le chitosane peut adhérer à la surface des nanoparticules de PLGA présentant une forte charge négative. Cette adhésion s'effectue dans un premier temps par une attraction électrostatique entre le chitosane et la membrane de la nanoparticule pour former la première couche. Dans un second temps, la liaison hydrogène ou les forces de Van der Waal seraient la force motrice dominante pour la poursuite de l'adsorption du chitosane expliquant l'augmentation de la charge de surface. Les données en chromatographie liquide haute performance montrent que l'efficacité d'encapsulation de l'insuline est maximale (100%) avec ce procédé de formulation que les particules soient formulées en présence de PVA ou non. Fei Yu et al. (2015) en employant la même méthode décrivaient un taux d'encapsulation supérieur à 92%. Kai Zhao et al. (2014) rapportaient, quant à eux, une efficacité d'encapsulation de 100% lors de la formulation de nanoparticules en PLGA renfermant des séquences d'ADN. Les études de stabilité montrent que dans un milieu salin (PBS) comme dans leur milieu de synthèse, les nanoparticules préservent leurs propriétés physicochimiques pendant 21 jours à 4°C. Cependant, les nanoparticules présentent une stabilité dépendante des milieux auxquelles elles sont exposées. En effet, à 37°C, près de 60% de l'insuline encapsulée est libérée au bout de 5 heures en milieu gastrique contre 20 % en milieu intestinal alors qu'à température ambiante, on ne note aucune libération. La validation *in vitro* a été réalisée sur deux modèles cellulaires : caco-2 seules (cellules entérocytaires) et coculture (Caco-2 et RevHT29MTX (productrice de mucus). Nous avons pu démontré que les nanoparticules recouvertes de chitosane sont mieux associées aux cellules que les autres types de formulation et ceci sur les deux types cellulaires. Guo M. et al., (2013) a précédemment montré une augmentation de l'internalisation des nanoparticules de PLGA recouvertes de chitosane et encapsulant du SN-7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (le métabolite actif de

l'inhibiteur de la topoisomérase 1) un anti-cancéreux : l'Irinotecan (Camptosar®, Pfizer). La cytométrie en flux est une méthode efficace et courante pour évaluer l'endocytose de systèmes nanoparticulaires par des cellules. Cependant, cette méthode n'est pas en mesure de dissocier les nanoparticules présentes en intracellulaire et celles associées à la surface cellulaire. Cette différenciation permettrait de se rendre compte réellement des propriétés d'interaction entre les cellules et les particules. Jari Nuutila and al. (2014) s'étonnaient du peu d'attention consacré à la distinction entre ces deux aspects. Ils suggéraient l'utilisation de « quencher » comme le bleu de trypan ou le cristal violet pour masquer toute fluorescence extérieure à la cellule compte tenu du fait que ces « quenchers » sont expulsés de cellule vivante. Dès lors que l'extinction de la fluorescence associée aux cellules est réalisée par ajout de bleu de trypan, nous avons pu mettre en évidence une chute importante de leur fluorescence mettant en lumière que l'augmentation de la mucoadhesion n'est pas associée à une augmentation de l'internalisation des nanoparticules par les cellules. A l'opposé, les nanoparticules négativement chargées (sans tensioactif et recouvert de PEG) sont très efficacement internalisées par les cellules (Chih-Hang Chu et al., 2011).

La validation *in vivo* sur un modèle de rat diabétique a permis de montrer que les nanoparticules sont en mesure d'induire une baisse de la glycémie de manière comparable à l'insuline non encapsulée en administration intrapéritonéale démontrant une conservation de l'activité biologique de l'insuline encapsulée. En revanche, par voie intraduodénale, l'efficacité biologique des nanoparticules sans PVA est supérieure aux autres nanoparticules formulées. Cependant, le modèle d'injection intraduodénal pose des limites techniques. La difficulté réside dans le fait que la glycémie des rats contrôle chute aussi au cours du temps. Cette chute, due à l'effet du jeun est accentuée par l'intervention chirurgicale subit lors de la mise en place du cathéter, ce qui ne permet pas d'établir clairement un effet des systèmes nanoparticulaires. La baisse de la glycémie chez le modèle de rat diabétique induit par streptozotocine lors d'un jeun est très rarement observée dans la littérature. Il est cependant admis que la streptozotocine outre sa destruction sélective des cellules β pancréatiques a beaucoup d'autres effets délétères sur d'autres organes (rein, foie,...). Takeuchi et al., (1994) identifiaient les lésions sur les muqueuses digestives suite à l'injection de la streptozotocine comme responsable de l'hypoglycémie observée lors du jeun sur ce modèle. Mais les auteurs n'étaient pas en mesure d'identifier le lien entre ces lésions et l'hypoglycémie lors du jeun. Cependant, ils ont décrit des modifications dans la sécrétion de mucus avec une mise en place progressive de la sévérité des lésions. Plus récemment, Goldin Eran et al. (1997) sur les bases des travaux de Takeuchi (1994) obtiennent les mêmes résultats lors d'une étude mettant en évidence l'implication de la

réduction du GSH (glutathion) dans le processus d'ulcération des muqueuses chez le modèle streptozotocine pendant le jeun.

La formulation des particules mucoadhésives par recouvrement de chitosane n'ont pas apporté les résultats attendues ; rendues plus mucoadhésives, les nanoparticules ne sont plus internalisées par les cellules ne permet pas de potentialiser leur activité biologique. A l'opposé, les nanoparticules négatives sont plus efficaces à la fois *in vitro* et *in vivo*, et représentent une formulation prometteuse pour l'administration d'insuline orale. En effet, la formulation de particules de PLGA chargées négativement est l'approche la plus simple pour formuler des particules chargées d'insuline stables, fonctionnelles. Cette formulation simple doit maintenant être transposable à l'échelle industrielle et être formulées dans un vecteur pharmaceutique complexe pour sa validation *in vivo*.

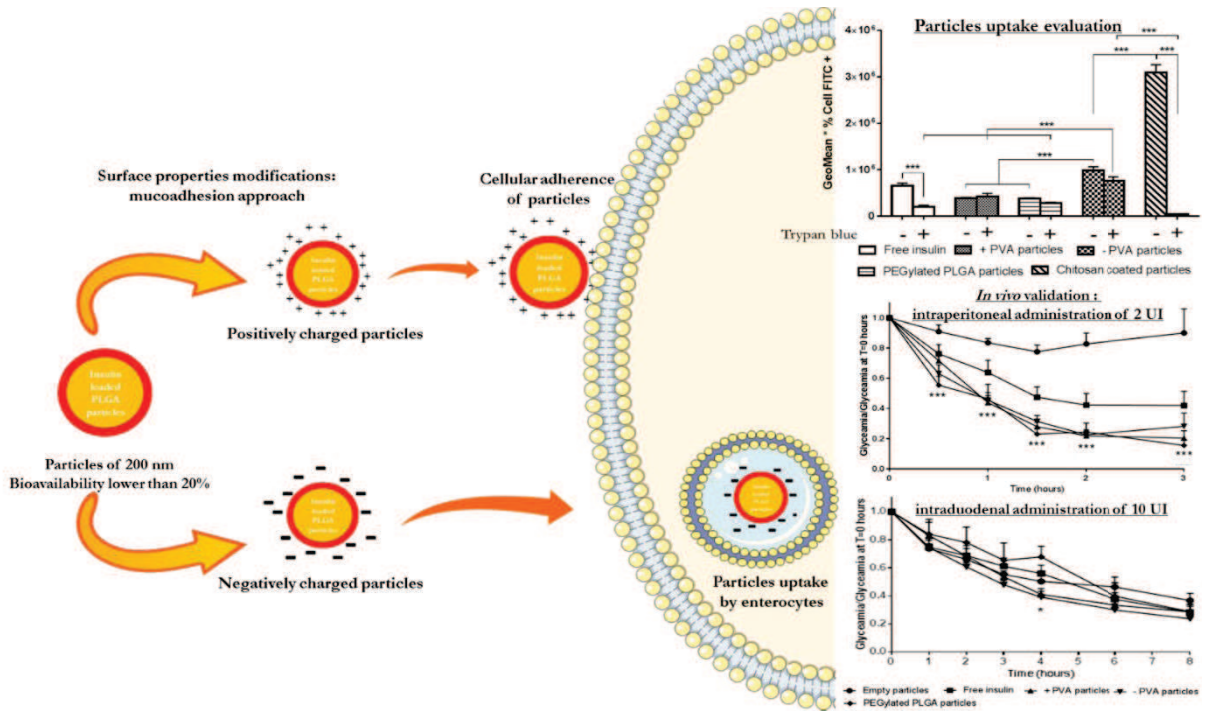


Figure 80: Schéma récapitulatif des travaux sur la bioadhésion des nanoparticules de PLGA *Mucoadhesion as a strategy to improve Insulin loaded PLGA particles bioavailability* (en soumission)

3. Augmentation de l'échelle de production des nanoparticules de PLGA

3.1. Introduction

Les travaux réalisés dans cette thèse s'inscrivent dans le cadre du projet ORAIL (Oral Administration of InsuLin) Bis. Le projet Orail est un programme collaboratif dans lequel sont impliqués des laboratoires publics du CNRS (l'Institut Charles Sadron (ICS) et l'Université Paris Sud (UPS)), un laboratoire de recherche associatif de statut lucratif (le Centre européen d'étude du Diabète (CeeD)) et deux entreprises (Catalent et la PME Photon and Polymers (PnP)). Le projet Orail a été labélisé par le pôle de compétitivité Alsace Biovalley et bénéficie d'un financement du Fonds Unique Interministériel (FUI) complété par la BPI (Banque publique d'investissement), de la région Alsace, le FEDER (Fonds Européen de Développement Régional) et de la CUS (Communauté Urbaine de Strasbourg aujourd'hui appelée Eurométropole). L'objectif de ce consortium est de conduire le système breveté de double encapsulation de l'échelle du laboratoire à l'échelle industrielle par la formulation d'un lot préclinique. De par la voie d'administration, le consortium doit lever un certain nombre de verrous technologiques. En effet, l'insuline doit être encapsulée dans des nanoparticules industrialisable. Ces nanoparticules doivent présenter les mêmes propriétés physicochimiques qu'en laboratoire, présenter un bon passage de la barrière intestinale et offrir une bonne biodisponibilité de l'insuline encapsulée. Ces nanoparticules doivent être encapsulées à leur tour dans un vecteur gastrorésistant dont la technologie relève du savoir-faire du partenaire industriel Catalent. Catalent est une entreprise pharmaceutique spécialisée dans la galénique et dans la production de capsules molles. Le vecteur pharmaceutique complexe définit dans le projet est donc une dispersion de nanoparticules d'insuline dans un dispersant lipophile (polyéthylène glycol, miglyol...) enrobé d'une tunique en alginate/gélatine assurant la gastro résistance et la libération des nanoparticules dans le milieu intestinal.

La première partie des travaux consistait à développer des nanoparticules présentant une bonne mucoadhésion sur la barrière intestinale afin d'améliorer leur internalisation et donc la biodisponibilité de l'insuline encapsulée. Des travaux ont été entrepris sur la modification de surface afin de les rendre bioadhésives (partie 2 des résultats). Il ressort de ces travaux que les nanoparticules négativement chargées étaient les mieux absorbées par les cellules et présentent un intérêt pour leur développement industriel en vue de devenir un vecteur efficace pour administration orale de l'insuline. En effet, celles-ci présentent une homogénéité de distribution, une taille et une charge de surface permettant de privilégier leur absorption par les cellules entérocytaires de l'intestin et ainsi permettre le métabolisme de premier passage hépatique de l'insuline encapsulée. D'autre part, la suppression du tensioactif (PVA) permet de

diminuer la quantité de polymère dans la formulation ce qui permet de s'écarter d'un possible verrou réglementaire. Comme tenu du potentiel de cette formulation, nous sommes passés à une phase de validation du processus d'augmentation de l'échelle de production vers un volume préindustriel. Des études préliminaires sont alors conduites en encapsulant de l'eau ou de l'insuline commerciale (Umline®, 100 UI/mL, Eli Lilly) dans des nanoparticules dont la membrane est fait de polycaprolactone en remplacement du PLGA. La polycaprolactone est un polymère semblable au PLGA mais moins couteux. Son utilisation nous a permis de suivre l'évolution des nanoparticules en fonction des volumes de synthèse. Les résultats encourageants obtenus avec ce polymère de substitution nous ont conduit vers les essais d'augmentation d'échelle avec du PLGA. L'ensemble de ces travaux de mise au point ont été, dans cette première phase, réalisés par un chercheur post-doctorant, Nathalie Auberval, à l'ICS.

3.2. Résultats

3.2.1. Augmentation d'échelle

Cette partie du projet est consacrée à l'application du transfert de technologie permettant de passer de l'échelle du laboratoire (13,5 mL) à une échelle industrielle (2,04 L). Cette augmentation d'échelle s'est faite par étape en changeant les volumes de synthèse et des systèmes d'agitation qui permettent progressivement d'augmenter les volumes des formulations et de se rapprocher du système d'agitation type rotor/stator de Catalent. Ainsi, nous sommes passés d'un système à ultrasons (13,5 mL) à un système d'agitation « tube drive » (50 mL) puis à un mixeur « Blender » commercial (1 L) et enfin le « Blender » modifié (1 L) en adaptant dans celui-ci une reproduction fidèle du système rotor-stator du Becomix® (Figure 81). L'ensemble de cette première phase a été réalisé à l'ICS par Nathalie Auberval. Cette phase d'augmentation d'échelle pose cependant la problématique de l'extraction du solvant. A l'échelle du laboratoire, pour de petits volumes, cette extraction se fait sous un flux d'air (hotte, boa...) mais l'augmentation des volumes implique de mettre au point des moyens d'extraction rapide et efficace des solvants, d'autant plus que pour une industrialisation pharmaceutique, les solvants doivent être recueillis et traités. De plus, le Becomix® ne permet pas de réaliser la dispersion D3 comme avec la technique des ultrasons car cela impliquerait la mise en œuvre de volumes trop importants. Des essais d'extraction du solvant sous vide ont donc été réalisés à l'ICS avec succès grâce à un évaporateur rotatif (Rotavap®, BUCHI, Suisse) sur de grands volumes de synthèse («Blender» et «Blender» modifié sans D3). Celui-ci permet de recueillir les vapeurs condensées de solvant dans des ballons.

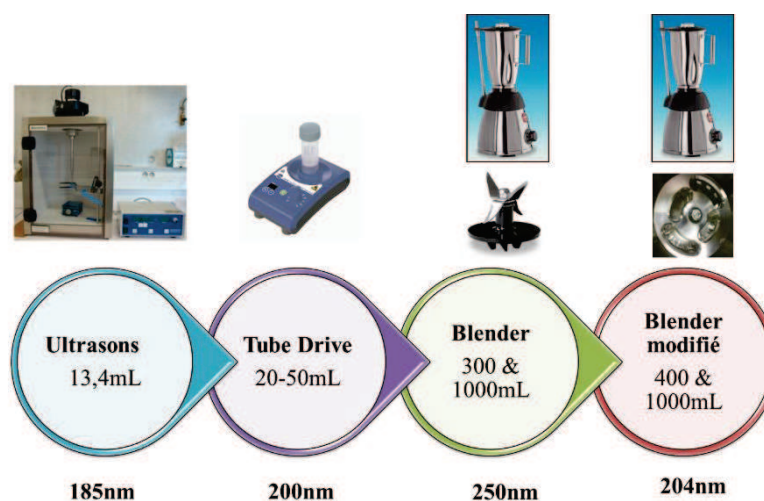


Figure 81: Les phases d'augmentation de l'échelle de production des nanoparticules PLGA/Insuline (Akkiz Bekel et Nathalie Auberval)

Pendant la phase d'augmentation d'échelle, la taille des nanoparticules est conservée malgré l'augmentation des volumes de synthèse. L'absence de la D3 et l'extraction du solvant sous vide n'affecte pas la formation des nanoparticules qui conservent leur taille dans la même gamme tout au long de l'augmentation de l'échelle de production. Les résultats dans les phases d'augmentation d'échelle au laboratoire nous ont permis de réaliser les premiers essais de formulation dans le Becomix® pour un volume de plus de 2 L par lot de particules. Dans la synthèse au Becomix® sont mise en jeu des quantités 600 fois plus importantes que celles utilisées au laboratoire.

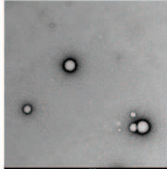
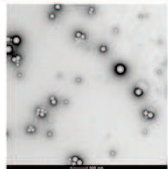
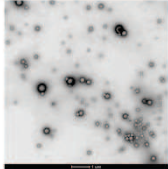
Systemes	Ultrasons	Blender modifié	Becomix
Volume final	13,4mL (D1+D2+D3)	1L (D1+D2)	2,04L (D1+D2)
Modification	/	Suppression de D3	Suppression de D3
Evaporation	Flux d'air	Evaporateur rotatif	Vide (pompe à membrane)
Taille (nm)	184 ± 3	219 ± 17	223 ± 1,4
Pdi	0,092	0,106	0,145
Charge (mV)	-6,6 ± 3,3	-1,3 ± 0,4	-2,3 ± 0,3
Aspect			

Figure 82: Résumé des étapes prédominantes de l'augmentation de l'échelle de production des nanoparticules (en collaboration avec Auberval N.).

La figure 82 montre que les nanoparticules, de la paillasse à l'échelle industrielle conservent leurs caractéristiques physicochimiques en présentant des tailles d'environ 200 nm, une homogénéité de distribution, une charge de surface légèrement négative à neutre et un aspect sphérique.

3.2.2. Première phase de synthèse des lots précliniques

Pour les besoins de l'étude de toxicologie réglementaire (administration, distribution, métabolisme et excrétion ainsi que la toxicité particulière des nanoparticules), des nanoparticules formulées dans le Becomix® et encapsulées dans un vecteur gastrorésistant doivent être administrées par gavage chez le rat. Des prélèvements d'organes vont ensuite être réalisés afin d'évaluer l'accumulation des nanoparticules ou des polymères les constituants dans

les organes cibles (intestin et foie). Afin d'obtenir une concentration de principe actif optimale et réduire le volume à administrer, une insuline quatre fois plus concentrée (Insuman®, 400 UI/mL, Sanofi-Aventis) que celle utilisée dans les phases d'augmentation d'échelle (Umuline®, 100 UI/mL, Eli Lilly) est encapsulée dans les nanoparticules formulées sans tensioactif (sans PVA).

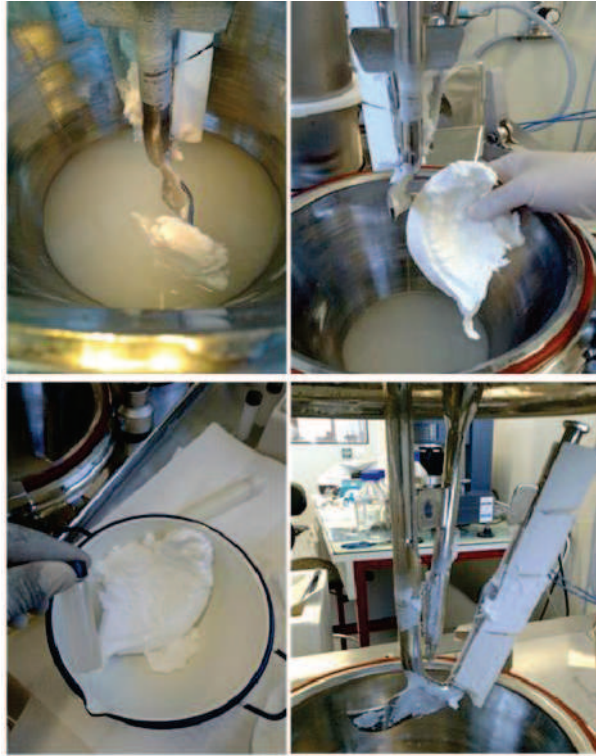


Figure 83: Vidange du Becomix après synthèse des nanoparticules encapsulant de l'*Insuman*®

La figure 83 montre le résultat obtenu à la fin du processus de synthèse des nanoparticules PLGA/*Insuman*®. Après l'évaporation de l'acétate d'éthyle sous vide pendant 4 heures, l'*Insuman* combiné à l'absence de tensioactif conduit à une agrégation massive des nanoparticules.

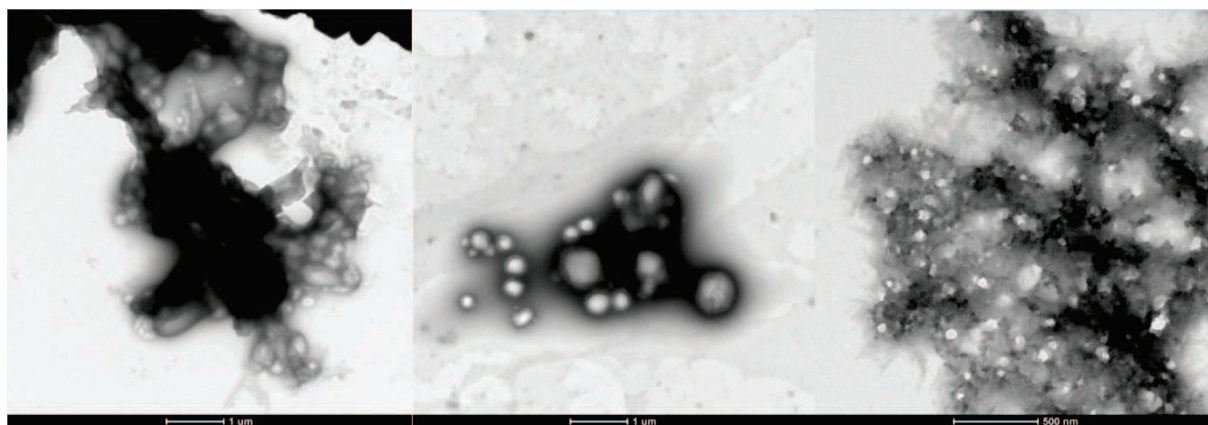


Figure 84: Cliches au microscope électronique à transmission des nanoparticules après 4 heures d'évaporation de l'acétate d'éthyle.

Les clichés au microscope électronique à transmission montrent que les nanoparticules formées après 4 heures d'évaporation restent prisonnières d'une matrice et/ou sont liées les unes aux autres. Ce transfert de technologie infructueux met en lumière la nécessité d'introduire pour ce type d'insuline une quantité minimale de tensioactif permettant de stabiliser la dispersion. Nous avons également identifié des points de surveillance, à savoir un contrôle strict de la température des solutions dans le réacteur, et un suivi des tailles à intervalles réguliers pendant la phase d'évaporation.

3.2.3. Seconde phase de synthèse des lots précliniques

Après l'échec du transfert de technologie, des études ont été menées au laboratoire afin de déterminer la formulation optimale nécessaire pour empêcher l'agrégation des nanoparticules contenant l'Insuman® tout en permettant une conservation de leur absorption par les cellules intestinales. Nous avons ainsi formulé à l'échelle du laboratoire différents types de systèmes nanoparticulaires avec Umuline® ou Insuman®, sans PVA ou avec 0,5, 1 ou 2,5% de PVA (m/v). Nous avons également testé deux types d'évaporation lente (sous hotte) ou rapide (sous Rotavap) pour identifier si le type d'évaporation pouvait impacter sur cette agrégation (Figure 85).

	Umuline			Insuman		
	PVA 0%	PVA 0,5%	PVA 1%	PVA 0%	PVA 0,5%	PVA 1%
Taille (nm)	155	150	160	474	190	190
PDI	0,14	0,11	0,09	1,22	0,14	0,14
Potentiel Zêta	-24	-12	-7	/	2,2	0,6

Figure 85: Influence de la quantité de tensioactif sur les propriétés physicochimiques des nanoparticules (évaporation sous flux d'air).

Ces études ont montré que l'encapsulation de l'Insuman® produit des nanoparticules de charge neutre et ce même en l'absence du tensioactif. Des études physicochimiques ont montré, qu'en présence d'Insuman®, l'ajout d'une quantité minimum de PVA à 1% (m/v) dans la D2 permet d'obtenir des nanoparticules de taille, de dispersion homogène sans processus d'agrégation alors que sans PVA ou avec 0,5% de PVA cette agrégation est observée quel que soit le type d'évaporation utilisé. Cette agrégation est spécifiquement obtenue pour les formulations en présence d'Insuman® suggérant que soit la concentration d'insuline, ou soit les additifs ou stabilisants utilisés dans cette formulation, sont à l'origine de cette agrégation. Nous avons également pu observer qu'en présence d'Insuman®, la charge de surface des nanoparticules est très faiblement négative, voire neutre que ce soit en présence ou non de PVA suggérant de nouveau que cette formulation particulière impacte fortement les propriétés physico-chimique des nanoparticules. A l'opposé, en présence d'Umuline®, cette agrégation n'est pas observée. De plus, la charge de surface des nanoparticules est fortement négative sans PVA, mais se rapproche de la neutralité dès qu'on rajoute du PVA. Une fois cette étape réalisée, nous avons cherché à vérifier l'internalisation de ces nanoparticules présentant une quantité minimum de PVA. Cependant, pour des raisons techniques, ces expériences sont réalisées avec de l'insuline FITC et ne tiennent donc pas compte du type d'insuline utilisée qui peut fortement impacter sur cette internalisation. Par contre, nous avons systématiquement mesuré la charge de surface des nanoparticules formulées pour vérifier que nous étions dans des valeurs comparable à celle formulées en présence d'Umuline® ou d'Insuman® (Figure 86).

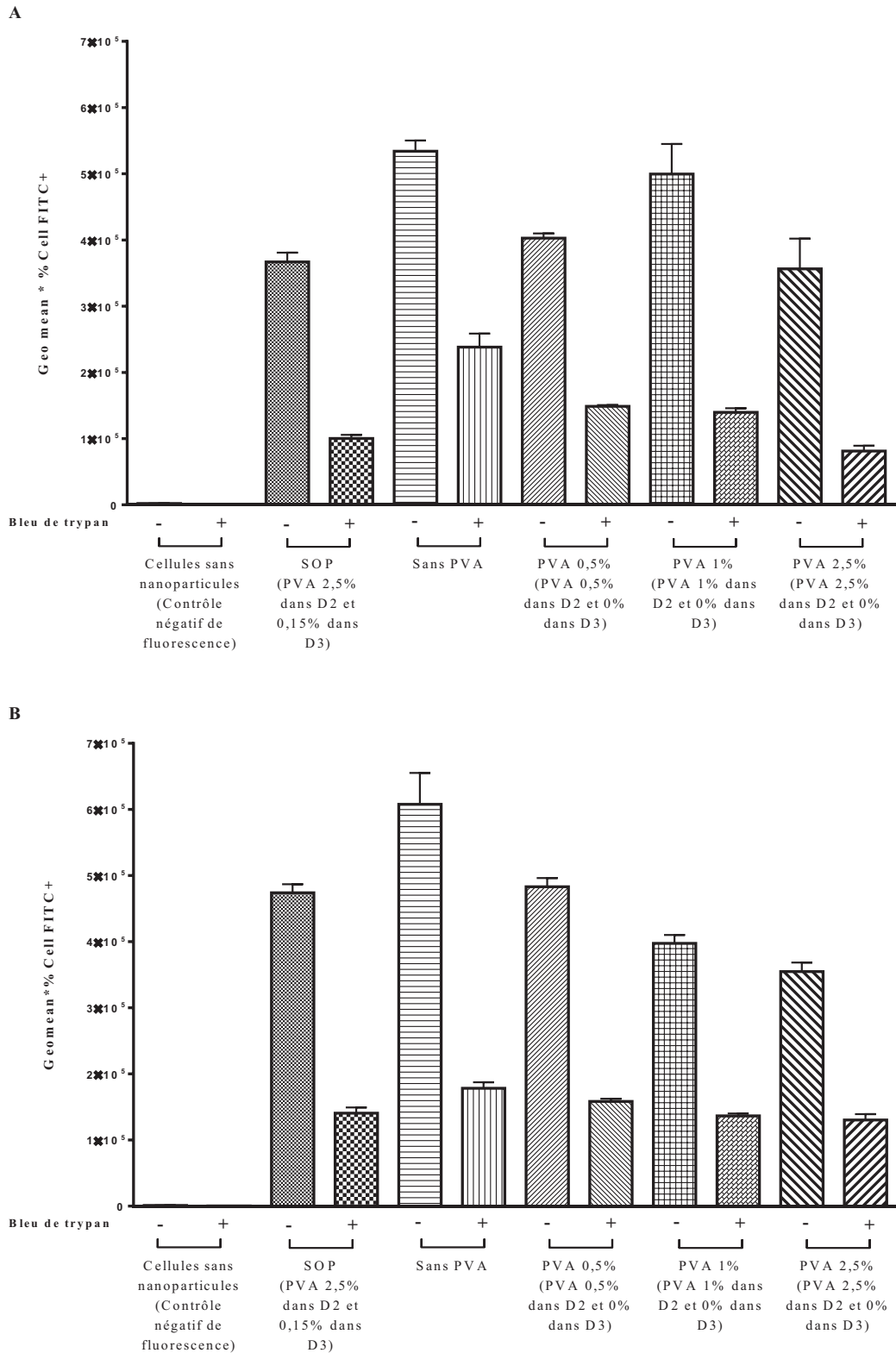


Figure 86: Influence de la quantité de tensioactif sur l'internalisation des nanoparticules sur les différents modèles *in vitro* : [A] sur le modèle caco-2 [B] sur le modèle coculture.

Les résultats obtenus montrent que les nanoparticules formulées en présence d'une quantité minimum de PVA, malgré leur charge de surface proche de la neutralité, présentent

une mucoadhésion et une internalisation comparable aux nanoparticules sans PVA. Ces résultats sont en contradiction avec l'hypothèse réalisée précédemment sur l'impact de la charge de surface sur la l'internalisation des nanoparticules mais suggèrent que ce n'est pas forcément la charge de surface qui impacte l'internalisation des nanoparticules mais la présence de PVA.

Suite à cette étape, la méthode a pu être transposée directement à l'échelle du Becomix® où un volume de 1200 mL de PVA 1% est introduit lors de la seconde dispersion D2. Des prélèvements sont effectués à intervalle régulier à partir du début de l'évaporation pour suivre l'évolution de la taille des particules et de leur morphologie.

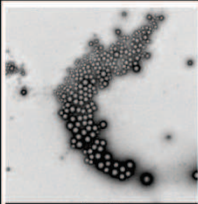
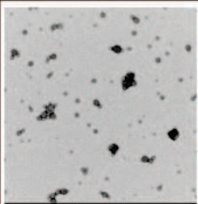
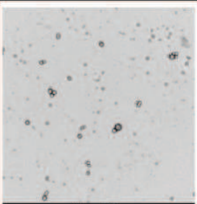
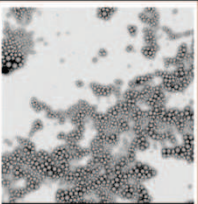
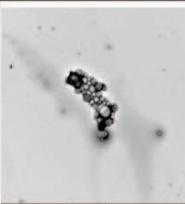
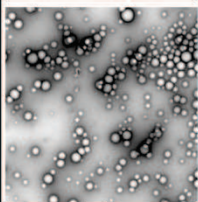
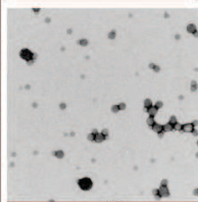
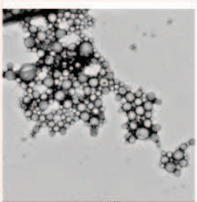
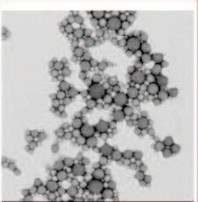
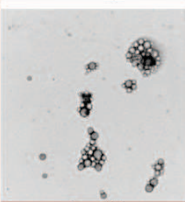
Etapes	Après D2	Après 1h d'évaporation	Après 2,5 h d'évaporation	Après 3,75 h d'évaporation	Après 5h d'évaporation
Taille (nm)	215 ± 1	215 ± 2	220 ± 1	224 ± 4	222 ± 2
PDI	0,08 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,08 ± 0,03	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01
Potentiel zêta (mV)	- 6 ± 0,3	- 4,3 ± 0,3	- 3,3 ± 0,4	- 2,8 ± 0,1	-2,5 ± 0,2
Morphologie					
					

Figure 87: Suivi de l'évolution des nanoparticules PLGA/Insuman en cours de synthèse dans le Becomix.

L'ajout du PVA à hauteur de 1% permet de réprimer l'agrégation observée lors de la première phase d'augmentation d'échelle avec l'Insuman®. Il permet d'obtenir des tailles, une distribution et un potentiel de surface conformes à ceux obtenus au laboratoire. Les clichés au microscope électronique à transmission montrent des nanoparticules indépendantes et sphériques. Le dosage CLHP de l'efficacité d'encapsulation par la méthode indirecte montre un taux d'encapsulation de 98%.

3.3. Conclusion et discussion

Cette étude a permis de mettre en évidence la nécessité d'incorporer une quantité de tensioactif dans le processus de synthèse des nanoparticules encapsulant l'Insuman®. La valeur de la charge de surface est proche de la neutralité mais ceci est dû au type d'insuline et de ses adjuvants. La quantification de l'efficacité d'encapsulation en CLHP donne un taux d'encapsulation de 98% confirmant les premiers résultats obtenus. Le transfert de technologie est aujourd'hui une réussite néanmoins, car nous avons pu démontrer qu'avec une quantité minimum de PVA, nous pouvions formuler des nanoparticules de taille homogène, sans agrégat qui conservent leur propriété d'internalisation. Cependant, la problématique de la charge de surface et son rôle sur l'internalisation doit encore être élucidé. Nous nous heurtons dans cette étape également à la limite technique de l'étude de l'internalisation *in vitro* sur des modèles cellulaires qui nécessitent l'utilisation d'insuline FITC. Or, nous avons pu remarquer dans cette étude que l'insuline elle-même joue un rôle clé dans les propriétés physico-chimiques de nos nanoparticules et il est raisonnable de penser que cela peut également impacter sur leur internalisation. A notre connaissance, nous n'avons pas trouvé d'étude qui répertorie ce type d'impact de la formulation d'insuline sur les propriétés physicochimiques et biologiques des nanoparticules. Pour répondre à ces questions, deux types de stratégies peuvent être envisagées. La première consisterait à formuler des nanoparticules avec les adjuvants de l'Insuman pour identifier si c'est la concentration en insuline qui joue un rôle clé ou ses adjuvants. Il est en effet important de rappeler que l'Insuman® est une insuline particulière qui est formulée pour maintenir l'insuline plus de 2 mois dans une pompe implantable, c'est-à-dire à 37°C. Cette expérience peut être réalisée grâce aux diluants commercialisés avec l'Insuman qui contiennent exactement les adjuvants présents dans la formulation d'Insuman®. L'autre possibilité consiste à réaliser l'étude du passage de la barrière intestinale sur intestin isolé grâce à la chambre de Ussing. Nous pouvons réaliser cette étude en présence de nanoparticules d'insuline (Umuline® et Insuman®) et quantifier par HPLC la quantité d'insuline qui passe la barrière intestinale dans le compartiment receveur. Ces études n'ont pu être réalisées au cours de cette thèse, les résultats obtenus sur la phase de changement d'échelle ayant été obtenus, très récemment. Pour l'étape industrielle, quelques analyses complémentaires doivent également être réalisées pour valider définitivement le processus. Il est notamment nécessaire de déterminer la quantité de solvant résiduel qui doit être minimum pour ne pas induire de toxicité. Enfin, les études de stabilité de ces lots au cours du temps doivent également être réalisées, la formulation devant être conservée à long terme. Ces études sont en cours de réalisation.

Enfin, une formulation des nanoparticules avec une autre insuline plus concentrée, l'Humuline® 500UI serait d'intérêt. Sa formulation étant proche de celle de l'Umuline®, elle pourrait apporter d'autres réponses aux questions posées sur l'impact de la concentration de l'insuline sur les propriétés des nanoparticules. Enfin, d'un point de vue industriel, nous pourrions ainsi augmenter de 25% la concentration d'insuline dans nos nanoparticules ce qui n'est pas négligeable.

4. Validation du vecteur pharmaceutique complexe

4.1. Introduction

Cette partie des travaux fait référence à la validation du vecteur pharmaceutique complexe. En effet, celui-ci est basé sur le concept de la double encapsulation de l'insuline. A ce niveau de développement, il est donc nécessaire d'encapsuler les nanoparticules dans un vecteur gastrorésistant et de valider la biofonctionnalité du système complet. Ce vecteur gastrorésistant a pour objectif de protéger les particules dans le milieu gastrique pour permettre leur libération dans le milieu intestinal qui est le site d'absorption préférentiellement ciblé par cette formulation. Dans cet objectif, des vecteurs en alginate administrable *per os* chez le rat sont formulés par gélation ionotropique de l'alginate de sodium en présence d'ions calcium grâce au protocole mis au point par Nathalie Auberval à l'ICS. Ces véhicules doivent encapsuler efficacement les nanoparticules et les protéger contre l'acidité et la dégradation enzymatique en milieu gastrique pour permettre leur libération en milieu intestinal. D'un point de vue moléculaire, ces vecteurs se présentent sous forme de réseaux denses de polymères (alginate dans notre cas) réticulés par des ions calcium. Ces réseaux forment un maillage qui emprisonne les nanoparticules, la densité de ce maillage étant dépendante de la quantité d'ions calcium.

Pour cette étape, nous avons fait le choix de valider ce vecteur complexe avec le lot de nanoparticules formulées dans le Becomix® avec la proportion de 1% de PVA et encapsulant l'insuline concentrée. Afin de réduire au maximum le volume de véhicule administrer *per os*, les nanoparticules sont concentrés par lyophilisation ou par évaporation du solvant de dispersion grâce au Rotavap®. Cette approche nous permet d'administrer moins de 100 µL de suspension de microbilles contenant 10 UI d'insuline. Après administration, les glycémies des animaux sont suivies dans le temps pendant 24 heures. En parallèle, et pour vérifier la fonctionnalité du système complet, nous avons administrés par voie orale des nanoparticules non encapsulées, et des vecteurs renfermant des nanoparticules vides.

4.2. Résultats

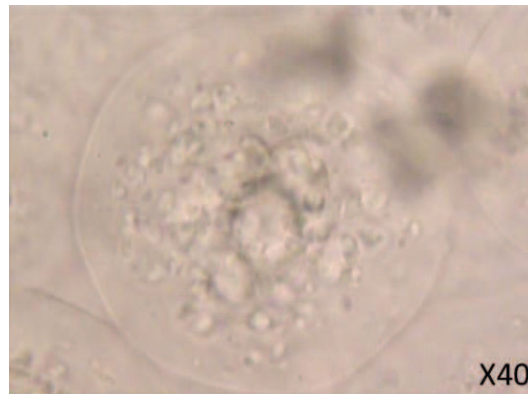


Figure 88 : Morphologie d'un vecteur pharmaceutique complexe renfermant des nanoparticules

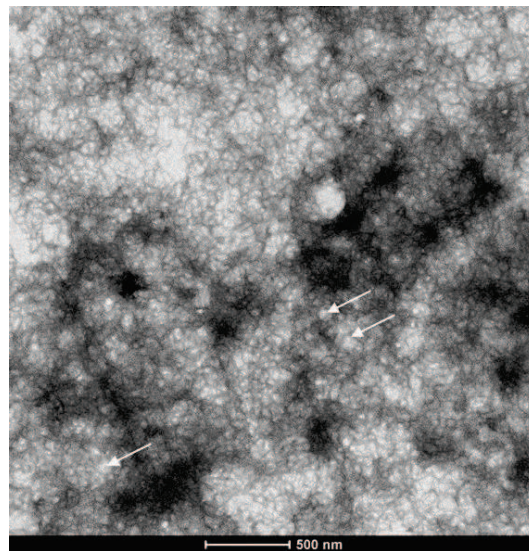


Figure 89: Cliché au microscope électronique à transmission des véhicules contenant les nanoparticules formulées grâce au Becomix®

Les clichés au MET montrent un enchevêtrement de polymère (filament noir) dans lequel les nanoparticules (points blancs) sont piégées.

Nous avons vérifié leur stabilité en milieu gastrique et leur capacité à libérer les nanoparticules en milieu intestinal (Figure 90).

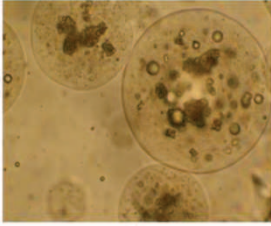
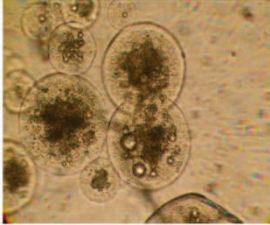
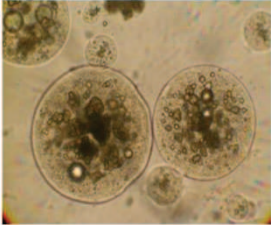
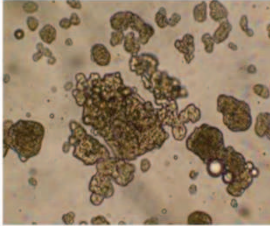
	T = 0 heure	T = 2 heures
Post synthèse		
Milieu gastrique simulé (37°C)		
Milieu intestinal simulé (37°C)		

Figure 90: Etude de stabilité des véhicules renfermant des nanoparticules dans les milieux gastrique et intestinal simulés (clichés réalisés au microscope optique X40)

Nous avons ainsi montré que nos véhicules sont gastrorésistants car ils conservent leur forme sphérique en milieu gastrique simulé. Par contre, dès qu'ils sont placés en milieu intestinal simulé, on peut distinctement voir que les véhicules perdent leur structure sphériques, sont détruits et libèrent donc les nanoparticules.

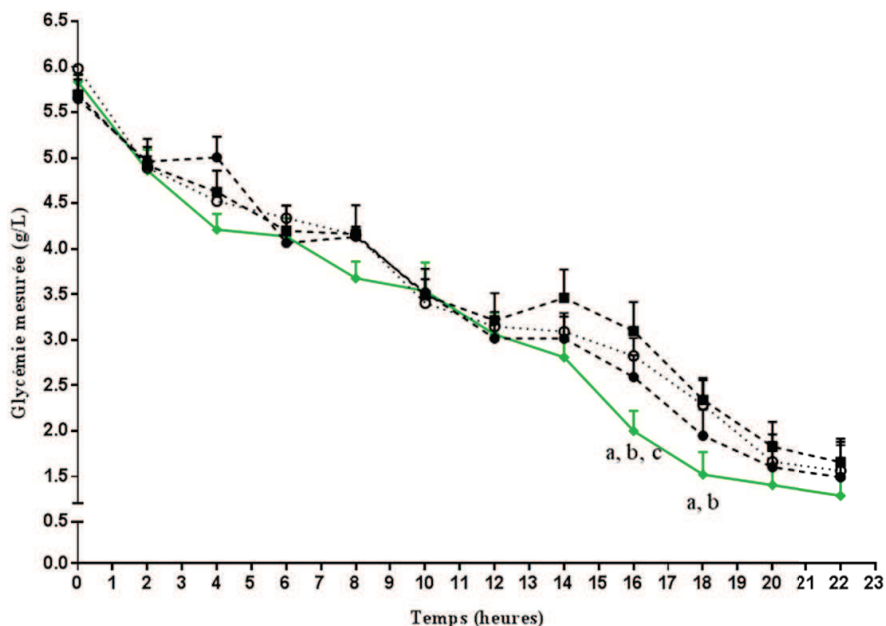


Figure 91: validation du vecteur complet renfermant les nanoparticules issues de l'augmentation d'échelle

Une dose unique de 10 UI est administrée par voie orale et la glycémie des rats à jeun est mesurée au cours du temps grâce à un glucomètre. Le motif (-●-) représente l'administration des nanoparticules libre formulées au laboratoire (n=10), (-■-) l'administration des nanoparticules libres formulées grâce au Becomix® (n=10). (-○-) représentent les véhicules contenant des nanoparticules vides (n=10), (-△-) pour ceux contenant les nanoparticules issues formulées grâce au Becomix® (n=10). Les résultats sont présentés en moyenne ± SEM. Un test ANOVA Oneway mesures répétées est appliqué pour comparer les différents groupes ^ap<0,05 vs véhicules contenant des nanoparticules vides, ^bp<0,05 vs nanoparticules libres formulées grâce au Becomix®, ^cp<0,05 vs nanoparticules libre formulées au laboratoire

L'étude *in vivo* nous a permis de valider leur efficacité biologique (Figure 91). Après l'administration des différentes formulations, nous notons une baisse de la glycémie chez tous les groupes d'animaux, chute liée à l'effet de jeun. Seuls véhicules contenant les nanoparticules issues de l'augmentation d'échelle induisent une baisse significativement de ces glycémies par rapport aux animaux contrôles (nanoparticules libres et véhicules renfermant des nanoparticules vides) entre 16 et 18 heures post administration.

4.3. Conclusion

La gélation ionotropique de l'alginate et des ions calcium permet d'obtenir des microparticules encapsulant les nanoparticules d'insuline. Les microparticules obtenues présentent la taille requise pour une administration *per os* chez le rat avec une forme sphérique. Leur taux d'encapsulation et leur stabilité ne sont pas encore connus. Théoriquement, cette encapsulation par ce procédé doit être de l'ordre de 100% et une stabilité dans le milieu gastrique avérée avec une résorption en milieu intestinal compte tenu des propriétés de ce type de vecteur. Cette étude a permis de montrer l'efficacité biologique du système complexe et la validation du concept de double encapsulation du vecteur pharmaceutique complexe. Des études complémentaires doivent cependant être réalisées pour valider la stabilité des systèmes complets. Ainsi, des formulations du système complet ont été conservées et seront testées après deux mois sur les animaux afin de vérifier que le système complet reste biofonctionnel. De plus, des études de stabilité des nanoparticules seules et du système complet seront également réalisées afin de s'assurer que cette formulation se maintient au cours du temps. Enfin, l'étude de biofonctionnalité, bien qu'elle ait montré une efficacité biologique des systèmes reste nuancée par la durée de suivi pour démontrer l'efficacité biologique (plus de 16h). Une étude sera donc réalisée avec des quantités d'insuline supérieure (20UI au lieu de 10UI/200g) pour potentialiser cet effet. Il sera également nécessaire de vérifier la biodisponibilité de cette insuline. Cependant, cette étude est rendue difficile par la modèle animal utilisé. En effet, nous réalisons nos études sur le rat et les prélèvements de sang au cours de l'étude sont réalisés à la queue, comme l'autorise la législation et le comité d'éthique. Les sangs prélevés dans ces conditions sont fortement hémolysés, hémolyse qui conduit à des dosages d'insuline complètement erronés. Nous avons réalisés à l'échelle du laboratoire des expériences comparables en encapsulant du C-peptide qui n'est pas impacté par l'hémolyse. Cette étape n'est pas envisageable à l'échelle industrielle car nous ne respecterions pas les conditions de formulation du vecteur (type d'insuline, concentration, adjuvant ...)

Les nanoparticules issues de l'augmentation d'échelle font aujourd'hui l'objet d'une étude de toxicologie (toxicologie réglementaire des nanoparticules) chez un prestataire de service (Charles River, Royaume Uni). Pour cela, 4 types de formulations sont testées : animaux gavés avec uniquement de l'eau, système complet avec une faible concentration d'insuline (2UI/animal) ; système complet avec la concentration d'insuline ayant démontré une efficacité biologique (10UI/animal) et système complet avec une forte quantité d'insuline (50UI/animal). Au cours de cette étude réalisée chez des rats mâles et femelles, le poids est suivi au cours du

temps, et certains paramètres toxicologiques (mesure de cytokines, ...). A la fin de l'étude, l'ensemble des organismes seront analysés et le foie et l'intestin seront plus particulièrement étudiés en microscopie électronique afin d'identifier une potentielle agglomération auprès de ces organes cibles.

V. Conclusion & perspectives

L'objectif de ce projet de thèse était de développer un vecteur pharmaceutique complexe, permettant de délivrer de l'insuline par voie orale. Le choix de cette voie d'administration permet d'augmenter la compliance du patient en raison de sa simplicité d'utilisation mais aussi d'avoir une délivrance plus physiologique, respectant le premier passage hépatique et limitant ainsi les fluctuations glycémiques. Cette voie permettrait ainsi de retarder l'apparition des complications liées au diabète.

Le projet Orail s'est essentiellement focalisé dans un premier temps sur la formulation des nanoparticules qui encapsulent l'insuline. Celles-ci doivent être obtenues à partir de polymères bio toléré, d'une formulation ne nécessitant pas de solvant ou tout au moins une quantité minimum de solvant, présentant une taille inférieure à 500 nm permettant leur passage à travers la barrière intestinale. Elles ont pour objet d'encapsuler efficacement l'insuline, d'être suffisamment stable en milieu intestinal pour y protéger le principe actif et lui permettre d'être transportée de la lumière intestinale vers le sang. Dans un second temps, la formulation d'un vecteur complet a été mis en place afin de valider le concept de la double encapsulation chez le rat (bioefficacité et toxicologie réglementaire).

Deux types de systèmes nanoparticulaires à base de polymères biocompatibles ont alors été développés : les nanoparticules en chitosane par la méthode de la coacervation complexe et les nanoparticules de PLGA par la méthode de la double émulsion évaporation de solvant.

En 2009, Madame Nathalie REIX dans le cadre de sa thèse avait mis au point la synthèse de nanoparticules de PLGA par double émulsion évaporation de solvant permettant d'encapsuler l'insuline. Lors de cette thèse, elle démontre la faisabilité de cette méthodologie et le potentiel hypoglycémiant des nanoparticules tout en gardant l'aspect toxicologique dans le choix des matériaux. Cependant, ces systèmes présentent une biodisponibilité de l'insuline encapsulée inférieure à 20%. En 2013, Madame GUHMANN Pauline lors de sa thèse démontre l'absence de toxicité des nanoparticules de PLGA et identifie leur mécanisme d'internalisation (mécanisme actif clathrine/caveoline dépendant). Cette avancée dans la compréhension des mécanismes cellulaires d'internalisation des nanoparticules en PLGA et l'absence de toxicité *in vitro* nous ont poussés à développer de nouveaux types de nanoparticules en vue d'augmenter la biodisponibilité faible identifiée par Madame REIX.

La formulation des nanoparticules de chitosane/insuline a fait l'objet d'une thèse en 2010 soutenue par Madame Adeline CALLET. Cette thèse a permis de mettre au point les conditions nécessaires à la synthèse de nanoparticules par une méthode simple ne faisant pas appel à l'utilisation de solvants ni de tensioactifs. Cependant, ces nanoparticules présentaient l'inconvénient majeur d'être instable pour permettre leur validation *in vitro* et *in vivo*. En effet,

dès que celles-ci sont en contact avec du milieu de culture (DMEM ou PBS), elles libèrent le principe actif encapsulé.

Les nanoparticules de chitosane sont développées pour pallier à la toxicité potentielle des nanoparticules de PLGA.

L'objectif de la première partie des travaux de cette thèse était de mettre au point une méthodologie permettant de formuler des nanoparticules stables à base de chitosane. Pour stabiliser ces nanoparticules, deux méthodes sont employées soit séparément soit combinées : la réticulation et la lyophilisation.

La réticulation avec du tripolyphosphate de sodium (TPP) est l'approche choisie. Le sodium tripolyphosphate permet d'améliorer la stabilité des coacervats en se complexant avec le chitosane par liaison des amines libres sur sa chaîne. Ceci a pour effet d'améliorer la qualité d'interaction au sein du coacervat en réduisant la distance intermoléculaire (compaction plus importante). La lyophilisation est une autre solution intéressante. En effet, cette procédure largement décrite dans la littérature permet la conservation dans le temps de principes actifs ou la stabilisation de nanoparticules. Celle-ci consiste en l'extraction du solvant de dispersion des coacervats par sublimation dans l'objectif de leur conférer une rigidité structurelle.

Les résultats ont montré que la formulation de nanoparticules auto-assemblées chargées d'insuline est une approche simple, reproductible qui permet d'obtenir un haut rendement d'encapsulation. Les études de stabilité en milieux simulés gastrique et intestinal ont montré que les nanoparticules sont immédiatement détruits dans le milieu gastrique quel que soit la méthode de formulation, mettant en lumière le besoin de la seconde encapsulation gastrorésistante faisant l'objet du développement du vecteur pharmaceutique complexe. Cette étude montre également que la combinaison de la réticulation et de la lyophilisation permet de réduire de manière importante la libération aspécifique de l'insuline dans l'intestin. Lors des études *in vitro* (modèle coculture) et *in vivo* (modèle streptozotocine de rat diabétique), les données démontrent de nouveau l'efficacité d'une combinaison de la réticulation et de la lyophilisation.

Cette étude a donc permis de montrer l'intérêt de la coacervation complexe pour formuler des nanoparticules d'insuline en vue de leur administration par la voie orale. La combinaison réticulation et lyophilisation est une approche prometteuse dans le développement de l'insuline orale car elle permet d'obtenir des nanoparticules stables dans les milieux biologique en limitant les libérations indésirables et en offrant une meilleure efficacité biologique. Mais cette approche reste limitée, elle offre une excellent mucoadhésion mais celle-

ci n'est pas suivie d'une internalisation efficace ce qui fait qu'elle ne sera pas la méthode privilégiée pour la suite.

La seconde partie de mon travail a donc consisté en l'amélioration de la biodisponibilité des systèmes nanoparticulaires de PLGA formulés par la méthode double émulsion eau/huile/eau. Pour augmenter cette biodisponibilité, la mucoadhésion est la stratégie choisie. En effet, la bioadhésion est une stratégie largement décrite dans la littérature afin d'augmenter la biodisponibilité des principes actifs encapsulés dans des nanoparticules. En 2013, Yu QIAN et al. (2013) déposent un brevet (US 2013/0034602) protégeant un système d'administration d'insuline par voie orale renfermant des nanoparticules mucoadhésives. Afin de rendre les nanoparticules de PLGA mucoadhésives, leur recouvrement avec du chitosane est privilégié. En parallèle, nous avons formulé d'autres types de nanoparticules avec du PLGA modifié par greffage d'un groupement PEG ou des nanoparticules formulées sans PVA.

L'étude a montré qu'en l'absence de PVA, les particules formulées par double émulsion sont plus petites, sont chargées négativement contrairement à celles formulées avec du PVA ou recouvertes de chitosane. Les études montrent qu'en milieu gastrique, les nanoparticules libèrent leur contenu mettant en lumière le besoin d'une seconde encapsulation permettant d'offrir une résistance en milieu gastrique. La validation *in vitro* réalisée sur deux modèles cellulaires : caco-2 seules (cellules entérocytaires) et coculture (Caco-2 et RevHT29MTX (productrice de mucus) montre que les nanoparticules recouvertes de chitosane sont mieux associées aux cellules que les autres types de formulation et ceci sur les deux types cellulaires. Mais la méthode employée (cytométrie en flux) n'est pas en mesure de dissocier les nanoparticules présentes en intracellulaire et celles associées à la surface cellulaire. L'utilisation du bleu de trypan permet de discriminer la fluorescence intracellulaire de la fluorescence totale. L'application de la méthode d'extinction de la fluorescence induit une chute importante de la fluorescence associée aux cellules des nanoparticules recouvertes mettant en lumière que l'augmentation de la mucoadhésion n'est pas associée à une augmentation de l'internalisation des nanoparticules par les cellules tandis que les nanoparticules négativement chargées (sans PVA ou/et recouvertes de PEG) sont quant à elles très efficacement internalisées par les cellules. Lors de la validation *in vivo* sur un modèle streptozotocine de rat diabétique, nous avons pu observer que toutes les nanoparticules sont en mesure d'induire une baisse de la glycémie comme l'insuline non encapsulée à la même dose par administration intrapéritonéale démontrant une conservation de l'activité biologique de l'insuline encapsulée. En revanche, par la voie intraduodénale, l'efficacité biologique des nanoparticules est plus difficile (lié au modèle d'étude) à mettre en lumière mais il semblerait que les nanoparticules formulées sans

PVA soient plus efficaces. Pour des raisons éthiques, les nanoparticules recouvertes de chitosane n'ont pas été évaluées *in vivo* ((numéro d'agrément de l'animalerie du laboratoire: C67-482-28, numéro de saisine AL / 60/67/02/13) car nous n'avions pas démontré d'efficacité *in vitro*.

La formulation des particules mucoadhésives par recouvrement de chitosane n'a pas apporté les résultats attendus. En effet, rendues plus mucoadhésives, les nanoparticules ne sont plus internalisées par les cellules et ne peuvent donc plus exercer leur activité biologique. A l'opposé, les nanoparticules négatives sont plus efficaces à la fois *in vitro* et *in vivo*, et représentent une formulation prometteuse pour l'administration d'insuline orale. En effet, la formulation de particules de PLGA chargées négativement (sans PVA) est l'approche la plus simple pour formuler des particules chargées d'insuline stables et facilement transposable à grande échelle.

Il ressort de ces travaux que les nanoparticules négativement chargées étaient les mieux absorbées par les cellules et présentent un intérêt pour leur développement industriel en vue de devenir un vecteur efficace pour administration orale de l'insuline. En effet, celles-ci présentent une homogénéité de distribution, une taille et une charge de surface permettant de privilégier leur absorption par les cellules entérocytaires de l'intestin et ainsi permettre le métabolisme de premier passage hépatique de l'insuline encapsulée. D'autre part, la suppression du PVA permet de s'écarter d'un possible verrou réglementaire. Ces résultats nous conduisent vers une augmentation de l'échelle de synthèse des nanoparticules dont les différentes phases du protocole ont été mises au point par Nathalie Auberval et Akkiz Bekel à l'ICS.

Cette partie du projet s'est donc ensuite consacrée à l'application du transfert de technologie permettant de passer de l'échelle du laboratoire (13,5 mL) à une échelle industrielle (2,04 L) grâce au système d'agitation rotor/stator utilisé par l'industriel appelé Becomix. Pendant la phase d'augmentation d'échelle, la taille des nanoparticules est conservée malgré l'augmentation des volumes de synthèse. Pour les besoins de l'étude de toxicologie réglementaire, des nanoparticules formulées dans le Becomix® et encapsulées dans un vecteur gastrorésistant doivent être administrées par gavage chez le rat. Afin de réduire le volume à administrer, une insuline concentrée (Insuman®, 400 UI/mL, Sanofi-Aventis) est employée dans la formulation du lot. Le résultat obtenu montre que l'Insuman® combinée à l'absence de tensioactif conduit à une agrégation massive des nanoparticules.

Après les résultats obtenus après cette première phase d'augmentation avec l'Insuman®, des études sont menées au laboratoire afin de déterminer la quantité optimale de PVA nécessaire pour éviter l'agrégation des nanoparticules tout en permettant une conservation de leur

absorption par les cellules intestinale. Des études physicochimiques et *in vitro* sur des nanoparticules formulées avec différentes concentration de PVA ont montré que l'ajout d'une solution de PVA à 1% (m/v) dans la D2 permet d'obtenir des nanoparticules avec une taille, une dispersion, et une charge de surface homogène accompagnée une bonne internalisation cellulaire lors des phases de validation *in vitro*. La méthode a été donc transposée directement à l'échelle du Becomix®. Cette dose de PVA permet de formuler des nanoparticules homogènes et non agrégées avec le Becomix. Le transfert de technologie est aujourd'hui une réussite et l'efficacité d'encapsulation en CLHP donne un taux d'encapsulation de 98% confirmant les premiers résultats obtenus.

L'administration orale des nanoparticules issues de l'augmentation d'échelle après encapsulation dans le vecteur gastrorésistant est biologiquement active et présente un profil d'insuline lente. Ces nanoparticules encapsulées dans un vecteur gastrorésistant sont aujourd'hui en phase d'étude (Charles River, Royaume Uni) afin d'évaluer la toxicité des nanoparticules après administration répétées. Trois groupes d'animaux recevant trois doses d'insuline (une fois par jour pendant 14 jours) : faible = 2UI, moyenne = 10 UI et forte =50 UI sont constitués à partir d'un pool de 80 rats Wistar (40 mâles et 40 femelles). Après euthanasie, une étude histologique sera réalisée sur les prélèvements d'organes (intestin et foie) afin de déterminer l'accumulation des nanoparticules dans les organes et/ou les lésions tissulaires.

Des tests préliminaires permettant de remettre en dispersion les nanoparticules issues de l'augmentation d'échelle dans un dispersant lipophile (PEG 200, PEG 400, Miglyol...) sont en cours. Cette étape permet de mettre en place la formulation permettant la construction des lots précliniques. Ces vecteurs seront ceux développés par le partenaire industriel Catalent® pour la validation chez le mini porc diabétique.

Des études sont actuellement en cours également afin de connaître l'impact de la formulation d'insuline sur la charge de surface des nanoparticules. D'après les résultats obtenus, il paraît difficile aujourd'hui de conclure sur le rôle de la charge de surface sur l'internalisation des nanoparticules. Nous avons clairement établi que la mucoadhésion joue un rôle délétère dans ce processus mais les changements de formulation et la présence d'additifs dans ces formulation semble avoir un impact non négligeable qu'il est nécessaire de clarifier. La concentration d'insuline doit également être investiguées plus précisément. De plus, le modèle cellulaire des entérocytes apporte une certaine limite technique dans la validation du passage de la barrière intestinale car il utilise de l'insuline FITC qui n'est pas représentative des types d'insulines utilisées lors de la formulation des lots précliniques. Un modèle plus représentatif de la situation *in vivo*, la chambre de Ussing, utilisant une fraction d'intestin devra ainsi être

utilisé pour ces étapes de validation. Le dosage de l'insuline dans le compartiment receveur par HPLC permettra d'avoir une idée plus précise de l'impact des formulations de l'insuline sur la biodisponibilité du système nanoparticulaire.

Il sera également nécessaire de s'assurer de la stabilité à moyen et long terme des systèmes développés, que ce soit pour le système nanoparticulaire seul ou pour le vecteur complexe. . Ces analyses nécessiteront de renforcer l'étape analytique par le dosage de l'efficacité d'encapsulation tant par la méthode indirecte que nous avons fait le choix de privilégier au cours de cette thèse, que par la méthode directe qui nécessite aujourd'hui des mises au point. De plus, les études de libération en milieux simulés doivent être complétées afin d'obtenir un nombre suffisant d'essais pour avoir des résultats représentatifs. D'un point de vue *in vivo* la biodisponibilité offerte par les particules libres (administration intraduodénale) et encapsulées dans le vecteur complet (administration par voie orale) doit être évaluée en encapsulant du peptide-C car celui-ci ne subit pas le métabolisme de premier passage hépatique. Cependant, cette étape n'est pas envisageable sur des lots précliniques et pourrait donner des résultats faussés liés à une formulation de C-peptide qui ne contient pas d'additifs contrairement aux autres formulations réalisées.

Enfin, cette étude de vectorisation d'insuline pour son administration par voie orale à l'aide d'un vecteur complexe n'est qu'une première étape. En effet, l'approche du vecteur pharmaceutique complexe peut ensuite être appliquée à d'autres principes actifs qui présentent les mêmes problématiques d'administration que l'insuline comme le GLP-1 de nature protéique également ou l'héparine qui est un glycosaminoglycane. Enfin, dans d'autres projets développés par le Ceed sur l'étude de composés bioactifs ayant un intérêt thérapeutique dans le traitement du diabète, il a souvent été mis en évidence une problématique de biodisponibilité de ces principes actifs par voie orale, notamment lors d'études sur des extraits antioxydants de nature lipophile. Leur formulation dans un vecteur pharmaceutique complexe pourrait donc être la solution.

**VI. Valorisation des compétences « Nouveau Chapitre de la
thèse » NCT®**

1. Introduction

D'aussi loin que je puisse me souvenir, j'ai toujours été passionné par les sciences et la technologie. Déjà petit je me souviens encore entrain d'essayer de comprendre et de résoudre des problèmes liés à la stabilité de structures réalisées avec un jeu de construction.

Je me suis beaucoup intéressé à la recherche et au développement de beaucoup de choses allant des médicaments, de l'automobile à l'aérospatial passant par les appareils d'imagerie médicale, du chemin de fer etc....

Compte tenu de mon jeune âge, ma seule source de documentation était la télévision. Je ne manquais aucun épisode de mon émission favorite était «C'est pas sorcier».

Au collège j'excelsais dans les sciences de la vie et de la terre ainsi qu'en mathématiques, mais je ne savais pas vraiment ce que je voulais faire dans la vie. Une chose était certaine, je voulais faire un métier ou j'aurai à construire des «choses» comme il me plaisait de dire.

Outre l'aspect technique il me plaisait l'idée de gérer un budget et d'avoir des responsabilités au sein de la famille. Assez tôt mes parents m'ont formé en quelques sorte, la première étape fût la mise en ma disposition du budget mensuel pour assurer les dépenses familiales récurrentes «pain, boissons etc...». A 14ans j'ai été envoyé en France pour les études, je devais gérer l'argent que mes parents m'avaient donné pour m'assurer le nécessaire du quotidien.

A l'université je visais l'industrie du médicament sans vraiment savoir ce que c'était ni quoi y faire. Mon master à la faculté de pharmacie de Strasbourg fût le déclic est m'a donné la passion du médicament et de son développement.

Lors d'une intervention de ma directrice de thèse dans ma promotion de master le sujet exposé m'a tout de suite plu et je me suis directement projeter dedans.

Pour résumer, en y réfléchissant mon histoire détermine déjà mes objectifs de carrière. Je voudrais concilier mes deux passions : le côté scientifique et le côté gestionnaire.

Grâce à ma thèse, actuelle j'embrasse un peu ce rêve de carrière. Cette envie me permet aujourd'hui de m'investir dans diverses activités annexes à mon parcours universitaire comme l'obtention d'un poste de vice-président de l'association des étudiants de l'université de Bordeaux 1, mon investissement dans l'association des docteurs et doctorants d'Alsace en tant que responsable politique doctorale, mon implication dans le conseil de l'école doctorale en tant que représentant des doctorants et mes diverses participations à des événements en vue de la création d'entreprise comme les Doctoriales d'Alsace, Alsace-Tech, le concours SEMIA ou encore le Start-up week-end.

La volonté de réunir ma passion pour la recherche et le développement et mon appétence pour le management et la gestion d'entreprise et de projet au sein d'un même plan de carrière me pousse à prendre part à cette nouvelle édition du nouveau chapitre de la thèse (NCT).

2. Cadre général et enjeux de la thèse

2.1. Cadre général

Le diabète est ce que l'on appelle une maladie métabolique c'est à dire un dérèglement de la régulation du métabolisme de l'organisme. Celle-ci se traduit par une forte quantité de sucre dans le sang due à une diminution (dans le cas du diabète de type 2) voir une absence (dans le cas du diabète de type 1) de la production de l'insuline. Cette dernière est l'hormone produite par des cellules spécifiques du pancréas qui doit assurer la régulation du taux de sucre dans le sang.

C'est une pathologie qui touche environ 365 millions de personnes dans le monde dont 2,9 millions en France. L'organisation mondiale de la santé prévoit une constante augmentation de ce chiffre pour atteindre 438 millions en 2030 soit 7% de la population mondiale.

A l'heure actuelle, dans leur prise en charge, les patients doivent soit recevoir une greffe totale de pancréas ou de cellules productrices d'insuline isolées à partir d'un pancréas et transplantées dans le foie ou encore s'injecter en sous cutanée plusieurs fois par jour une solution d'insuline afin de réguler leur glycémie grâce à des seringues ou des pompes. Ces méthodes de prise en charge sont extrêmement difficiles pour les patients car très contraignantes, peu confortables et extrêmement douloureuses.

2.2. Cadre de recherche du CeeD

Mes travaux se font au sein du Centre européen d'étude du Diabète (CeeD), dont les recherches s'orientent vers une amélioration des protocoles d'isolement et de transplantation des cellules productrices d'insuline, mais aussi la recherche de sites receveurs plus optimaux pour la transplantation ainsi que le développement de voies alternatives pour l'administration de l'insuline.

2.3. Contexte sociologique et scientifique de la thèse

Des chercheurs du monde entier ont proposé plusieurs autres voies pour administrer l'insuline que la voie sous cutanée dont la voie orale. Cette dernière est plus physiologique et présente l'avantage d'offrir ce qu'on appelle le premier passage hépatique. Tous les éléments absorbés par l'intestin comme les nutriments et les molécules pharmacologiques passent par le

foie qui les métabolise avant leur accès dans la circulation générale. Le foie est un site qui peut être défini de «checkpoint» pour tout élément exogène. Mais la voie orale présente deux limites majeures, en effet, du fait de sa nature protéique, l'insuline est sensible l'acidité de l'estomac d'une part et de l'autre part la paroi de l'intestin représente une barrière physique qui empêche l'insuline de rejoindre le sang.

Le Centre européen d'étude du Diabète en collaboration avec ses partenaires académique et industriel développent le système breveté du vecteur pharmaceutique complexe. Celui-ci est basé sur la double encapsulation de l'insuline. En effet, celle-ci est encapsulée dans des nanostructures appelées nanoparticules qui sont en fait des capsules avec une enveloppe polymérique. Ces nanoparticules vont protéger l'insuline dans l'intestin et lui permettre de traverser la barrière intestinale grâce à leurs propriétés mucoadhésives. Les nanoparticules sont-elles même protégées dans une gélule gastrorésistante qui va les protéger contre l'acidité de l'estomac.

A ce jour des grands laboratoires essayent de développer un système leur permettant d'administrer l'insuline par voie orale.

2.4. Mon rôle dans le projet

A ce jour nous avons des nanoparticules qui encapsulent efficacement l'insuline. Mon rôle dans ce projet est d'optimiser les méthodes de synthèse de ces nanoparticules et de procéder à des modifications de leurs propriétés de surface pour augmenter leur propriété mucoadhésive. Je dois également valider d'un point de vue physico-chimique la faisabilité, la répétabilité des méthodes de synthèse en prenant en considération les besoins de l'industriel dans sa phase d'augmentation d'échelle. J'ai pour mission également de valider en in vitro, en in vivo et en ex vivo leur biofonctionnalité et l'absence de toxicité de ce système particulière. Qui sont des données importantes pour la constitution du dossier d'autorisation de mise sur le marché. Les particules seront comparées et les meilleurs systèmes seront introduits dans le système complet.

La prochaine étape est la production industrielle des nanoparticules les plus optimisées pour des essais sur le gros animal, soit le mini porc. A la suite de quoi les premiers essais sur l'homme seront réalisés.

2.5. Mon intérêt pour le projet

Mon choix s'est porté sur ce projet pour la réalisation de ma thèse pour quatre raisons:

- Son caractère multidisciplinaire : j'ai la possibilité d'acquérir de nombreuses compétences autant en biologie qu'en chimie. J'ai la possibilité d'interagir avec des

experts de différents domaines qui partagent avec moi leurs connaissances et leurs expertises.

- Son caractère appliqué et la relation avec l'industriel : ce projet vise à développer un dispositif médical en collaboration avec un industriel. Le développement de ce dispositif implique un respect des contraintes liées au développement pharmaceutique et à la réglementation en vigueur.
- Premiers pas dans l'apprentissage du management de projet : Le Dr Séverine SIGRIST m'a laissé libre court dans la gestion de mon projet de thèse. Après avoir défini avec elle lors d'une première réunion les objectifs à atteindre, elle m'avait demandé de définir les sous projets, les livrables ainsi que la liste des ressources humaines et le découpage dans le temps. C'était un exercice pratique très intéressant et extrêmement formateur car ce fût une application concrète de ma formation de planification de projet suivie lors de mon master. Exercice à la suite duquel j'ai commencé à prendre conscience de ce que je veux vraiment faire après la thèse. J'ai ainsi défini les sous projets, les tâches et les livrables ainsi que le temps nécessaire à l'obtention des résultats ainsi que des personnes à qui je dois faire appel pour la bonne marche du projet.

3. Gestion et coût du projet

Ma thèse est financée par les fonds propres du Centre européen d'étude du Diabète qui me permettent de me focaliser entièrement sur mes travaux de recherches et de suivre les formations transversales.

Compte tenu de l'organisation au sein de la structure du centre européen d'étude du diabète, il y a certains frais qui sont englobé dans le fonctionnement général. De ce fait, les frais relatifs au fonctionnement de la structure (électricité, gardiennage, internet, téléphone, reprographie etc...) et à l'équipement général (ordinateurs, logiciels, le consommable de laboratoire et le matériel de bureau) ne sont pas détaillés dans le tableau ci-dessous. Celui-ci récapitule le coût financier de la thèse à mi-parcours à travers cinq thématiques :

	Nature de la dépense	Coûts totaux à mi-parcours (euros TTC)			
		Nombre d'unités	Coût unitaire moyen	Quote-part utilisation	Total
1.	Ressources Humaines				
1.1	Doctorant	2373	16,68	100	31 815,00
1.2	Encadrant 1	450	63,99	20	8 254,00
1.3	Autre personnel (hors sous-traitance)	364	12,27	20	4 466,28
1.4	Master	840		100	2 616,00
1.5	Sous-total Ressources Humaines				47 151,28
2.	Consommables				
2.1	Fournitures expérimentales				88 559,01
2.2	Autres achats				27 000,00
2.3	Sous-total consommables				115 559,01
3.	Déplacements				
3.1	Missions en France				3 179,90
3.2	Congrès en France				928,26
3.3	Sous-total Déplacements				4 108,16
4.	Formation				
4.1	Formations				5 645,00
4.2	Autres frais (inscription Université, sécurité sociale,,,))				0,00
4.3	Sous-total Formations				5 645,00
5.	Documentation et communication				
5.1	Publicité, communication, impressions				120,00
5.2	Documentation (périodiques, bases de données...)				
5.3	Autres				
5.4	Sous-total Documentation et communication				120,00
5.	Charges exceptionnelles				0,00
5.1	Sous-total charges exceptionnelles				0,00
6.	Total				172 583,45

4. Compétences et savoir faire

Au cours de mon expérience personnelle, professionnelle et scolaire j'ai acquis un certain nombre de compétences qui peuvent être en partie ou totalement transférables dans le monde de l'entreprise.

4.1. Compétences managériales, humaines et de gestion financière

Le management et la planification de projet sont la clé de voûte de ma future carrière. C'est une compétence que je développe tout au long de ma thèse en apprenant à adapter le planning et le management à la réalité quotidienne. Outre mon activité principale de doctorat, je m'exerce en participant à des événements/concours de création d'entreprise et de planification de projet comme les «concours SEMIA», «Alsace Tech.», «Start-up Week-end» et les Doctoriales® d'Alsace.

4.2. Compétences en communication et humaines

La participation à ses événements ainsi que ma thèse m'ont donné la possibilité de travailler en équipe avec des membres qui ne sont pas du même domaine, de la même culture ou de la même langue que moi. Cela a été une expérience enrichissante et particulièrement plaisante.

Ma désignation par les membres de l'équipe comme porteur et manager de projet lors de ces événements m'a permis de mettre en pratique ma formation à la communication et de planification de projet ainsi que la gestion d'équipe et des conflits au sein du groupe (différentes personnalités au sein de l'équipe). J'ai acquis une expérience en encadrement d'équipe, de les coacher de les garder motivés dans l'intérêt de l'objectif fixé.

Dans cette même ligne j'ai actuellement un stagiaire en master 2 de pharmacologie qui est sous ma responsabilité avec qui je planifie et conduit un sous projet de ma thèse pour son master. Ce stagiaire a fait un retour positif à mon sujet au Dr SIGRIST en mentionnant ma disponibilité et ma volonté de conduire avec lui le projet. Je me tiens à son entière disposition pour trouver des solutions aux problèmes qu'il peut rencontrer au quotidien afin que nous puissions délivrer les livrables à temps selon les conditions définies par la planification.

Je prends part dans une association, l'ADDAL qui est l'association des docteurs et doctorants d'Alsace ou je suis responsable de la politique doctorale. Je m'efforce de me tenir au service des doctorants en leur apportant mon aide et mon soutien dans leurs démarches et en cas de conflits avec leurs supérieurs. Dans cette association je suis force de proposition et participe activement à la vie de l'association et des doctorants en allant à leur rencontre. Je suis aussi

investi d'une fonction de représentant des doctorants au conseil scientifique de l'école doctorale ou je participe à la prise de décision concernant le doctorat.

Je me suis découvert une aptitude à un investissement total dans le but d'atteindre les objectifs fixés. Je suis toujours volontaire pour participer à des rencontres pour définir d'une nouvelle stratégie soit au sein de l'association soit au sein d'organismes comme le SEMIA qui m'a convié à une réunion pour la définition d'une nouvelle stratégie d'évolution de l'incubateur.

Au sein de mon laboratoire je coordonne les relations expérimentales entre les différents participants du projet. Je prends contact avec eux et organise les expériences et l'achat de matériels.

En règle générale je suis chargé de la présentation du projet insuline orale lors des journées portes ouvertes, visite des médecins prescripteurs, journée des bénévoles du Ceed.

4.3. Compétences en gestion financière

J'ai acquis des compétences en établissement des tableaux financiers prévisionnels dans le cadre de la réalisation d'un projet avec une estimation des coûts et de la rentabilité. Compétences que je mets en application au quotidien pour gérer mes avoirs et financer des projets personnels en me servant d'un tableau financier sur lequel j'alloue un budget à chaque poste de dépense et ainsi définir le montant à économiser.

Au sein du laboratoire j'ai été au cœur de l'acquisition de matériels onéreux et indispensables à la marche du projet. J'ai pris contact avec les fournisseurs, négocié les prix, fait jouer la concurrence entre fabricants pour tirer le prix des produits vers le bas pour rentrer dans le budget alloué par le laboratoire. C'est ainsi que le laboratoire a acquis un système d'organe isolé et un granulomètre.

4.4. Compétences administratives

D'un point de vue administratif je suis réactif et organisé. Très jeune j'ai appris à gérer mon compte en banque à payer mes factures, loyer, et me présenter à la préfecture tous les ans pour l'obtention de mon titre de séjour. Autre exemple j'ai récemment acquis la nationalité française qui est un parcours administratif assez difficile.

D'un point de vue personnel je suis très créatif j'ai toujours des idées de création d'entreprise d'où ma participation aux concours SEMIA, Start-up week-end.

4.5. Compétences techniques et scientifiques

Mes compétences scientifiques sont le fruit de ma formation en sciences de la vie et de la santé ainsi que de ma thèse de doctorat. Ma thèse m'a permis d'acquérir des compétences dans des techniques de pointes dans le développement de médicaments. Des techniques qui permettent de répondre à la demande de l'industrie pharmaceutique qui à l'heure actuelle essaie de vectoriser des composants d'origine biotechnologique. Ma formation universitaire m'a également permis de suivre des formations sanctionnées par des examens qui me confèrent des connaissances mise en application pour les transformer en compétences.

Compétences scientifiques	Techniques	Management de la science
<ul style="list-style-type: none">– Statistique– Toxicologie– Pharmacocinétique-pharmacodynamique– Expérimentation animale– Métabolomique– pharmacie galénique– Biologie cellulaire– Biologie animale	<ul style="list-style-type: none">– Contrôle qualité des produits finis– Pharmacocinétique-pharmacodynamique– Expérimentation animale– Toxicologie– HPLC– Interaction ligand-récepteur (binding)– Validation <i>In vitro</i>– Validation <i>In vivo</i>– Validation <i>Ex vivo</i>– Synthèse de nanoparticules– Caractérisation de nanoparticules– Modification de la surface des nanoparticules	<ul style="list-style-type: none">– Planification et management de projet– Expérimentation animale– Utilisation de bases de données comme PubMed– Veille scientifique et de brevet– Gestion de la bibliographie (EndNote, Zotero)– Encadrement (stagiaire)– Communication– Interaction avec mon équipe– Interaction avec d'autres équipes

En dehors de mon domaine pharmaceutique, les compétences listées dans ce documents me permettent de pouvoir intégrer d'autres secteurs d'activités comme l'automobile, l'aéronautique, la logistique car nécessite une compétence en gestion.

5. Résultats et impacts de la thèse

L'aboutissement de ce projet sera une avancée majeure dans la prise en charge du diabète. Car facilitera la prise de l'insuline et limitera les effets secondaires liés à la prise d'insuline comme les hypoglycémies sévères.

Outre l'aspect de santé publique, la technologie de l'insuline orale représente une source et une manne financière importante, raison pour laquelle, bon nombre de laboratoires essayent de formuler de l'insuline orale.

Les premiers résultats démontrent la faisabilité technique et l'efficacité du système nanoparticulaire. En effet, les études sur le petit animal de laboratoire ont démontré l'efficacité des nanoparticules en réduisant le taux de glucose circulant chez le modèle de rat diabétique et ne montrant aucun effet toxique ni sur les cellules ni sur l'animal entier.

La mise sur le marché de ce système permettra une rentrée importante de fonds pour le laboratoire et permettra de financer les projets en cours et d'en faire de nouveaux.

Pour moi l'aboutissement de cette thèse m'aura donné les bagages nécessaires et indispensables à mon insertion professionnelle. Cette thèse m'a permis de me conforter dans mon choix de carrière d'allier la recherche et le développement, la planification et gestion de projet. Cette expérience m'a permis de prendre conscience de mes points faibles et sur lesquels je vais travailler pour m'améliorer et de les corriger avant la fin de la thèse :

- apprendre réagir avec un peu d'humour pour désamorcer les tensions lors des provocations
- apprendre à prendre le temps de m'occuper de la partie administrative et ne pas me focaliser sur la course aux résultats car cela me met en retard.

6. Pistes professionnelles

6.1. Identification des pistes professionnelles

Pour l'heure actuelle je suis en prospection dans le monde entier d'un poste qui correspond à mon profil. Je souhaite un poste où je peux allier planification management de projet et R&D.

J'ai pour l'heure commencé à m'intéresser aux start-up qui se créent dans le bassin du Rhin (Alsace, Allemagne et Suisse). Je souhaite intégrer une entreprise dans son stade de développement dans le secteur pharmaceutique et des dispositifs médicaux afin de participer à la prospection et aux levées de fonds, la définition et la mise en place des stratégies de développement.

Et en second lieu les entreprises qui essayent de s'implanter à Dakar. En effet, lors de l'implantation ces entreprises ont besoin de personnes pour conduire les projets en cours car il y a tout à faire. Cela représente pour moi un challenge intéressant car il va falloir adapter les enseignements et les méthodes de travail européens à la réalité locale. Mes recherches sur le Web m'indiquent des laboratoires comme Sanofi qui a un site de production à Dakar, GSK, Pfizer, Institut Pasteur et l'institut de recherche pour le développement géré par le ministère des affaires étrangères français.

Mon réseau professionnel se constitue pour l'instant sur Linked In mais aussi les relations nouées avec les collaborateurs et leur propre réseau.

6.2. Projet de centre de recherche à Dakar.

J'ai actuellement un projet en maturation pour Dakar sur lequel j'essaie de travailler. Ce projet est né de la connaissance du caractère original de la société dans laquelle j'effectue ma thèse. Je souhaite développer à Dakar une structure similaire au Ceed.

Celle-ci ne sera pas une copie conforme du Ceed car ce n'est pas la le but. Au Sénégal actuellement il y'a un grand nombre de diabétiques avec une prise en charge médiocre voir mauvaise. Outre le diabète il y'a d'autre maladie non ou mal prise en charge. Il y'a un défaut de formation, d'information et de diagnostic.

Raison pour laquelle j'ai imaginé le Centre Afrique Diabète et Diagnostic, qui est une structure qui va avoir une composante destinée à la formation des patients et de prévention, une composante de location et d'entretien des pompes à insuline, un pole diagnostic équipé de l'instrumentation d'imagerie médicale (scanner, IRM etc...)

Une composante de sous traitance pour de la validation in vitro, in vivo et ex vivo de candidats médicaments pour le compte de grands groupes pharmaceutiques.

Avec une finalité de centre de recherche clinique pour des essais cliniques de phase II et III. Pour cela dès la conception du projet je dois intégrer dans la planification l'accréditation AAALAC, ISO 9001, ANSM et FDA.

Pour la levée de fonds je pense déposer des demandes de financement auprès de partenaires industriels pharmaceutique, OMS, Aide au développement européen, Aide au développement ONU, ministère local de la santé (avec le moins de financement publique étatique possible pour éviter toute ingérence et corruption).

Un grand merci à Jean-Jacques HINCKER
pour sa patience et ses précieux conseils.

Une pensée amicale pour Jennifer, Vivian,
Timothée et Yannick avec qui j'ai suivi
cette très riche expérience du NCT.

Un grand merci à Séverine et Richard
pour leurs conseils, leur soutien et
surtout pour m'avoir transmis le virus
de l'entrepreneuriat.

VII. Bibliographie

Abbad, S., Zhang, Z., Waddad, A.Y., Munyendo, W.L.L., Lv, H., and Zhou, J. (2015). Chitosan-Modified Cationic Amino Acid Nanoparticles as a Novel Oral Delivery System for Insulin. *J Biomed Nanotechnol* 11, 486–499.

Adjei, A. L., Gupta, P. K., & Lee, D. Y. (1997). *U.S. Patent No. 5,635,161*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

AFSSAPS, *Recommandations relatives à l'évaluation toxicologique des médicaments*

Agarwal, V., Reddy, I. K., & Khan, M. A. (2001). Polymethacrylate based microparticulates of insulin for oral delivery: preparation and in vitro dissolution stability in the presence of enzyme inhibitors. *International journal of pharmaceutics*, 225(1), 31-39.

Agnihotri, S.A., Mallikarjuna, N.N., Aminabhavi, T.M., 2004. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *J. Control. Release* 100, 5–28.

Alba, A., Puertas, M.C., Carrillo, J., Planas, R., Ampudia, R., Pastor, X., Bosch, F., Pujol-Borrell, R., Verdaguer, J., and Vives-Pi, M. (2004). IFN Accelerates Autoimmune Type 1 Diabetes in Nonobese Diabetic Mice and Breaks the Tolerance to Cells in Nondiabetes-Prone Mice. *The Journal of Immunology* 173, 6667–6675.

Almeida, A., and Souto, E. (2007). Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins☆. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59, 478–490.

Al-Tabakha, M.M., and Arida, A.I. (2008). Recent Challenges in Insulin Delivery Systems: A Review. *Indian J Pharm Sci* 70, 278–286.

Al-Tabakha, M.M., Arida, A.I., 2008. Recent challenges in insulin delivery systems: a review. *Indian J. Pharm. Sci.* 70, 278–286.

Aoki, R., Wada, M., Takesue, N., Tanaka, K., Yokota, A., 2005. Enhanced glutamic acid production by a H⁺-ATPase-defective mutant of *Corynebacterium glutamicum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 1466–1472.

Arai, K., Kinumaki, T., & Fujita, T. (1968). Toxicity of chitosan. *Bull. Tokai. Region. Fish. Res. Lab.*, (56), 89-94.

Atlas-poster-2014_FR.pdf. *Fédération internationale du diabète, 2014), IDF Diabetes Atlas Sixth Edition Update, International Diabetes Federation 2014*

Babou-Kammoe, R., Hamoudi, S., Larachi, F., and Belkacemi, K. (2012). Synthesis of CaCO₃ nanoparticles by controlled precipitation of saturated carbonate and calcium nitrate aqueous solutions. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 90, 26–33.

Baheti, A., Kumar, L., and Bansal, A.K. (2010). Excipients used in lyophilization of small molecules. *Journal of Excipients and Food Chemicals* 1, 41–54.

Barbi, M.D.S., Carvalho, F.C., Kiill, C.P., Barud, H.D.S., Santagneli, S.H., Ribeiro, S.J.L., and Gremião, M.P.D. (2015). Preparation and Characterization of Chitosan Nanoparticles for Zidovudine Nasal Delivery. *J Nanosci Nanotechnol* 15, 865–874.

Becquemin, M.-H., and Chaumuzeau, J.-P. (2010). Inhaled insulin: A model for pulmonary systemic absorption? *Revue Des Maladies Respiratoires* 27, e54–e65.

Belcourt, A., Danicher, L., Frère, Y., 2004. Vector for oral administration. Patent WO2004096172.

Benoit J.P. and Richaud J., Microencapsulation, Réf.J2210. *Techniques de l'ingénieur*, ed Weka. 2000.

Blanchette, J., Kavimandan, N., and Peppas, N.A. (2004). Principles of transmucosal delivery of therapeutic agents. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 58, 142–151.

Blickle, J.F., Attali, J.R., Barrou, Z., Brocker, P., De Rekeneire, N., Verny, C., and Leutenegger, M. (1999). Le diabète du sujet âgé. *Diabetes Metab* 25, 84–93.

Bliclé JF. Traitements oraux du diabète, *Encycl Med Chir (Elsevier Paris) Endocrinologie Nutrition* 10 366 R 20 1999 14p

Bohr, A., Water, J., Beck-Broichsitter, M., and Yang, M. (2015). Nanoembedded microparticles for stabilization and delivery of drug-loaded nanoparticles. *Curr. Pharm. Des.*

Boucaud, A., Garrigue, M.A., Machet, L., Vaillant, L., and Patat, F. (2002). Effect of sonication parameters on transdermal delivery of insulin to hairless rats. *Journal of Controlled Release* 81, 113–119.

Bungenberg de Jong HG and Kruyt HR. Coacervation (partial miscibility in colloid systems). *Proc. Koninkl. Med. Akad. Wetenschap.* 1929; 32: 849-856.

Burgess D. J. Practical Analysis of Complex Coacervate Systems *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol. 140, No. 1, November 1990

Buzzai, M., Jones, R.G., Amaravadi, R.K., Lum, J.J., DeBerardinis, R.J., Zhao, F., Viollet, B., and Thompson, C.B. (2007). Systemic Treatment with the Antidiabetic Drug Metformin Selectively Impairs p53-Deficient Tumor Cell Growth. *Cancer Research* 67, 6745–6752.

CALLET Adeline_ Administration orale d'insuline par double encapsulation : développement du système nanoparticulaire par coacervation complexe insuline / chitosane, 2010.

Chang, K.-L., Higuchi, Y., Kawakami, S., Yamashita, F., and Hashida, M. (2010). Efficient Gene Transfection by Histidine-Modified Chitosan through Enhancement of Endosomal Escape. *Bioconjugate Chem.* 21, 1087–1095.

Chang, M., Li, X., Sun, Y., Cheng, F., Wang, Q., Xie, X., Zhao, W., and Tian, X. (2013). Effect of Cationic Cyclopeptides on Transdermal and Transmembrane Delivery of Insulin. *Molecular Pharmaceutics* 10, 951–957.

Chaturvedi, M., Kumar, M., and Pathak, K. (2011). A review on mucoadhesive polymer used in nasal drug delivery system. *J Adv Pharm Technol Res* 2, 215–222.

Chaudhury, A., and Das, S. (2010a). Recent Advancement of Chitosan-Based Nanoparticles for Oral Controlled Delivery of Insulin and Other Therapeutic Agents. *AAPS PharmSciTech* 12,

10–20.

Chaudhury, A., and Das, S. (2010b). Recent Advancement of Chitosan-Based Nanoparticles for Oral Controlled Delivery of Insulin and Other Therapeutic Agents. *AAPS PharmSciTech* 12, 10–20.

Chaudhury, A., Das, S., 2010. Recent advancement of chitosan-based nanoparticles for oral controlled delivery of insulin and other therapeutic agents. *AAPS PharmSciTech* 12, 10–20.

Chen, J., Liu, C., Shan, W., Xiao, Z., Guo, H., and Huang, Y. (2015). Enhanced stability of oral insulin in targeted peptide ligand trimethyl chitosan nanoparticles against trypsin. *Journal of Microencapsulation* 1–10.

Chen, J., Liu, C., Shan, W., Xiao, Z., Guo, H., and Huang, Y. (2015). Enhanced stability of oral insulin in targeted peptide ligand trimethyl chitosan nanoparticles against trypsin. *Journal of Microencapsulation* 1–10.

Chen, J., Liu, C., Shan, W., Xiao, Z., Guo, H., and Huang, Y. (2015). Enhanced stability of oral insulin in targeted peptide ligand trimethyl chitosan nanoparticles against trypsin. *Journal of Microencapsulation* 1–10.

Choi, E. H., Lee, S. H., Ahn, S. K., & Hwang, S. M. (1999). The pretreatment effect of chemical skin penetration enhancers in transdermal drug delivery using iontophoresis. *Skin Pharmacology and Physiology*, 12(6), 326-335.

Chronopoulou, L., Massimi, M., Giardi, M.F., Cametti, C., Devirgiliis, L.C., Dentini, M., and Palocci, C. (2013). Chitosan-coated PLGA nanoparticles: A sustained drug release strategy for cell cultures. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 103, 310–317.

Chu, C.-H., Wang, Y.-C., Huang, H.-Y., Wu, L.-C., and Yang, C.-S. (2011). Ultrafine PEG-coated poly(lactic- co -glycolic acid) nanoparticles formulated by hydrophobic surfactant-assisted one-pot synthesis for biomedical applications. *Nanotechnology* 22, 185601.

Chung, T.-W., Wang, S.-S., and Tsai, W.-J. (2008). Accelerating thrombolysis with chitosan-coated plasminogen activators encapsulated in poly-(lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles. *Biomaterials* 29, 228–237.

Coppieters, K.T., Dotta, F., Amirian, N., Campbell, P.D., Kay, T.W.H., Atkinson, M.A., Roep, B.O., and von Herrath, M.G. (2012). Demonstration of islet-autoreactive CD8 T cells in insulinitic lesions from recent onset and long-term type 1 diabetes patients. *Journal of Experimental Medicine* 209, 51–60.

Costantino, L. (2010). Drug delivery to the CNS and polymeric nanoparticulate carriers. *Future Medicinal Chemistry* 2, 1681–1701.

Cynthia M. Ripsin, MD, Helen Kang, MD; and Randall J. Urban, MD, Management of Blood Glucose in Type 2 Diabetes Mellitus - American Family Physician. *Am Fam physician*. 2009 Jan 1;79(1):29-36.

Dance Biopharm Announces Encouraging Clinical Data for Adagio™-- Inhalable Insulin Product Candidate for Diabetes.

de Kruif, C.G., Weinbreck, F., and de Vries, R. (2004). Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 9, 340–349.

de Moura, M.R., Aouada, F.A., Avena-Bustillos, R.J., McHugh, T.H., Krochta, J.M., and Mattoso, L.H.C. (2009). Improved barrier and mechanical properties of novel hydroxypropyl methylcellulose edible films with chitosan/tripolyphosphate nanoparticles. *Journal of Food Engineering* 92, 448–453.

Diabète : comment éviter les complications. *Le Figaro*, 02/10/12

Diana, J., Simoni, Y., Furio, L., Beaudoin, L., Agerberth, B., Barrat, F., and Lehuen, A. (2012). Crosstalk between neutrophils, B-1a cells and plasmacytoid dendritic cells initiates autoimmune diabetes. *Nature Medicine* 19, 65–73.

Diop M., Auberval N., A. Viciglio, A. Langlois, W. Bietiger, C. Mura, C. Peronet, A. Bekel, D. Julien David, M. Zhao, M. Pinget, N. Jeandidier, C. Vauthier, E. Marchioni, Y. Frere, S. Sigrist, Design, characterisation, and bioefficiency of insulin–chitosan nanoparticles after stabilisation by freeze-drying or cross-linking *International Journal of Pharmaceutics* 491 (2015) 402–408

El-Dakrouri, W.A., Ibrahim, H.K., Ghorab, M.K., and Ghorab, M.M. (2010). Enhancement of the intranasal delivery of insulin via a novel mucoadhesive Carbopol gel. J. Pharm. Pharmacol. 62, 866–872.

El-Dakrouri, W.A., Ibrahim, H.K., Ghorab, M.K., and Ghorab, M.M. (2010). Enhancement of the intranasal delivery of insulin via a novel mucoadhesive Carbopol gel. *J. Pharm. Pharmacol.* 62, 866–872.

Fasano, A., and Uzzau, S. (1997). Modulation of intestinal tight junctions by Zonula occludens toxin permits enteral administration of insulin and other macromolecules in an animal model. *Journal of Clinical Investigation* 99, 1158–1164.

Fischer, S., Foerg, C., Merkle, H.P., and Gander, B. (2004). Chitosan Coated Plga-Microspheres-A Modular System for Targeted Drug Delivery. *Eur Cell Mater* 7, 11–12.

Fondjo, F., Kamgang, R., Oyono, J.-L., and Yonkeu, J. (2013). Anti-dyslipidemic and Antioxidant Potentials of Methanol Extract of *Kalanchoe crenata*; Whole Plant in Streptozotocin-induced Diabetic Nephropathy in Rats. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 11.

Foss, A.C., and Peppas, N.A. (2004). Investigation of the cytotoxicity and insulin transport of acrylic-based copolymer protein delivery systems in contact with caco-2 cultures. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 57, 447–455.

Foss, A.C., Goto, T., Morishita, M., and Peppas, N.A. (2004). Development of acrylic-based copolymers for oral insulin delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 57, 163–169.

Foss, A.C., Peppas, N.A., 2004. Investigation of the cytotoxicity and insulin transport of acrylic-based copolymer protein delivery systems in contact with caco-2 cultures. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57, 447–455.

Gaumet, M., Gurny, R., and Delie, F. (2010). Interaction of biodegradable nanoparticles with

intestinal cells: The effect of surface hydrophilicity. *International Journal of Pharmaceutics* 390, 45–52.

Generex Biotechnology, encouraging data, 2015 (http://www.avarx.com/getimage?_id=bucket7930974422659611102&Extent=AvaRx.SubDomains.Company272.Documents&fileName=Orallyn%20Factsheet%20June%2015,%202011%20_002%20copy.pdf)

Goldin, E., Ardite, E., Elizalde, J.I., Odriozola, A., Panes, J., Pique, J.M., and Fernandez-Checa, J.C. (1997). Gastric mucosal damage in experimental diabetes in rats: role of endogenous glutathione. *Gastroenterology* 112, 855–863.

Grabowski, N., Hillaireau, H., Vergnaud, J., Santiago, L.A., Kerdine-Romer, S., Pallardy, M., Tsapis, N., and Fattal, E. (2013). Toxicity of surface-modified PLGA nanoparticles toward lung alveolar epithelial cells. *International Journal of Pharmaceutics* 454, 686–694.

Gref, R., Lück, M., Quellec, P., Marchand, M., Dellacherie, E., Harnisch, S., Blunk, T., and Müller, R. (2000). “Stealth” corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 18, 301–313.

Guhmann P., Délivrance orale d’insuline par encapsulation : développement et évaluation de l’efficacité et de la sécurité des systèmes entériques et nanoparticulaires, 2013

GUILLAUSSEAU, P. Sulfamides hypoglycémiantes et apparentés et leur utilisation.

Guo, M., Rong, W.-T., Hou, J., Wang, D.-F., Lu, Y., Wang, Y., Yu, S.-Q., and Xu, Q. (2013a). Mechanisms of chitosan-coated poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for improving oral absorption of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin. *Nanotechnology* 24, 245101.

Harshad, P., Bhandari, A., and Shah, D. (2011). Recent techniques in nasal drug delivery: a review. *International Journal of Drug Development & Research* 31, 99–106.

Hartley, T., Brumell, J., and Volchuk, A. (2008). Emerging roles for the ubiquitin-proteasome system and autophagy in pancreatic β -cells. *AJP: Endocrinology and Metabolism* 296, E1–E10.

Heinemann, L. (2008). The failure of exubera: are we beating a dead horse? *Journal of Diabetes Science and Technology* 2, 518–529.

Henkin, R.I. (2010). Inhaled insulin—Intrapulmonary, intranasal, and other routes of administration: Mechanisms of action. *Nutrition* 26, 33–39.

Hinchcliffe, M., and Illum, L. (1999). Intranasal insulin delivery and therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 35, 199–234.

Hu, F.B. (2001). The role of N-3 polyunsaturated fatty acids in the prevention and treatment of cardiovascular disease. *Drugs of Today* 37, 49.

Huibi, X., Kaixun, H., and Qiuhua, G. (2002). Insulin spray for oral cavity and its prepn process.

Improving the stability of chitosan–gelatin-based hydrogels for cell delivery using

transglutaminase and controlled release of doxycycline - Online First - Springer.

Jean Yves Pabst, tiré de Vandamme Thierry, Poncelet Denis, Subra-Paternault pascale, Micro encapsulation : des sciences aux technologies, Lavoisier (2007), ISBN 978-2-7430-0976-2

Jianxin Guo, Q.P. Lei Zhang (2000). Transdermal Delivery of Insulin in Mice by Using Lecithin Vesicles as a Carrier. *Drug Delivery* 7, 113–116.

Jin, P., Li, F., Ruan, R., Zhang, L., Man, N., Hu, Y., Zhou, W., and Wen, L. (2014). Enhanced transdermal delivery of epidermal growth factor facilitated by dual peptide chaperone motifs. *Protein Pept. Lett.* 21, 550–555.

Jones, R.G., and Thompson, C.B. (2009). Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes & Development* 23, 537–548.

Khafagy, E.-S., Morishita, M., Onuki, Y., and Takayama, K. (2007). Current challenges in non-invasive insulin delivery systems: A comparative review. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59, 1521–1546.

Kharia, A.A., and Singhai, A.K. (2013). Controlled Release Drug Delivery System with Stomach Specific Mucoadhesive Nanoparticles. *Indian Journal of NanoScience* 1, 36–52.

Kim, D., Mudaliar, S., Chinnapongse, S., Chu, N., Boies, S.M., Davis, T., Perera, A.D., Fishman, R.S., Shapiro, D.A., and Henry, R. (2003). Dose-response relationships of inhaled insulin delivered via the Aerodose insulin inhaler and subcutaneously injected insulin in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 26, 2842–2847.

Kim, D., Mudaliar, S., Chinnapongse, S., Chu, N., Boies, S.M., Davis, T., Perera, A.D., Fishman, R.S., Shapiro, D.A., and Henry, R. (2003). Dose-response relationships of inhaled insulin delivered via the Aerodose insulin inhaler and subcutaneously injected insulin in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 26, 2842–2847.

Kim, Y.D., Park, K.-G., Lee, Y.-S., Park, Y.-Y., Kim, D.-K., Nedumaran, B., Jang, W.G., Cho, W.-J., Ha, J., Lee, I.-K., et al. (2008). Metformin Inhibits Hepatic Gluconeogenesis Through AMP-Activated Protein Kinase-Dependent Regulation of the Orphan Nuclear Receptor SHP. *Diabetes* 57, 306–314.

King, P., Peacock, I., and Donnelly, R. (1999). The UK Prospective Diabetes Study (UKPDS): clinical and therapeutic implications for type 2 diabetes. *British Journal of Clinical Pharmacology* 48, 643–648.

Ko, J.A., Park, H.J., Hwang, S.J., Park, J.B., and Lee, J.S. (2002). Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 249, 165–174.

Koukaras, E.N., Papadimitriou, S.A., Bikiaris, D.N., and Froudakis, G.E. (2012). Insight on the Formation of Chitosan Nanoparticles through Ionotropic Gelation with Tripolyphosphate. *Molecular Pharmaceutics* 9, 2856–2862.

Lamprecht, A., Ubrich, N., Yamamoto, H., Schäfer, U., Takeuchi, H., Maincent, P.,

Kawashima, Y., and Lehr, C.-M. (2001). Biodegradable Nanoparticles for Targeted Drug Delivery in Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *J Pharmacol Exp Ther* 299, 775–781.

Landry, Y., and Gies, J.-P. (2014). *Pharmacologie des cibles à la thérapeutique: cours et fiches thérapeutiques* (Paris: Dunod).

Lassmann-Vague, V., and Raccach, D. (2006). Alternatives routes of insulin delivery. *Diabetes & Metabolism* 32, 513–522.

Laurence Plapied, N.D. (2011). Fate of polymeric nanocarriers for oral drug delivery. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 16, 228–237.

Lemaire, K., and Schuit, F. (2012). Integrating insulin secretion and ER stress in pancreatic [beta]-cells. *Nature Cell Biology* 14, 979–981.

Li, C., *Protein hormones*, in *The proteins*, B.K. Neurath H, Editor. 1954, Acad. Press: Lilly Announces Termination of AIR Insulin Program (NYSE:LLY).

Lin, D., Li, G., Qin, L., Wen, Z., Wang, J., and Sun, X. (2013). Preparation, characterization and uptake of PEG-coated, muco-inert nanoparticles in HGC-27 cells, a mucin-producing, gastric-cancer cell line. *J Biomed Nanotechnol* 9, 2017–2023.

MAAROUFI, A., JBILOU, M., FAOUZI, M., KABBAJ, S. EL, and TIJANE, M. Effet de la metformine sur l'oxydation in vitro des LDL.

Makadia, H.K., and Siegel, S.J. (2011a). Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers* 3, 1377–1397.

Malkov, D., Angelo, R., Wang, H., Flanders, E., Tang, H., and Gomez-Orellana, I. (2005). Oral Delivery of Insulin with the eligen(™) Technology: Mechanistic Studies. *Current Drug Delivery* 2, 191–197.

Martanto, W., Davis, S.P., Holiday, N.R., Wang, J., Gill, H.S., and Prausnitz, M.R. (2004). Transdermal delivery of insulin using microneedles in vivo. *Pharmaceutical Research* 21, 947–952. Mary Ann Liebert, Inc. - Home.

Matteucci, E., Giampietro, O., Covolani, V., Giustarini, D., Fanti, P., and Rossi, R. (2015). Insulin administration: present strategies and future directions for a noninvasive (possibly more physiological) delivery. *Drug Design, Development and Therapy* 3109.

Meng, F.T., Ma, G.H., Qiu, W., and Su, Z.G. (2003). W/O/W double emulsion technique using ethyl acetate as organic solvent: effects of its diffusion rate on the characteristics of microparticles. *Journal of Controlled Release* 91, 407–416.

Mohammadpourdounighi, N., Behfar, A., Ezabadi, A., Zolfagharian, H., Heydari, M., 2010. Preparation of chitosan nanoparticles containing Naja naja oxiana snake venom. *Nanomedicine* 6, 137–143.

Morales, J.O., Huang, S., Williams, R.O., and McConville, J.T. (2014). Films loaded with insulin-coated nanoparticles (ICNP) as potential platforms for peptide buccal delivery. *Colloids*

and Surfaces B: Biointerfaces *122*, 38–45.

Moses, A.C., Gordon, G.S., Carey, M.C., and Flier, J.S. (1983). Insulin administered intranasally as an insulin-bile salt aerosol: effectiveness and reproducibility in normal and diabetic subjects. *Diabetes* *32*, 1040–1047.

Moses, R.G., Bartley, P., Lunt, H., O'Brien, R.C., Donnelly, T., Gall, M.-A., Vesterager, A., Wollmer, P., and Roberts, A. (2009). Safety and efficacy of inhaled insulin (AERx® iDMS1) compared with subcutaneous insulin therapy in patients with Type 1 diabetes: 1-year data from a randomized, parallel group trial. *Diabetic Medicine* *26*, 260–267.

Mudaliar, S. (2007). Inhaled insulin using AERx insulin Diabetes Management System (AERx iDMS). *Expert Opin Investig Drugs* *16*, 1673–1681.

Müller, M., Vörös, J., Csucs, G., Walter, E., Danuser, G., Merkle, H.P., Spencer, N.D., and Textor, M. (2003). Surface modification of PLGA microspheres. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* *66*, 55–61.

Nafee, N., Taetz, S., Schneider, M., Schaefer, U.F., and Lehr, C.-M. (2007). Chitosan-coated PLGA nanoparticles for DNA/RNA delivery: effect of the formulation parameters on complexation and transfection of antisense oligonucleotides. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* *3*, 173–183.

Nakajima A. and Sato H. Complex coacervation in sulfated polyvinyl alcohol-amino acetylated polyvinyl alcohol system *Colloid and Polymer Science*, Vol. 252. No. 4 New York. p. 636.

Nihant, N., Schugens, C., Grandfils, C., Jérôme, R., and Teyssié, P. (1994). Polylactide microparticles prepared by double emulsion/evaporation technique. I. Effect of primary emulsion stability. *Pharm. Res.* *11*, 1479–1484.

Nollevaux, G., Devillé, C., Moualij, B.E., Zorzi, W., Deloyer, P., Schneider, Y.-J., Peulen, O., and Dandrifosse, G. (2006). Development of a serum-free co-culture of human intestinal epithelium cell-lines (Caco-2/HT29-5M21). *BMC Cell Biology* *7*, 20.

Nuffer, W., Trujillo, J.M., and Ellis, S.L. (2015). Technosphere insulin (Afrezza): a new, inhaled prandial insulin. *Ann Pharmacother* *49*, 99–106.

Nuutila, J., and Lilius, E.-M. (2005). Flow cytometric quantitative determination of ingestion by phagocytes needs the distinguishing of overlapping populations of binding and ingesting cells. *Cytometry* *65A*, 93–102.

Olokoba, A.B., Obateru, O.A., and Olokoba, L.B. (2012). Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Current Trends. *Oman Med J* *27*, 269–273.

OMS | Diabète (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/fr/>).

Overbeek JTG, Voorn MJ. Phase separation in polyelectrolyte solutions. *Theory of Complex Coacervation. J. Cell. Comp. Physiol.* 1957; 49(1): 7-26.

Pandey, R., Ahmad, Z., Sharma, S., Khuller, G.K., 2005. Nano-encapsulation of azole antifungals: potential applications to improve oral drug delivery. *Int. J. Pharm.* *301*, 268–276.

Park, J., Mattessich, T., Jay, S.M., Agawu, A., Saltzman, W.M., and Fahmy, T.M. (2011). Enhancement of surface ligand display on PLGA nanoparticles with amphiphilic ligand conjugates. *Journal of Controlled Release* 156, 109–115.

Park, J.S., Han, T.H., Lee, K.Y., Han, S.S., Hwang, J.J., Moon, D.H., Kim, S.Y., and Cho, Y.W. (2006). N-acetyl histidine-conjugated glycol chitosan self-assembled nanoparticles for intracytoplasmic delivery of drugs: Endocytosis, exocytosis and drug release. *Journal of Controlled Release* 115, 37–45.

Parveen, S., Misra, R., and Sahoo, S.K. (2012). Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 8, 147–166.

Patel, V.F., Liu, F., and Brown, M.B. (2011). Advances in oral transmucosal drug delivery. *Journal of Controlled Release* 153, 106–116.

Paul W. Franks, Helen C. Looker, Sayuko Kobes, Leslie Touger, P. Antonio Tataranni, Robert L. Hanson, and William C. Knowler, Gestational Glucose Tolerance and Risk of Type 2 Diabetes in Young Pima Indian Offspring, *Diabetes*, Vol. 55, february 2006

Pawar, V.K., Meher, J.G., Singh, Y., Chaurasia, M., Surendar Reddy, B., and Chourasia, M.K. (2014). Targeting of gastrointestinal tract for amended delivery of protein/peptide therapeutics: Strategies and industrial perspectives. *Journal of Controlled Release* 196, 168–183.

Pillai, O., Nair, V., and Panchagnula, R. (2004). Transdermal iontophoresis of insulin: IV. Influence of chemical enhancers. *International Journal of Pharmaceutics* 269, 109–120.

Plapied, L., Vandermeulen, G., Vroman, B., Pr at, V., des Rieux, A., 2010. Bioadhesive nanoparticles of fungal chitosan for oral DNA delivery. *Int. J. Pharm.* 398, 210–218.

Polonsky, K.S. (2012). The Past 200 Years in Diabetes. *New England Journal of Medicine* 367, 1332–1340.

Présentation “Décembre 2005 Marc uzan hôpital j. Ducuing toulouse. 1 action et secretion de l’insuline. Insulines mises sur le marche. Indications et non indications.”

Qihua Gao, Zhonghong Gao, Kaixun Huang, Huibi Xu, Jilin Yang Spray buccal contenant de l’insuline et procede de preparation correspondant (WO 2003013589 A1)

Raja Abdul Ghafoor, M., Katas, H., and Jing Wen, T. (2015). Stability, Intracellular Delivery, and Release of siRNA from Chitosan Nanoparticles Using Different Cross-Linkers. *PLOS ONE* 10, e0128963.

Ramasamy, T., Tran, T.H., Cho, H.J., Kim, J.H., Kim, Y.I., Jeon, J.Y., Choi, H.-G., Yong, C.S., and Kim, J.O. (2014). Chitosan-Based Polyelectrolyte Complexes as Potential Nanoparticulate Carriers: Physicochemical and Biological Characterization. *Pharmaceutical Research* 31, 1302–1314.

Reix, N., Parat, A., Seyfritz, E., Van Der Werf, R., Epure, V., Ebel, N., Danicher, L., Marchioni, E., Jeandidier, N., Pinget, M., et al. (2012). In vitro uptake evaluation in Caco-2 cells and in

vivo results in diabetic rats of insulin-loaded PLGA nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 437, 213–220.

Rekha, M.R., and Sharma, C.P. (2009). Synthesis and evaluation of lauryl succinyl chitosan particles towards oral insulin delivery and absorption. *J Control Release* 135, 144–151.

Rekha, M.R., Sharma, C.P., 2009. Synthesis and evaluation of lauryl succinyl chitosan particles towards oral insulin delivery and absorption. *J. Control. Release* 135, 144–151.

Renukuntla, J., Vadlapudi, A.D., Patel, A., Boddu, S.H., Mitra, A.K., 2013. Approaches for enhancing oral bioavailability of peptides and proteins. *Int. J. Pharm.* 447,75–93.

Rodrigues, S., Cordeiro, C., Seijo, B., Remuñán-López, C., and Grenha, A. (2015). Hybrid nanosystems based on natural polymers as protein carriers for respiratory delivery: Stability and toxicological evaluation. *Carbohydrate Polymers* 123, 369–380.

Saffran, M., Kumar, G.S., Savariar, C., Burnham, J.C., Williams, F., and Neckers, D.C. (1986). A new approach to the oral administration of insulin and other peptide drugs. *Science* 233, 1081–1084.

Sameti, M., Bohr, G., Ravi Kumar, M.N.V., Kneuer, C., Bakowsky, U., Nacken, M., Schmidt, H., and Lehr, C.-M. (2003). Stabilisation by freeze-drying of cationically modified silica nanoparticles for gene delivery. *Int J Pharm* 266, 51–60.

Sarmiento, B., Ribeiro, A., Veiga, F., Ferreira, D., and Neufeld, R. (2007b). Oral Bioavailability of Insulin Contained in Polysaccharide Nanoparticles. *Biomacromolecules* 8, 3054–3060.

Sarmiento, B., Ribeiro, A., Veiga, F., Sampaio, P., Neufeld, R., and Ferreira, D. (2007a). Alginate/Chitosan Nanoparticles are Effective for Oral Insulin Delivery. *Pharmaceutical Research* 24, 2198–2206.

Sato, M.H., and Nakajima, D.A. (1974). Complex coacervation in sulfated polyvinyl alcohol-amino acetylated polyvinyl alcohol system. *Colloid & Polymer Sci* 252, 294–297.

Sayin, B., Somavarapu, S., Li, X.W., Sesardic, D., Senel, S., Alpar, O.H., 2009. TMC-MCC (N-trimethyl chitosan-mono-N-carboxymethyl chitosan) nanocomplexes for mucosal delivery of vaccines. *Eur. J. Pharm. Sci.* 38, 362–369.

Schuster, J., Rubsamen, R., Lloyd, P., and Lloyd, J. (1997). The AERX aerosol delivery system. *Pharm. Res.* 14, 354–357.

Semete, B., Booyesen, L.I.J., Kalombo, L., Venter, J.D., Katata, L., Ramalapa, B., Verschoor, J.A., and Swai, H. (2010). In vivo uptake and acute immune response to orally administered chitosan and PEG coated PLGA nanoparticles. *Toxicology and Applied Pharmacology* 249, 158–165.

Songsurang, K., Pakdeebumrung, J., Praphairaksit, N., Muangsin, N., 2011. Sustained release of amoxicillin from ethyl cellulose-coated amoxicillin/chitosan- cyclodextrin-based tablets. *AAPS PharmSciTech* 12, 35–45.

Tainaka, K.-I. (1980). Effect of counterions on complex coacervation. *Biopolymers* 19, 1289–

1298.

Takeuchi, K., Ueshima, K., Ohuchi, T., and Okabe, S. (1994). Induction of gastric lesions and hypoglycemic response by food deprivation in streptozotocin-diabetic rats. *Digestive Diseases and Sciences* 39, 626–634.

Tiebacks . Simultaneous two flocculation Colloids.Chem. Ind. Colloids 1911; 8: 198-201.
Toxicologie des nanoparticules, Déclaration des substances à l'état nanoparticulaire (<https://www.r-nano.fr/>; nanogenotox.eu).

Turgeon, S.L., Schmitt, C., and Sanchez, C. (2007). Protein–polysaccharide complexes and coacervates. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 12, 166–178.

Un cocktail santé anti-diabète - Blogue www.Ikonet.com

Vangoitsenhoven, R., Mathieu, C., and Van der Schueren, B. (2012). GLP1 and cancer: friend or foe? *Endocrine Related Cancer* 19, F77–F88.

Varshosaz, J., Sadrai, H., and Heidari, A. (2006). Nasal delivery of insulin using bioadhesive chitosan gels. *Drug Deliv* 13, 31–38.

Vauthier, C. and Couvreur, P., Nanotechnologies pour la thérapeutique et le diagnostic, Réf. NM 4 010. *Techniques de l'Ingénieur, ed. Weka. 2008*

Veis, A. (2011). A review of the early development of the thermodynamics of the complex coacervation phase separation. *Adv colloid interface sci* 167, 2–11.

Veis, A., and Aranyi, C. (1960). Phase separation in polyelectrolyte systems. I. Complex coacervates of gelatin. *The Journal of Physical Chemistry* 64, 1203–1210.

Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clinical Science (London, England: 1979)*. 2012;122(6):253-270. doi:10.1042/CS20110386.

Whitehead, K., & Mitragotri, S. (2008). Mechanistic analysis of chemical permeation enhancers for oral drug delivery. *Pharmaceutical research*, 25(6), 1412-1419.

Whitehead, K., Karr, N., & Mitragotri, S. (2008). Safe and effective permeation enhancers for oral drug delivery. *Pharmaceutical research*, 25(8), 1782-1788.

Wigley, F. M., Londono, J. H., Wood, S. H., Shipp, J. C., & Waldman, R. H. (1971). Insulin across respiratory mucosae by aerosol delivery. *Diabetes*, 20(8), 552-556.

Wu, Y., Yang, W., Wang, C., Hu, J., and Fu, S. (2005). Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. *Int J Pharm* 295, 235–245.

Xu, Y., Hanna, M.A., 2007. Electrosprayed bovine serum albumin-loaded tripolyphosphate cross-linked chitosan capsules: synthesis and characterization. *J. Microencapsul.* 24, 143–151.

Xue, M., Hu, S., Lu, Y., Zhang, Y., Jiang, X., An, S., Guo, Y., Zhou, X., Hou, H., and Jiang,

C. (2015). Development of chitosan nanoparticles as drug delivery system for a prototype capsid inhibitor. *International Journal of Pharmaceutics*.

Yang, Y. (2001). Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. *Biomaterials* 22, 231–241.

Yu QIAN et al. (2013) enteric-coated capsule containing cationic nanoparticles for oral insulin delivery (US 2013/0034602)

Yu, F., He, C., Waddad, A.Y., Munyendo, W.L.L., Lv, H., Zhou, J., and Zhang, Q. (2014). N-octyl-N-arginine-chitosan (OACS) micelles for gambogic acid oral delivery: preparation, characterization and its study on in situ intestinal perfusion. *Drug Dev Ind Pharm* 40, 774–782.

Yu, F., Li, Y., Liu, C.S., Chen, Q., Wang, G.H., Guo, W., Wu, X.E., Li, D.H., Wu, W.D., and Chen, X.D. (2015). Enteric-coated capsules filled with mono-disperse micro-particles containing PLGA-lipid-PEG nanoparticles for oral delivery of insulin. *International Journal of Pharmaceutics* 484, 181–191.

Zambaux, M.F., Bonneaux, F., Gref, R., Dellacherie, E., Vigneron, C., 1999. MPEO-PLA nanoparticles: effect of MPEO content on some of their surface properties. *J. Biomed. Mater. Res.* 44, 109–115.

Zhang, M., Li, X.H., Gong, Y.D., Zhao, N.M., and Zhang, X.F. (2002). Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PEG. *Biomaterials* 23, 2641–2648.

Zhang, Wang Mengshu, Feng Jiao, Gu Tiejun, Dong Qingguang, Yang Xu, Sun Yanan, Wu Yongge, Chen Yan, and Kong Wei (2013a). Preparation, characterization, and in vitro and in vivo investigation of chitosan-coated poly (d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles for intestinal delivery of exendin-4. *International Journal of Nanomedicine* 1141.

Zhang, Z.-H., Abbad, S., Pan, R.-R., Waddad, A.Y., Hou, L.-L., Lv, H.-X., and Zhou, J.-P. (2013c). N-octyl-N-Arginine chitosan micelles as an oral delivery system of insulin. *J Biomed Nanotechnol* 9, 601–609.

Zhao, K., Zhang, Y., Wang, X., Shi, C., Wang, X., Wang, X., Jin, Z., and Cui, S. (2014). Chitosan-coated poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles as an efficient delivery system for Newcastle disease virus DNA vaccine. *International Journal of Nanomedicine* 4609.

Zhen-Hai Zhang, S.A. (2013). N-Octyl-N-Arginine Chitosan Micelles as an Oral Delivery System of Insulin. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 9, 601–609.

Zhou, Y.-Y., Du, Y.-Z., Wang, L., Yuan, H., Zhou, J.-P., and Hu, F.-Q. (2010). Preparation and pharmacodynamics of stearic acid and poly (lactic-co-glycolic acid) grafted chitosan oligosaccharide micelles for 10-hydroxycamptothecin. *International Journal of Pharmaceutics* 393, 144

Résumé

Formulation, développement et validation de systèmes particulaires d'insuline en vue de leur administration par voie orale.

L'insulinothérapie permet aux diabétiques de réguler leur glycémie. La thèse s'inscrit dans le projet ORAIL Bis qui vise à développer un système d'administration orale d'insuline basé sur la double encapsulation de l'insuline. Le vecteur développé est composé d'une gélule contenant des particules (NP) d'insuline formulées à partir de chitosane (CS) par coacervation complexe ou d'acide (lactique-co-glycolique) (PLGA) par double émulsion. Les objectifs de la thèse sont de stabiliser les NP de chitosane par réticulation et lyophilisation, augmenter la biodisponibilité des NP de PLGA par mucoadhésion, les transposer à l'échelle industrielle. Les résultats ont montré que la combinaison des deux approches permet de réduire la taille des NP de CS, de maintenir une charge positive, de leur conférer une stabilité et une bioefficacité. La mucoadhésion n'a pas permis d'augmenter la biodisponibilité des NP de PLGA. Une charge négative permet d'améliorer leur efficacité biologique et sont transposable à échelle industrielle. L'encapsulation de ces NP dans une gélule a permis de valider *in vivo* le concept de double encapsulation de l'insuline.

Abstract

Formulation, development and validation of insulin loaded particulate systems for their oral administration.

Insulinotherapy helps diabetics to regulate their glycaemia. This thesis is part of the ORAIL Bis project which aims to develop an oral insulin delivery system based on the double encapsulation of insulin. The developed vector is composed of a capsule containing insulin loaded particles (NPs) formulated with chitosan (CS) by complex coacervation or poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA) by double emulsion solvent evaporation. The objectives of the thesis are to stabilize chitosan NPs by crosslinking and freeze-drying, increase the bioavailability of NPs PLGA by mucoadhesion and transpose them to the industrial scale. Results showed that the combination of both strategies reduces the size of CS NPs, maintain a positive charge, give them stability and bioefficacy. Mucoadhesion failed to increase the bioavailability of PLGA NPs. A negative charge allows to improve their biological efficacy and are transposed to industrial scale. The encapsulation of these NPs in an alginate capsule allowed to validate *in vivo* the concept of double encapsulation of insulin.