



**HAL**  
open science

# Assemblage nanoparticules lipidiques solides-polysaccharide : étude des propriétés physico-chimiques pour la vectorisation d'un polyphénol

Hassan Hajjali

► **To cite this version:**

Hassan Hajjali. Assemblage nanoparticules lipidiques solides-polysaccharide : étude des propriétés physico-chimiques pour la vectorisation d'un polyphénol. Alimentation et Nutrition. Université de Lorraine, 2015. Français. NNT : 2015LORR0210 . tel-01754631

**HAL Id: tel-01754631**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01754631v1>**

Submitted on 30 Mar 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.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE LORRAINE

Ecole Doctorale Ressources Procédés Produits Environnement

Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules

---

THÈSE

*Présentée à l'Université de Lorraine par*

**Mr Hassan HAJJALI**

*En vue d'obtenir le grade de*

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

*Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires*

---

**Assemblage nanoparticules lipidiques solides-polysaccharide : étude des propriétés physico-chimiques pour la vectorisation d'un polyphénol**

---

Soutenue publiquement le 16 décembre 2015 devant la commission d'examen

<i>Rapporteurs</i>	Mme C. Genot	Directeur de recherche à l'INRA, Nantes
	Mr H.M. Womeni	Maître de conférences-HDR à l'Université de Deschang, Cameroun
<i>Examineurs</i>	Mme Andrée Voilley	Professeur Emérite, Université de Dijon (Présidente du jury)
	Mr M. Linder	Professeur à l'Université de Lorraine, Nancy
	Mr F. Michaux	Maître de conférences à l'Université de Lorraine, Nancy
<i>Invitée</i>	Mme A. Pasc	Maître de conférences-HDR à l'Université de Lorraine, Nancy

## *Remerciements*

Je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à cette formidable période de thèse.

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, Michel Linder, pour sa confiance et pour avoir accepté de diriger cette thèse, ainsi que pour le partage de ses précieuses connaissances.

Je souhaite aussi manifester tous mes remerciements et ma vive reconnaissance à mon co-directeur de thèse, Florentin Michaux, pour le partage de ses précieuses connaissances, pour son encouragement, son suivi et son aide à rédaction.

J'adresse également mes remerciements à Madame Claude Genot, Monsieur Hilaire Womeni, Madame Andrée Voilley et Madame Andreea Pasc qui me font l'honneur d'évaluer ce travail.

Je remercie tous les membres du LIBio qui m'ont suivi et soutenu pendant ces 2 années. En particulier, je voudrais remercier Carole Jeandel et Carole Perroud sans qui le laboratoire ne pourrait pas fonctionner.

Tous mes remerciements au doctorant Ghazi Ben Massoud pour son aide et les nombreux moments d'échanges.

Je dédie cette thèse à mes parents. Je vous remercie pour votre grand soutien et vos conseils précieux. Vous m'avez aidé à me surpasser tout au long de mes études. J'espère que vous êtes fiers de mon parcours.

Je remercie tous les doctorants et stagiaires, d'hier et d'aujourd'hui : Nadine, Rana, Christelle, Aya, Mahmoud, Abdulhadi, Mohammad, Adrien, Ghazi, Mouna, Jennifer, Charlotte, Mariam, ... et tous ceux que j'oublie de citer.

---

## **SOMMAIRE**

<b>LISTES DES FIGURES.....</b>	<b>VI</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>XIV</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>XVI</b>
<b>LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....</b>	<b>XIX</b>
<b>Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre I: Revue bibliographique.....</b>	<b>5</b>
I.1 Nanoparticules lipidiques solides ( Solid Lipid Nanoparticles-SLNs).....	5
I.1.1. Introduction.....	5
I.1.2. Avantages et inconvénients des SLN.....	7
I.1.3. Composition des SLN.....	10
I.1.4. Méthodes de préparation des SLN.....	26
I.1.5. Incorporation de principes actifs dans des SLN.....	31
I.1.6. Libération du principe actif des SLNs.....	34
I.1.7. Stabilité des SLNs.....	35
I.1.8. Stabilité de stockage des SLNs.....	40
I.1.9. Coexistence de plusieurs espèces colloïdales.....	42
I.1.10. La lyophilisation.....	42
I.1.11. Digestion des SLNs.....	43
I.2. La curcumine.....	46
I.2.1. Définition.....	46
I.2.2. Propriétés physico-chimiques.....	47
I.2.3. Activités biologiques.....	47
I.2.4. Curcumine et MICI.....	50
I.3 Chitosane.....	51
I.3.1. Définition.....	51
I.3.2. Caractéristiques du chitosane.....	52

---

I.3.3. Interaction chitosane – lipides.....	55
I.3.4. Interaction chitosane – mucines.....	57
I.3.5. Particules de chitosane.....	58
I.3.6. Mécanismes physico-chimiques de libération du principe actif des microparticules biopolymériques.....	61
I.4 Systèmes nanoparticules dans microparticules (Nanoparticles In Microparticles – NIMs).....	64
<b>Contexte de l'étude.....</b>	<b>72</b>
<b>Chapitre II: Matériels et méthodes.....</b>	<b>72</b>
II.1 Matériels.....	72
II.2 Méthodes.....	73
II.2.1. Caractérisation du beurre de Karité par chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	73
II.2.2. Préparation des nanoparticules lipidiques solides (SLN).....	74
II.2.3. Etude de la solubilité de la curcumine dans le beurre de Karité.....	75
II.2.4. Détermination de l'efficacité d'encapsulation.....	77
II.2.5. Optimisation du système Karité / Tween 80/ Span 80 par plans d'expériences.....	78
II.2.6. Préparation des microparticules de chitosane.....	82
II.2.7. Encapsulation des SLNs dans les microparticules de chitosane.....	85
II.2.8. Méthodes de caractérisation.....	87
II.2.8.1. Diffusion Dynamique de la lumière (DLS, Dynamic Light Scattering)...	90
II.2.8.2. Diffusion Statique de la lumière – Granulométrie Laser.....	92
II.2.8.3. Diffraction des Rayons X (DRX).....	94
II.2.8.4. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC: Differential Scanning Calorimetry).....	96
II.2.8.5. Microscopie Electronique à Balayage (MEB).....	98
II.2.9. Encapsulation des SLNs dans les microparticules de chitosane par l'Encapsulateur Buchi 390 Pro.....	87

<b>Chapitre III: Résultats et discussion.....</b>	<b>98</b>
III.1 Système beurre de karité/curcumine : cristallisation, préparation des SLNs et incorporation de la curcumine.....	98
III.1.1. Système beurre de karité/curcumine à l'état non dispersé ; solubilité et cristallisation.....	99
III.1.1.1. Solubilité de la curcumine dans le beurre de karité.....	99
III.1.1.2. Influence de la curcumine sur la cristallisation du beurre de karité.....	99
III.1.2. Préparation des SLNs à base de beurre de karité : influence de la composition du système ternaire sur les propriétés des nanoparticules.....	107
III.1.3. Incorporation de la curcumine dans la formulation : influence de la taille des SLNs sur l'efficacité d'encapsulation (EE).....	115
III.1.4. Influence de la curcumine sur le profil thermique du beurre de karité à l'état non dispersé et sous forme de SLNs.....	119
III.1.5. Influence de la curcumine sur la structure cristalline du beurre de karité à l'état non dispersé et sous forme de SLNs.....	120
III.1.6. Conclusion.....	126
III.2 Préparation et caractérisation du système NIMs SLNs-chitosane.....	128
III.2.1. Préparation et caractérisation des SLNs stabilisées par un phospholipide.....	128
III.2.1.1. Préparation des SLNs sans curcumine.....	129
III.2.1.2. Encapsulation de la curcumine dans les SLNs.....	132
III.2.2. Etude de stabilité des SLNs encapsulant la curcumine.....	134
III.2.3. Assemblages chitosane-SLNs-curcumine sous forme de microparticules.....	136
III.2.3.1. Caractérisation par diffusion statique de la lumière.....	137
III.2.3.2. Caractérisation thermique et structurale.....	141
III.2.4. Caractérisation des microparticules de chitosane par microscopie électronique à balayage (MEB) et microscopie optique.....	146
III.2.5. Microparticules chitosane-SLNs par encapsulateur.....	147
III.2.6. Conclusions.....	151
<b>Chapitre IV: Conclusions et perspectives.....</b>	<b>153</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>158</b>





## **LISTES DES FIGURES**

Figure 1: Représentations schématiques de différents vecteurs : micelles, liposomes, nanoémulsions et nanoparticules lipidiques solides (SLN/NLC). Les micelles sont composées d'un cœur hydrophobe formé par les parties hydrophobes des tensioactifs. Les liposomes sont composés d'un cœur aqueux entouré par une bicouche phospholipidique. Les nanoémulsions sont formées d'un cœur hydrophobe composé d'huile dispersée dans l'eau (nanoémulsion directe) et stabilisée par une monocouche de tensioactif. Les nanoparticules lipidiques solides (Solid Lipid Nanoparticles - SLN) et les vecteurs lipidiques nanostructurés (Nanostructured Lipid Carriers – NLC) sont formés d'un cœur hydrophobe lipidique solide à température ambiante. La cristallisation du lipide produit souvent des nanoparticules non sphériques [21]..... 6

Figure 2 : Structure de certains lipides. .... 10

Figure 3: Schéma de l'organisation d'un lipide cristallisé..... 16

Figure 4: Types de structures cristallines formées par les lipides (empilement latéral)... 17

Figure 5: Types d'empilements longitudinaux formés par les lipides. .... 18

Figure 6: Exemple des tensioactifs courants..... 20

Figure 7: Représentation schématique de la structure générale d'un phospholipide, et son comportement sous forme de bicouche dans l'eau (slide player.fr, consulté le 16/09/2015) ..... 25

Figure 8: Représentation schématique de la préparation des SLNs et NLCs par homogénéisation à haute pression [21]..... 27

Figure 9: Représentation schématique de la technique d'émulsification - évaporation du solvant pour la préparation des SLNs et NLCs [21]. .... 29

Figure 10: Modèles d'incorporation du principe actif dans les SLNs [22]: a) Modèle de couronne enrichie. b) Modèle cœur enrichi en principe actif. c) Modèle de dispersion homogène du principe actif dans les SLNs..... 32

Figure 11: Libération de lipoyl-mémantine <i>in vitro</i> dans SGF à pH 1,2 et dans SIF à pH 8 .....	34
Figure 12: Le mécanisme de déstabilisation des SLNs au cours du stockage [21]. .....	38
Figure 13: Représentation du vieillissement d'Ostwald.....	40
Figure 14: Représentation schématique de la digestion et l'absorption des principes actifs après administration par voie orale des SLNs encapsulant des molécules bioactives.....	44
Figure 15: Structure des curcuminoïdes [168].....	46
Figure 16: Effets anticancéreux de la curcumine [168]. La curcumine inhibe l'activation de NF- $\kappa$ B via l'inhibition de l'activité d'I $\kappa$ B, conduisant à la suppression de nombreux gènes régulés par NF- $\kappa$ B impliqués dans la tumorigénèse y compris cycline D1, TNF, interleukines et d'autres. La curcumine est impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire et la stimulation de l'apoptose via l'up- régulation de p16 et p53. De plus, la curcumine est un modulateur de l'autophagie et possède des effets inhibiteurs sur l'angiogénèse tumorale et la métastase par suppression d'une variété de facteurs de croissance, y compris VEGF, MMP-9 et ICAMs.....	49
Figure 17: Structure de la chitine et du chitosane.....	51
Figure 18: Structure du chitosane en milieu acide (A) et en milieu basique (B) [192]. ...	53
Figure 19: Structure des chitosomes [202]. A) Interaction électrostatique entre les groupements du chitosane chargés positivement et les liposomes chargés négativement. B) Agrégation des chitosomes après déprotonation partielle du chitosane. Elle est médiée par des interactions hydrophobes entre les chaînes du chitosane déprotoné. ....	56
Figure 20: Images microscopiques obtenues par une caméra sous observation en contraste de phase d'une vésicule après l'addition de 10 $\mu$ l de chitosane (0.1 mg / ml) [203].....	56
Figure 21: Modèle d'enlèvement de la mucine adsorbée à la monocouche de phospholipides chargés négativement par le chitosane [204].....	58

---

Figure 22: Représentation schématique de 3 méthodes de réticulation [219]. A) Réticulation chimique avec l'agent de réticulation incorporé dans la liaison. B) Réticulation chimique où l'agent de réticulation n'est pas incorporé dans la liaison. C) Réticulation physique par des liaisons non covalentes. D) Réticulation enzymatique. .... 60

Figure 23: Les mécanismes physico-chimiques de la perte d'intégrité des particules biopolymériques : diffusion, gonflement, érosion et fragmentation [228]. ..... 62

Figure 24: Représentation schématique du système nanoparticules dans microparticules, images MEB de nanoparticules de gélatine et de microparticules de PCL encapsulant les nanoparticules de gélatine [245]. ..... 69

Figure 25: Schéma représentatif de la réticulation de l'hydrogel par les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{SO}_4^{2-}$  (A), et photo de l'hydrogel prise par microscopie optique (B) [251]. ..... 70

Figure 26: Chromatogramme et composition en acides gras extraits du beurre de karité. 72

Figure 27: Représentation schématique du protocole de préparation des SLNs. .... 75

Figure 28: Courbe d'étalonnage préparée à partir des solutions standards de curcumine dissoute dans le méthanol. La droite obtenue correspond à l'absorbance de la curcumine dans le méthanol à 425 nm. .... 76

Figure 29: Description et principe d'un tube centrisart I. .... 77

Figure 30: Représentation schématique du protocole de préparation des microparticules de chitosane [262] (référence de l'image MEB des microparticules de chitosane). .... 84

Figure 31: Protocole d'encapsulation des SLNs dans les microparticules de chitosane. .. 86

Figure 32: Principe de l'encapsulateur Buchi ([www. Buchi.com](http://www.buchi.com), consulté le 4/8/2015). 1) Mélange du principe actif à encapsuler avec le polymère. 2) Pompage du mélange à l'aide d'une pompe à seringue. 3) Création d'une vibration superposée. 4) Formation des gouttelettes. 5) Chargement des gouttelettes à l'aide d'un champ électrostatique ce qui permet la dispersion des gouttelettes par répulsion électrostatique. 6) Contrôle en ligne de la formation des gouttelettes à la lumière d'une lampe stroboscopique. 7) Formation des

microparticules par gélification ou polymérisation dans le bain de réticulation. 8)	
Récupération des particules. ....	88
Figure 33: Principe de la DLS. ( <a href="http://www.quantachrome.co.uk">www.quantachrome.co.uk</a> , consulté le 28/7/2015) .....	90
Figure 34: Principe de la diffraction de la lumière. ( <a href="http://www.cilas.com">www.cilas.com</a> , consulté le 3/8/2015). .....	92
Figure 35: Principe de la DRX. A : interactions constructives conduisant à l'apparition d'un pic de diffraction pour une certaine valeur de $\theta$ ; B : interactions destructives ne conduisant pas à l'apparition d'un signal de diffraction. ....	95
Figure 36: Schéma descriptif du protocole utilisé pour l'étude de la cristallisation du beurre de karité.....	100
Figure 37: Evolution des diffractogrammes WAXS lors de la recristallisation du beurre de karité. (A) évolution lors des 900 premières minutes et (B) diffractogrammes représentatifs de la cinétique de cristallisation à différents temps. ....	101
Figure 38: Evolution des diffractogrammes WAXS lors de la recristallisation du beurre de karité en présence de curcumine. (A) évolution lors des 350 premières minutes et (B) diffractogrammes représentatifs de la cinétique de cristallisation à différents temps. ...	104
Figure 39: Evolution de la structure cristalline en fonction du temps du beurre de karité seul et en présence de curcumine.....	105
Figure 40: Comparaison des diffractogrammes obtenus pour le beurre de karité seul et pour le beurre de karité en présence de curcumine après respectivement 40 et 47 heures. ....	106
Figure 41: Diffractogramme de la curcumine pure cristallisée. ....	107
Figure 42: Domaine de composition du plan de mélange sur le diagramme ternaire beurre de karité/eau/tensioactif. ....	110
Figure 43: Distributions de tailles en intensité des particules obtenues à partir des expériences 7 (pointillés) et 9 (ligne pleine).....	112

Figure 44: Diagrammes de surfaces de réponse issus du plan de mélange pour la taille des particules et l'indice de polydispersité. La zone blanche correspond au domaine expérimental décrit en Figure 42. Les points violets correspondent aux manipes annulées pour bien affiner le modèle. ....	112
Figure 45: Représentation de l'efficacité d'encapsulation en fonction (A) de la taille des SLNs et (B) de la surface spécifique calculée. ....	117
Figure 46: Thermogrammes du beurre de karité à l'état non dispersé (en haut) et sous forme de SLNs (en bas) sans (ligne continue noire) et avec curcumine (ligne pointillée rouge). ....	119
Figure 47: Diffractogrammes enregistrés aux petits angles du beurre de karité sans (ligne noire) et avec curcumine (ligne rouge) à l'état non dispersé.....	121
Figure 48: Diffractogrammes enregistrés aux grands angles du beurre de karité sans (ligne noire) et avec curcumine (ligne rouge) à l'état non dispersé.....	123
Figure 49: Diffractogrammes enregistrés aux petits (A) et grands (B) angles du beurre de karité non dispersé sans curcumine (ligne noire) et à l'état SLNs sans (ligne verte) et avec curcumine (ligne rouge).....	125
Figure 50: Influence du potentiel zêta sur la répulsion / coalescence des particules [21]. ....	130
Figure 51: Distribution de la taille des SLNs et SLNs encapsulant la curcumine.....	133
Figure 52: Variation de la taille, du Pdl et du potentiel zêta des SLNs encapsulant la curcumine en fonction du temps. Disp : Dispersion de SLNs. Lyo : SLNs lyophilisées. ZP : Zeta potential (potentiel zêta). ....	135
Figure 53: Distribution de la taille des particules de chitosane (CS-MP).....	137
Figure 54: Distribution de taille des particules de chitosane (CS MP), avec SLNs (CS-SLN MP) et SLNs encapsulant la curcumine diluée au 1/5 (CS-SLN-C MP).....	139

Figure 55: Photo de la récupération de l'assemblage chitosane-SLNs-curcumine dans le culot après centrifugation..... 140

Figure 56: Thermogrammes du beurre de karité à l'état bulk (a), des SLNs lyophilisées en absence (b) et en présence de curcumine (c), des microparticules de chitosane encapsulant des SLNs en absence (d) et en présence de curcumine (e) et des microparticules de chitosane sans SLNs (f). A) Premier chauffage de 5°C à 60°C avec une vitesse de 2°C / min. B) Deuxième chauffage de 5°C à 300°C avec une vitesse de 10°C / min..... 141

Figure 57 : Diffractogrammes du beurre de karité à l'état bulk (a), des SLNs lyophilisées en absence (b) et en présence de curcumine (c), des microparticules de chitosane encapsulant des SLNs en absence (d) et en présence de curcumine (e) et des microparticules de chitosane sans SLNs (f), aux bas (A) (SAXS) et aux grands angles (B, C) (WAXS). Les pics marqués par \* correspond aux signaux de diffraction du tréhalose (cryoprotecteur utilisé pendant la lyophilisation des SLNs). ..... 144

Figure 58: Images de microscopie électronique à balayage (A et B) et microscopie optique (C et D) des microparticules de chitosane avec (B et D) et sans SLNs (A et C) encapsulant la curcumine..... 146

Figure 59: (A) Distribution de la taille des microparticules de chitosane encapsulant des SLNs obtenue par la buse 120 µm (préparation 2). (B) Image de microscopie optique pour des microparticules de chitosane encapsulant des SLNs obtenues avec la buse 120 µm. .... 150

## ***LISTE DES TABLEAUX***

Tableau 1: Tableau comparatif entre les vecteurs colloïdaux utilisés dans l'encapsulation des principes actifs.....	8
Tableau 2: Tableau récapitulatif des différents types de lipides utilisés pour la préparation des SLNs et NLCs.....	12
Tableau 3: Composition (%) en triglycérides du beurre de Karité. S : acide stéarique, P : acide palmitique, O : acide oléique, A : acide arachidique Li : acide linoléique, Ln : acide linoléique.....	15
Tableau 4: Tableau récapitulatif des différents types de tensioactifs utilisés pour la préparation des SLNs et NLCs .....	23
Tableau 5: Influence de la structure du lipide sur les propriétés des SLNs [21]. .....	37
Tableau 6: Propriétés physico-chimiques de la curcumine.....	47
Tableau 7: Tableau récapitulatif des différents NIMs développés dans la littérature et leurs applications. ....	65
Tableau 8: Limites choisies pour chaque paramètre du domaine expérimental. ....	80
Tableau 9: Matrice des expériences.....	81
Tableau 10: Conditions expérimentales de préparation des microparticules de chitosane. ....	83
Tableau 11: Conditions expérimentales de l'encapsulation des SLNs dans les microparticules de chitosane.....	87
Tableau 12: Conditions expérimentales de l'encapsulation des SLNs dans des microparticules de chitosane en utilisant l'encapsulateur Buchi Pro 390.....	89
Tableau 13: Angles de diffraction et distances de répétition correspondantes des différentes phases observées lors de la cristallisation du beurre de karité.....	103
Tableau 14: Composition des 23 expériences et réponses associées (diamètre et PDI)..	110

Tableau 15: Coefficients du modèle généré par le logiciel NEMROD. ....	114
Tableau 16: Composition, tailles et PDI prédits et mesurés des expériences complémentaires. ....	115
Tableau 17: Composition, quantité de curcumine ajoutée, tailles et PDI des SLNs et efficacité d'encapsulation. ....	116
Tableau 18: Raies de diffractions aux grands angles relevées pour le beurre de karité (Figure 22.B) et distances de répétition correspondantes comparées à celles relevées pour le beurre de cacao (polymorphe $\beta$ - forme V) [282]. ....	124
Tableau 19: Compositions et caractérisation des formulations par DLS. Tous les pourcentages sont exprimés en masse (m/m). K : Karité, PL : phospholipides de Soja (PL 80H), T80 : Tween 80, ZP : Zeta Potential (Potentiel Zêta). ....	131
Tableau 20: Caractérisation des SLNs encapsulant la curcumine : taille des particules, PDI, potentiel zêta et efficacité d'encapsulation. La taille des particules est présentée en moyenne $\pm$ écart-type de 3 répétitions indépendantes. Les moyennes suivies par la même lettre (a) ne sont pas significativement différentes au $p < 0.05$ ....	133
Tableau 21: Propriétés de la taille des particules obtenues avec et sans SLNs à des concentrations différentes en SLNs. La lettre C correspond à des échantillons contenant de la curcumine dans les SLNs. F : Facteur de dilution des SLNs. $D_{10}$ : 10 <sup>e</sup> centile de la distribution. $D_{50}$ : taille médiane de la taille des particules. $D_{90}$ : 90 <sup>e</sup> centile de la distribution. Span : largeur de la distribution de taille des particules. La taille des particules est présentée en moyenne $\pm$ écart-type de 3 répétitions indépendantes. Les moyennes suivies par la même lettre (a) ne sont pas significativement différentes au $p < 0.05$ ....	138
Tableau 22: Conditions expérimentales et résultats obtenus par granulométrie laser. $D_{10}$ : 10 <sup>e</sup> centile de la distribution. $D_{50}$ : taille médiane de la taille des particules. $D_{90}$ : 90 <sup>e</sup> centile de la distribution. Span : largeur de la distribution de taille des particules. La taille des particules est présentée en moyenne $\pm$ écart-type de 3 répétitions. ....	149



## ***LISTE DES ABREVIATIONS***

ADN : Acide DéoxyriboNucléique

AMCase: Acidic Mamalian Chitinase

ANOVA: Analysis Of Variance

ARNi : Acide ribonucléique interférent

C<sub>max</sub> : Concentration maximale

Cmc : Concentration micellaire critique

c-myc : clone-myelocytose

COX-2 : Cyclooxygenase-2

CPG : Chromatographie à Phase Gazeuse

CRM2 : Cristallographie, Résonance Magnétique et Modélisations

Cryo-TEM: Cryogenic Transmission Electron Microscopy

CS-MP : Microparticule de chitosane

CS-SLN MP : Microparticule de chitosane encapsulant des SLNs

CS-SLN-C M : Microparticule de chitosane encapsulant des SLNs portant la curcumine

CU : Cholite Ulcéral

Da : Dalton

DD : Degré de Désacétylation

Disp : Dispersé

DLS : Diffusion Dynamique de la Lumière

DL<sub>50</sub> : Dose Létale médiane

DMPA : Dimyristoylphosphatidic acid

DMSO : Diméthyl sulfoxyde

DRX : Diffraction des rayons X

DSC : Differential Scanning Calorimetry

D10 : 10e centile de la distribution

D50 : Taille médiane

D<sub>90</sub> : 90<sup>e</sup> centile de la distribution  
EE : Efficacité d'encapsulation  
EGDE : Ethylène glycol diglycidyl éther  
EGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein  
ESR: Electron Spin Resonance  
FTIR: Fourier Transform Infrared Spectroscopy  
g: gramme  
GA: Glutaraldéhyde  
GUV: Giant Unilamellar Vesicle  
h: Heure  
HCl : acide chlorhydrique  
He: Hélium  
HLB: Hydrophilic-Lypophilic Balance  
H/E : Huile/Eau  
Hz : Hertz  
ICAMs : Intercellular Adhesion Molecules  
IFN $\gamma$  : Interféron  $\gamma$   
IL-5 : Interleukine-5  
IL-12 : Interleukine-12  
iNOS : inducible Nitric Oxide Synthase  
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique  
K<sub>B</sub> : Constante de Boltzmann  
KDa : KiloDalton  
KPV : Lysine-Proline-Valine  
Kv : Kilovolt  
LIBio : Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules  
LOX : Lipoxigénase

Log P : Coefficient de partage (octanol/eau)

LUV : Large Unilamellar Vesicle

Lyo : Lyophilisé

MC : Maladie de Crohn

MEB : Microscopie Electronique à Balayage

MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

m/m : masse/masse

MMP-9 : Matrix Metalloproteinase 9

MPs : Microparticules

MSR : Méthode des Surfaces de Réponses

m/v: masse/volume

MWCO: Molecular Weight Cut Off

NEMROD: New Efficient Methodology for Research using Optimal Design

NLCs: Nanostructured Lipid Carriers

NF-  $\kappa$ B: Nuclear Factor-Kappa B

NIMs : Nanoparticles in Microparticles

NPs: Nanoparticules

PALS: Phase Analysis Light Scattering

PC: Phosphatidylcholine

PCL: Polycaprolactone

PdI: Polydispersity Index

PE: Phosphatidyléthanolamine

PEITC: Phénéthyl-Isothiocyanate

pH : potentiel d'hydrogène

PI : Phosphatidylinositol

pKa : Constante de dissociation acide à l'échelle logarithmique

PL: Phospholipide

PLGA: Poly (lactic-co-glycolic acid)

PLA: Poly Lactic Acid

PLH: Pranlukast Hemihydrate

PLLA : Poly-L-Lactide

RMN<sup>1</sup>H : Résonance Magnétique Nucléaire du proton

RMN<sup>13</sup>C : Résonance Magnétique Nucléaire du carbone -13

RPE : Résonance Paramagnétique Electronique

Rpm : Round per minute

SAXS: Small -Angle X-ray Scattering

SEC: Size Exclusion chromatography

SGF: Simulated Gastric Fluid

SIF: Simulated Intestinal Fluid

SLNs: Solid Lipid Nanoparticles

SLS: Static Light Scattering

TA: Tensioactifs

TEM : Transmission Electron Microscopy

T<sub>1/2</sub> : Temps de demi-vie

T80 : Tween 80

TH1 : Réponse immunitaire inflammatoire

TH2 : Réponse immunitaire allergique

T<sub>m</sub> : Température de fusion

TNF: Tumor Necrosis Factor

TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor-  $\alpha$

TPP: Tripolyphosphate

UV: Ultraviolet

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

WAXS: Wide -Angle X-ray Scattering

°C: Degré Celsius

°K: Degré Kelvin

Å: Angström

## ***LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS***

### **Communications par affiche :**

- **H. Hajjali**, F. Michaux and M. Linder. *Shea butter solid nanoparticles for curcumin encapsulation: influence of nanoparticles size on drug loading*. Séminaire RP2E, Nancy, 15 janvier 2015. (Prix poster)
- **H. Hajjali**, F. Michaux and M. Linder. *Shea butter solid nanoparticles for curcumin encapsulation: influence of curcumin on lipid organization*. Congress DOF (2015), Paris-France.

### **Publications**

- **Hajj Ali H.**, Michaux F., Bouelet Ntsama I.S., Durand P., Jasniewski J., Linder M. *Shea butter solid nanoparticles for curcumin encapsulation: influence of nanoparticles size on drug loading*. *European Journal of Lipid Science and Technology* 2015, volume 117.

# **Introduction générale**

Au cours de ces dernières années, il est devenu de plus en plus évident que le développement de nouveaux médicaments seuls n'est plus suffisant pour assurer le progrès dans le domaine médical. Les principes actifs hydrophobes constituent 70% des molécules d'intérêts découvertes récemment [1]. Ces substances présentent une activité exceptionnelle *in vitro* qui est néanmoins souvent suivie par des résultats décevants *in vivo* [2]. Ces résultats sont dus en partie à la faible solubilité du principe actif dans l'eau, ce qui limite son absorption du fait de sa faible biodisponibilité et ce qui favorise également sa dégradation et son excrétion rapide par l'organisme. Une stratégie prometteuse pour résoudre ces problèmes consiste à encapsuler les principes actifs dans des vecteurs permettant ainsi leur protection, leur ciblage et une libération contrôlée de la molécule d'intérêt vers l'organe cible.

L'introduction de vecteurs colloïdaux a conduit à une révolution dans le domaine thérapeutique au cours des deux dernières décennies. Il est maintenant établi que l'utilisation de ces vecteurs améliore non seulement l'efficacité thérapeutique, mais réduit également les effets secondaires du principe actif [3]. Une large variété de vecteurs colloïdaux a été introduite dans le domaine thérapeutique pour relever le défi de l'amélioration de la biodisponibilité des principes actifs hydrophobes [4]. Ces vecteurs sont classés suivant la nature de la matrice utilisée pour leur préparation. Ils sont principalement à base de lipides, de polymères synthétiques ou de biopolymères (polysaccharides et protéines) [5]. Les nanoparticules polymériques sont des nanovecteurs colloïdaux composés de polymères biodégradables. Le problème majeur de l'utilisation de ces particules est que leur production nécessite souvent des agents de réticulation toxiques et des monomères cancérigènes. L'élimination complète de ces constituants est difficile [6].

Les nanovecteurs lipidiques ont été introduits pour surmonter les problèmes toxicologiques des nanovecteurs polymériques. Il existe de nombreuses recherches sur les systèmes lipidiques, tels que les liposomes, les nanoémulsions, les micelles et les nanoparticules lipidiques solides (SLNs, Solid Lipid Nanoparticles). Les liposomes sont considérés comme les premiers vecteurs thérapeutiques commercialisés. La réussite du développement de formulations de liposomes administrées par voie intraveineuse telles que



Doxyl<sup>®</sup>, Caelyx<sup>®</sup> (liposomes encapsulant la doxorubicine), DaunoXome<sup>®</sup> (liposome encapsulant la daunorubicine) et de formulations utilisées en cosmétique a montré l'utilité de ces nanovecteurs en tant que matrices thérapeutiques. Cependant, ce système souffre d'un inconvénient majeur relatif à la stabilité de la formulation lors du stockage. Par ailleurs, l'incorporation du principe actif dans la bicouche phospholipidique peut diminuer la stabilité du liposome. De plus, des limitations supplémentaires associées à la production de liposomes à grande échelle ainsi que la stérilisation nécessaire après production mettent en évidence la difficulté de commercialiser les liposomes [7].

Les nanoémulsions sont des vecteurs lipidiques composés d'un cœur liquide hydrophobe et d'une surface hydrophile. Ces nanoparticules peuvent présenter une bonne stabilité à long terme, ce qui en fait de bons outils de vectorisation dans le domaine thérapeutique. Plusieurs médicaments à base d'émulsions sont commercialisés tels que le Daizemuls<sup>®</sup>, le Diazepam-Lipuro<sup>®</sup> (diazepam), le Liple<sup>®</sup> (alprostadiol), le Diprivan<sup>®</sup> (propofol) et le Etomidat-Lipuro<sup>®</sup> (étomidate). Cependant, les principes actifs encapsulés dans des gouttelettes huileuses sont très mobiles et ils peuvent diffuser vers l'extérieur, déstabilisant ainsi la couche de tensioactifs. Ceci à son tour peut induire la coalescence des particules [8]. Cet inconvénient limite l'utilisation des émulsions comme vecteurs à libération prolongée du principe actif [9].

Les particules formées à base de lipides solides ont été formulées afin d'obtenir des systèmes limitant la mobilité du principe actif à l'intérieur des vecteurs. La faible mobilité de la molécule d'intérêt dans le cœur lipidique solide confère à ces systèmes une bonne stabilité en comparaison des émulsions. Ceci rend les SLNs intéressantes pour une vectorisation permettant une libération contrôlée du principe actif.

Les SLNs sont ainsi des nanovecteurs colloïdaux utilisés pour encapsuler des principes actifs hydrophobes et à moindre degré des principes actifs hydrophiles. Le beurre de Karité a été utilisé en tant que lipide solide dans cette étude. Le beurre de Karité est utilisé en cosmétique comme hydratant et en tant que substitut au beurre de cacao en alimentaire. La présence d'insaponifiables (stérols, composés phénoliques, etc.) confère au beurre de Karité des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes, ce qui le rend

intéressant pour des applications médicales et cosmétiques. Plusieurs travaux portent sur la modification de la surface des SLNs par un enrobage de chitosane qui est un polymère hydrophile chargé positivement à pH acide [10, 11]. Cette stratégie a été utilisée pour éviter la libération rapide du principe actif en milieu acide. En outre, cette modification permet de protéger les SLNs contre la dégradation par les lipases et d'augmenter l'absorption intestinale du principe actif grâce à la propriété mucoadhésive du chitosane.

Dans ce contexte, l'objectif global de ce travail porte d'une part sur la formulation d'un système de vectorisation multi-échelle sous forme de microparticules formées par un polymère agro-sourcé (le chitosane) incluant des nanoparticules lipidiques solides (SLNs), contenant elles-mêmes une molécule active, la curcumine. D'autre part, la compréhension des phénomènes mis en jeu ainsi que le contrôle des interactions entre le polymère et les SLNs et entre les SLNs et la curcumine sont également abordés. Ce vecteur est développé pour un ciblage spécifique et un relargage contrôlé de la molécule dans l'intestin après une absorption par voie orale. Le choix de la curcumine en tant que molécule active réside dans son fort potentiel anti-inflammatoire pour lutter contre les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) [12]. Les MICI regroupent les maladies liées à l'inflammation de l'intestin à caractère chronique (maladie de Crohn et rectocolite hémorragique). Largement méconnues malgré leur fréquence, les maladies inflammatoires chroniques intestinales touchent 200 000 personnes en France. Il apparaît ainsi nécessaire de développer des systèmes incorporables dans l'aliment pour une facilité de traitement (donc résistants aux conditions du tractus intestinal) et contenant des principes actifs permettant de soulager les symptômes.

Le premier chapitre est consacré à une présentation des nanoparticules lipidiques solides (SLNs) axée sur leurs compositions, leurs méthodes de préparation, leurs propriétés physico-chimiques ainsi que leurs utilisations dans le domaine de la vectorisation. La curcumine est ensuite abordée ainsi que le chitosane qui est le biopolymère utilisé dans cette étude. Un bref aperçu des systèmes "nanoparticules dans microparticules" (NiMs Nanoparticles in Microparticles) est également présenté. La partie expérimentale décrit ensuite les produits ainsi que les techniques de caractérisation utilisées dans cette étude. Le

premier chapitre de résultats porte sur le système lipide-curcumine au travers d'une étude de la cristallisation du lipide en présence du polyphénol et ensuite de la préparation des SLNs à base de tensioactifs non ioniques pour l'encapsulation de la curcumine. La préparation des SLNs à bases de tensioactifs anioniques et la préparation de l'assemblage micrométrique chitosane-SLNs ainsi que la caractérisation physico-chimique des deux systèmes fait l'objet du chapitre suivant.

# **Revue bibliographique**

## **Chapitre I: Revue bibliographique**

Ce chapitre donne brièvement quelques notions de base nécessaires à la compréhension du travail présenté dans ce mémoire.

La première partie est centrée sur les nanoparticules lipidiques solide (SLNs – Solid Lipid Nanoparticles) et décrit leurs compositions, leurs modes de préparation ainsi que leurs avantages et inconvénients vis-à-vis des autres vecteurs lipidiques. La seconde partie est consacrée au principe actif utilisé dans cette thèse : la curcumine. Ces différentes propriétés et activités sont présentées brièvement. La troisième partie concerne le chitosane, polymère naturel choisi dans cette étude pour former des assemblages avec les SLNs produites.

Enfin, le contexte général dans lequel se situe ce travail sera présenté à travers les travaux de la littérature notamment sur les systèmes NiMs (Nanoparticles in Microparticles) ainsi qu'au niveau de son intégration dans les objectifs de recherche du laboratoire.

### **I.1 Nanoparticules lipidiques solides ( Solid Lipid Nanoparticles-SLNs)**

#### **I.1.1. Introduction**

Les SLNs sont des nanovecteurs colloïdaux développés durant les années 90 par les groupes de Westesen, Muller et Gasco [13-15]. Ces particules sont composées de lipides solides à température ambiante, biodégradables, et non toxiques stabilisés par l'ajout de tensioactifs et/ou de co-tensioactifs adaptés (Figure 1). Elles sont généralement obtenues en passant par une étape de préparation d'une nanoémulsion directe, huile dans l'eau (H/E), à une température supérieure au point de fusion de la phase lipidique qui est ensuite, refroidie entraînant la cristallisation du lipide [16]. Les SLNs peuvent être préparées par différentes méthodes [2], telles que l'homogénéisation à grande vitesse [17], l'homogénéisation à haute pression [18], l'homogénéisation à chaud [19] et l'émulsification par une évaporation de solvant [20].

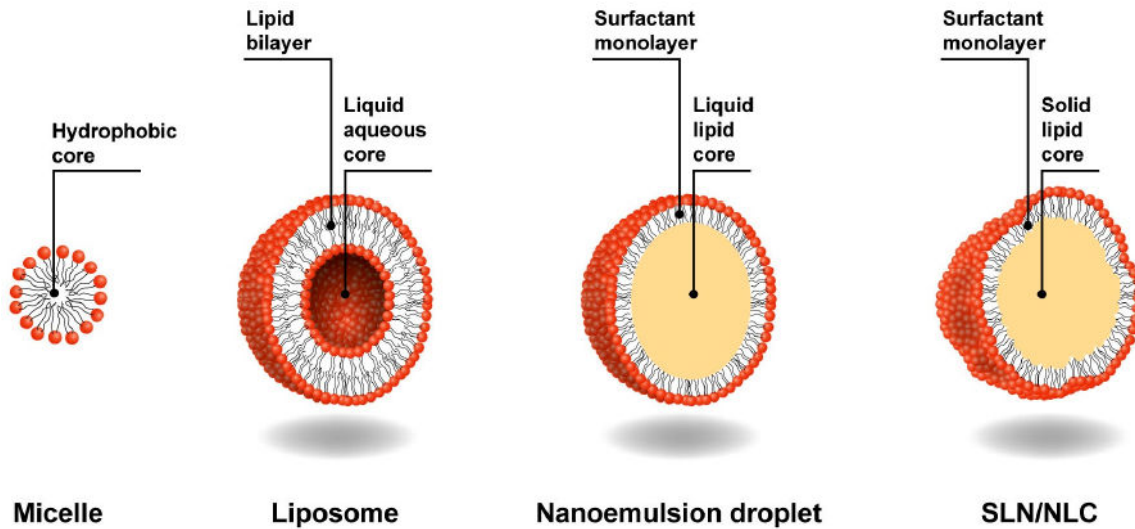


Figure 1: Représentations schématiques de différents vecteurs : micelles, liposomes, nanoémulsions et nanoparticules lipidiques solides (SLN/NLC). Les micelles sont composées d'un cœur hydrophobe formé par les parties hydrophobes des tensioactifs. Les liposomes sont composés d'un cœur aqueux entouré par une bicouche phospholipidique. Les nanoémulsions sont formées d'un cœur hydrophobe composé d'huile dispersée dans l'eau (nanoémulsion directe) et stabilisée par une monocouche de tensioactif. Les nanoparticules lipidiques solides (Solid Lipid Nanoparticles - SLN) et les vecteurs lipidiques nanostructurés (Nanostructured Lipid Carriers – NLC) sont formés d'un cœur hydrophobe lipidique solide à température ambiante. La cristallisation du lipide produit souvent des nanoparticules non sphériques [21].

L'utilisation de lipides solides au lieu d'huiles permet de mieux maîtriser la libération du principe actif de par sa mobilité réduite dans une phase solide que dans une phase liquide huileuse. Les lipides solides ont été utilisés depuis plusieurs années en tant qu'adjuvant afin d'obtenir une libération prolongée du principe actif après l'administration par voie orale (par exemple le Mucosolvan<sup>®</sup>).

### I.1.2. Avantages et inconvénients des SLN

Les SLNs présentent plusieurs avantages tels qu'une insensibilité à la dilution, ainsi qu'une stabilité importante (Tableau 1). Par ailleurs, elles présentent plusieurs inconvénients tels qu'une plus faible quantité de principe actif encapsulé qui est principalement due à une expulsion du principe actif lors du stockage ainsi qu'une faible capacité à encapsuler des molécules hydrophiles [22]. La capacité d'encapsulation des SLN est liée à la solubilité du principe actif dans le lipide, à la structure de la matrice lipidique et à l'état polymorphique de la matrice lipidique. Si la matrice lipidique est composée par des triacylglycérols purs, un cristal parfait avec de légères imperfections sera formé [23]. Comme les principes actifs encapsulés peuvent se trouver soit entre les chaînes d'acides gras, soit entre les couches lipidiques, un réseau cristallin ordonné ne peut pas accueillir une grande quantité de principe actif (même dans les imperfections du cristal) et généralement il sera expulsé dans la phase aqueuse [24]. L'utilisation de lipides plus complexes permet d'augmenter la quantité de principe actif incorporé à l'intérieur des SLNs [25, 26]. Le tableau 1 résume les propriétés des différents vecteurs colloïdaux.

Tableau 1: Tableau comparatif entre les vecteurs colloïdaux utilisés dans l'encapsulation des principes actifs.

	Taille	Avantages	Inconvénients	Références
Micelles / Microémulsion	5 – 50 nm	Préparation facile Bonne stabilité Transparent Stabilité thermodynamique	Très sensible à la dilution (cmc) Désintégration après administration Quantité encapsulée faible	[27, 28]
Emulsions/ Nanoémulsions	20 nm – 10 µm	Quantité encapsulée importante	Sensibilité à la dilution Stabilité physique	[29, 30]
Liposomes / Vesicules	20 nm – 100 µm	Solubilisation de substances hydrophiles et hydrophobes Relargage contrôlé	Préparation complexe et usage de solvant Stabilité limitée Faible taux d'encapsulation	[28, 31, 32]
Isasomes (dispersion de cristaux liquides)	100 nm – 10 µm	Solubilisation de substances hydrophiles et hydrophobes Stabilité Structures variées Non sensible à la dilution	Nécessite un tensioactif présentant sur son diagramme de phase une phase micellaire en équilibre avec une phase cristalline (2 systèmes recensés, monooléine et phytantriol) Quantité encapsulée faible	[33]
Nanostructured Lipid Nanocarriers (NLC)	20-200 nm	Non sensible à la dilution Stabilité Quantité encapsulée importante et non expulsée lors de la cristallisation grâce au mélange de lipides.		[3, 21, 34, 35]



---

Taille	Avantages	Inconvénients	Références
Solid Lipid Nanoparticles (SLN) (lipide pur)	20 nm – 200 nm	Non sensible à la dilution Stabilité importante Quantité encapsulée importante Utilisation des lipides biocompatibles et biodégradables Facilité de Production en grande échelle Absence de solvants organiques Contrôle du relargage du principe actif	Expulsion des molécules encapsulées lors de la cristallisation [3, 21, 22, 32, 35, 36]

---

### I.1.3. Composition des SLN

Les SLNs sont préparées à partir de lipides solides, de tensioactifs et d'eau. Cette partie porte sur la description détaillée de ces composants.

#### I.1.3.1. Les lipides

##### I.1.3.1.1. Définition

Les lipides sont des molécules hydrophobes ou amphiphiles comprenant entre autres les cires, les stérols, les mono-, di- et triglycérides ou encore des phospholipides (Figure 2). Les lipides peuvent se présenter à température ambiante à l'état solide, comme les beurres et les cires, ou bien liquide comme les huiles. De plus, les lipides sont solubles dans des solvants organiques comme l'hexane, le chloroforme, etc.

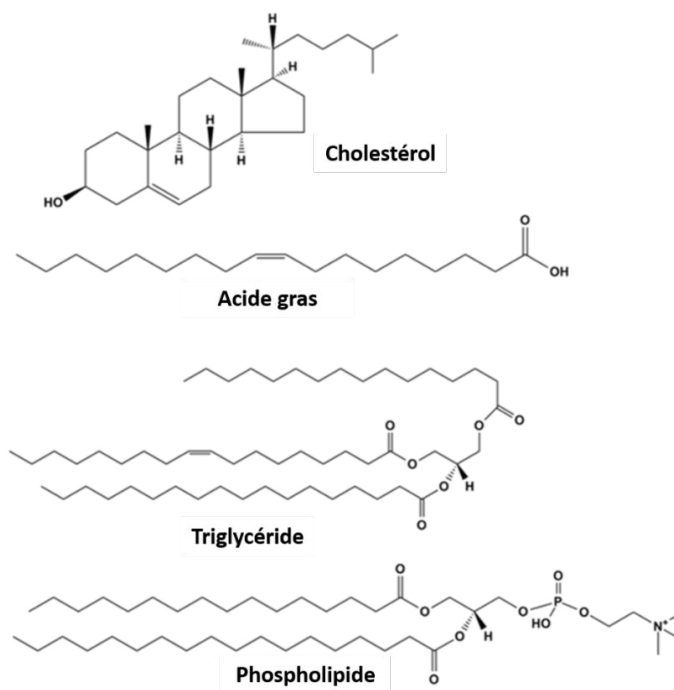


Figure 2 : Structure de certains lipides.

*I.1.3.1.2. Types de lipides utilisés dans la préparation des SLNs*

Les SLNs sont majoritairement composés de triglycérides ou d'acides gras (Tableau 2). Chaque lipide utilisé dans la préparation des SLNs est caractérisé par sa température de fusion ( $T_m$ ).

Tableau 2: Tableau récapitulatif des différents types de lipides utilisés pour la préparation des SLNs et NLCs.

Lipides utilisés pour préparer des SLNs et NLCs			
Groupes	Formules brutes	Point de fusion (T <sub>m</sub> , °C)	Références
<b>Triglycérides</b>			
Tristéarine	C <sub>57</sub> H <sub>110</sub> O <sub>6</sub>	72-75	[37-43]
Tripalmitine	C <sub>51</sub> H <sub>98</sub> O <sub>6</sub>	66-68	[37, 39, 43-45]
Trimirystine	C <sub>45</sub> H <sub>45</sub> O <sub>6</sub>	56-57	[37-39, 42, 43, 46]
Trioléine (NLC)	C <sub>57</sub> H <sub>104</sub> O <sub>6</sub>	-5,5	[47]
Trilaurine	C <sub>39</sub> H <sub>74</sub> O <sub>6</sub>	46,5	[48]
Tricaprine	C <sub>33</sub> H <sub>62</sub> O <sub>6</sub>	31-32	[47, 49, 50]
Triglycérides à chaîne moyenne			[51-53]
<b>Monoglycérides</b>			
Glyceryl monostearate	C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub>	78-81	[42, 43, 54, 55]

Groupes	Formules brutes	Point de fusion (T <sub>m</sub> )	Références
Glyceryl monolaurate	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	63	[56]
<b>Mélanges</b>			
Glyceryl behenate	C <sub>25</sub> H <sub>25</sub> O <sub>4</sub>	83	[57, 58]
Glyceryl palmitostearate	C <sub>37</sub> H <sub>73</sub> O <sub>7</sub>	52-55	[59-61]
Qualité witepsol		31-39	[10, 62, 63]
<b>Acides gras</b>			
Acide béhénique	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	72-80	[57, 58]
Acide stéarique	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	67-72	[43, 55, 57, 58, 64]
Acide palmitique	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	61-62,5	[57, 58, 65, 66]
Acide oléique	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	13-14	[38, 59, 67]
Acide myristique	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	54,4	[57, 58]
<b>Alcools gras</b>			
Stearyl alcohol	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub> O	59,4-59,8	[68-70]
Cetyl alcohol	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> O	49	[38, 61, 70, 71]
Myristyl alcohol	C <sub>14</sub> H <sub>34</sub> O	38	[70]
Lauryl alcohol	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> O	24-27	[70]

Groupes	Formules brute	Point de fusion (T <sub>m</sub> )	Références
<b>Cires</b>			
Cetyl palmitate	C <sub>32</sub> H <sub>64</sub> O <sub>2</sub>	54	[53, 68, 72, 73]
Cire des abeilles	C <sub>15</sub> H <sub>31</sub> COOC <sub>30</sub> H <sub>61</sub>	62-64	[74, 75]
Cire de carnauba		82	[75, 76]
<b>Autres</b>			
Huile de ricin (NLC)	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	-18	[77]
Huile de ricin hydrogéné		86	[65, 78-80]
Huile de palme hydrogéné			[81, 82]
Beurre de cacao		34-38	[83, 84]
Beurre de Karité		33-37	[85]
La graisse de chèvre		51	[86]
La graisse de lait anhydre		32-34	[87]

### 1.1.3.1.3. Beurre de Karité

Le beurre de Karité est une matière grasse végétale extraite des fruits de Karité. Elle est composée essentiellement de triacylglycérols et des insaponifiables. Kapseu *et al.* et Di Vincenzo *et al.*, ont identifié trois groupes de triacylglycérols dans le beurre de Karité : polyinsaturés, di-insaturés et mono-insaturés [88, 89].

Tableau 3: Composition (%) en triglycérides du beurre de Karité. S : acide stéarique, P : acide palmitique, O : acide oléique, A : acide arachidique Li : acide linoléique, Ln : acide linoléique [90].

<b>Triacylglycérols polyinsaturés</b>									
SLiLi	OOLi	POLi	OOO	SLiO	LiLiLi	OLiO	LiLnLi	PLiP	Références
-	2	2,6	7,8	10,5	-	-	-	-	[88]
0,6	-	-	10,8	5,2	1,7	1,6	0,3	0,1	[89]

<b>Triacylglycérols di-insaturés</b>				
POO	PLiS	SOO	AOO	Références
2,5	-	35,2	-	[88]
3,1	1,5	26,7	1,2	[89]

<b>Triacylglycérols mono-insaturés</b>			
PPS	POS	SOS	Références
0,5	8,5	32,6	[88]
-	5,3	40,4	[89]

Le triacylglycérol polyinsaturé principal est OOO (10,6 %), tandis que les principaux triacylglycérols s mono- et di-insaturés sont SOS (40,4 %) et SOO (35,2 %) respectivement. La composition varie avec les régions. Par exemple, le teneur en SOS varie de 13% dans le beurre de Karité d'origine Ougandaise à 45% dans le beurre de Karité provenant du Burkina Faso [90]. L'analyse des acides gras a montré que le beurre de Karité est riche en acide oléique (49,3% en moyenne) et acide stéarique (42,6% en moyenne).

En outre la variation de la composition en lipides présente une influence sur le point de fusion du beurre de Karité qui varie entre 25°C et 45°C. De plus, le beurre de Karité contient des insaponifiables tels que les stérols, les alcools triterpéniques, les composés

phénoliques et les tocophérols [91-93]. La présence de ces composés confère au beurre de Karité des activités biologiques intéressantes telles qu'une activité anti-inflammatoire et une activité antioxydante. En outre, le beurre de Karité en particulier à l'état non raffiné, peut contenir du latex qui confère en plus une protection naturel contre les ultraviolets [89].

#### 1.1.3.1.4. Cristallisation des lipides – état polymorphique

L'organisation des chaînes lipidiques à l'état solide se présente à deux niveaux différents [94]. Le premier fait référence à l'empilement longitudinal en feuillets des chaînes hydrocarbonées (structure lamellaire) avec des distances de répétition comprises en 40 et 60 Å). Le second correspond à la structure cristalline des chaînes entre elles (empilement latéral) selon différentes géométries (hexagonale, orthorhombique, triclinique) avec des distances de répétition plus faibles comprises en 3 et 5 Å) (Figure 3). Les deux organisations peuvent être mises en évidence par diffraction des rayons X (DRX) respectivement aux bas angles (SAXS : Small Angles X ray Scattering) pour l'empilement longitudinal et aux grands angles (WAXS : Wides Angles X ray Scattering) pour l'empilement latéral. Le principe de la DRX est détaillé dans le *chapitre II partie 9.3*.

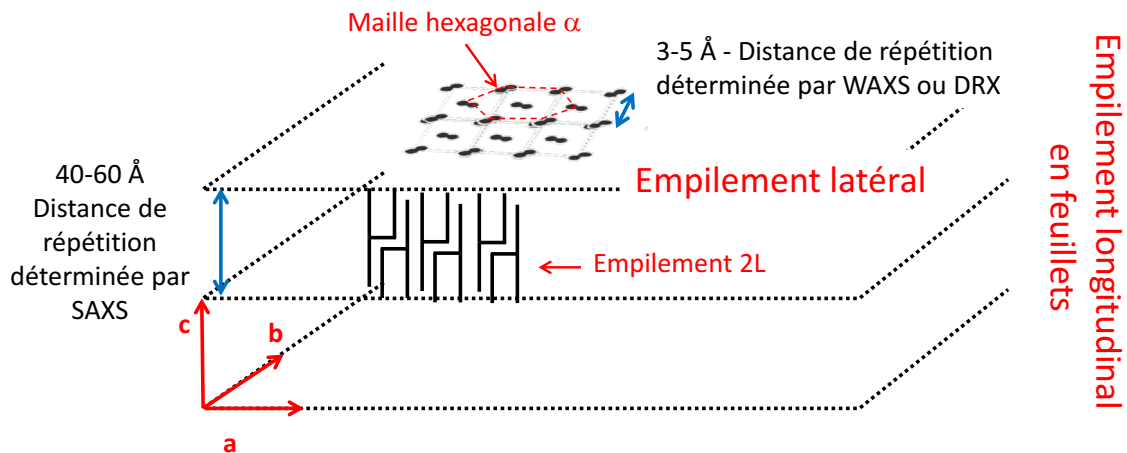


Figure 3: Schéma de l'organisation d'un lipide cristallisé.

D'après la littérature, les chaînes d'acides gras cristallisent principalement sous trois structures (polymorphes) nommées  $\alpha$ ,  $\beta'$  et  $\beta$  (Figure 4).



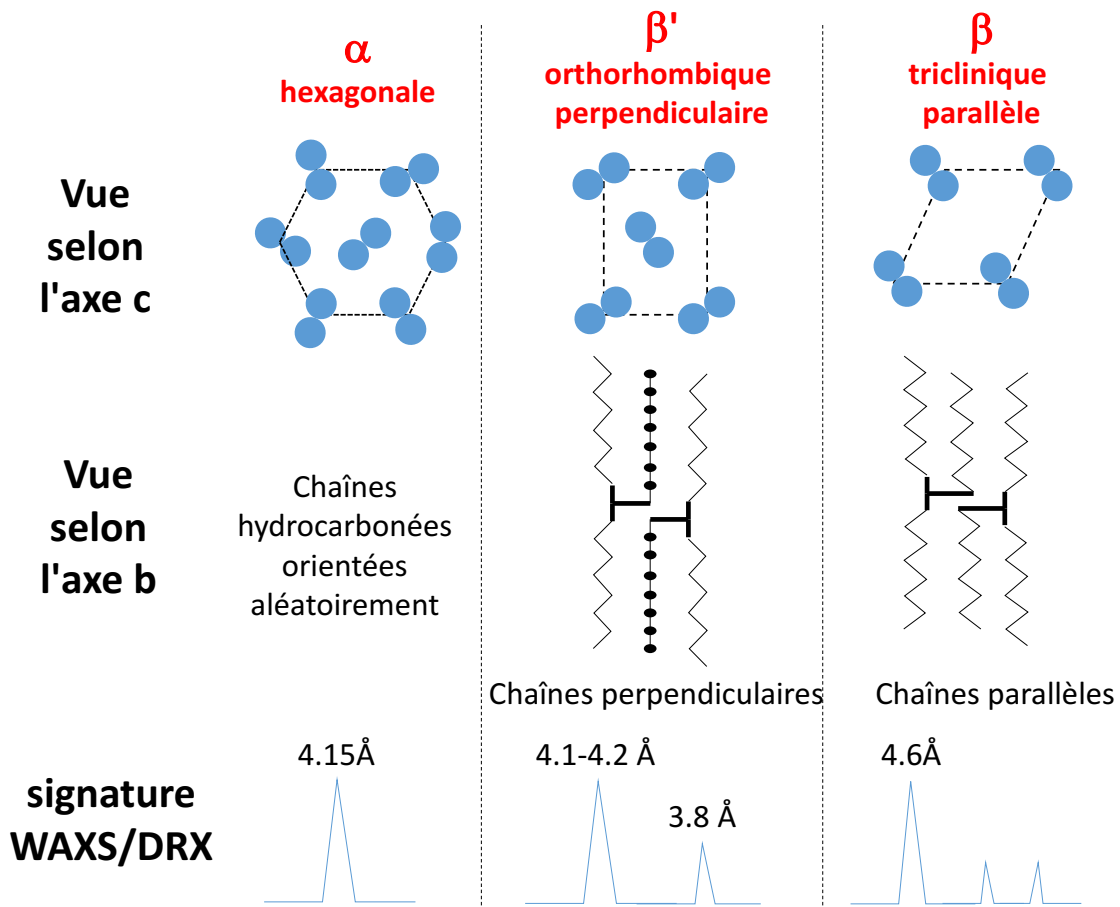


Figure 4: Types de structures cristallines formées par les lipides (empilement latéral).

La phase  $\alpha$  correspond à un empilement hexagonal des chaînes hydrocarbonées avec une orientation aléatoire. La phase  $\beta'$  présente une structure orthorhombique perpendiculaire dont les chaînes d'acides gras sont perpendiculaires les unes aux autres. La phase  $\beta$  présente une structure triclinique dans laquelle les chaînes sont parallèles entre elles.

Chaque structure présente des pics caractéristiques sur les diffractogrammes DRX. La phase  $\alpha$  présente principalement un pic à  $4,15 \text{ \AA}$ . La phase  $\beta'$  présente 2 pics à  $4,1-4,2 \text{ \AA}$  et un pic à  $3,8 \text{ \AA}$ . La phase  $\beta$  présente 3 pics avec le premier est situé à  $4,6 \text{ \AA}$ .

Trois types d'empilement des chaînes d'acides gras sont également présentés dans la littérature (Figure 5) [94].

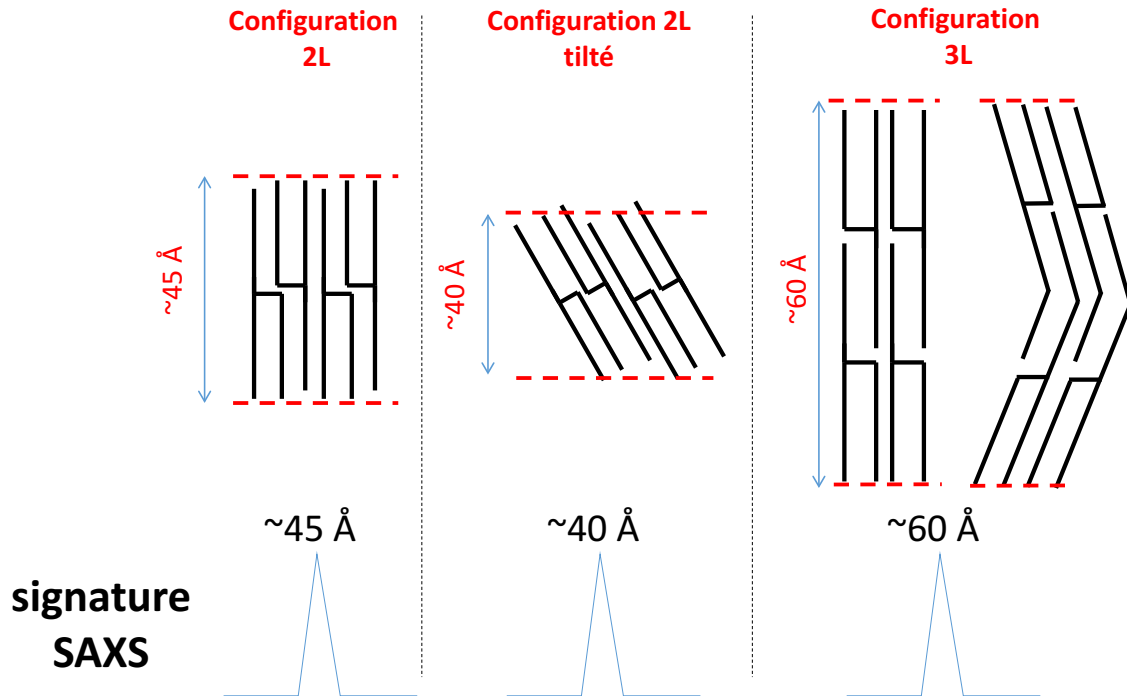


Figure 5: Types d'empilements longitudinaux formés par les lipides.

Chaque configuration présente un pic caractéristique en SAXS. La configuration 2L présente un pic caractéristique à  $45 \text{ \AA}$  qui correspond à la longueur de 2 chaînes hydrocarbonées. La configuration 3L présente un pic à  $60 \text{ \AA}$  qui correspond à la longueur de 3 chaînes. En outre, les chaînes peuvent être perpendiculaires ou inclinées au plan de l'empilement longitudinal. Lorsque les chaînes sont inclinées on parle de la configuration 2L inclinée ou tiltée qui présente un pic caractéristique à  $40 \text{ \AA}$ . La présence d'insaturations peut conduire à une structure coude des chaînes hydrocarbonées.

### *1.1.3.2. Les tensioactifs*

Les études portant sur les SLNs ont démontré que la composition du système (concentration du lipide, ratio lipide/tensioactif, ...) influe sur plusieurs propriétés des particules obtenues telles que la taille des particules et la stabilité [53, 71, 95, 96]. La nature du tensioactif utilisé pour stabiliser la dispersion est ainsi importante et va contrôler différentes propriétés telles que la taille et la stabilité des SLNs. La concentration en tensioactif est aussi primordiale. Pour obtenir des particules de petites tailles, il est nécessaire d'augmenter la concentration du tensioactif, afin de stabiliser l'interface [97, 98].

#### *1.1.3.2.1. Définition*

Un tensioactif ou agent de surface est un composé qui modifie la tension interfaciale entre deux milieux. Les composés tensioactifs sont des molécules amphiphiles, c'est-à-dire qu'elles présentent deux parties d'affinités différentes, l'une lipophile (« queue hydrophobe », chaîne hydrocarbonée soluble dans l'huile) et apolaire, l'autre hydrophile (« tête » hydrophile soluble dans l'eau) et polaire (Figure 6).

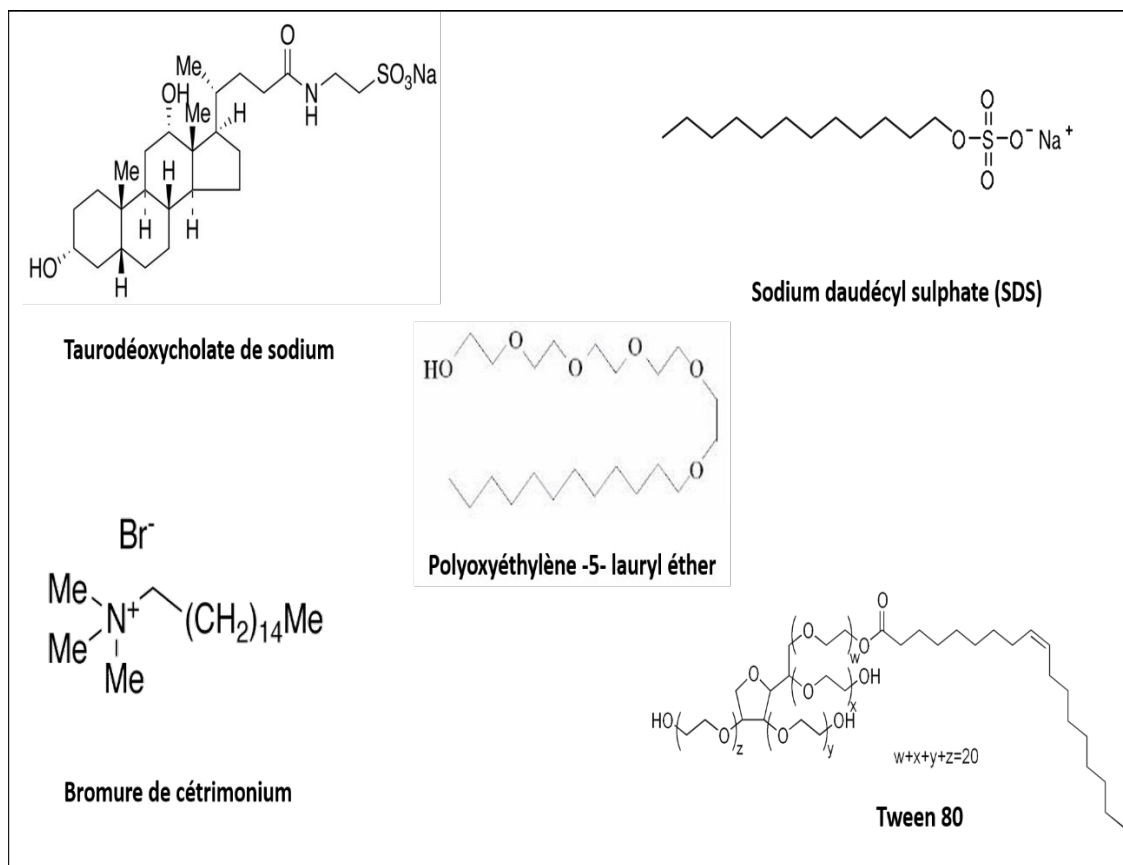


Figure 6: Exemple des tensioactifs courants.

Les tensioactifs permettent ainsi de faire coexister deux phases non miscibles, en se plaçant à l'interface. Ils interagissent avec la partie apolaire par leur partie hydrophobe et avec la phase aqueuse par leur partie hydrophile. Dans les domaines pharmaceutiques et agro-alimentaires, les tensioactifs sont utilisés comme émulsifiants, et/ou agents de solubilisation [99].

#### 1.1.3.2.2. Classification

Les tensioactifs sont classés selon deux critères : leur caractère hydrophile / lipophile (balance hydrophile / lipophile ou HLB (Hydrophilic/lipophilic Balance)) et leur charge. La HLB est une échelle allant de 0 à 20 utilisée pour caractériser le caractère hydrophile ou hydrophobe des tensioactifs. Elle est calculée par la formule suivante (échelle de Griffin valable pour les tensioactifs non-ioniques) (Eq.1, [100]) :

$$HLB = \left( \frac{\text{Masse de la partie hydrophile}}{\text{Masse de la partie hydrophobe}} \right) \times 20 \quad (\text{Eq.1})$$

La balance HLB est liée à la solubilité du tensioactif. Les tensioactifs lipophiles présentent une HLB faible (< 8) tandis que les tensioactifs hydrophiles possèdent HLB élevée (> 12), les tensioactifs intermédiaires possèdent une HLB comprise entre 8 et 12. Les tensioactifs hydrophobes permettent généralement de stabiliser des émulsions inverses alors que les tensioactifs hydrophiles favorisent la formation d'émulsions directes. La loi de Bancroft stipule en effet que le sens de l'émulsion dépend de la solubilité du tensioactif, le milieu continu étant celui dans lequel le tensioactif est soluble préférentiellement.

Les tensioactifs non ioniques ne présentent pas de charge électrique. Ils sont généralement moins irritants par rapport aux tensioactifs anioniques et cationiques [99]. La partie hydrophile peut être composée de motifs oxyéthylènes (OC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) ou de dérivés de polyols. La partie hydrophobe comprend des chaînes hydrocarbonées saturées ou insaturées ou des alcools [99].

Les tensioactifs anioniques (tête polaire chargée négativement) conduisent à une charge de surface négative des objets qu'ils forment en solution aqueuse. La HLB des tensioactifs ioniques est déterminée par la formule de Davis (Eq.2) [101]. Ils sont utilisés notamment dans la fabrication des shampooings. Par ailleurs, ils sont partiellement désactivés par des métaux chargés positivement tels que le calcium et le magnésium d'où l'ajout des agents chélateurs de Ca et Mg [99].

$$HLB = \sum \text{valeurs associées aux groupes hydrophiles} - \sum \text{valeurs associées aux groupes hydrophobes} + 7$$

(Eq.2)

Les tensioactifs cationiques portent une charge positive dans le milieu aqueux. Ce sont généralement des produits azotés (avec un atome d'azote chargé positivement). Ils ont des propriétés bactériostatiques et émulsifiantes. Ils peuvent être utilisés dans le nettoyage des plaies [102].

Les tensioactifs zwitterioniques ou amphotères contiennent à la fois des groupements positifs et négatifs. La charge de ce type de tensioactifs dépend du pH du milieu [99]:

- En milieu basique, ils se comportent comme des tensioactifs anioniques, le groupement chargé positivement est déprotoné tandis que le groupement acide est chargé négativement (déprotonation).
- En milieu acide, ils se comportent comme des tensioactifs cationiques où la partie basique est protonée.
- A un pH spécifique, la somme des charges est nulle, ils se comportent alors comme des tensioactifs non ioniques.

Ils sont utilisés dans la fabrication des produits cosmétiques et les produits de lavage de vaisselle en raison de leurs propriétés moussantes.

Les tensioactifs, souvent utilisés dans la littérature pour stabiliser les SLNs et NLCs, sont présentés dans le Tableau 4.

Tableau 4: Tableau récapitulatif des différents types de tensioactifs utilisés pour la préparation des SLNs et NLCs

Tensioactifs	Références
<b>Non ioniques</b>	
<b>Polyoxyéthylène sorbitan ester d'acide gras</b>	
Polysorbate 20 (Tween 20)	[54, 81, 103]
Polysorbate 60 (Tween 60)	[45, 69, 71]
Polysorbate 80 (Tween 80)	[42-45, 51, 55, 81]
Polysorbate 85 (Tween 85)	[81]
<b>Polyoxyéthylène alkyl/aryl éthers</b>	
Polyoxyéthylène (20) cétyl ether	[104]
Polyoxyéthylène (20) isohecadecyl ether	[104]
Polyoxyéthylène (20) oleyl ether	[104]
Polyoxyéthylène (20) stearyl ether	[103-106]
Tyloxapol	[107, 108]
<b>Huiles de ricin éthoxylés</b>	
PEG-35 huile de ricin	[109]
PEG-40 huile de ricin hydrogéné	[110, 111]
<b>Poloxamers (copolymères à blocs)</b>	
Poloxamer 188	[46, 51, 77, 112]
Poloxamer 407	[63, 113, 114]
<b>Anioniques</b>	
Déhydrocholate de sodium	[55]
Taurocholate de sodium	[64, 83, 115]
Glycocholate de sodium	[116-118]
Cholate de sodium	[119, 120]

Tensioactifs	Références
Lauryl sulphate de sodium	[121, 122]
<b>Cationiques</b>	
Bromure de cetrimonium	[68, 69, 71]
DOTAP	[38, 123]
DOTMA	[124]
Sels de Chlorhexidine	[125]
Bromure de diméthyl diocta- décylammonium	[67]
<b>Amphotères</b>	
L- $\alpha$ -phosphatidylcholine	[47]
Lécithine de soja	[40, 55, 60, 77, 126]
Lécithine d'œuf	[75, 127]

#### *1.1.3.2.1. Les phospholipides*

Les phospholipides sont des lipides contenant une chaîne de glycérol estérifiée en positions 1 et 2 par des acides gras et en position 3 par un groupement phosphate. Ce sont des lipides amphiphiles c'est-à-dire constitués d'une « tête » polaire attachée à des chaînes hydrocarbonées (« queues » hydrophobes) (Figure 7). La nature des groupements liés aux groupements phosphates est très diverse. Les plus courants sont l'acide phosphatidique, la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE) ou la phosphatidylsérine. Les chaînes hydrocarbonées varient en taille et en degré de saturation. La lécithine est probablement la forme la plus commune de phospholipides, elle est formée principalement de PC.



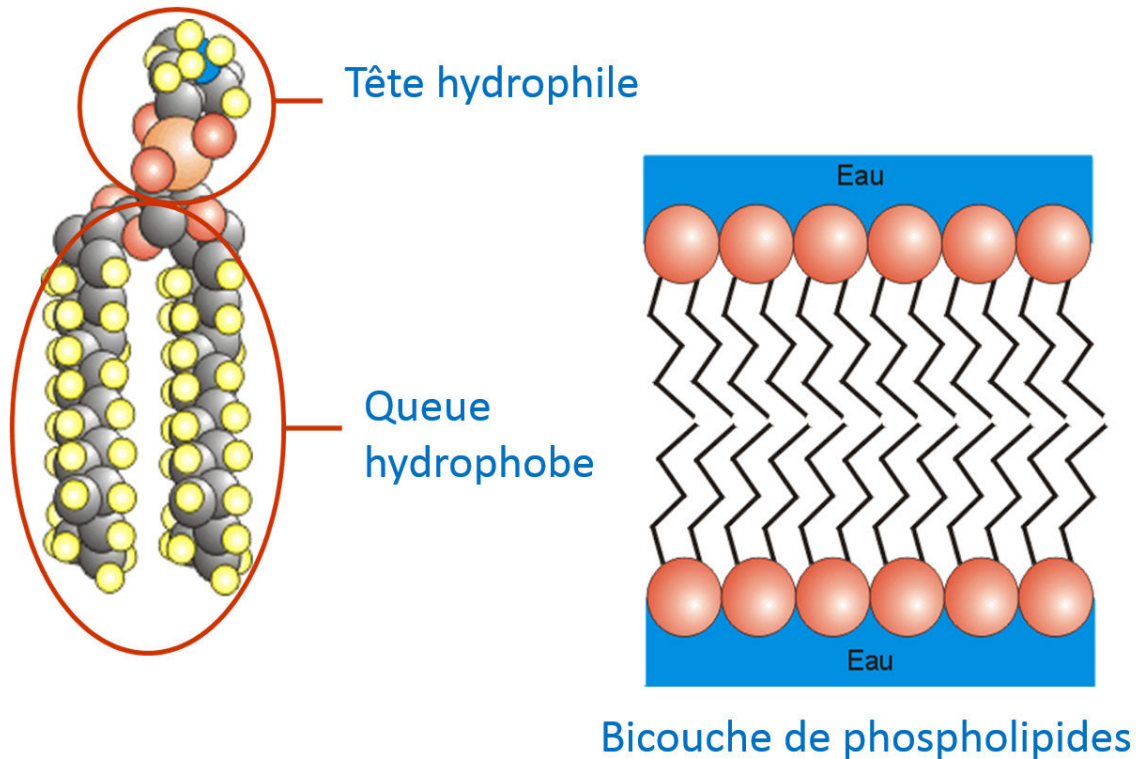


Figure 7: Représentation schématique de la structure générale d'un phospholipide, et son comportement sous forme de bicouche dans l'eau (slide player.fr, consulté le 16/09/2015)

Les phospholipides sont des composés amphiphiles, utilisés en tant que tensioactifs stabilisant des nanoparticules lipidiques. Les premiers efforts dans le but de comprendre les mécanismes de stabilisation des émulsions par des phospholipides sont attribués à Frieberg et à ses collègues qui ont étudié l'effet de l'adsorption d'une couche de phospholipides à l'interface sur la stabilité des émulsions [128-130]. Ils ont ainsi montré que la stabilité de l'émulsion est améliorée par la présence d'une couche de phospholipides à l'interface. Rydhag et Wilton ont étudié le gonflement des PCs (sous forme des vésicules) à l'interface. Ils ont ainsi montré que le gonflement dépend de la concentration des autres phospholipides (PE, phosphatidylinositol (PI) et acide phosphatidique) [131]. Le gonflement a été renforcé par la présence des phospholipides chargés négativement, ce qui montre que la présence de ces phospholipides permet une répulsion électrostatique entre les gouttelettes qui renforce leur stabilité.

Les phospholipides peuvent être utilisés dans la stabilisation des émulsions et des SLNs [45] .

#### I.1.4. Méthodes de préparation des SLN

Les méthodes de préparation des nanoparticules lipidiques solides sont nombreuses et largement décrites dans la littérature [2, 21, 132]. Le principe de base de ces méthodes repose sur la préparation de nanoémulsions avec ou sans apport d'énergie dans le système. Les nanoparticules sont obtenues à partir d'une nanoémulsion directe huile/eau préparée à une température supérieure à la température de fusion du lipide utilisé. La phase suivante de solidification/cristallisation du lipide par refroidissement conduit à la formation des nanoparticules solides à température ambiante.

##### *I.1.4.1. Homogénéisation à haute pression*

La technique d'homogénéisation à haute pression est l'une des premières techniques utilisées pour la préparation des SLNs [14] (Figure 8). De nos jours, cette technique est bien établie pour la production des nanoémulsions, l'homogénéisation du lait, la préparation de crèmes glacées, etc [21]. Elle présente de nombreux avantages dont une facilité de production à grande échelle, une absence de solvants organiques et un temps de production relativement courts. Elle peut être effectuée à chaud (lipide fondu) ou à froid (lipide solide)

Dans cette technique, un liquide est poussé à haute pression dans un espace étroit. La pression élevée (100-2000 bars) et le faible diamètre de l'orifice (quelques microns) vont provoquer une accélération de la dispersion et une diminution de pression très importante. Il en résulte une contrainte de cisaillement et des forces de cavitation très élevées qui vont perturber les particules dans le liquide. Une augmentation de la température au cours du processus (généralement autour de 10°C tous les 500 bars) est également possible en raison de la forte accélération et des forces de friction [21].

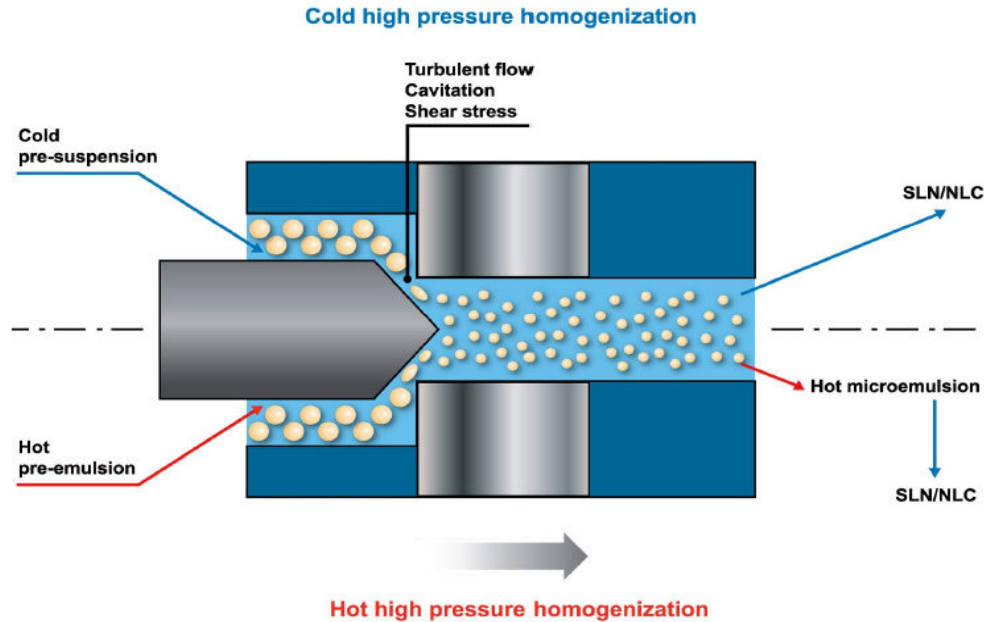


Figure 8: Représentation schématique de la préparation des SLNs et NLCs par homogénéisation à haute pression [21].

#### *1.1.4.2. Homogénéisation à chaud*

Cette technique est réalisée à des températures supérieures au point de fusion du lipide. Elle est similaire à l'homogénéisation d'une émulsion. Une pré-émulsion H / E est obtenue après homogénéisation à grande vitesse du mélange principe actif / lipide chauffé à une température supérieure au point de fusion. L'homogénéisation à haute pression est ensuite effectuée toujours à une température supérieure au point de fusion du lipide utilisé. Généralement, la taille des particules obtenues diminue lorsque la température utilisée lors de la production augmente en relation avec une diminution de la viscosité du lipide. Néanmoins, une température trop élevée peut affecter la stabilité des particules [133]. Les propriétés du système final dépendent du nombre de passages à travers l'homogénéisateur à haute pression. Dans la plupart des cas il suffit de 3 à 5 cycles d'homogénéisation à une pression allant de 500 à 1500 bars pour obtenir des nanoparticules monodisperses. L'augmentation du nombre des cycles d'homogénéisation conduit à une augmentation de la taille des SLNs due à la coalescence des particules.

#### *1.1.4.3. Homogénéisation à froid*

La première étape est similaire avec la technique d'homogénéisation à chaud incluant la solubilisation du principe actif à encapsuler dans le lipide fondu. La solution contenant le principe actif subit ensuite un refroidissement rapide (plongée dans de la carboglace ou dans de l'azote liquide) pour favoriser une bonne dispersion du principe actif dans la matrice lipidique. Le lipide solide est ensuite pulvérisé à froid pour fragiliser les lipides par un broyeur en mortier pour conduire à des microparticules de tailles variant entre 50 et 100  $\mu\text{m}$ . Ces particules sont ensuite dispersées dans une solution d'émulsifiant réfrigérée. Enfin, la dispersion est soumise à une homogénéisation à haute pression à une température inférieure ou égale à la température ambiante avec un contrôle approprié de l'élévation de la température au cours du processus. En comparant avec l'homogénéisation à chaud cette technique conduit à des particules de taille supérieure [134]. Cette technique a pour avantage d'éviter l'exposition de l'échantillon à la chaleur durant le processus d'homogénéisation. Il est cependant toujours nécessaire de chauffer pour solubiliser le principe actif dans le lipide fondu.

#### *1.1.4.4. Ultrasonication ou homogénéisation à grande vitesse*

Les SLNs peuvent être préparées par sonication ou homogénéisation à grande vitesse [135, 136]. L'inconvénient de ces techniques réside dans l'obtention de dispersions de particules de grande taille (quelques microns), induisant une instabilité physique, notamment une augmentation de la taille des particules lors du stockage. Par ailleurs, l'ultrasonication provoque une contamination par des métaux et une augmentation de la température de l'échantillon ce qui induit une dégradation du principe actif sensible à la chaleur. L'idéal est d'utiliser des systèmes de contrôle de température en gardant la température constante durant la sonication. Les mauvaises propriétés du produit obtenu après homogénéisation à grande vitesse (particules de taille de microns, instables) sont les raisons pour lesquelles cette technique est couplée soit avec l'ultrasonication soit l'homogénéisation à haute pression [21]. Le principal avantage de ces techniques est la facilité de mise en œuvre ainsi qu'une bonne reproductibilité de résultats.

#### 1.1.4.5. Emulsification / Evaporation du solvant

Cette technique consiste à solubiliser le lipide dans un solvant organique non miscible à l'eau (ex : cyclohexane). Cette phase organique est ensuite émulsifiée dans une phase aqueuse par sonication [137] (Figure 9). Après évaporation sous pression réduite du solvant, une dispersion des nanoparticules est formée par précipitation du lipide dans le milieu aqueux. La taille des nanoparticules obtenues peut être comprise entre 25 et 100 nm et dépend du mélange tensioactifs / co-tensioactifs. L'inconvénient majeur de cette technique est l'utilisation des solvants organiques. Cette technique est utilisée notamment pour l'encapsulation des principes actifs thermosensibles en raison de l'absence de toute contrainte thermique.

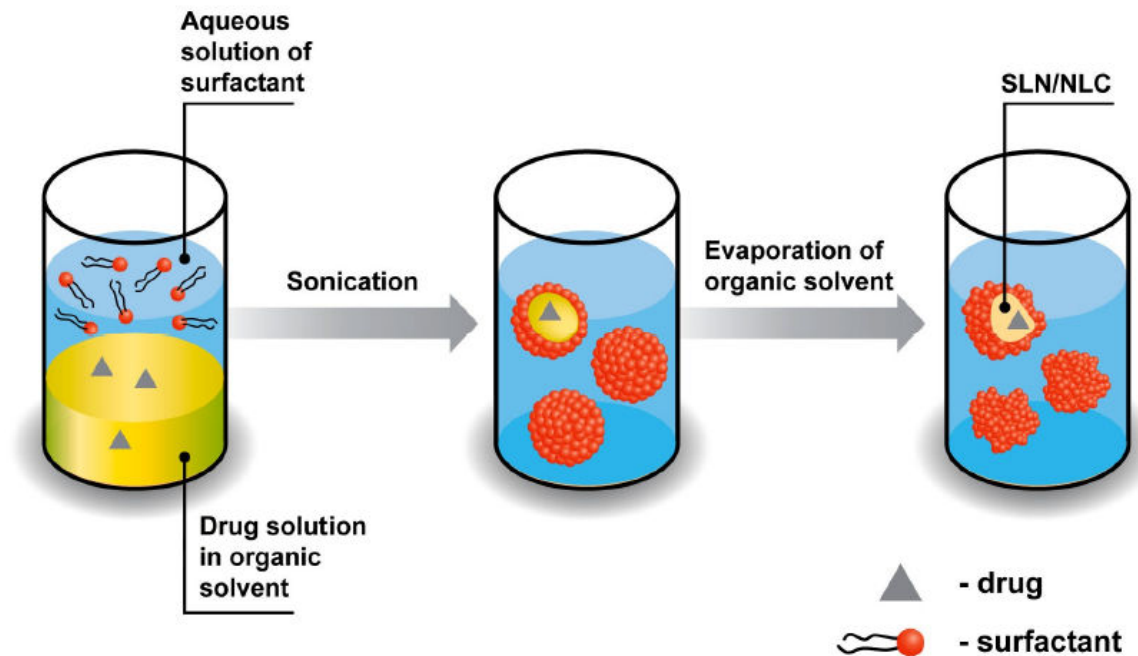


Figure 9: Représentation schématique de la technique d'émulsification - évaporation du solvant pour la préparation des SLNs et NLCs [21].

#### 1.1.4.6. Électro-atomisation

Dans cette technique relativement nouvelle, une atomisation électrodynamique est utilisée pour produire des SLNs directement sous forme de poudre [138]. Les particules obtenues par cette méthode sont monodisperses et de taille inférieure au 1 $\mu$ m. Cependant,

le procédé est actuellement à l'étude pour son applicabilité dans la production de grandes quantités de particules.

#### *1.1.4.7. Préparation des SLN basée sur la formation d'une microémulsion*

La formation de microémulsion est utilisée comme une étape pour préparer des SLNs et NLCs depuis les années 90 [139]. La microémulsion est formée spontanément (état thermodynamiquement favorable) en utilisant un ratio lipides / tensioactifs faible. Les proportions des composants du système sont essentielles et dans la plupart des cas, des diagrammes de phases ternaires sont utilisés pour étudier et décrire les domaines de la formation de la microémulsion. Cette technique consiste à mélanger un lipide fondu avec une solution micellaire de tensioactifs, chauffée à la même température. Cette dispersion est soumise à une agitation à faible vitesse jusqu'à ce que la microémulsion soit formée. La microémulsion est ensuite dispersée dans un grand volume d'eau froide (2-3°C) tout en agitant. Ainsi, les gouttelettes lipidiques vont se solidifier. Les SLNs ou NLCs obtenues par cette technique sont sphériques et monodisperses. Cependant, le procédé présente plusieurs inconvénients : i) La dispersion finale est très diluée (comprise entre 1 : 25 et 1 : 50 par rapport à l'émulsion chaude), d'où la nécessité de concentrer les particules par ultrafiltration, lyophilisation ou par d'autres méthodes. ii) La concentration élevée de tensioactifs / co-tensioactifs utilisés est un autre inconvénient majeur de cette technique.

#### *1.1.4.8. Préparation des SLNs par injection du solvant*

Cette technique a été développée par Fessi *et al.* [140]. Elle consiste à solubiliser les lipides utilisés dans des solvants qui diffusent rapidement dans la phase aqueuse (ex : acétone, DMSO, éthanol). La taille des particules obtenues augmente avec l'augmentation de la lipophilicité du solvant utilisé. D'après Fessi *et al.*, la taille des particules dépend de la vitesse de diffusion des lipides dans la phase aqueuse et les solvants polaires peuvent être uniquement utilisés. Cette technique présente comme avantage l'absence de températures élevées et des cisaillements lors de la préparation des SLN. Néanmoins, l'inconvénient majeur reste l'utilisation de solvants organiques.

### I.1.5. Incorporation de principes actifs dans des SLN

Plusieurs types de principes actifs avec différentes lipophilicités ont été incorporés dans des SLNs. L'incorporation du principe actif prend en compte sa localisation dans la matrice lipidique [141]. La capacité d'incorporation du principe actif est influencée par différents paramètres :

- La solubilité du principe actif dans le lipide.
- La structure chimique et physique de la matrice lipidique solide.
- L'état polymorphique du lipide utilisé.

La solubilité du principe actif dans le lipide est une condition primordiale pour obtenir une capacité d'incorporation suffisante. Elle doit être plus élevée que nécessaire car elle diminue lors de la cristallisation du lipide. L'addition des tensioactifs et l'utilisation des mono- ou di- glycérides dans la formation de la matrice lipidique favorise la solubilisation du principe actif dans le lipide fondu [142].

Par ailleurs, il faut tenir compte de la nature chimique du lipide. Les lipides formant un réseau cristallin parfait conduisent à une expulsion du principe actif. Les lipides plus complexes comme des mélanges de mono-, di- et triglycérides avec des acides gras possédant des chaînes de longueurs différentes diminuent le risque d'expulsion, en formant des cristaux imparfaits [142].

Le polymorphisme du lipide est un autre facteur qui influe sur les propriétés des nanoparticules lipidiques. La présence de plusieurs formes cristallines dans les lipides est particulièrement utile car elles fournissent des défauts de structure (imperfections) dans laquelle les molécules actives peuvent être logées. Cependant, le réseau cristallin parfait est thermodynamiquement plus stable que le réseau imparfait. Par exemple, la forme  $\beta$  des triglycérides est plus stable que les formes  $\beta'$  et  $\alpha$  [143]. Les formes métastables ont tendance à se transformer en une forme thermodynamiquement plus stable. Ces transitions posent un défi important dans le développement des SLNs, puisque les molécules actives sont logées dans les imperfections du réseau cristallin. Leur disparition avec le temps crée donc un problème évident au niveau de la quantité de principe actif encapsulé. Il en résulte

l'expulsion du principe actif pendant le stockage ou bien une libération rapide après administration du système.

Généralement, la cristallisation des lipides à longues chaînes d'acides gras est plus lente que ceux avec des chaînes plus courtes [144]. Les nanoparticules lipidiques à base de cire sont physiquement plus stables, mais elles présentent une expulsion importante du principe actif à cause de sa nature cristalline [145]. Un système optimisé à base de SLNs peut être créé en formant une fraction de la forme  $\alpha$  préservée lors du stockage. Ainsi, les SLNs peuvent être considérées comme des vecteurs d'administration du principe actif ayant un mécanisme de déclenchement intégré de libération en initiant la transformation de la forme  $\alpha$  vers la forme  $\beta$  qui est la plus stable. On peut citer plusieurs facteurs de déclenchement tels que la température et une diminution de la proportion en eau de la dispersion.

Concernant la localisation du principe actif au sein de la particule, Muller a décrit 3 modèles d'incorporation du principe actif dans des SLNs (Figure 10) :

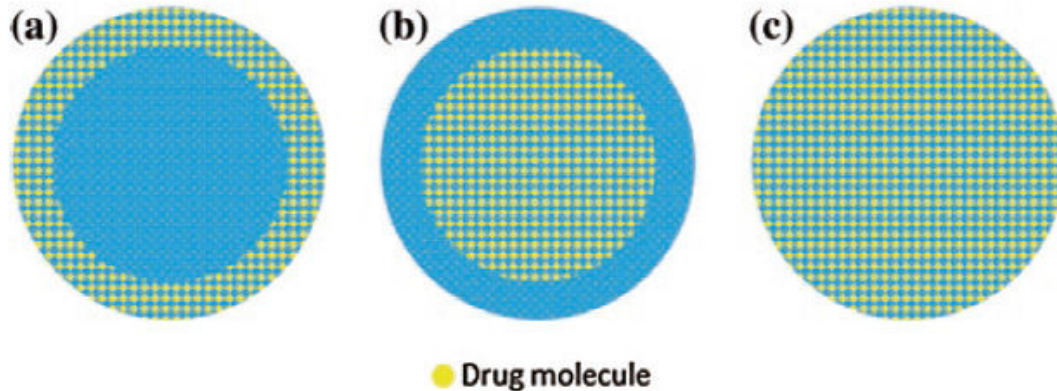


Figure 10: Modèles d'incorporation du principe actif dans les SLNs [22]: a) Modèle de couronne enrichie. b) Modèle cœur enrichi en principe actif. c) Modèle de dispersion homogène du principe actif dans les SLNs.

a) Le modèle « couronne enrichie » peut être expliqué par un mécanisme de précipitation des lipides qui se produit lors de la production entraînant une répartition spécifique du principe actif pendant le refroidissement. Le refroidissement rapide accélère



la précipitation du lipide dans le cœur de la particule avec une augmentation concomitante de la concentration du principe actif dans la couronne. La chute de température conduit à la précipitation du principe actif dans la couronne des SLNs. Ce modèle est approprié pour avoir une libération rapide du principe actif. Une telle libération rapide est hautement souhaitable pour les formulations des SLNs utilisées en dermatologie nécessitant une pénétration rapide du principe actif dans la peau [34].

La solubilité du principe actif dans la phase aqueuse à une température élevée, est un autre facteur pouvant influencer la précipitation du principe actif dans la couronne. Au cours de l'homogénéisation à chaud le principe actif se déplace partiellement dans la phase aqueuse en raison de sa solubilité accrue dans cette phase (tensioactifs et eau). Cependant, le refroidissement de la dispersion entraîne une diminution de la solubilité du principe actif dans la phase aqueuse. Cela conduit à l'enrichissement du principe actif dans la couronne, dans le cas où la recristallisation du lipide a déjà commencé [34].

b) Le modèle d'incorporation du principe actif dans le cœur de SLN est obtenue quand le principe actif précipite avant la recristallisation du lipide, c'est-à-dire lorsque la concentration en principe actif est proche de la saturation. Le refroidissement de la nanoémulsion entraîne la supersaturation du principe actif et donc sa précipitation avant la recristallisation du lipide.

c) Un modèle de solution solide, ou modèle de matrice homogène, est obtenu lorsque le principe actif est dispersé d'une manière homogène dans la matrice lipidique. Ce modèle est habituellement décrit pour des nanoparticules lipidiques préparées par la technique d'homogénéisation à froid, ou lorsque des principes actifs très lipophiles sont incorporés dans les nanoparticules de telle sorte que la technique d'homogénéisation à chaud peut être employée sans l'utilisation de tensioactifs. Lorsque la technique d'homogénéisation à froid est utilisée, le principe actif solubilisé se disperse dans le lipide. Lorsqu'il est soumis à une homogénéisation à haute pression, l'agitation mécanique conduit à la formation de nanoparticules lipidiques avec une matrice homogène. Un résultat similaire est obtenu lorsque les gouttelettes lipidiques produites par homogénéisation à chaud se refroidissent rapidement. Les gouttelettes cristallisent et il n'y a pas de séparation

de phase entre le principe actif et le lipide. Ce modèle est approprié pour avoir une libération prolongée du principe actif [34, 145].

### I.1.6. Libération du principe actif des SLNs

De nombreuses études ont été réalisées pour contrôler les propriétés des SLNs telles que leur stabilité, leur morphologie, leur cristallisation, leur toxicité *in vivo*, etc [45, 95, 96, 146]. Par ailleurs, ces particules étant souvent utilisées comme vecteur potentiel, l'étude de l'incorporation et de la libération d'un principe actif est un facteur important dans la conception, le développement et l'évaluation de ces nanovecteurs.

Une caractéristique importante des SLNs concerne le contrôle de la libération du principe actif qui dépend principalement de sa localisation au sein de la particule [134]. Une molécule active se trouvant à la surface ou dans l'enveloppe externe (modèle couronne enrichie) sera rapidement libérée, tandis que si elle est localisée dans le cœur de la nanoparticule, sa libération se fera de manière prolongée. Laserra *et al.* ont étudié la libération de lipoyl-mémantine encapsulé dans des SLNs, dans des milieux simulant le suc gastrique (SGF, Simulated Gastric Fluid) et intestinal (SIF, Simulated Intestinal Fluid) en utilisant une membrane de dialyse [147] (Figure 11).

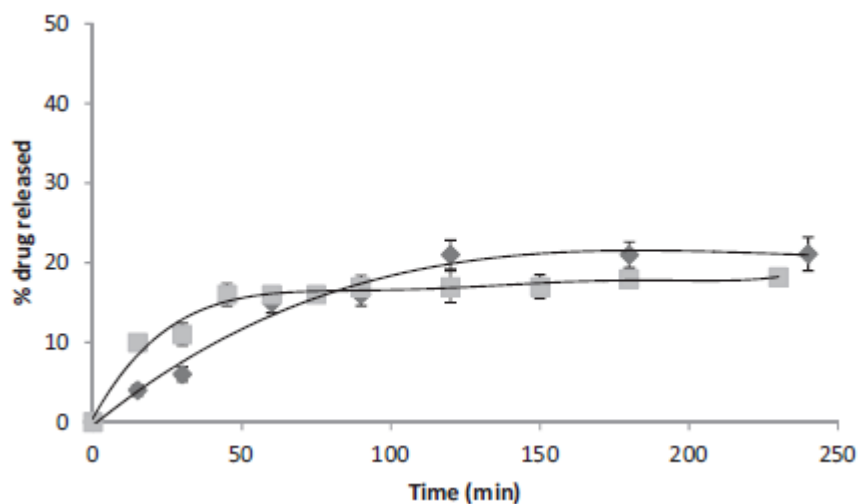


Figure 11: Libération de lipoyl-mémantine *in vitro* dans SGF à pH 1,2 et dans SIF à pH 8

Le lipoyl-mémantine est un principe actif hydrophobe et faiblement soluble dans la phase aqueuse. Pour cela un tensioactif non ionique (crémophore ELP) a été ajouté pour améliorer la solubilité du principe actif libéré. Les résultats indiquent que dans les deux milieux, 12% du principe actif a été libéré après une heure d'incubation. Par contre, 20% de lipoyl-mémantine a été libéré après 4h d'incubation. D'après ces résultats, on peut dire que 80% du principe actif existe dans le cœur hydrophobe, et 20% existe soit dans la couronne ou à la surface des SLNs.

La composition du système utilisé peut également influencer la libération du principe actif encapsulé. Olbrich et Muller ont montré que le lipide et le tensioactif sont responsables de la dégradation de la matrice lipidique par les lipases, puisque les lipases ont besoin d'une interface lipidique pour être actives. Une balance entre des stabilisateurs stériques et d'autres tensioactifs doit être optimisée pour modifier la libération du principe actif et la dégradation des particules [148]. Le revêtement des nanoparticules par un polymère hydrophile (ex : chitosane) évite la reconnaissance des nanoparticules par les lipases.

### I.1.7. Stabilité des SLNs

#### *I.1.7.1. Mécanismes physico-chimiques de déstabilisation des SLNs*

Tout comme les émulsions, les SLNs sont des systèmes thermodynamiquement instables. Leur stabilité ne peut être donc être qualifiée que de cinétique, la séparation de phase étant le système stable du point de vue thermodynamique. Les aspects de stabilité sont donc une question majeure dans toute étude axée sur les SLNs. Pour conserver un système stable au cours du temps, il faut lutter contre plusieurs mécanismes physico-chimiques impliqués dans la déstabilisation des SLN.

##### *I.1.7.1.1. Stabilité chimique (stabilité des lipides)*

La stabilité chimique des lipides dans les formulations est très importante pour la qualité du produit final. Le mécanisme d'oxydation des lipides à l'état nanodispersé diffère

de l'état « bulk » en raison de la phase aqueuse qui peut contenir des antioxydants et des pro-oxydants [149].

Les principaux pro-oxydants pouvant existés dans la phase aqueuse sont les métaux de transition. Ces derniers permettent la décomposition des hydroperoxydes situés à la surface des particules en radicaux libres [150]. Les acides gras libres sont aussi des promoteurs de l'oxydation des lipides [151]. Néanmoins, la structure rigide des SLNs et NLCs est censée protéger les lipides de l'oxydation en les piégeant dans le cœur solide [149]. Soukharev *et al.* ont ainsi préparé des formulations de SLNs en utilisant exclusivement des triglycérides et ont ensuite comparé la stabilité des systèmes obtenus avec d'autres formulations produites avec des lipides de différents ratios en mono-, di- et triglycérides (Softisan et Imwitor) et des lipides ayant différents groupements hydroxyles (Witepsol S51 et S55) [152]. La stabilité des lipides a été étudiée par chromatographie en phase gazeuse. Les résultats obtenus ont montré que les SLNs fabriqués avec des triglycérides sont plus stables avec ceux produits avec des mono- et diglycérides. Les triglycérides peuvent subir une réaction d'hydrolyse conduisant à la formation des mono-, diglycérides et des acides gras libres. Néanmoins, leur localisation à l'intérieur des particules limite leur sensibilité à l'hydrolyse contrairement à des phospholipides localisés à l'extérieur des liposomes.

#### *1.1.7.1.2. Stabilité physique*

##### *1.1.7.1.2.1 Relation entre la stabilité physique des SLNs et la transition polymorphique du lipide*

La stabilité physique peut être liée à l'état cristallin des lipides dans la formulation. Les lipides présentent plusieurs structures citées précédemment. Ces phases  $\alpha$ ,  $\beta'$  et  $\beta$ , ainsi qu'un état possible de surfusion « supercooled melt » peuvent influencer directement sur la stabilité des particules (Tableau 4).

Tableau 5: Influence de la structure du lipide sur les propriétés des SLNs [21].

Etats	Capacité d'incorporation	Mobilité des molécules lipidiques	Stabilité	Taille du cristal	Morphologie des particules
Lipide en surfusion	Très élevée	Très élevée	Très faible	Etat liquide	Sphère
Polymorphe $\alpha$	Elevée	Elevée	Faible	Quelques microns	Sphéroïde
Polymorphe $\beta'$	Faible	Faible	Elevée	Inférieure à 5 $\mu\text{m}$	Sphéroïde
Polymorphe $\beta$	Très faible	Très faible	Très élevée	20-100 $\mu\text{m}$	Plaquette et Forme d'aiguille

Lorsque la formulation est refroidie rapidement les lipides cristallisent sous forme  $\alpha$  ou dans certains cas en état de surfusion (supercooled melts). Pendant le stockage une transition de phase se produit à partir des structures les moins stables vers les formes  $\beta'$  et  $\beta$  les plus stables [153]. Généralement, l'efficacité d'encapsulation et la capacité d'incorporation en principe actif diminue avec la diminution du taux d'imperfections de la structure cristalline du lipide. Pour cette raison, une expulsion du principe actif se produit après la transition de la structure cristalline. En outre, le polymorphisme entraîne un changement au niveau de la morphologie de la forme sphérique (polymorphe  $\alpha$ ) vers la forme plaquettaire ou vers la forme des aiguilles (polymorphe  $\beta$ ). Cette transformation entraîne une augmentation de la surface globale, c'est-à-dire, l'apparition de nouvelles surfaces non stabilisées par les molécules de tensioactifs [45, 146] (Figure 12).

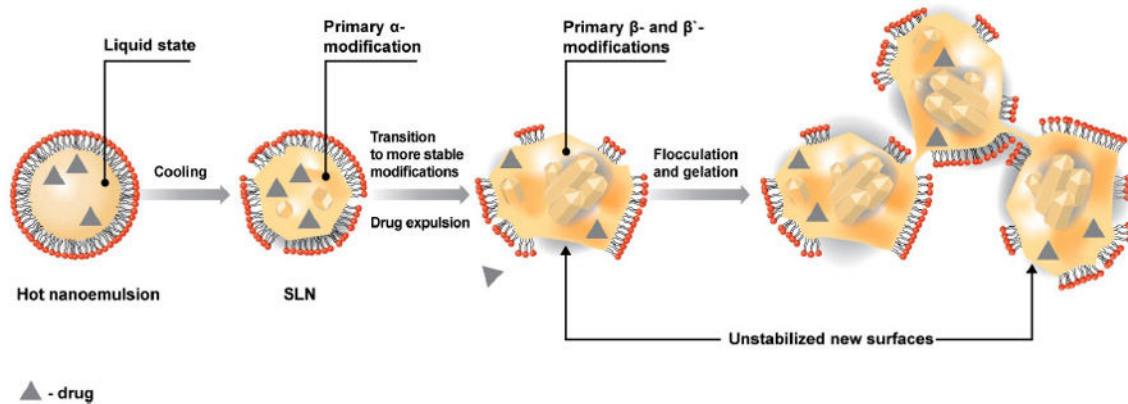


Figure 12: Le mécanisme de déstabilisation des SLNs au cours du stockage [21].

La détection de la transition polymorphique peut être très difficile et plusieurs facteurs peuvent interférer. Par exemple, la présence de phases liquides peut promouvoir des changements de la structure cristalline des SLNs en dissolvant les cristaux moins stables et entraîne ainsi une recristallisation supplémentaire dans la forme la plus stable [154]. Une cristallisation rapide peut conduire à la gélification du système avec des modifications substantielles dans ces propriétés physico-chimiques [26]. Cependant, l'état colloïdal des particules et la présence d'une grande quantité de tensioactifs retardent généralement la cristallisation dans les formes les plus stables [153].

#### 1.1.7.1.3. Gélification

La formation d'un gel est considérée comme un problème très grave. La gélification est un phénomène rapide et imprévisible dans laquelle une dispersion de SLNs de faible viscosité se transforme en un gel visqueux. Dans la plupart des cas ce phénomène est irréversible [141]. Il existe plusieurs promoteurs de gélification, tels que la température élevée, la lumière et la force de cisaillement [155]. La formation du gel peut se produire en raison d'une concentration élevée en lipide, de la présence d'une grande force ionique [156], de la cristallisation rapide du lipide [157] ou d'un contact intense de la dispersion de SLNs avec d'autres surfaces telles que les matériaux d'emballage [154]. Tous les promoteurs de gélification tendent à augmenter l'énergie cinétique des particules, qui favorise leur collision.

L'addition des co-tensioactifs avec une mobilité élevée (ex : glycocholate) permet de retarder ou d'éviter la gélification [158]. De plus, le stockage à 8°C dans l'obscurité tend à inhiber la croissance des particules. Le stockage des particules lipidiques dans une atmosphère d'azote rend les particules plus stables [155]. Le potentiel zêta est un bon prédicteur de la gélification. Une augmentation ou une diminution indique le début d'une gélification [159].

#### *1.1.7.2. Modification de la dispersion : coalescence et mûrissement d'Ostwald*

Contrairement aux émulsions, les particules solides devraient être plus stables par rapport à la coalescence. Une charge de surface suffisante permet par ailleurs de lutter contre ce phénomène par une répulsion mutuelle des particules.

Néanmoins, le phénomène de mûrissement d'Ostwald (Figure 13) peut apparaître même à l'état solide. Ce phénomène bien connu pour les émulsions, consiste en la migration de l'huile de petites gouttelettes vers de plus grosses à cause d'une différence de pression interne suivant la loi de Laplace (pression inversement proportionnelle à la taille des gouttelettes). Une émulsion présentant une distribution monodisperse de la taille des particules est ainsi moins sensible au mûrissement d'Ostwald.

Pour les SLNs, le mûrissement d'Ostwald correspond à l'augmentation de la taille des particules due à la dissolution des petits cristaux conduisant à une augmentation de la taille des grosses particules au détriment des plus petites [160]. Il est généralement important dans le stade de formulation des SLNs (stade de formation de l'émulsion chaude) et pas dans le stade de SLNs solidifiées [3].

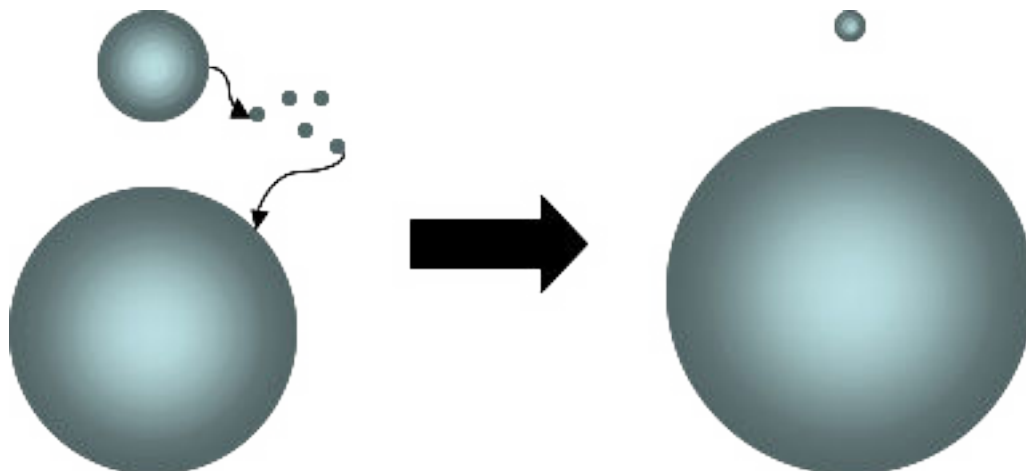


Figure 13: Représentation du vieillissement d'Ostwald.

#### 1.1.8. Stabilité de stockage des SLNs

Les nanoparticules lipidiques solides stabilisées par des tensioactifs, présentent une stabilité physique importante dans le temps. Cependant, la stabilité des SLNs peut dépendre également des conditions de stockage [161]. La gélification, l'agréation, l'augmentation de la taille des particules et l'expulsion du principe actif sont les problèmes majeurs pouvant être rencontrés lors du stockage des SLNs [141]. Les conditions de stockages telles que, l'exposition à la lumière, la température et les matériaux d'emballage sont des paramètres importants de la stabilité des SLNs.

Freitas et Muller ont ainsi étudié l'effet de la lumière, de la température et des matériaux d'emballage sur le potentiel zêta, la taille des particules et sur la gélification des SLN [155].

##### 1.1.8.1. Influence de la lumière

Dans cette étude, les dispersions de SLNs ont été exposées à différentes conditions de luminosité telles que l'obscurité, une lumière naturelle et une lumière artificielle pendant le stockage dans des flacons en verre de couleur blanche et brune. Le stockage dans des flacons en verre de couleur blanche sous lumière artificielle induit une gélification rapide au bout de 14 jours avec une augmentation rapide de la taille des particules tandis que le



processus de gélification est moins rapide lors de l'exposition à la lumière naturelle. Les résultats de l'exposition à l'obscurité montrent que le processus de gélification et l'augmentation de la taille des particules sont plus lents après un mois de stockage. La dispersion de SLN a été modifiée après l'exposition à des conditions différentes d'éclairage, conduisant à une diminution du potentiel zêta. En conclusion, l'introduction d'énergie au système conduit à une diminution du potentiel zêta. Cet apport d'énergie peut entraîner des changements dans la structure cristalline du lipide. La réorientation des cristaux peut conduire à des modifications de la charge de surface des particules et ensuite le potentiel zêta mesuré.

#### *1.1.8.2. Influence de la température*

La température correspond à l'apport d'énergie au système pouvant conduire à une modification de la structure cristalline des lipides et à la réduction du potentiel zêta [160]. Freitas et Muller ont montré que l'augmentation de la température provoque l'augmentation de la taille des particules et la réduction du potentiel zêta.

#### *1.1.8.3. Influence des matériaux d'emballage*

L'influence du matériau d'emballage sur la stabilité des SLN n'est pas bien connue, mais l'agrégation et la gélification peuvent être induites par la surface du matériau utilisé. Des études ont ainsi mis en évidence que les SLN sont plus stables lorsqu'elles sont stockées dans des récipients en plastique que dans des flacons en verre [162].

Freitas et Muller ont étudié la stabilité des SLN stockées dans des flacons en verre et dans des flacons en verre siliconé dans des conditions optimales (8°C, obscurité), pour mettre en évidence la siliconisation du verre sur la stabilité des SLNs. Ils ont observé que le diamètre des particules stockées dans le verre non traité est plus grand par rapport aux SLNs stockées dans des flacons en verre siliconé, tandis que le potentiel zêta des particules stockées dans des flacons en verre siliconé était plus élevé par rapport au potentiel des particules stockées dans des flacons en verre non traité. Il a été constaté que la réduction

de l'adhésion des SLN à la surface du flacon par siliconisation minimise l'agrégation des SLNs et par conséquent améliore la stabilité physique des particules.

### I.1.9. Coexistence de plusieurs espèces colloïdales

La présence de différentes espèces colloïdales est un point important à envisager. Malheureusement, cet aspect a été ignoré dans la majorité des études sur les SLN. Les tensioactifs ne sont pas localisés exclusivement sur la surface des lipides, mais ils peuvent exister également dans la phase aqueuse sous différentes formes. Par exemple, le SDS qui est un tensioactif anionique existe sous 3 formes différentes : i) sur la surface du lipide, ii) en micelle, et iii) sous forme de monomère. De plus, la lécithine utilisée comme un stabilisant forme des liposomes et la présence des micelles mixtes doit être prise en compte dans les systèmes stabilisés par des mélanges lécithine / glycocholate (sel biliaire). Les micelles, micelles mixtes et liposomes sont connus comme agents de solubilisation des principes actifs, diminuant ainsi le pourcentage d'encapsulation du principe actif dans les SLNs. Il faut ainsi tenir compte du fait de la présence de l'une de ces structures si l'un de ces agents existe dans le système en faisant de différents tests tels que par RMN ou ESR (Electron Spin Resonance) qui permet de déterminer la localisation du principe actif [2].

### I.1.10. La lyophilisation

La lyophilisation est largement utilisée pour améliorer la stabilité physico-chimique des nanoparticules lipidiques. Néanmoins, il est essentiel de prévenir les réactions de dégradation et de permettre la conservation de la taille des particules avant lyophilisation.

Il est prévu que le lyophilisat présente une meilleure stabilité chimique et physique que les dispersions aqueuses des particules lipidiques. Par contre, les particules passent par deux transformations qui pourraient affecter leur stabilité.

1- La transformation de l'état dispersé dans un liquide vers l'état poudre : Cette étape implique la congélation de l'échantillon et la sublimation de l'eau. La congélation peut provoquer des problèmes de stabilité en raison de la modification de la concentration osmotique.

2- La dispersion du lyophilisat : cette étape implique des situations où l'agrégation des particules est favorisée (pression osmotique élevée, teneur élevée en particules).

Il a été prouvé que la teneur en lipide dans les SLNs doit être inférieure à 5% pour prévenir l'augmentation de la taille des particules pendant la lyophilisation. Le contact direct des particules lipidiques est diminué dans les échantillons dilués. Pour cela, l'addition d'un cryoprotecteur est indispensable pour prévenir l'agrégation des SLN. L'effet des cryoprotecteurs sur la qualité du lyophilisat a été largement étudié dans le domaine des liposomes et des SLNs [163-165]. Les cryoprotecteurs typiques utilisés sont le sorbitol, le mannose, le tréhalose, le glucose et le polyvinylpyrrolidone. Ils diminuent l'activité osmotique de l'eau [166-168]. De plus, ils vont empêcher le contact entre les particules lipidiques. Par ailleurs, ils interagissent avec les têtes polaires des tensioactifs et gardent les particules dans un état pseudo-hydraté [169].

Schwarz *et al.* ont étudié l'effet de la lyophilisation sur les propriétés physico-chimiques des SLNs [164]. Ils ont trouvé que le glucose, le tréhalose, le mannose et le maltose (entre 10% et 15 % en poids) conduisent aux meilleurs résultats concernant la stabilité et l'expulsion du principe actif après lyophilisation. Ces observations sont en accord avec les résultats des études de lyophilisation des liposomes, indiquant que le tréhalose est le plus efficace en tant que prévention de fusion des liposomes et expulsion du principe actif [167, 170].

#### I.1.11. Digestion des SLNs

Généralement, la biodisponibilité est définie par la quantité du principe actif disponible pour agir au niveau de la cible thérapeutique, c'est-à-dire la quantité du principe actif qui va atteindre la circulation systémique. Les nanoparticules lipidiques sont utilisées pour améliorer la biodisponibilité des principes actifs qui sont faiblement solubles dans l'eau comme la curcumine et la quercétine et des principes actifs qui possèdent une faible perméabilité cellulaire comme la catéchine [171].

Bien que la digestion des SLNs est un processus complexe, elle peut être classée en trois phases principales, (1) la phase de digestion, (2) la phase d'absorption et (3) la phase d'entrée dans la circulation systémique.

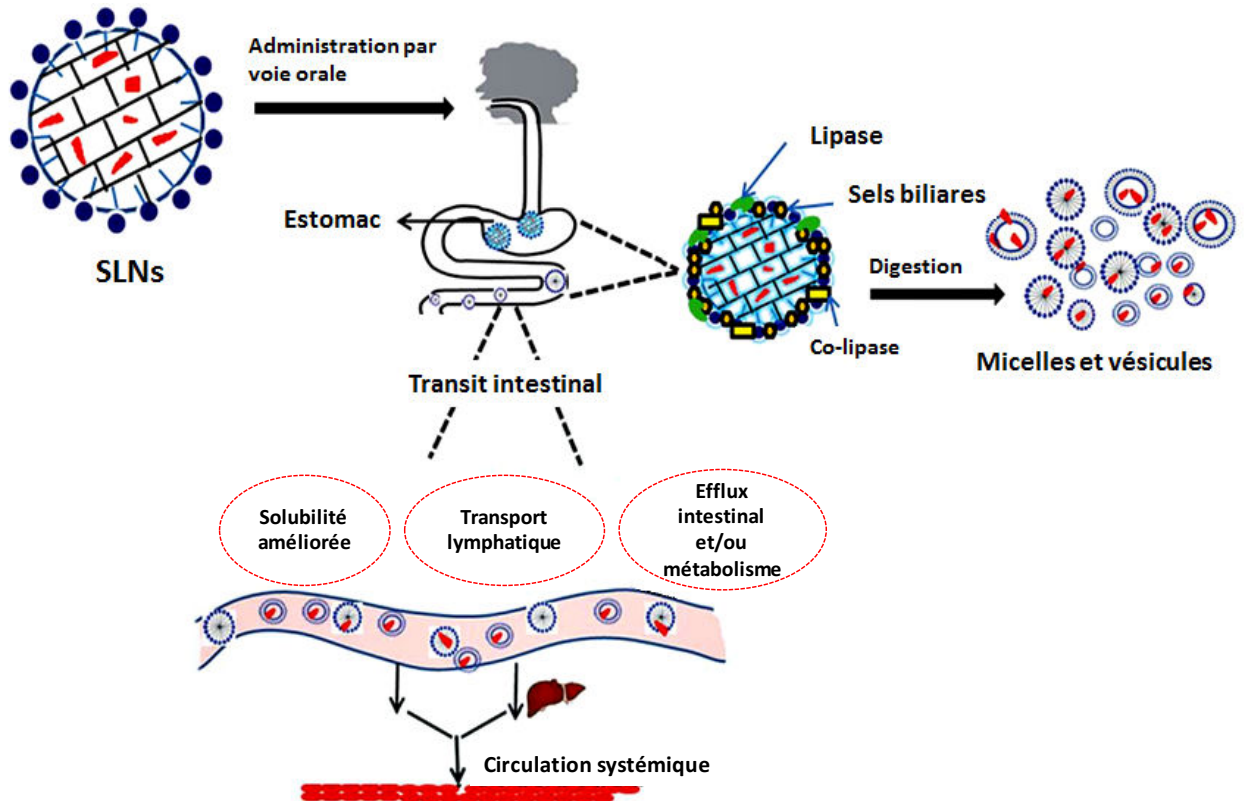


Figure 14: Représentation schématique de la digestion et l'absorption des principes actifs après administration par voie orale des SLNs encapsulant des molécules bioactives [171].

La digestion est initiée par l'hydrolyse des triacylglycérols en diacylglycérols et en acides gras par les lipases linguales et gastriques dans l'estomac. En outre, la force de cisaillement générée lors de la contraction antrale, de la rétropulsion et de la vidange gastrique conduit à la formation d'émulsions à partir des lipides hydrolysés. Dans le duodénum, la présence de lipides stimule la libération de sels biliaires et des fluides pancréatiques par les vésicules biliaires qui vont assister à la formation des émulsions. En outre, les sels biliaires qui sont de nature amphiphile, vont former une couche autour des gouttelettes lipidiques. Cela va augmenter la surface des particules et les rendre plus hydrophiles évitant ainsi la réagrégation des particules. Ensuite, la lipase qui est une

enzyme hydrophile va agir sur les tri- et diacylglycérols en brisant la liaison entre le glycérol et les chaînes d'acides gras. En conséquence, chaque triacylglycérol libère deux acides gras et un monoacylglycérol [172]. Les acides gras et les monoacylglycérols libérés vont former des micelles ou bien des micelles mixtes dans lesquelles le principe actif sera encapsulé après digestion. Ensuite, le principe actif encapsulé dans ces particules sera absorbé par les entérocytes. Si le principe actif possède une solubilité suffisante ( $\log P < 5$ ) il sera transporté directement vers la circulation portale. Dans le cas de principes actifs très hydrophobes ( $\log P > 5$ ), ils seront transportés par les chylomicrons (lipoprotéines intestinales) [32]. Ces lipoprotéines vont fusionner avec la membrane basolatérale des entérocytes et vont atteindre la circulation à travers le conduit lymphatique thoracique.

## I.2 La curcumine

Dans cette étude, la curcumine a été choisie comme principe actif encapsulé dans les SLNs. Cette partie présente ainsi ses propriétés ainsi que ses activités diverses qui la rendent très intéressante pour de nombreuses applications.

### I.2.1. Définition

La curcumine est le composant principal de l'épice curcuma qui est un dérivé du rhizome de la plante indienne *Curcuma longa*. Cette plante appartient à la famille des *Zingiberaceae* (gingembre). C'est une plante vivace originaire du Sud-Est de l'Asie [173, 174]. Le curcuma contient des composés connus sous le nom de curcuminoïdes qui comprend la curcumine, la déméthoxycurcumine et la bisdéméthoxycurcumine (Figure 14) [175].

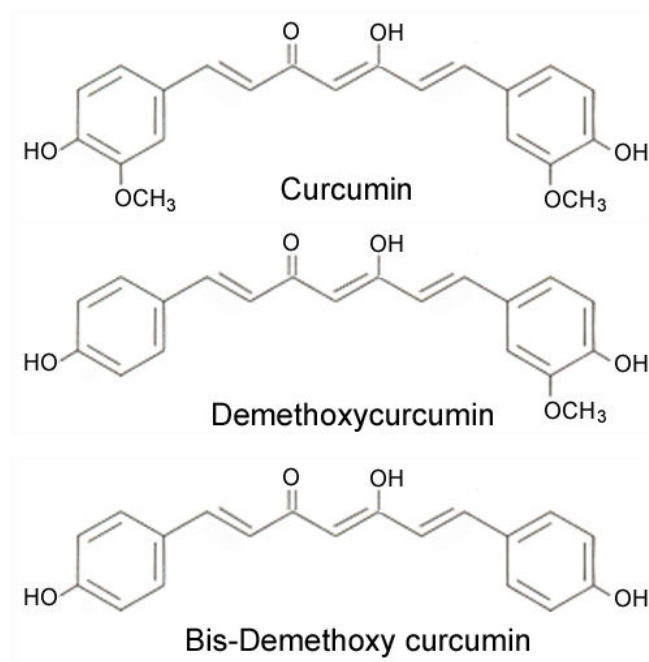


Figure 15: Structure des curcuminoïdes [176].

La curcumine est le composé principal des curcuminoïdes et il est responsable de la couleur jaune du curcuma ainsi que de la majorité de ces activités biologiques [174].

### I.2.2. Propriétés physico-chimiques

La curcumine est un pigment polyphénolique de couleur jaune. Ses propriétés physico-chimiques sont citées dans le Tableau 5.

Tableau 6: Propriétés physico-chimiques de la curcumine.

<b>Propriétés physico-chimiques de la curcumine</b>	
<b>Formule moléculaire</b>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>
<b>Masse moléculaire</b>	368.38 g.mol <sup>-1</sup>
<b>Température de fusion (T<sub>m</sub>)</b>	183°C
<b>Aspect</b>	Poudre de couleur jaune-orangée
<b>Solubilité</b>	Ether, acide acétique, méthanol, chloroforme, DMSO, acétone et l'huile
<b>Absorption maximale dans l'UV</b>	425 nm

### I.2.3. Activités biologiques

#### *I.2.3.1. Activité anti-oxydante*

La curcumine est un polyphénol peu soluble dans l'eau et soluble dans des solvants organiques (DMSO, acétone, éthanol) [177]. L'activité anti-oxydante des curcuminoïdes provient du fait de leur structure chimique. Ils sont formés de deux noyaux phénols méthoxylés reliés par deux groupements carbonyles  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturés qui existent sous la forme énol stable [178]. Il a été démontré que la curcumine inhibe la peroxydation des lipides en neutralisant les radicaux libres d'acides gras formés après oxydation [179]. De plus, la curcumine a montré *in vitro* et *in vivo* une activité anti-radicalaire qui permet de piéger diverses substances réactives produites par les macrophages (anions superoxydes, peroxyde d'hydrogène et des radicaux nitrites) en utilisant les macrophages péritonéaux de rat comme modèle [180]. L'oxyde nitrique synthase est une enzyme oxydoréductase qui

produit de l'oxyde nitrique un radical libre de formule chimique  $\cdot\text{N}=\text{O}$  présent dans la circulation sanguine. Il existe dans l'organisme trois formes d'oxyde nitrique synthase : la forme inductible, la forme neuronale et la forme endothéliale. La forme inductible (inducible nitric oxide synthase, iNOS) est une enzyme qui existe dans les macrophages et qui produit du NO suite à un environnement oxydatif comme un mécanisme de défense contre des agents pathogènes. L'oxyde nitrique produit peut réagir avec des radicaux superoxydes pour former le peroxyde nitrique qui est très cytotoxique. Il a été démontré que la curcumine permet la « down – régulation » de l'activité de iNOS dans les macrophages ce qui diminue le taux de production des substances réactives toxiques [181, 182].

#### *1.2.3.2. Activité anti – inflammatoire*

La curcumine présente un effet inhibiteur sur différentes voies de signalisation impliquées dans l'inflammation. Elle inhibe l'activation de NF- $\kappa$ B, un facteur de transcription inductible qui régule l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans l'inflammation, la prolifération et la survie cellulaire (exemple de gènes régulés par NF- $\kappa$ B: cyclooxygénase-2 (COX-2), TNF- $\alpha$ , c-myc [175, 183, 184]. De plus la curcumine inhibe d'autres voies impliquées dans l'inflammation. La voie de l'acide arachidonique pour la biosynthèse des eicosanoïdes est un acteur important dans l'inflammation. Elle génère la synthèse de plusieurs produits lipidiques réactifs y compris les leucotriènes, prostaglandines, prostacyclines et les thromboxanes. La curcumine diminue le métabolisme de l'acide arachidonique en down-régulant l'activité de lipoxigénase (LOX) et COX-2 [185]. Par ailleurs, la curcumine inhibe la biosynthèse de la prostaglandine E2 par inhibition directe de l'enzyme microsomale prostaglandine E2 synthase -1 [186].

#### *1.2.3.3. Activité anti-cancéreuse*

La curcumine a été étudiée dans le cadre de plusieurs types de cancers humains, tels que le mélanome, le cancer de la tête et du cou, du sein, du côlon, du pancréas, de la prostate et de l'ovaire [187-190].



Les études épidémiologiques ont attribué la faible incidence du cancer de colon en Inde grâce aux propriétés anti-oxydantes et chimio-préventives des régimes alimentaires riches en curcumine [191]. Les mécanismes par lesquels la curcumine exerce ses effets anti-cancéreux sont nombreux et connus. Elle joue un rôle en ciblant plusieurs niveaux de régulation dans les processus de croissance cellulaire et de l'apoptose (Figure 15). En plus des effets de la curcumine sur les divers facteurs de transcription, sur des oncogènes et sur les protéines de signalisation, elle agit également à des différents stades temporels de la carcinogénèse (mutation de l'ADN, croissance et métastase).

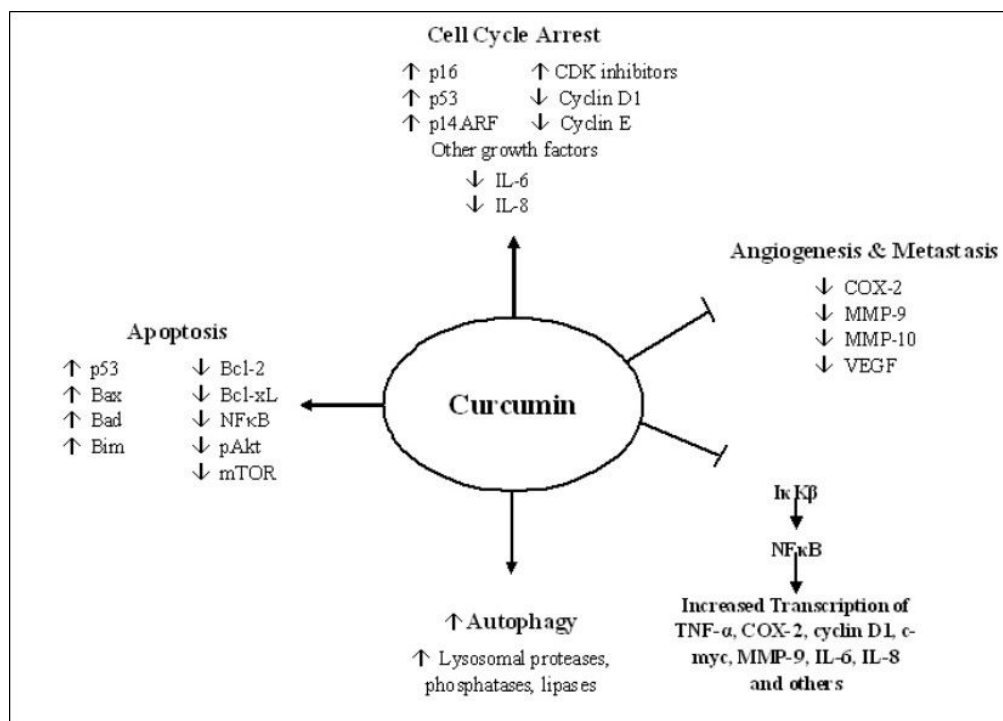


Figure 16: Effets anticancéreux de la curcumine [176]. La curcumine inhibe l'activation de NF-κB via l'inhibition de l'activité d'Iκ-KB, conduisant à la suppression de nombreux gènes régulés par NF-κB impliqués dans la tumorigénèse y compris cycline D1, TNF, interleukines et d'autres. La curcumine est impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire et la stimulation de l'apoptose via l'up-régulation de p16 et p53. De plus, la curcumine est un modulateur de l'autophagie et possède des effets inhibiteurs sur l'angiogenèse tumorale et la métastase par suppression d'une variété de facteurs de croissance, y compris VEGF, MMP-9 et ICAMs.

En raison des effets à long terme et des différentes cibles de la curcumine sur les processus de régulation de la croissance cellulaire, celle-ci est très prometteuse en tant qu'agent chimiothérapeutique potentiel dans le traitement de nombreux cancers humains.

#### I.2.4. Curcumine et MICI

Les MICI ou Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin sont des maladies chroniques progressives définies comme des maladies auto-immunes impliquées dans l'inflammation aberrante et persistante de l'intestin. Les deux formes principales sont la maladie de Crohn (MC) et la colique ulcéraive (CU). Ces deux maladies sont caractérisées par des réponses immunologiques contre des antigènes bactériens mais le type de la réponse immunologique semble être distinct. MC est considérée comme une maladie inflammatoire de type II (TH2) avec une sécrétion particulière des interleukines telles que IL-5, tandis que CU est considérée comme une maladie de type I (TH1) avec prédominance du TNF (Tumor Necrosis Factor), IFN $\gamma$  (Interféron- $\gamma$ ) et IL-12.

Dans les maladies intestinales idiopathiques (maladies dont on ne connaît pas les causes), la persistance de l'inflammation dépend en partie de l'activation de la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B qui joue un rôle très important dans l'inflammation en activant la libération des interleukines et des cytokines telles que le TNF. La curcumine va réduire l'inflammation en inhibant la voie de NF- $\kappa$ B. Cette molécule est ainsi très intéressante en tant que traitement pour les MICI [12]. Des études *in vitro* et *in vivo* ont mises en évidence que la curcumine présente des mécanismes d'action différents dans les deux maladies MC et CU, ce qui dépend probablement du type de dérèglement immunitaire impliqué [192-194].

## I.3 Chitosane

### I.3.1. Définition

Le chitosane est un polysaccharide linéaire formé d'unités D-glucosamines liées entre elles par des liens glycosidiques et de N-acétyl-D-glucosamine (Figure 16).

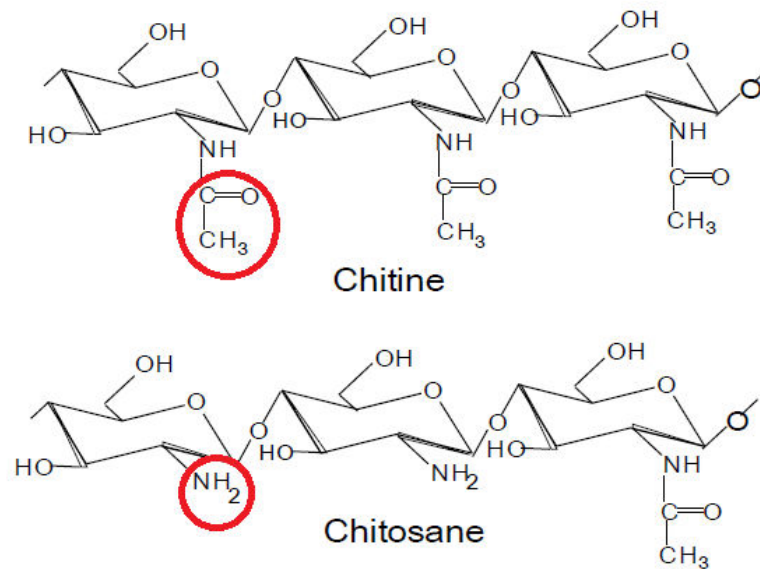


Figure 17: Structure de la chitine et du chitosane.

Il est produit par déacétylation chimique ou enzymatique de la chitine. La chitine est le composant principal de l'exosquelette des arthropodes ou de l'endosquelette des céphalopodes ou encore de la paroi des champignons [195].

Le chitosane ne diffère de la chitine que par les groupements amino ( $-\text{NH}_2$ ). Ces derniers confèrent une nature cationique intéressante en milieu acide. Cette caractéristique rend le chitosane soluble dans l'eau et lui donne une propriété bioadhésive en interagissant avec des surfaces chargées négativement telles que la muqueuse intestinale.

### I.3.2. Caractéristiques du chitosane

#### *I.3.2.1. Degré de désacétylation (DD)*

Le degré de désacétylation (DD) est le pourcentage molaire de l'élimination des groupements N-acétyle. Lorsque le DD est supérieur à 50% le biopolymère obtenu est considéré comme du chitosane, tandis que lorsqu'il est inférieur à 50% il s'agit de la chitine. Ce paramètre (DD) influe sur toutes les propriétés physico-chimiques (masse moléculaire en poids, viscosité, solubilité, ...) du chitosane et apparaît donc comme le plus important. Il existe différentes techniques utilisées dans la détermination de DD telles que la résonance magnétique nucléaire (RMN), un dosage potentiométrique, etc [196].

#### *I.3.2.2. Masse moléculaire*

La détermination de la masse moléculaire du chitosane peut se faire par viscosimétrie, par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) couplée à des différentes techniques de détection telle que la diffusion statique de la lumière,...[197].

#### *I.3.2.3. Comportement du chitosane en milieu acide*

Le chitosane est l'un des rares polyélectrolytes naturels cationiques existant dans la nature. Les groupements amines primaires du chitosane possèdent un pKa d'environ 6,3 (Figure 18), permettant une protonation des amines primaires en milieu acide, où la densité de charges dépend du pH et du DD [198]. Quand le DD augmente la valeur du pKa diminue [199].

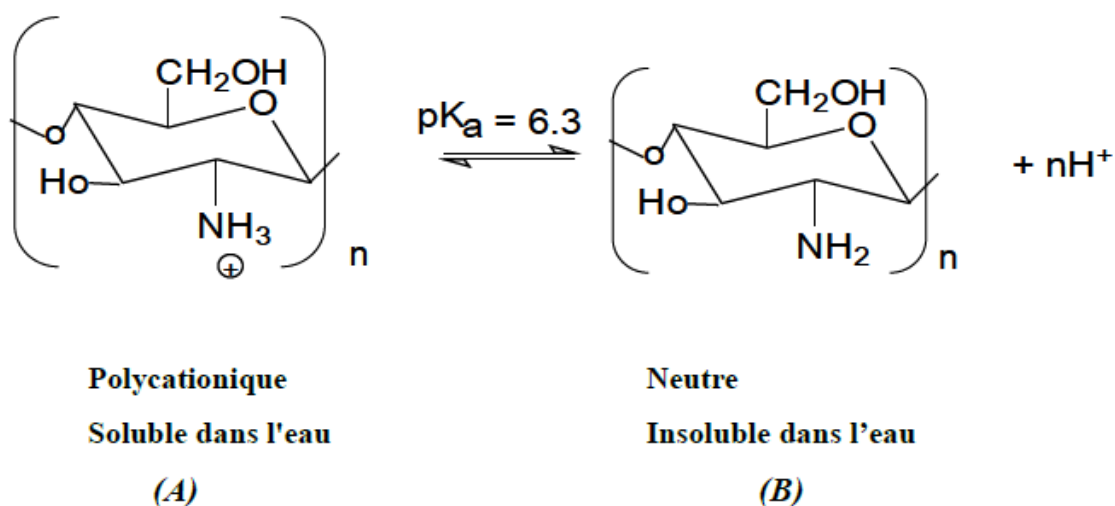


Figure 18: Structure du chitosane en milieu acide (A) et en milieu basique (B) [200].

#### *1.3.2.4. Viscosité*

La viscosité est une caractéristique importante du chitosane relative à son comportement en solution. Elle est influencée par différents facteurs, comme le DD, la masse molaire, le pH, la force ionique et la température. La viscosité du chitosane augmente avec la diminution du pH où la densité de charges des groupements  $\text{NH}_3^+$  est importante. De plus, elle augmente quand le DD augmente, car le pourcentage des groupements  $\text{NH}_2$  libres est plus important d'où une densité de charge plus importante [201]. Comme pour les autres polysaccharides, la viscosité diminue quand la température augmente.

#### *1.3.2.5. Flexibilité*

Les polysaccharides sont caractérisés par une flexibilité limitée due à l'encombrement stérique exercé par les liaisons glycosidiques [197]. De plus, pour les polysaccharides ioniques, l'apparition d'interactions électrostatiques répulsives conduit à une augmentation de la rigidité du polymère. Le chitosane est considéré comme un copolymère cationique, linéaire et flexible. La flexibilité du chitosane est affectée par le

DD, l'augmentation du DD conduit à une diminution de la flexibilité due à l'augmentation de la densité de charges d'amines primaires libres [201].

#### *1.3.2.6. Biocompatibilité*

La biocompatibilité d'un polymère est d'une importance fondamentale pour une utilisation thérapeutique [202]. Le chitosane est biocompatible. Sa présence dans l'organisme entraîne des réactions inflammatoires et des réactions de rejet très limitées. La biocompatibilité du chitosane est caractérisée par sa non toxicité et sa biodégradabilité [203].

#### *1.3.2.7. Biodégradabilité*

Chez les vertébrés, le chitosane est dégradé par les lysozymes et des enzymes bactériennes au niveau du colon. Les chercheurs ont pu identifier 8 chitinases humaines (famille de glycoside hydrolase) mais 3 seulement présentent une activité enzymatique.

Ces 3 enzymes sont :

-Acidic Mamalian Chitinase (AMCase) : elle se trouve surtout dans les poumons et dans le tractus gastro-intestinal, elle est stable en pH acide [204].

-Di-N-acétylchitobiase : elle existe dans les maladies de Sandhoff et Tay Sachs [205].

- Chitotriosidase : elle existe dans la maladie de Gaucher où elle est sécrétée par les macrophages. Elle a un rôle protectif contre les mycètes et les parasites qui possèdent de la chitine dans leur squelette [206].

La biodégradation du chitosane dépend de 2 paramètres : le degré de désacétylation (DD) et la masse moléculaire moyenne (MM). Quand le degré de désacétylation augmente le taux de biodégradation va diminuer tandis que l'augmentation de la MM entraîne la dégradation du chitosane [207].

#### I.3.2.8. Toxicité systémique

L'innocuité du chitosane a été démontrée chez la souris, le rat, et l'homme pour des applications diététiques et cosmétiques. Dans le cas d'une administration orale, la dose létale  $DL_{50}$  dépasse les 16g/kg /jour chez la souris. L'administration sous-cutanée du chitosane conduit à une valeur de  $DL_{50}$  supérieure à 10 g/kg/jour chez la souris, tandis que la  $DL_{50}$  d'applications intra-péritonéales de chitosane est supérieure à 5,2 g/kg/jour chez la souris. Globalement, pour des doses administrées adéquates, la non-toxicité du chitosane est admise [208].

#### I.3.3. Interaction chitosane – lipides

Le chitosane est un copolymère chargé positivement en milieu acide dû à la protonation des groupements amines primaires libres. Cette caractéristique donne au chitosane une possibilité d'interactions avec différentes substances par des interactions électrostatiques, des liaisons hydrogènes ou de Van der Waals.

Dans la littérature, plusieurs études ont été réalisées sur l'interaction entre le chitosane et les lipides. Pawel *et al.*, ont étudié l'interaction entre le chitosane et les acides gras (acide oléique...) en utilisant la technique de monocouche de Langmuir. Ils ont conclu que l'interaction entre le chitosane et les lipides se fait en 2 étapes [209] :

- Les lipides s'ancrent sur le chitosane via des interactions électrostatiques entre les groupements carboxyles des lipides et les groupes  $NH_3^+$  du chitosane, et par des liaisons hydrogènes entre les groupements hydroxyles du cholestérol et les groupes  $NH_3^+$  du chitosane.
- Ensuite, des interactions hydrophobes ont lieu entre les chaînes hydrocarbonées des lipides et le chitosane permettant sa fixation sur la monocouche.

Mertins et Rumiana, ont étudié l'effet de la déprotonation du chitosane sur l'interaction avec des vésicules phospholipidiques (liposomes). Les résultats ont montré que le chitosane protoné ( $pH \leq 5,3$ ) interagit avec les phospholipides par des interactions électrostatiques entre ses groupes  $NH_3^+$  et les groupes phosphates des phospholipides, ce qui permet l'enrobage des liposomes par le chitosane (Figure 19). La déprotonation du chitosane ( $pH \geq 6$ ) provoque un changement de sa conformation à cause des interactions

inter- et intramoléculaires (interactions hydrophobes) entre les chaînes du polymère ce qui va permettre une forte adsorption du chitosane sur la surface des liposomes et enfin l'agrégation des chitosomes.

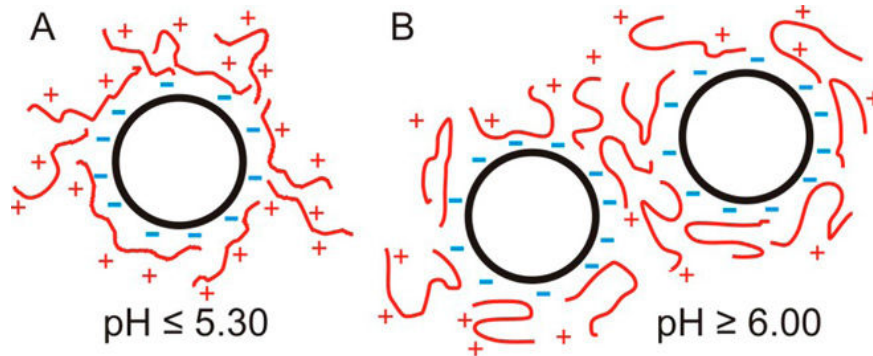


Figure 19: Structure des chitosomes [210]. A) Interaction électrostatique entre les groupements du chitosane chargés positivement et les liposomes chargés négativement. B) Agrégation des chitosomes après déprotonation partielle du chitosane. Elle est médiée par des interactions hydrophobes entre les chaînes du chitosane déprotoné.

Enfin, ces auteurs ont également mis en évidence l'effet du chitosane sur les propriétés de la membrane des liposomes (Giant Unilamellar Vesicles « GUV »). Ils ont ainsi conclu que le chitosane provoque une lyse de la membrane en provoquant la formation de pores microscopiques, induisant l'effondrement des vésicules (Figure 20). Cette déstabilisation des vésicules n'apparaît pas pour des liposomes de plus petites tailles (Large Unilamellar Vesicles « LUV ») [211]. Cette caractéristique est importante pour la vectorisation des médicaments à l'intérieur de la cellule, le biopolymère pouvant déstabiliser la membrane et ainsi augmenter sa perméabilité.

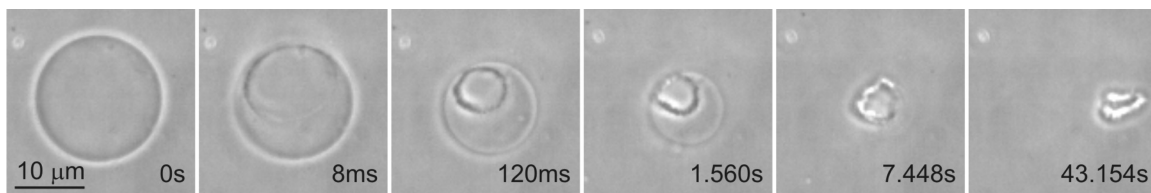


Figure 20: Images microscopiques obtenues par une caméra sous observation en contraste de phase d'une vésicule après l'addition de 10 µl de chitosane (0.1 mg / ml) [211].



Dans notre étude, nous allons utiliser le chitosane comme un agent d'encapsulation des SLNs encapsulant elles-mêmes la curcumine. Ce système est développé en vue de son utilisation en tant que traitement pour les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Cette encapsulation tend à protéger les SLNs contre les lipases gastriques et intestinales et à améliorer la mucoadhésivité des nanoparticules grâce à l'interaction entre le chitosane et la mucine qui sera décrite dans le paragraphe ci-dessous.

#### I.3.4. Interaction chitosane – mucines

Les mucines sont une famille de protéines de haut poids moléculaire ( $10^6$ - $10^7$  Da), hautement glycosylées par différents oligosaccharides tels que l'acide sialique, le fucose, le galactose [212]. Elles sont produites par les tissus épithéliaux [213].

Plusieurs études mentionnent l'existence d'interactions entre la mucine et le chitosane. Les chercheurs ont mis ainsi en évidence une possibilité d'interaction entre les groupements  $\text{NH}_3^+$  du chitosane et la charge négative de l'acide sialique ( $\text{COO}^-$ ) présent dans la mucine par des interactions électrostatiques [214]. Silva *et al.* ont étudié l'interaction entre le chitosane et la mucine en utilisant la technique de monocouche de Langmuir [212]. D'après les résultats obtenus, la mucine interagit avec la monocouche de DMPA (dimyristoylphosphatidic acid, acide gras chargé négativement) par des interactions hydrophobes. Lors de l'ajout de chitosane, des interactions électrostatiques se forment entre les groupes  $\text{NH}_3^+$  du chitosane et la charge négative de la mucine. Cette interaction étant plus forte que celle entre la mucine et le DMPA, elle permet le retrait de la mucine de l'interface (Figure 21).

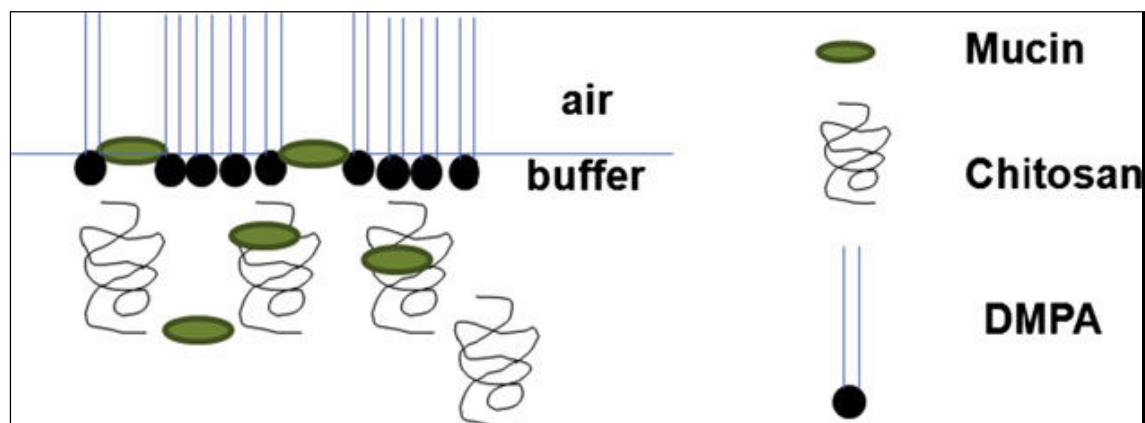


Figure 21: Modèle d'enlèvement de la mucine adsorbée à la monocouche de phospholipides chargés négativement par le chitosane [212].

### I.3.5. Particules de chitosane

Au cours des 20 dernières années, beaucoup de travaux ont été publiés sur le chitosane et sur son utilisation potentielle en tant que vecteur pour différents types de principes actifs tels que des peptides, des polyphénols, des gènes ou des protéines. Le chitosane est le seul polysaccharide cationique en raison de la présence d'amines primaires. Ces groupements fonctionnels offrent des propriétés spécifiques et distinctes telles que la libération contrôlée des principes actifs, la mucoadhésion, la gélification *in situ*, la transfection des gènes, l'amélioration de la perméabilité cellulaire.

Les particules de chitosane (micro- et nanoparticules) sont utilisées pour fournir une libération contrôlée de nombreux principes actifs et pour améliorer la biodisponibilité des substances qui sont dégradées rapidement telles que des protéines. Cela permet également l'amélioration de l'absorption de principes actifs hydrophiles à travers les cellules épithéliales. Il est utilisé comme un vecteur au niveau de l'intestin et du colon grâce à son interaction avec la mucine intestinale et sa dégradation dans le colon par les enzymes microbiennes [215].

Les biomatériaux qui dérivent des biopolymères sous forme de particules, de fibres, d'hydrogels ou de micro- et nanoparticules sont largement utilisés dans des applications *in vitro* et *in vivo* [216]. Malgré les avantages connus des biomatériaux et leur application

dans différents domaines, ils possèdent des points faibles qui limitent leur utilisation dans le domaine biomédical. Principalement, les biomatériaux ne résistent pas aux forces mécaniques et ne sont pas stables dans les conditions physiologiques nécessaires pour des applications médicales [217]. Pour cela, la réticulation est la solution pour surmonter les limitations des biomatériaux [218]. L'agent de réticulation crée des liaisons intra- et intermoléculaires, et améliore la stabilité et les propriétés mécaniques du biomatériau. Cependant, la réticulation conduit à une diminution de la dégradabilité et de la disponibilité des groupements fonctionnels du biopolymère, modifie les propriétés rhéologiques du polymère et augmente également sa cytotoxicité [217].

Plusieurs types d'agents et de techniques de réticulation sont utilisés pour préparer des particules biopolymériques telles que des particules de chitosane, d'alginate, de pectine ou de protéines (Figure 22). Les micro- et nanoparticules de chitosane sont préparées par différentes techniques telles que la réticulation chimique par le glutaraldéhyde [219, 220] et la génipine [221, 222], la réticulation ionique par des polyanions comme le tripolyphosphate [223] et le sulfate [224], la coacervation complexe [225] ou la réticulation thermique par l'acide citrique [226].

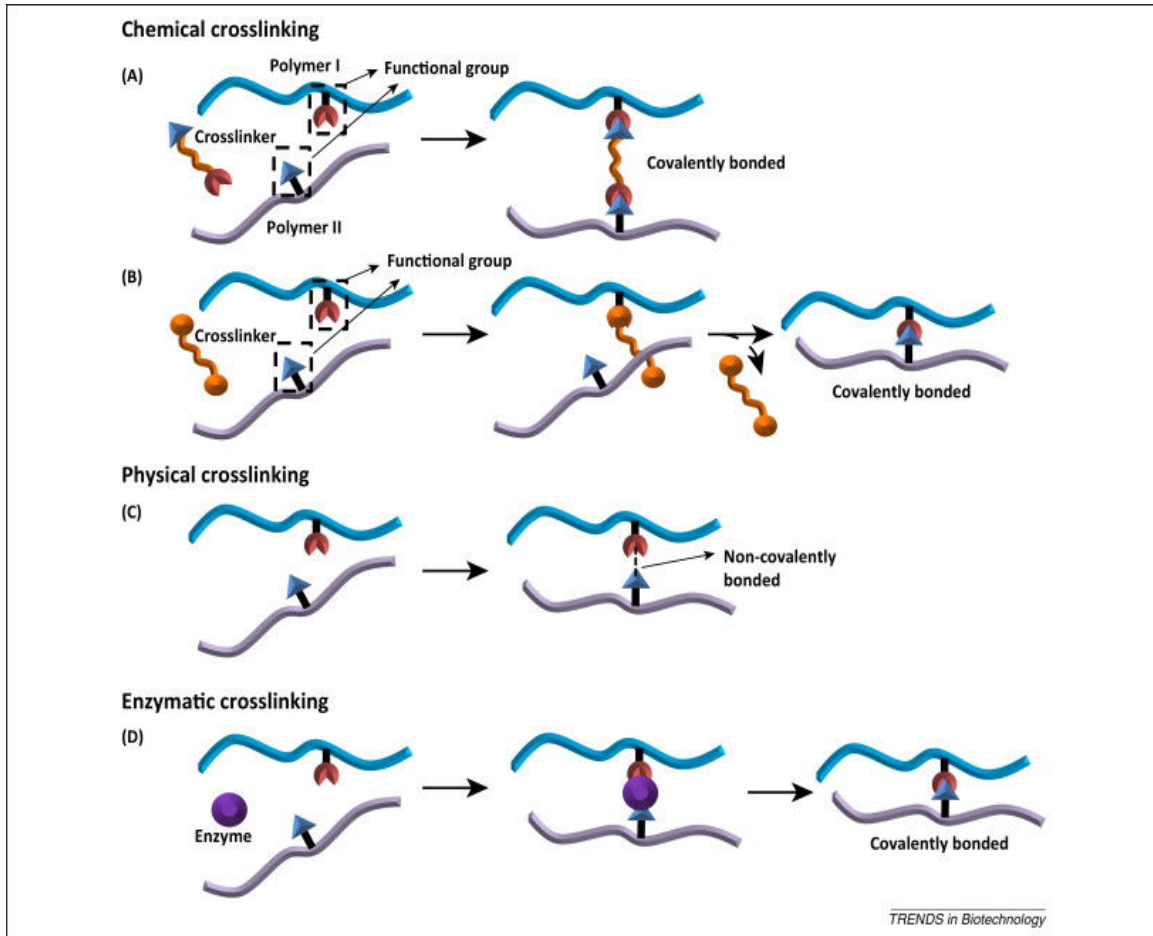


Figure 22: Représentation schématique de 3 méthodes de réticulation [227]. A) Réticulation chimique avec l'agent de réticulation incorporé dans la liaison. B) Réticulation chimique où l'agent de réticulation n'est pas incorporé dans la liaison. C) Réticulation physique par des liaisons non covalentes. D) Réticulation enzymatique.

La sélection de l'une de ces méthodes dépend des facteurs tels que, la taille des particules attendue, la stabilité chimique et thermique du principe actif encapsulé, la stabilité et la toxicité du produit final [228].

Dans notre étude, nous allons encapsuler des SLNs chargées en curcumine dans des microparticules de chitosane en utilisant la technique de gélification ionique par le tripolyphosphate (TPP), et ce, pour la vectorisation de la curcumine vers l'intestin. Cette technique est basée sur la capacité des polyélectrolytes (ex : chitosane, alginate...) d'être réticulés par un anion multivalent tel que le TPP. Les particules de chitosane chargé

positivement sont formées à travers des interactions intra- et intermoléculaires entre les groupements amino du chitosane et les groupements phosphates chargés négativement du TPP. La distribution de taille des particules dépend fortement de la procédure du mélange chitosane-TPP (agitation par un barreau aimanté, cisaillement par ultra-turrax, etc.), de la stœchiométrie, de la concentration en chitosane, de son DD et de son poids moléculaire [229-232]. Par ailleurs, la taille des particules dépend de la force ionique et du pH du milieu [229]. Cette technique présente plusieurs avantages tels qu'une utilisation en solution aqueuse et la possibilité d'encapsulation de plusieurs types de principes actifs comme des protéines [233], des polyphénols [234] et de l'ADN [235]. Cependant, les particules de chitosane préparées par cette méthode ne sont pas résistantes aux forces mécaniques limitant ainsi leur utilisation comme vecteur thérapeutique [228].

#### I.3.6. Mécanismes physico-chimiques de libération du principe actif des microparticules biopolymériques

Les particules biopolymériques sont conçues pour encapsuler, protéger et libérer un principe actif dans un site particulier tel que l'estomac, l'intestin grêle, le colon. Typiquement, les particules biopolymériques doivent résister à certaines conditions, et doivent ensuite libérer le principe actif encapsulé dans d'autres conditions particulières. Par exemple, si l'intérêt est la vectorisation d'un principe actif vers le côlon (pH = 6,8), il faut que les particules encapsulant ce principe actif résistent aux conditions gastriques (pH = 1,2), permettant la libération du principe actif dans le colon. C'est la notion du système pH dépendant.

La perte de l'intégrité du biopolymère peut se produire par différents mécanismes physico-chimiques, y compris la diffusion simple, la fragmentation, l'érosion et le gonflement (Figure 23).

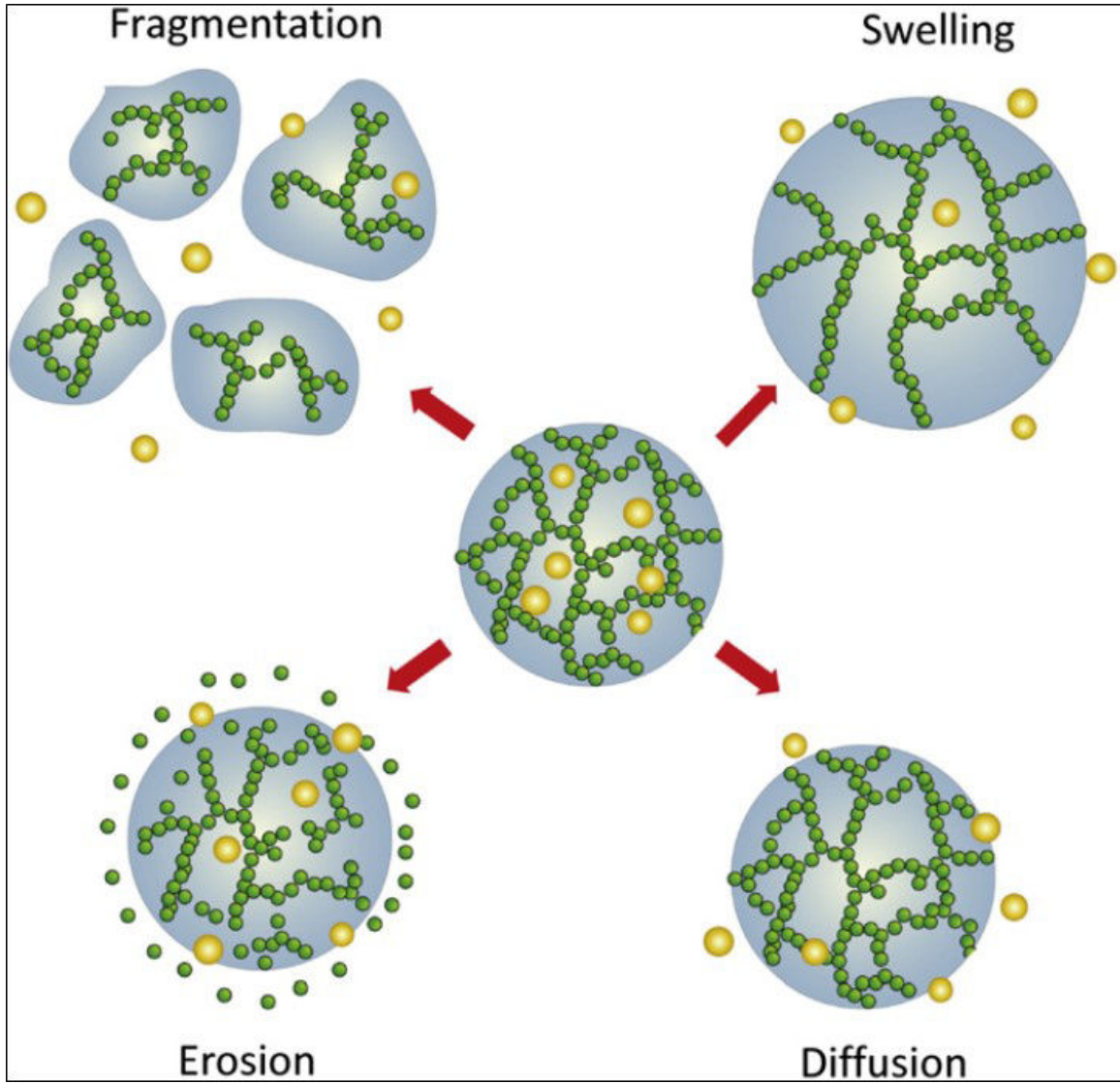


Figure 23: Les mécanismes physico-chimiques de la perte d'intégrité des particules biopolymériques : diffusion, gonflement, érosion et fragmentation [236].

- Diffusion : Le principe actif encapsulé diffuse simplement dans le milieu externe à travers la matrice des particules biopolymériques. Le taux de diffusion dépend de la taille de la maille du réseau du polymère par rapport à la taille du principe actif , ainsi que des interactions spécifiques entre le réseau du biopolymère et le principe actif (interactions électrostatiques ou hydrophobes) [237].

- Erosion : Le principe actif est libéré dans le milieu en raison de l'érosion qui se déroule soit à la couche externe ou bien dans tout le réseau du biopolymère. Il existe plusieurs raisons qui peuvent provoquer l'érosion de la matrice du biopolymère telles que la dégradation physique, chimique ou enzymatique des liaisons physiques (liaisons électrostatiques, hydrophobiques ou des liaisons hydrogènes) ou des liaisons covalentes.

- Fragmentation : Le principe actif est libéré à cause des ruptures physiques des particules, qui seront fragmentées en appliquant des forces de cisaillement ou de compression.

- Gonflement : La libération du principe actif est induite par l'absorption du solvant ce qui provoque le gonflement des particules et la diffusion du principe actif dans le milieu.

#### **I.4 Systèmes nanoparticules dans microparticules (Nanoparticles In Microparticles – NIMs)**

Les applications des nanoparticules et des microparticules en tant que vecteurs de principes actifs vers leurs organes cibles sont largement décrites dans la littérature [3, 238-240]. Cependant, chaque système possède certaines limitations, en fonction du mode d'administration du principe actif et de l'organe cible. Par exemple, les nanoparticules lipidiques sont des nanovecteurs pouvant être utilisés dans la vectorisation de principes actifs hydrophobes. Si le but de l'encapsulation est de vectoriser le principe actif vers le côlon, une protection des nanoparticules contre l'action des lipases gastriques et intestinales est indispensable [241, 242]. Afin de protéger les nanoparticules contre la dégradation et d'améliorer leur stabilité, différentes stratégies ont été développées pour surmonter ce problème majeur. L'enrobage des particules par un biopolymère résistant au pH gastrique et à la dégradation enzymatique tel que le chitosane est une stratégie envisageable [11, 243-245]. Le chitosane est largement utilisé comme un vecteur vers le côlon, grâce à ses propriétés de mucoadhésivité et à sa dégradation par les enzymes microbiennes du côlon [246]. Une autre stratégie que l'enrobage existe et consiste à la formation de microparticules polymériques incluant des nanoparticules : les systèmes appelés NIMs pour Nanoparticles in Microparticles. Ces systèmes combinent les avantages des nano- et des microparticules. Les microparticules servent de vecteurs et de protecteurs des nanoparticules encapsulant le principe actif vers l'organe cible tel que le côlon par exemple. Différents types de polymères biocompatibles et biodégradables ont été utilisés pour encapsuler les nanoparticules tels que le PCL (Polycaprolactone) et le chitosane (Tableau 6).



Tableau 7: Tableau récapitulatif des différents NIMs développés dans la littérature et leurs applications.

PLGA: Poly (lactic-co-glycolic acid). PCL: PolyCaproLactone. PLLA: Poly-L-Lactide. PEITC: Phénéthyl Isothiocyanate. PLH: Pranlukast hemihydrate. SLNs: Solid Lipid Nanoparticles. MPs : Microparticules. KPV : Lysine-Proline-Valine (tripeptide bioactif). IRM : Imagerie de Résonance Magnétique. PLA: Poly Lactic Acid. ARNi (Acide Ribonuléique interférent).

Polymères	Nanoparticules	Principes actifs	Techniques (MPs)	Applications	Références
PLGA	PCL	Hydrocortisone acétate	Emulsion double	Chimioembolisation de tumeurs	[247]
PLLA	Puérarine (principe actif sous forme de particules micronisée)	Puérarine	Liquide supercritique	Traitement des diabètes	[248]
PCL	Gélatine B	Vecteur plasmidique	Emulsion double	Traitement des maladies intestinales par transfection des vecteurs plasmidiques	[249-252]
PCL	Gélatine	ARNi	Emulsion double	Traitement des MICI	[253]

Polymères	Nanoparticules	Principes actifs	Techniques (MPs)	Applications	Références
Mannitol	PLGA	Brucine Rifampicine	Emulsion double Spray drying	Traitement de l'arthrose Traitement de la tuberculose	[254, 255]
Chitosane	SLNs	PEITC	Emulsion inverse	Chimiothérapie	[256]
Chitosane	Phytosomes	Curcumine	Gélification ionique	Amélioration de l'absorption de la curcumine chez les rats après administration par voie orale	[257]
Mannitol	Dispersion de PLH dans l'eau	PLH	Spray drying	Traitement de l'asthme	[258]
Chitosane / alginate	PLA	KPV	Réticulation par des agents chélateurs (Ca <sup>2+</sup> et SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )	Traitement des MICI	[259]

---

Polymères	Nanoparticules	Principes actifs	Techniques (MPs)	Applications	Références
PLGA	Particules magnétique (FeCo)		Emulsion inverse	IRM de la chimioembolisation de la tumeur	[260]

---

La combinaison des microparticules et des nanoparticules offre la possibilité de double ou de multiples fonctions au sein d'une formulation. Par exemple, des profils de relargage multiples sont possibles (relargage rapide du principe actif à la surface des microparticules et libération prolongée du principe actif provenant des nanoparticules encapsulées dans des microparticules). La combinaison des propriétés des deux systèmes permet des interactions cellulaires spécifiques pour l'imagerie et la protection *in vivo* [247]. Veisèh *et al.* ont ainsi proposé un système de vectorisation multifonctionnel comprenant à la fois l'imagerie (encapsulation d'un agent fluorophore) et des agents thérapeutiques, en plus d'une surface fonctionnalisée pour améliorer les interactions cellulaires spécifiques [247]. Jelvehagri *et al.* ont produit un système de nanoparticules encapsulant la théophylline incluses dans des microparticules de PCL (polycaprolactone) pour le traitement de l'asthme, le PCL permettant de réduire la vitesse de libération trop rapide de la théophylline [261]. Un autre exemple porte sur un système composé de nanoparticules de gélatine type B encapsulant un siARN (small interfering ARN (acide ribonucléique)) pour le TNF  $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) dans des microparticules de PCL (polycaprolactone) (Figure 24). Ce siARN permet d'inhiber l'expression du gène qui code pour TNF  $\alpha$  qui est un facteur produit lors des réactions inflammatoires. Kreigel *et al.* ont testé ce système pour le traitement des MICI (Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin) par administration orale de ce vecteur. Le PCL est un polymère biodégradable et biocompatible. Il est digéré par les lipases intestinales ce qui permet la libération des nanoparticules de gélatine encapsulant le siARN où elles sont absorbées par les entérocytes par endocytose [250]. Les études ont mis en évidence que la diminution de l'expression du TNF  $\alpha$  a réduit le degré de sévérité de la maladie [262].

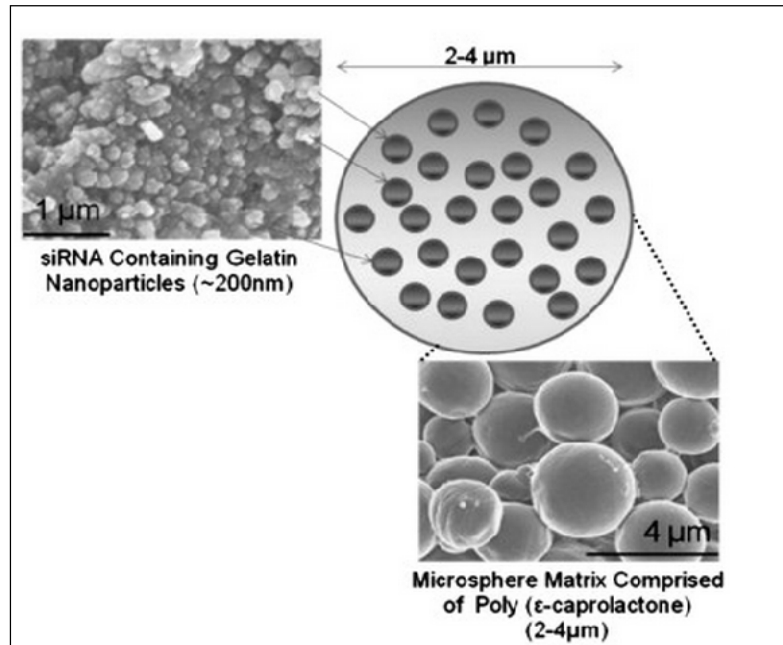


Figure 24: Représentation schématique du système nanoparticules dans microparticules, images MEB de nanoparticules de gélatine et de microparticules de PCL encapsulant les nanoparticules de gélatine [253].

En outre, d'autres études ont été réalisées par Bhavsar *et al.* en utilisant des NIMs composées également d'un système gélatine et PCL pour encapsuler un autre plasmide codant pour EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein), une protéine fluorescente [250]. Ils ont constaté que les NPs de gélatine seules ne peuvent pas traverser le tractus gastro-intestinal, à cause du pH gastrique et de la présence des enzymes (peptidases, etc.), tandis que les NIMs, ont pu traverser le tractus et sont arrivés jusqu'au côlon. Cela a été quantifié par l'évaluation du taux d'expression d'EGFP.

Des biopolymères ont également été utilisés pour la formation des NIMs. Laroui *et al.*, ont ainsi développé un système composé de nanoparticules de PLA (Poly Lactic Acid) encapsulant un tripeptide bioactif avec des activités anti-inflammatoires, le KPV (Lysine-Proline-Valine), inclus dans un hydrogel composé de chitosane et d'alginate [259] (Figure 25). Ces hydrogels ont été réticulés en ajoutant des ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{SO}_4^{2-}$  permettant la réticulation de l'alginate et du chitosane. Cet hydrogel a permis la vectorisation de

nanoparticules vers le côlon, après dégradation de l'hydrogel par les enzymes microbiennes.

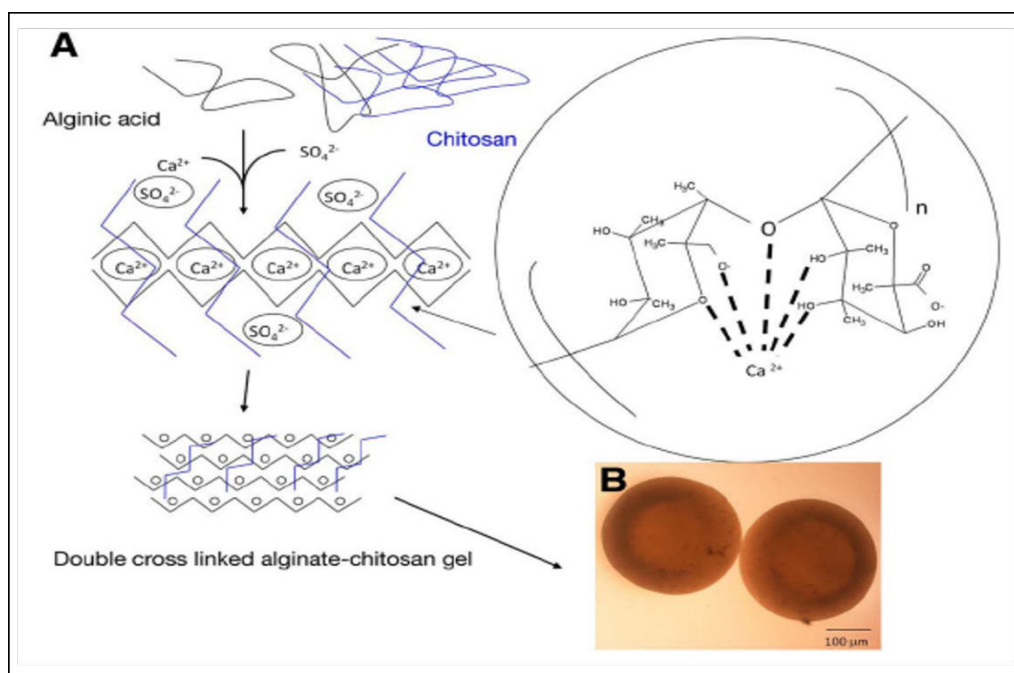


Figure 25: Schéma représentatif de la réticulation de l'hydrogel par les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{SO}_4^{2-}$  (A), et photo de l'hydrogel prise par microscopie optique (B) [259].

Zhang *et al.*, ont produit un système de phytosomes encapsulant la curcumine incorporé dans des microparticules de chitosane [257]. La curcumine a été complexée par les phospholipides des phytosomes. Ensuite, ces derniers ont été encapsulés dans des microparticules de chitosane par gélification ionique à l'aide du TPP (tripolyphosphate). Le but de l'encapsulation des phytosomes dans des microparticules de chitosane est de les protéger contre la dégradation par les enzymes pancréatiques et de permettre une libération plus lente de la curcumine. Les études de libération ont montré que 70% de la curcumine a été libérée à pH 7,4 après 48h. Cela est dû aux interactions électrostatiques entre les phytosomes chargés négativement et le chitosane chargé positivement ralentissant ainsi la diffusion des phytosomes vers le milieu externe. En outre, les études pharmacocinétiques chez des rats après administration par voie orale de la curcumine native, de phytosomes encapsulant la curcumine, de microparticules de chitosane encapsulant la curcumine et de microparticules de chitosane encapsulant des phytosomes, eux même encapsulant la

curcumine, ont montré que la concentration maximale ( $C_{\max}$ ) de la curcumine dans le sang est 60% plus élevée (359,67 ng / mL) pour les microparticules de chitosane encapsulant les phytosomes en comparant avec la  $C_{\max}$  provenant des phytosomes encapsulant la curcumine (142,61 ng / mL). Par ailleurs, la curcumine provenant des microparticules de chitosane encapsulant les phytosomes seuls ( $T_{1/2} = 3,16\text{h}$ ) reste plus longtemps dans la circulation sanguine que celle qui provient des phytosomes ( $T_{1/2} = 1,73\text{h}$ ). Cela provient de la libération prolongée de la curcumine des phytosomes encapsulées dans les microparticules de chitosane.

En résumé, les systèmes nanoparticules dans microparticules sont des systèmes prometteurs pour le ciblage des principes actifs vers le côlon. Leur efficacité dépend de la nature du polymère choisi pour la production des microparticules. Il faut ainsi qu'il soit biocompatible, biodégradable et qu'il résiste au pH gastrique et aux enzymes pancréatiques. En outre ce système permet une libération lente et prolongée du principe actif des nano- et des microparticules.

## ***Contexte de l'étude***

Les nanoparticules lipidiques solides (SLNs) sont une nouvelle génération de nanoparticules lipidiques dans laquelle le lipide liquide utilisé pour préparer des nanoémulsions est substitué par des lipides solides à température ambiante [263]. Les SLNs ont gagné une attention accrue des industries pharmaceutiques et alimentaires en raison de leurs avantages potentiels tels que leur capacité à encapsuler des principes actifs hydrophobes, leur stabilité, la libération contrôlée du principe actif, la protection du principe actif contre la dégradation chimique et enzymatique et la possibilité de les produire à grande échelle [22]. En outre, le principe actif encapsulé dans la matrice lipidique est moins mobile en comparaison avec des nanoémulsions et des liposomes ce qui permet une meilleure stabilité du principe actif en fonction du temps. Néanmoins, la transition polymorphique du lipide relatif au changement de sa structure cristalline au cours du temps peut conduire à l'expulsion du principe actif vers le milieu externe. Les SLNs sont souvent stables au pH gastrique, mais elles sont dégradées par les lipases pancréatiques au niveau de l'intestin entraînant la libération du principe actif. Notre objectif est de vectoriser un polyphénol vers le côlon en utilisant les SLNs comme nanovecteurs. Pour cela il faut les protéger ou les rendre furtifs pour qu'elles puissent traverser l'intestin grêle. La solution envisagée dans ce travail est de protéger les SLNs en les encapsulant dans des microparticules biopolymériques résistantes aux conditions gastriques (pH et enzymes) et qui sont digérées par les enzymes microbiennes du côlon.

Le Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio) travaille depuis quelques années sur l'encapsulation de principes actifs hydrophobes tels que la curcumine dans des nanovecteurs lipidiques en utilisant des lipides naturels. L'interaction du principe actif avec le vecteur ainsi que le transfert du principe actif vers le milieu externe sont ainsi étudiés au laboratoire. A partir de ces travaux, nous avons envisagé la possibilité d'encapsuler un principe actif hydrophobe dans un nouveau nanovecteur lipidique en utilisant du beurre de Karité comme lipide solide, lui-même encapsulé dans des microparticules biopolymériques à base de chitosane en utilisant un agent de réticulation non toxique.



L'objectif principal de ce travail est de produire un système composé de microparticules de chitosane encapsulant des nanoparticules lipidiques solides incluant la curcumine dans des conditions douces sans utilisation de solvants organiques. Ainsi, la caractérisation de l'assemblage (taille des particules, caractérisation thermique et structurale par DSC et DRX) et les propriétés physico-chimiques des SLNs encapsulant la curcumine telles que la taille, la polydispersité et la stabilité ont été évaluées.

Dans un premier temps, l'influence de la composition du système (lipide, tensioactifs et eau) sur la distribution de la taille des SLNs encapsulant la curcumine a été étudiée en utilisant la méthodologie des plans de mélanges. Un système simple à base de beurre de Karité et de tensioactifs non-ioniques commerciaux (Tween 80 et Span 80) a été utilisé. Le modèle mathématique validé expérimentalement a ainsi permis de prévoir les caractéristiques du système en fonction des paramètres étudiés. D'autre part, les propriétés physico-chimiques des SLNs obtenues (taille, indice de polydispersité) et l'influence de la curcumine sur le profil thermique et la structure cristalline des SLNs ont été évaluées par diffusion dynamique de la lumière (DLS : Dynamic Light Scattering), Calorimétrie Différentielle à Balayage (DSC : Differential Scanning Calorimetry) et DRX (Diffraction des Rayons X).

Dans un deuxième temps, les SLNs ont été encapsulées dans des microparticules de chitosane par la technique de gélification ionique en utilisant le tripolyphosphate (TPP) comme agent de réticulation. Pour cela, un autre système de SLNs à base de tensioactifs anioniques (phospholipides de Soja) et non-ioniques (Tween 80) a été utilisé pour assurer une bonne interaction avec le chitosane qui est chargé positivement à pH acide. Plusieurs raisons nous ont conduit à choisir le chitosane et non pas un autre biopolymère : le chitosane est bien connue pour sa biocompatibilité, sa biodégradabilité et sa non toxicité. Il présente naturellement des propriétés intéressantes telles que la mucoadhésivité, une activité antibactérienne et une activité antifongique. Le chitosane est le seul biopolymère dans la nature qui est chargé positivement à pH acide. Cette propriété va permettre au chitosane d'interagir avec la muqueuse intestinale chargée négativement ce qui fait du chitosane un bon système de vectorisation des principes actifs vers le côlon. Le choix

d'agent de réticulation s'est porté sur le tripolyphosphate (TPP) car celui-ci est non toxique et soluble dans l'eau.

De la même façon que pour les SLNs du premier système, les propriétés physico-chimiques (taille et indice de polydispersité), ainsi que l'interaction chitosane-SLNs-curcumine et l'effet de l'assemblage sur le profil thermique et la structure cristalline des SLNs ont été évalués par granulométrie laser (pour les microparticules), par DLS (pour les SLNs), par DSC et par DRX.

# **Matériels et méthodes**

## Chapitre II: Matériels et méthodes

### II.1 Matériels

Le beurre de Karité a été fourni par le laboratoire *IES (Oraison, France)*. C'est une matière grasse naturelle extraite du fruit de Karité. Il est composé majoritairement d'acides oléique (C18 :1) et stéarique (C18 :0) avec des traces d'acides palmitique (C16:0) et linoléique (C18:2n-6) mis en évidence par le chromatogramme présenté sur la Figure 26 en accord avec la littérature [264].

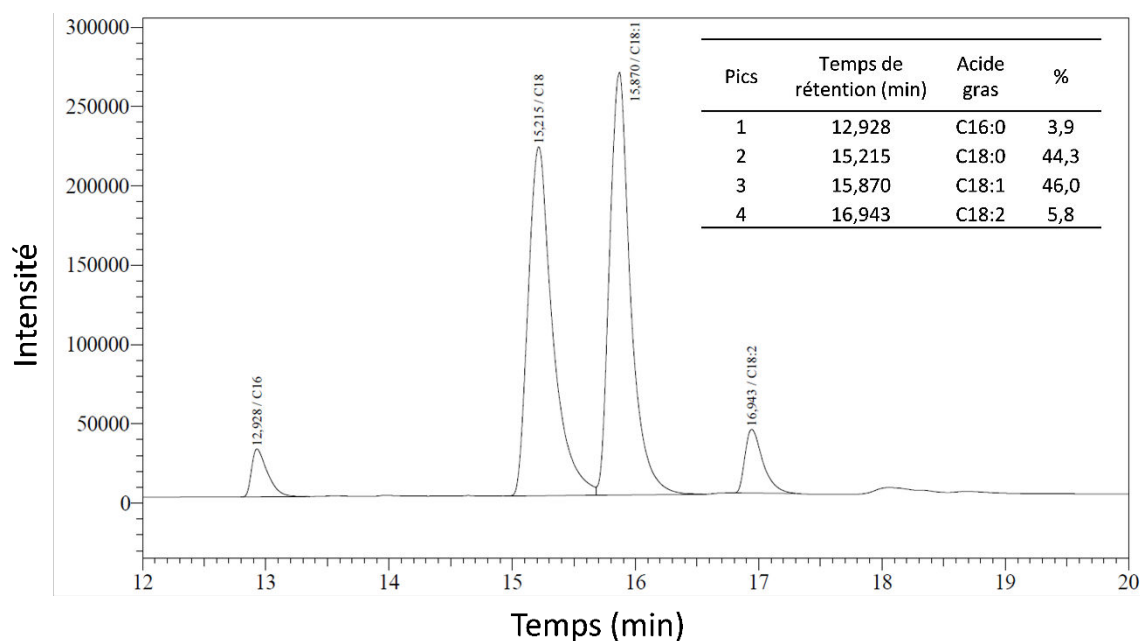


Figure 26: Chromatogramme et composition en acides gras extraits du beurre de karité.

Le Tween 80 et le Span 80 ont été fournis par *Sigma-Aldrich (France)*. Ces deux tensioactifs non ioniques utilisés pour stabiliser des émulsions directes Huile / Eau ((Tween 80 HLB = 15) et Eau / Huile (Span 80 HLB = 4,3)).

La curcumine provient de chez *Sigma-Aldrich (Chine)*. La curcumine est un polyphénol hydrophobe de couleur jaune issue des rhizomes de la plante indienne *Curcuma longa*.

Le *phospholipon 80H* a été fournis par la société *Lipoid (Allemagne)*. Le *phospholipon 80H* est composé de lécithine de soja hydrogénée avec 70% de phosphatidylcholine (donnée du fournisseur).

Le chitosane (190-310 KDa, DD (degré de désacétylation) = 75-85%) a été fourni par *Sigma - Aldrich (Islande)*. Le chitosane est un biopolymère formé d'unités D-glucosamines liées entre elles par des liens glycosidiques et de N-acétyl-D-glucosamine.

Le tripolyphosphate (TPP,  $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ , pureté 85%) a été fournis par *Sigma-Aldrich (Etats-Unis)*. Le TPP est un élément essentiel de savons, détergents et produits pour adoucir l'eau dure. Il est utilisé dans la réticulation du chitosane par la technique de gélification ionique.

Le tréhalose dihydraté (provient de maïs, pureté 99%) a été fourni par *Sigma-Aldrich (Etats-Unis)*. Le tréhalose est un disaccharide non réducteur, composé de deux molécules de glucose liées par une liaison 1,1- $\alpha$ -glycosidique. Il est utilisé comme un agent cryoprotecteur pour les SLNs pendant la lyophilisation ce qui va éviter l'agrégation des nanoparticules.

## II.2 Méthodes

### II.2.1. Caractérisation du beurre de Karité par chromatographie en phase gazeuse (CPG)

- *Préparation des esters méthyliques d'acides gras*

100 mg d'échantillon sont pesés dans un tube en verre fermé par un bouchon à vis et dissous dans 5 mL d'hexane. 0,2 mL de réactif de trans-estérification (potasse/méthanol 2 M) sont ensuite ajouté. Le tube est ensuite vigoureusement mélangé pendant une minute sous vortex. Après une phase de repos de 10 minutes permettant la séparation de phase, la phase supérieure est récupérée pour l'analyse CPG.

- *Programme d'analyse d'acides gras par CPG*

La séparation des esters méthyliques a été effectuée sur un appareil de chromatographie en phase gazeuse Shimadzu GC 2010 (*Shimadzu, France*) équipé d'une colonne capillaire (60 m, 0,25 mm de diamètre interne, 0,2  $\mu\text{m}$  d'épaisseur de film, SPTM2380 *Supelco, Bellfonte-PA-USA*) et d'un détecteur à ionisation de flamme. Les températures du détecteur et de l'injecteur sont fixées à 250°C. Le programme d'analyse est le suivant : la température de départ 120°C est maintenue pendant 5 minutes puis la colonne est portée à 180°C à 40°C.min<sup>-1</sup> et est maintenue 2 minutes à cette température. Elle est ensuite chauffée jusqu'à 220°C à 3°C.min<sup>-1</sup> et est maintenue 25 minutes. La durée totale d'une analyse est de 44 minutes.

## II.2.2. Préparation des nanoparticules lipidiques solides (SLN)

### II.2.2.1. Protocole général

Le mode de préparation des SLNs est équivalent à un protocole d'obtention de nanoémulsions. La seule différence réside dans le contrôle de la température tout au long de la préparation pour conserver la matière grasse à l'état liquide. Dans cette étude, un cisaillement à grande vitesse par Ultra-turrax (*IKA T25*) suivi d'un traitement par ultrasonication a été utilisé.

Le protocole général de préparation des SLNs est détaillé dans la Figure 27. Dans un premier temps, la phase lipophile constituée du beurre de karité et d'un tensioactif lipophile (si nécessaire) est chauffée à une température supérieure au point de fusion du beurre de karité (33-37°C) [85]. Dans un deuxième temps, la phase hydrophile composée du ou des tensioactifs hydrophiles et de l'eau, est chauffée à la même température. La phase lipophile est ensuite injectée goutte à goutte dans la phase hydrophile sous agitation à 500 rpm. Cette pré-émulsion est soumise à un cisaillement à grande vitesse à 10 000 rpm pendant 5 min à l'aide d'un Ultra-turrax digital conduisant à une émulsion plus fine. L'émulsion obtenue est par la suite soumise à une sonication à l'aide d'une sonde à ultrason (*Vibracell 75115 bioblock scientific*) en mode pulsé (1s on, 1s off) pendant 3 min à 40%

de puissance maximale pour obtenir des gouttelettes dont la taille avoisine la centaine de nanomètres. La température est maintenue constante durant toute la manipulation. La nanoémulsion obtenue est finalement refroidie à température ambiante permettant la cristallisation du lipide et la formation des SLNs.

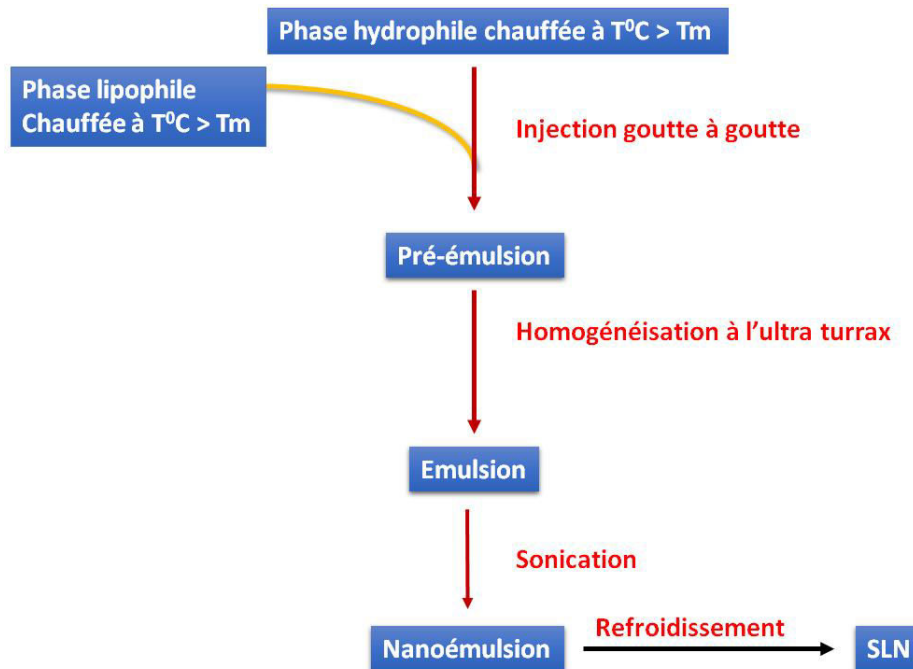


Figure 27: Représentation schématique du protocole de préparation des SLNs.

La préparation des SLNs stabilisées par un mélange de Tween 80 et de Span 80 est effectuée à 40°C. Dans le cas d'une utilisation du phospholipon 80H, cette température n'est pas suffisante pour assurer une dispersion complète des phospholipides. Les SLNs formées avec des phospholipides de soja ont ainsi été préparées à 52°C.

Les SLNs encapsulant la curcumine sont préparées de manière identique. La seule différence réside dans l'ajout de la curcumine solubilisée dans la phase lipophile.

### II.2.3. Etude de la solubilité de la curcumine dans le beurre de Karité

La curcumine est soluble dans des solvants organiques tels que le méthanol, le chloroforme et dans les huiles. Il est nécessaire de déterminer sa solubilité maximale dans le beurre de karité afin de connaître la quantité maximale pouvant être incorporée dans les

SLNs et ainsi pouvoir déterminer l'efficacité d'encapsulation. La solubilité de la curcumine a été déterminée aux températures utilisées pour préparer les nanoparticules ; 40°C et 52°C (système Karité /Tween 80/ Span 80 et Karité / PL80H/Tween 80). Un excès de curcumine (5 mg.ml<sup>-1</sup> de lipide fondu) est ajouté au beurre de karité fondu. Ce mélange est incubé aux différentes températures sous une agitation douce pendant 72h. Cette suspension est ensuite centrifugée à 12,100 g pendant 20 min pour faire précipiter la curcumine non solubilisée, et ce, en gardant une température supérieure au point de fusion du beurre de karité. La quantité de curcumine soluble dans le beurre est déterminée par dosage spectrophotométrique UV-visible dans le méthanol à 425 nm (*Shimadzu UV-1605*). La solubilité de la curcumine (mg.g<sup>-1</sup> de lipides) a été calculée en utilisant une courbe d'étalonnage (Figure 28) préparée à partir des solutions standards de curcumine dissoute dans le méthanol.

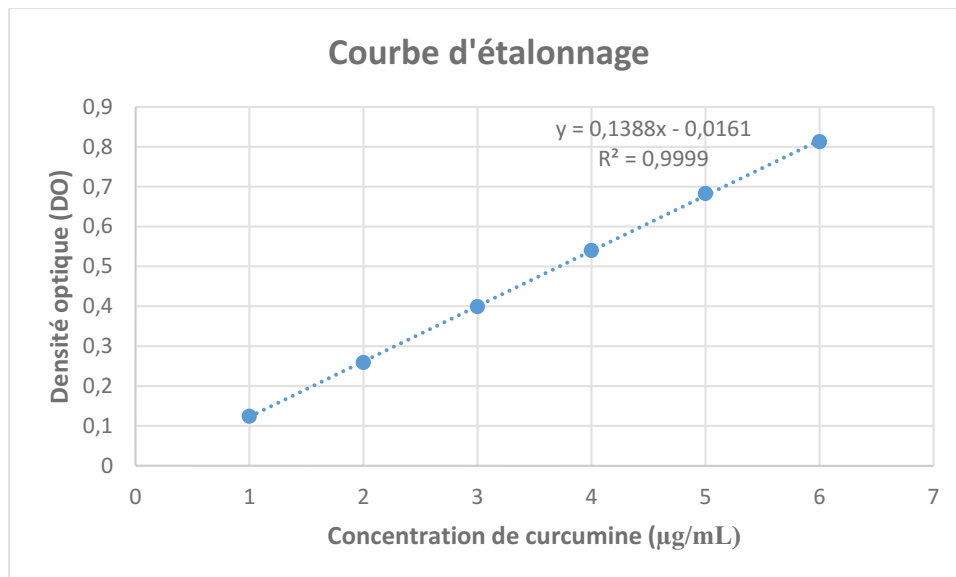


Figure 28: Courbe d'étalonnage préparée à partir des solutions standards de curcumine dissoute dans le méthanol. La droite obtenue correspond à l'absorbance de la curcumine dans le méthanol à 425 nm.



#### II.2.4. Détermination de l'efficacité d'encapsulation

L'efficacité d'encapsulation est un paramètre important pour la caractérisation des systèmes obtenus. Il est ainsi nécessaire de doser la curcumine encapsulée dans les SLNs. La curcumine non encapsulée est présente sous deux formes : une forme cristallisée qui est sédimentée par centrifugation à faible vitesse (3000 g) pendant 10 min, et une forme dissoute dans les micelles de Tween 80 qui présentent une taille inférieure à 10 nm. Dans le deuxième cas, il faut séparer les SLNs des micelles de Tween 80. Cela est effectué à l'aide de tubes de centrifugation équipés de membranes spécifiques (*centrisart I*, Sartorius GmbH, Figure 29). Ces tubes d'ultrafiltration sont composés d'un tube externe dans lequel l'échantillon à filtrer est placé et d'un tube interne portant un ultrafiltre de 100 KDa MWCO (Molecular Weight Cutt Off), correspondant à une porosité de 10 nm. Par centrifugation, le milieu continu aqueux ainsi que des particules de taille inférieure à 10 nm (pouvant être des micelles de Tween 80 encapsulant la curcumine) sont récupérées dans le tube interne et les SLNs dans le tube externe. Enfin, la curcumine encapsulée dans les SLNs (récupérées dans le tube interne) est dosée après extraction dans le méthanol par spectrophotométrie UV-visible à 425 nm, en utilisant la courbe d'étalonnage présentée dans la Figure 28.

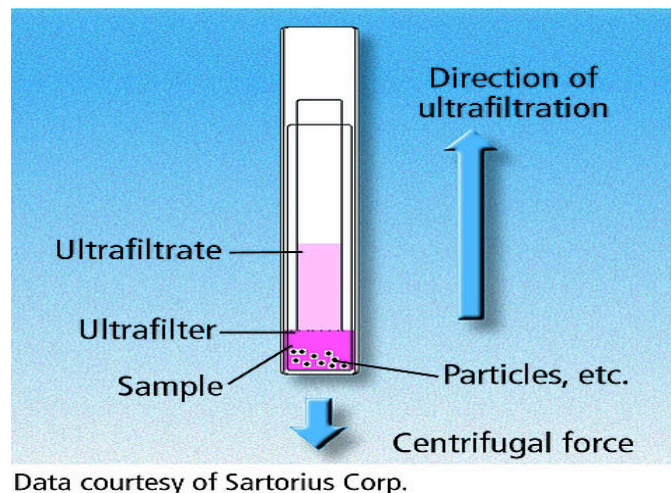


Figure 29: Description et principe d'un tube centrisart I.

Cette méthode est utilisée pour doser la curcumine encapsulée dans le premier système (Karité/Tween 80/Span 80) tandis que le second système (Karité/ PL 80H/Tween

80) ne présente pas de micelles de Tween 80 selon les distributions de taille par DLS. Pour cela le protocole de dosage de la curcumine a donc été simplifié en annulant l'étape d'ultrafiltration.

L'efficacité d'encapsulation (EE) de la curcumine dans les SLNs est déterminée à partir de l'équation suivante :

$$EE = \left( \frac{\text{Curcumine encapsulée } (mg \cdot g^{-1})}{\text{Solubilité de la curcumine } (mg \cdot g^{-1})} \right) \times 100 \quad (\text{Eq.4})$$

### II.2.5. Optimisation du système Karité / Tween 80/ Span 80 par plans d'expériences

En vue de l'optimisation de la préparation des nanoparticules, nous avons utilisé une approche empirique basée sur les plans d'expériences. Un plan d'expériences est une succession d'essais organisés de manière à déterminer avec un minimum d'essais et avec un maximum de précision l'influence de plusieurs paramètres (facteurs) sur une ou plusieurs réponses. Les plans de mélanges sont définis comme des plans d'expériences utilisés pour étudier la formulation d'un produit composé de plusieurs constituants. Dans notre cas, nous avons étudié l'effet de la composition du système (lipide, tensioactifs, eau) sur la taille et la polydispersité des SLNs obtenues. La démarche générale des plans de mélanges consiste à traduire la variation d'une réponse en fonction des constituants du mélange par la relation  $Y = f(X_i)$  avec  $X_i = 1$  et  $i$  varie entre 1 et  $n$  (le nombre total des facteurs). Les avantages de cette méthode sont une diminution du nombre d'essais, un nombre plus important de facteurs étudiés, une détection des interactions entre les constituants ainsi qu'une modélisation conduisant à une optimisation des réponses [265].

#### II.2.5.1. Le choix du modèle

Plusieurs modèles existent pour traduire les variations d'une réponse en fonction de la composition du mélange. L'élaboration d'un tel modèle de degré  $n$  avec  $k$  constituants, se fait par le réseau de Scheffé ( $k, n$ ). Celui-ci propose de choisir les teneurs

en  $X_i$  du mélange suivant la série  $0, 1/n, 2/n, \dots, n/n$  ; ainsi on aura autant de mélanges différents que des coefficients à déterminer dans le modèle polynomial.

Dans le cas des mélanges, les facteurs sont les proportions de chaque composant. Ils ont donc deux particularités importantes [266] :

- Leur somme est égale à l'unité, ils ne sont donc pas indépendants ( $\sum_i X_i = 1$ ).
- Leurs valeurs sont des nombres sans dimension, parfaitement comparables ; une valeur de 0.1 a la même signification, qu'elle représente la fraction d'un antioxydant dans une crème dessert, ou la proportion d'un cépage dans un vin.

Ces contraintes sur les valeurs que peut prendre  $X_i$  font que les mélanges ne peuvent pas être traités de la même façon que dans le cas général, dans lequel les valeurs prises par les variables codées ne sont pas soumises à ces contraintes. Compte tenu de celles-ci, toute variation de la proportion d'un composant entraîne une variation de la proportion des autres composants [266].

On a notamment le modèle linéaire, le modèle quadratique et le modèle spécial cubique.

- Le modèle linéaire a une forme générale  $Y = \beta_k \cdot X_k$ . Ce modèle n'a pas de constante. Pour  $k=3$ , on aura  $Y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3$ .
- Le modèle quadratique est un modèle de degré 2. Sa formule générale est :
- $Y = \beta_i X_i + \beta_{ij} X_i X_j$  ( $j > i$ ). Dans le cas du mélange ternaire on a  $Y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$ .
- Le modèle spécial cubique est un modèle de degré 3. Sa formule générale est
- $Y = \beta_m X_m + \beta_{ij} X_i X_j + \beta_{ijh} X_i X_j X_h$  ( $i < j < h$ ) et  $m$  varie entre 1 et  $k$ .

Dans notre cas, le modèle est spécial cubique, avec  $k=3$  Sa formule est :

$$Y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{123} X_1 X_2 X_3$$

Y est la réponse étudiée (dans notre cas le diamètre hydrodynamique des nanoparticules et l'indice de polydispersité PDI),  $\beta_{ijk}$  sont les paramètres de régression et  $X_1$ ,  $X_2$  et  $X_3$  sont les teneurs des constituants du mélange (beurre de Karité, tensioactifs (Tween 80 et Span 80 et eau).

#### II.2.5.2. La réalisation des essais

Le plan de mélanges permet de modéliser l'influence de la composition du système sur les réponses étudiées en utilisant la méthode des surfaces de réponse (MSR). Cette méthode a pour but d'explorer les relations entre les variables dépendantes et indépendantes impliquées dans une expérience [267]. Cette méthode a été utilisée pour étudier l'influence de la composition de la formulation sur la taille et la polydispersité des SLNs obtenues. Le domaine expérimental est limité en choisissant le minimum et le maximum pour chaque paramètre (Tableau 7).

Tableau 8: Limites choisies pour chaque paramètre du domaine expérimental.

Paramètres	Domaine expérimental (m/m)
Beurre de Karité	5-40%
Tensioactifs	1,5-19%
Eau	48-92%

La matrice du plan de mélanges a été construite par le logiciel NEMROD (New Efficient Methodology for Research using Optimal Design) avec 23 expériences (Tableau 8) [268].

Tableau 9: Matrice des expériences.

N°.exp.	Fraction de beurre de Karité	Fraction d'eau	Fraction de tensioactifs
1	0,05	0,76	0,190
2	0,40	0,58	0,015
3	0,05	0,92	0,030
4	0,06	0,92	0,015
5	0,40	0,48	0,120
6	0,33	0,48	0,190
7	0,05	0,84	0,110
8	0,19	0,62	0,190
9	0,23	0,75	0,015
10	0,40	0,53	0,067
11	0,05	0,92	0,022
12	0,36	0,48	0,150
13	0,21	0,69	0,093
14	0,13	0,72	0,140
15	0,30	0,63	0,054
16	0,13	0,8	0,061
17	0,14	0,8	0,050
18	0,30	0,58	0,100
19	0,27	0,58	0,140
20	0,10	0,87	0,020
21	0,20	0,76	0,017
22	0,30	0,68	0,038
23	0,40	0,57	0,028

### II.2.5.3. Interprétation des résultats

L'interprétation des résultats se traduit par l'analyse statistique des résultats notamment la significativité des coefficients du modèle et la validité du modèle. Ceci se fait par régression linéaire et l'analyse des variances (ANOVA). L'exploitation des résultats se fait à l'aide du logiciel NEMROD, en calculant les coefficients du modèle polynomial. En d'autres termes, il s'agit de déterminer les facteurs ou les interactions qui ont une influence statistiquement significative sur la réponse étudiée. L'estimation de l'erreur et du manque d'ajustement du modèle seront évalués également. En conclusion de

l'étude on juge de la fiabilité du modèle à prédire le phénomène étudié. Il est important de signaler que le modèle obtenu ne peut être utilisé qu'à l'intérieur du domaine d'étude.

### II.2.6. Préparation des microparticules de chitosane

Les microparticules de chitosane (CS-MP) ont été préparées à l'aide d'un protocole issu de préparation des nanoparticules de chitosane adapté au niveau des concentrations en chitosane et tripolyphosphate (TPP) (Figure 30) [269]. Cette méthode est basée sur la gélification ionique du chitosane protoné (groupement  $\text{NH}_3^+$ ) par le TPP ( $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ ). L'ajout du TPP, qui est un polyanion, va induire la formation spontanée des microparticules de chitosane, par des interactions électrostatiques entre les groupements amino du chitosane et les ions phosphates du TPP. Par cette méthode il est possible de préparer soit des nano- soit des microparticules, en modifiant les concentrations en chitosane et en TPP. L'obtention des nanoparticules est limitée à une certaine concentration en chitosane (<0,15%) et TPP (< 0,1%) [269]. Dans notre étude, nous avons obtenues des microparticules en utilisant des concentrations en chitosane de 0,15% et en TPP de 0,05%. Les conditions expérimentales de la préparation des microparticules sont précisées dans le Tableau 10.

Tableau 10: Conditions expérimentales de préparation des microparticules de chitosane.

Conditions de manipulation	CS-MP
Masse moléculaire du chitosane	190-310 kDa
Concentration du chitosane (m/v)	0,15%
Ratio CS/TPP (m/m)	3/1
Ratio CS/TPP (v/v)	1/2
pH	CS (pH=4,0), TPP (pH=7,0)
Vitesse d'agitation	700 rpm
Temps de gélification	10 min

Le chitosane (0,15% (m/v)) est tout d'abord solubilisé dans une solution d'acide acétique diluée et laissé sous agitation modérée (350 rpm) pendant 24h à température ambiante. La concentration en acide acétique correspond à 0.4 fois la concentration en chitosane, et ce, pour présenter une faible force ionique permettant de rendre les particules plus stables en limitant l'effet de blindage du contre-ion et d'augmenter les sites de réticulation accessibles par le TPP [269]. La solution de chitosane est filtrée sous vide sur des membranes en nitrocellulose de porosité 8  $\mu\text{m}$  et 0,45  $\mu\text{m}$  pour éliminer les particules non dissoutes. Le pH de la solution de chitosane (4,6) est ajusté à 4,0 en ajoutant de l'acide

chlorhydrique 1M. Le TPP 0,05 % (m/v) est dissout dans l'eau et le pH (9,2) est ajusté à 7 à l'aide d'acide chlorhydrique HCl 1M.

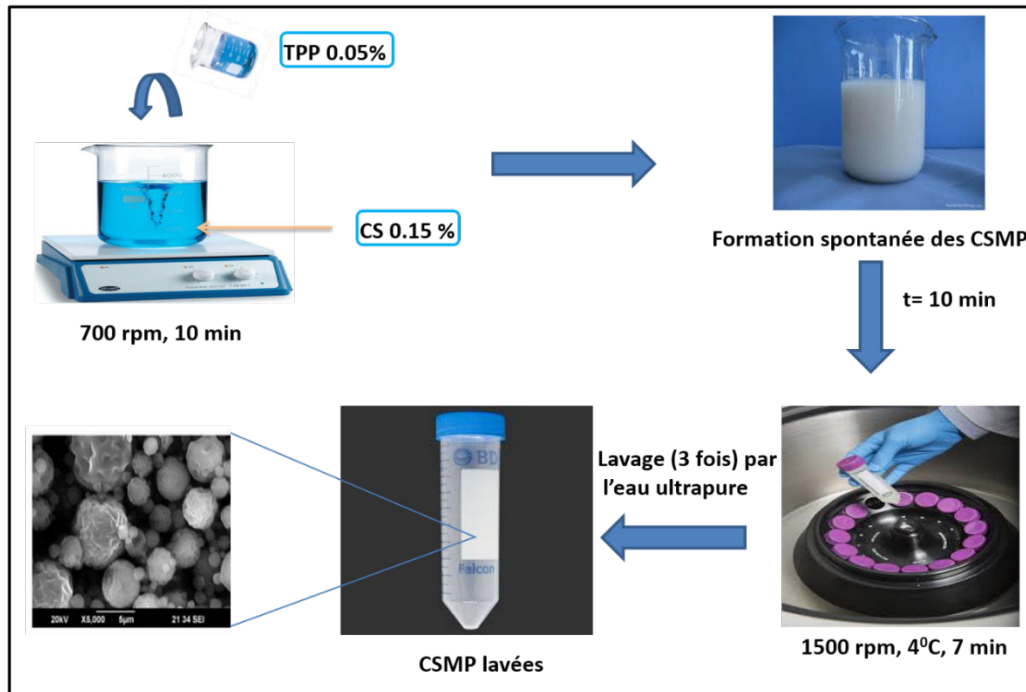


Figure 30: Représentation schématique du protocole de préparation des microparticules de chitosane [270] (référence de l'image MEB des microparticules de chitosane).

Ensuite, 10 mL de la solution de chitosane 0,15% est placé dans un bécher de 25 mL et est mis sous agitation à 700 rpm. 20 mL de la solution de TPP 0,05% sont versés dans la solution de chitosane. La suspension est laissée sous agitation pendant 10 min pour assurer la réticulation du chitosane par le TPP.

Enfin, les particules formées sont récupérées par centrifugation à 1500 rpm, pendant 7 min à 4°C et lavées 3 fois avec de l'eau ultrapure pour éliminer le TPP en excès. Les particules lavées sont redispersées dans l'eau ultrapure et stockées à 4°C.



## II.2.7. Encapsulation des SLNs dans les microparticules de chitosane

### *II.2.7.1. Méthode fondamentale*

Les SLNs sont des nanovecteurs lipidiques utilisés pour protéger et vectoriser des principes actifs hydrophobes [271-274] et hydrophiles [19, 275, 276] vers des organes cibles. Néanmoins, les SLNs ne résistent pas aux actions des lipases gastriques et pancréatiques qui sont les deux principales enzymes impliquées dans la digestion des lipides [277]. Ainsi, pour éviter la digestion des SLNs et la libération de la curcumine dans l'intestin grêle (lieu de digestion des lipides par la lipase pancréatique), les SLNs ont été encapsulées dans des microparticules de chitosane. Ces microparticules vont protéger les SLNs contre la digestion en masquant le site d'action des lipases (interface huile-eau) permettant ainsi la vectorisation des SLNs vers le côlon qui seront libérées après digestion du chitosane par les enzymes microbiennes présentes dans cette partie du tractus gastro-intestinal.

Les microparticules encapsulant les SLNs, elles-mêmes encapsulant la curcumine ont été préparées par le même protocole utilisé pour préparer les microparticules de chitosane, en ajoutant la dispersion de SLNs dans la solution du chitosane (Figure 31). L'ajout du TPP va permettre l'encapsulation des SLNs dans les microparticules en formant des réseaux entre les différentes chaînes du chitosane réticulé par le TPP.

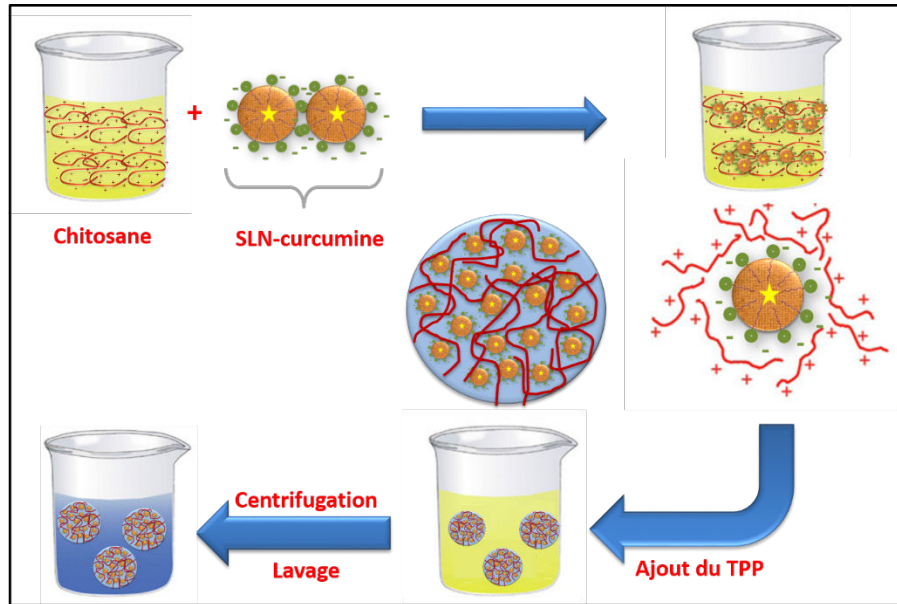


Figure 31: Protocole d'encapsulation des SLNs dans les microparticules de chitosane.

L'effet de la concentration en SLNs sur la taille des microparticules et sur l'efficacité d'encapsulation des SLNs a été étudié.

Les dispersions de SLNs initiales (10% en lipide) ont été diluées (F=0, 5, 25, 50) à différentes concentrations, puis ont été mélangées avec la solution de chitosane (0,15 %) sous agitation à 700 rpm. Un volume précis du TPP est versé conduisant à la formation des microparticules de chitosane encapsulant les SLNs (CS-SLN-MP). Les microparticules obtenues après 10 min de réticulation, ont été récupérées par centrifugation (1500 rpm, 37°C, 7 min) et lavées avec de l'eau bidistillée pour éliminer le TPP en excès.

Les conditions expérimentales de l'encapsulation des SLNs figurent dans le Tableau 11.

Tableau 11: Conditions expérimentales de l'encapsulation des SLNs dans les microparticules de chitosane.

Conditions de manipulation	CS-SLN-MP
Masse moléculaire du chitosane	190-310 kDa
Concentration du chitosane (m/v)	0,15%
Ratio CS/SLN (m/m)	10/1
Ratio CS/TPP (m/m)	3/1
Ratio CS/TPP (v/v)	1/2
pH	CS (pH=4,0), TPP (pH=7,0)
Vitesse d'agitation	700 rpm
Temps de gélification	10 min

#### *II.2.7.2. Encapsulation des SLNs dans les microparticules de chitosane par l'Encapsulateur Buchi 390 Pro*

En plus de la gélification ionique précédemment décrite pour préparer les microparticules de chitosane, des expériences utilisant un encapsulateur ont été effectuées.

##### *II.2.7.2.1. La technologie « Jet Break »*

L'encapsulateur Buchi (Figure 35) est utilisé pour l'encapsulation de principes actifs, de bactéries, de cellules végétales dans des particules biopolymériques. La technologie de vibration est un outil puissant pour obtenir des particules avec des tailles contrôlables et dans des conditions stériles surtout dans le domaine de l'encapsulation de bactéries. Elle donne également la possibilité de produire des particules à l'échelle industrielle grâce à sa simplicité d'utilisation [278]. Cette technologie est basée sur le principe selon lequel un jet liquide à écoulement laminaire se brise en gouttelettes de taille égale par une vibration superposée au niveau de la buse. La fréquence de vibration choisie

détermine la quantité de gouttelettes produites. Par exemple, une fréquence de vibration 700 Hz produit 700 gouttelettes par seconde.

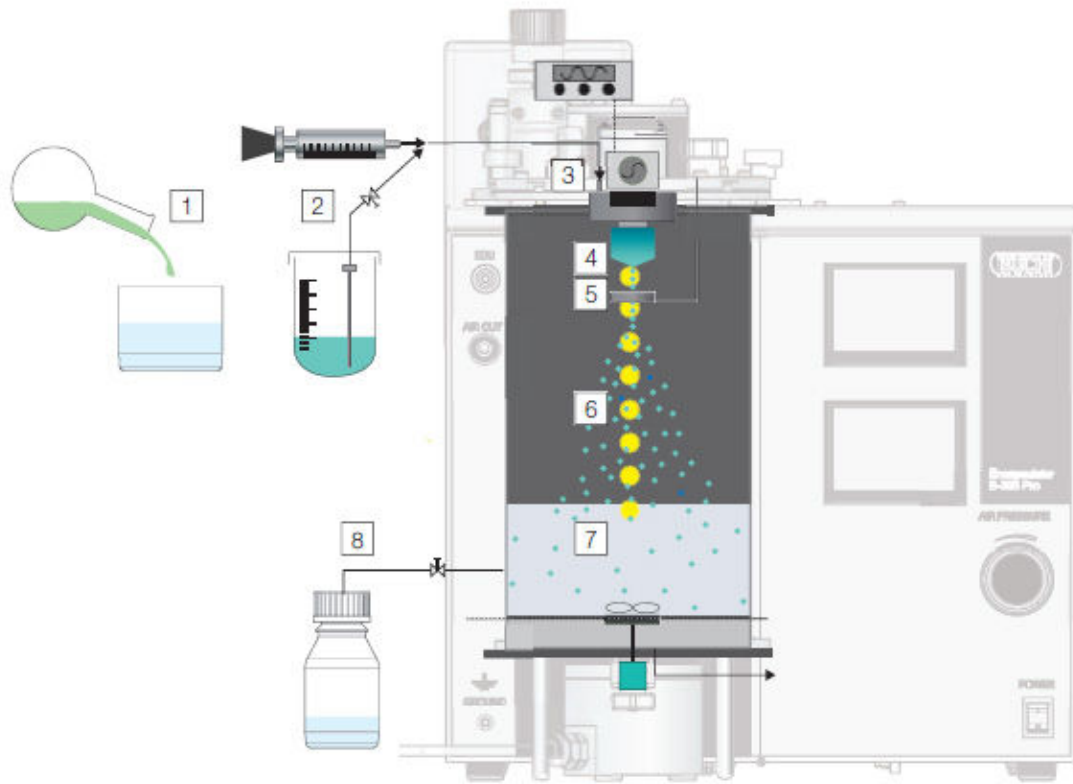


Figure 32: Principe de l'encapsulateur Buchi ([www. Buchi.com](http://www.Buchi.com), consulté le 4/8/2015). 1) Mélange du principe actif à encapsuler avec le polymère. 2) Pompage du mélange à l'aide d'une pompe à seringue. 3) Création d'une vibration superposée. 4) Formation des gouttelettes. 5) Chargement des gouttelettes à l'aide d'un champ électrostatique ce qui permet la dispersion des gouttelettes par répulsion électrostatique. 6) Contrôle en ligne de la formation des gouttelettes à la lumière d'une lampe stroboscopique. 7) Formation des microparticules par gélification ou polymérisation dans le bain de réticulation. 8) Récupération des particules.

#### II.2.7.2.2. Protocole

Les microparticules de chitosane encapsulant des SLNs ont été préparées par gélification ionique en utilisant le même principe qu'avant, mais en utilisant l'encapsulateur (*Buchi 390 Pro, Switzerland*). Les SLNs ont été mélangées avec la solution

de chitosane 0,4% (m/v) avec un ratio 1 :10 (v/v). Ce mélange a été aspiré par une seringue de 20 mL et pompé à l'aide d'une pompe pousse seringue. Ce mélange a subi ensuite une vibration superposée au niveau de la buse, ce qui conduit à la formation des gouttelettes. Ces gouttelettes ont été chargées à l'aide d'un champ électrostatique permettant ainsi la dispersion des gouttelettes par répulsion électrostatique. Le bain de réticulation est composé d'une solution de TPP 8% (m/v) et de tween 80 0,05% (m/v). Le tween 80 a été ajouté pour diminuer la tension de surface ce qui facilite le plongement des particules dans le bain de réticulation. Les particules ont été laissées pendant 20 min sous faible agitation (250 rpm) pour assurer une bonne réticulation par le TPP. Les particules ainsi réticulées ont été filtrées sur un papier filtre et lavées plusieurs fois par l'eau pour éliminer le TPP n'ayant pas réagi.

Les conditions expérimentales de l'encapsulation des SLNs dans les microparticules de chitosane sont présentées dans le Tableau 12.

Tableau 12: Conditions expérimentales de l'encapsulation des SLNs dans des microparticules de chitosane en utilisant l'encapsulateur Buchi Pro 390.

Préparations	% Chitosane (m/v)	Ratio SLN : Chitosane	Fréquence (Hz)	Débit (ml/min)	Diamètre de la buse ( $\mu\text{m}$ )	Voltage (V)
1	0.4	1 :10	500	4	120	950
2	0.4	1 :10	1200	4	120	850
3	0.4	1 :10	1380	4	120	900
4	0.4	1 :10	500	7	300	800
5	0.4	1 :10	770	7	300	900
6	0.4	1 :10	800	7	300	900

## II.2.8. Méthodes de caractérisation

### II.2.8.1. Diffusion Dynamique de la lumière (DLS, Dynamic Light Scattering)

#### II.2.8.1.1. Principe

La taille des SLNs est un paramètre majeur dans leur caractérisation. La méthode de mesure la plus adaptée est la diffusion dynamique de la lumière par la facilité de sa mise en œuvre et également la possibilité d'obtenir une vue globale de l'échantillon à la différence d'autre technique telle que la microscopie électronique par exemple. Cette technique de diffusion de la lumière ou spectroscopie par corrélation de photons permet de déterminer la distribution de taille des nanoparticules en phase aqueuse. Cette technique est basée sur la mesure de la variation en fonction du temps de l'intensité de la lumière diffusée par les particules soumises au mouvement du brownien (Figure 32).

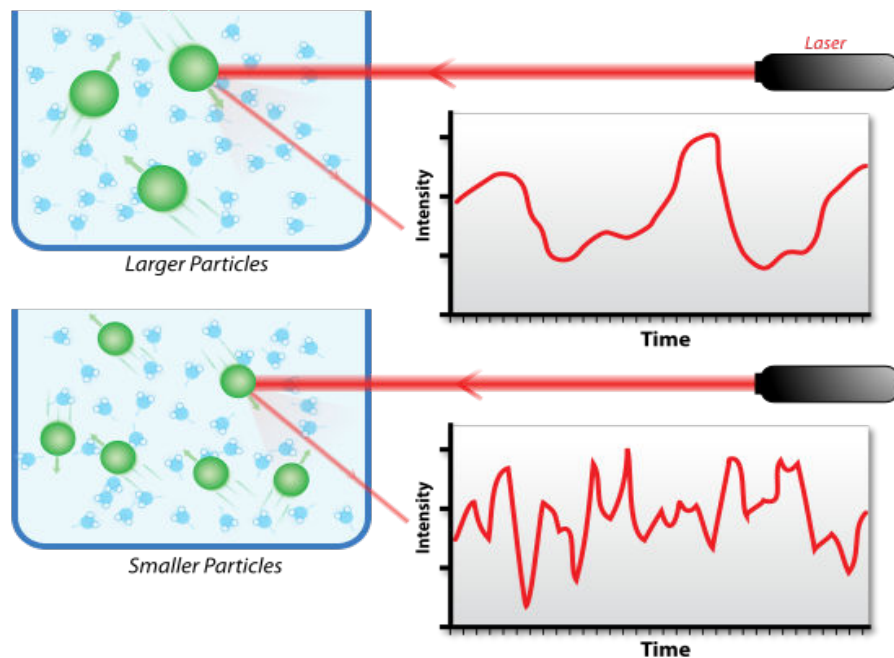


Figure 33: Principe de la DLS. ([www.quantachrome.co.uk](http://www.quantachrome.co.uk), consulté le 28/7/2015)

Ce dernier correspond à des mouvements produits par des collisions aléatoires entre les particules et les molécules du solvant qui les entoure. Il impose ainsi des fluctuations de l'intensité de la lumière diffusée par les particules au cours du temps. Plus une particule

est petite, plus son mouvement est rapide. De ce fait, la fluctuation de l'intensité est plus importante pour les petites particules. La vitesse de déplacement des particules est reliée à leur rayon hydrodynamique par la relation de Stokes-Einstein (Eq.5).

$$D = \frac{k_B T}{6\pi \cdot \eta \cdot R} \quad (\text{Eq.5})$$

Avec  $D$  ( $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ) le coefficient de diffusion,  $k_B$  ( $1,38 \times 10^{-23} \text{ N} \cdot \text{m} \cdot \text{K}^{-1}$ ) la constante de Boltzmann,  $T$  la température (K),  $\eta$  (Pa.s) la viscosité et  $R$  (m) le rayon hydrodynamique des particules.

La diffusion dynamique de la lumière permet de déterminer la distribution de la taille des SLNs allant de quelques nanomètres jusqu'à 3 microns [279].

#### *II.2.8.1.2. Protocole*

La taille moyenne des particules, l'indice de polydispersité (PDI) et le potentiel zêta des particules (charge de surface) ont été mesurés en utilisant un Zetasizer Nano ZS (fourni par *Malvern Instruments, UK*). L'échantillon a été dilué 100 fois préalablement à la mesure pour éviter la saturation du détecteur. L'appareil est équipé d'une source lumineuse laser He-Ne émettant à 532 nm, une cellule de mesure, un photomultiplicateur et un corrélateur. La mesure de la taille des particules a été effectuée dans des micro-cuvettes, tandis que le potentiel zêta (charge de surface) des nanoparticules (système Beurre de Karité/ PL80H/ Tween 80 seulement) a été mesuré dans des cellules à capillaire replié. L'intensité de diffusion a été mesurée à un angle de  $173^\circ$  par rapport à la source lumineuse en utilisant un détecteur à système photodiode à avalanche. Cette configuration permet une réduction considérable du signal en raison des phénomènes de diffusion multiple rencontrés dans les échantillons concentrés en particules et permet de travailler dans des milieux dilués. Les fonctions d'autocorrélation de l'intensité ont été analysées par l'algorithme de CONTIN pour déterminer les coefficients de diffusion moyens des particules, liés aux rayons hydrodynamiques par la relation de Stokes-Einstein. Le potentiel zêta est mesuré par

électrophorèse Laser Doppler. Un champ électrique est appliqué sur l'échantillon où les particules vont se déplacer à une vitesse liée à leur potentiel zêta. Cette vitesse est mesurée au moyen d'un procédé d'interférométrie laser M3-PALS (Phase Analysis Light Scattering). Il permet de calculer la mobilité électrophorétique, le potentiel zêta et sa distribution. Les SLNs étant solides, elles ne risquent pas d'être déformées par le champ électrique, le potentiel zêta déterminé est donc directement utilisable tel quel.

### II.2.8.2. Diffusion Statique de la lumière – Granulométrie Laser

#### II.2.8.2.1. Principe

La diffusion statique de la lumière (SLS, Static Light Scattering), appelée également granulométrie laser ou diffraction laser permet de mesurer la taille des particules de 0,01  $\mu\text{m}$  à plusieurs millimètres en se basant sur la diffraction de la lumière. Lorsqu'un faisceau laser éclaire une particule, on peut observer des franges de diffraction (Figure 33).

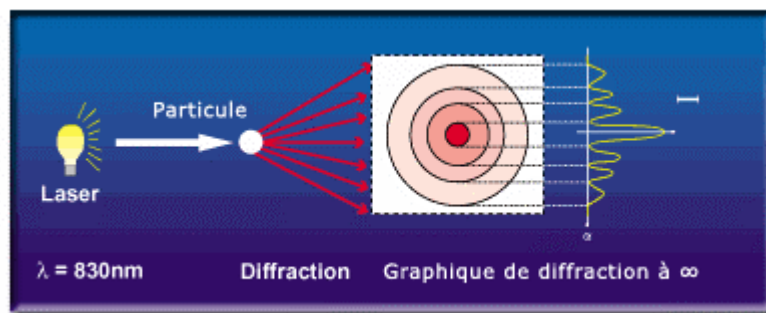


Figure 34: Principe de la diffraction de la lumière. (www.cilas.com, consulté le 3/8/2015).

Selon Fraunhofer, l'intensité du rayonnement diffracté et l'angle de diffraction dépendent de la taille des particules. Plus la particule est petite, plus l'angle de diffraction est grand et inversement. La mesure de l'intensité diffractée en fonction de l'angle de diffraction permet ainsi de déterminer la distribution en taille des particules.

Les deux méthodes de mesure de la taille des particules par diffusion de la lumière (DLS et SLS) sont complémentaires et permettent l'accès à une large gamme de taille comprise entre le nanomètre et le millimètre.



Néanmoins, il faut prendre en compte le fait que ces 2 techniques ne mesurent pas directement la taille des particules, mais une intensité diffusée ou une fluctuation d'intensité en fonction du temps qui est ensuite analysée par des modèles mathématiques pour conduire à une distribution de taille des particules. Par exemple, les algorithmes utilisés correspondent généralement à des particules sphériques, ce qui n'est pas toujours le cas dans la réalité.

#### II.2.8.2.2. Protocole

La taille des microparticules a été mesurée par diffraction laser en utilisant un granulomètre laser (*Mastersizer 3000, Malvern Instruments, UK*) couplé à un disperseur automatique hydro MV. Quelques gouttes de la dispersion à analyser sont ajoutées dans le disperseur rempli d'eau ultrapure. La quantité d'échantillon ajoutée dépend de l'obscurité laser mesurée par l'appareil. La mesure est lancée à partir d'une valeur d'obscurité de 1%. Cette valeur, couplée à un temps d'analyse de 10 secondes, suffit à obtenir des résultats fiables d'après le logiciel de traitement de donnée et permet d'éviter les phénomènes de diffusion multiples. L'échantillon dispersé traverse la zone de mesure du banc optique où le faisceau laser éclaire les particules. Une série de détecteurs mesure avec exactitude l'intensité de la lumière dispersée par les particules dans l'échantillon pour les deux longueurs d'ondes de lumière rouge et bleue sur une large gamme d'angles allant de 0,015 à 144° ( $\lambda_{\text{rouge}} = 632,8 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{bleue}} = 470 \text{ nm}$ ). Les données de diffusion sont analysées par un logiciel qui traite les données pour calculer la distribution granulométrique. Les résultats obtenus sont la moyenne de 10 mesures de 10 secondes par échantillons. Par ailleurs, ce logiciel permet d'accéder au paramètre SPAN relié à la largeur de la distribution granulométrique permettant de comparer la polydispersité de différents échantillons (Eq.6).

$$SPAN = \frac{d_{90} - d_{10}}{d_{50}} \quad (\text{Eq.6})$$

Avec  $d_{90}$  est le 90<sup>e</sup> centile de la distribution,  $d_{10}$  est le 10<sup>e</sup> centile et  $d_{50}$  est la taille médiane de la taille des particules.

### II.2.8.3. Diffraction des Rayons X (DRX)

Toutes les études axées sur les lipides solides doivent prendre en compte la phase cristalline sous laquelle la matière grasse est structurée. Pour cela, la technique de référence est la diffraction des rayons X.

#### II.2.8.3.1. Principe

La diffraction des rayons X est une méthode d'analyse physico-chimique. Elle permet d'identifier la nature et la structure de produits cristallisés. Elle ne fonctionne que sur les échantillons cristallins (minéraux, métaux, ...) ou présentant les caractéristiques de l'état cristallin, c'est-à-dire un arrangement périodique, ordonné et dans des plans réticulaires formés par les atomes, mais pas sur les matières amorphes (liquide, verre, ...).

Une partie d'un rayonnement de longueur d'onde suffisamment petite (de l'ordre de l'Angström pour les rayons X) arrivant à un certain angle  $\theta$  est réfléchi selon le même angle par les plans cristallins de l'échantillon qui jouent le rôle de miroir. En fonction de la longueur d'onde et de la distance entre les plans réticulaires, les ondes réfléchies à cet angle peuvent être en phase (interactions constructives, Figure 34.A) ou déphasée (interactions destructives, Figure 34.B). Dans le premier cas, l'intensité des rayons X diffractés sera importante et un pic de diffraction sera détecté pour l'angle de diffraction  $\theta$  correspondant. Dans le deuxième cas, aucun signal ne sera enregistré. Il apparaît ainsi que pour une distance inter réticulaire donnée, une seule valeur de l'angle  $\theta$  permet d'obtenir des interactions constructives et ainsi conduire à l'apparition d'un pic de diffraction et ce, en suivant la loi de Bragg :

$$2d \sin(\theta) = n \cdot \lambda \quad (\text{Eq.7})$$

Avec  $d$ , la distance de répétition,  $\theta$ , l'angle de diffraction,  $n$ , l'ordre de diffraction (nombre entier) et  $\lambda$ , la longueur d'onde des rayons X.

Un diffractogramme présente ainsi la variation de l'intensité diffracté en fonction de l'angle de diffraction exprimé en degrés. La loi de Bragg permet d'associer à la position de chaque pic en degré une distance de répétition correspondante.

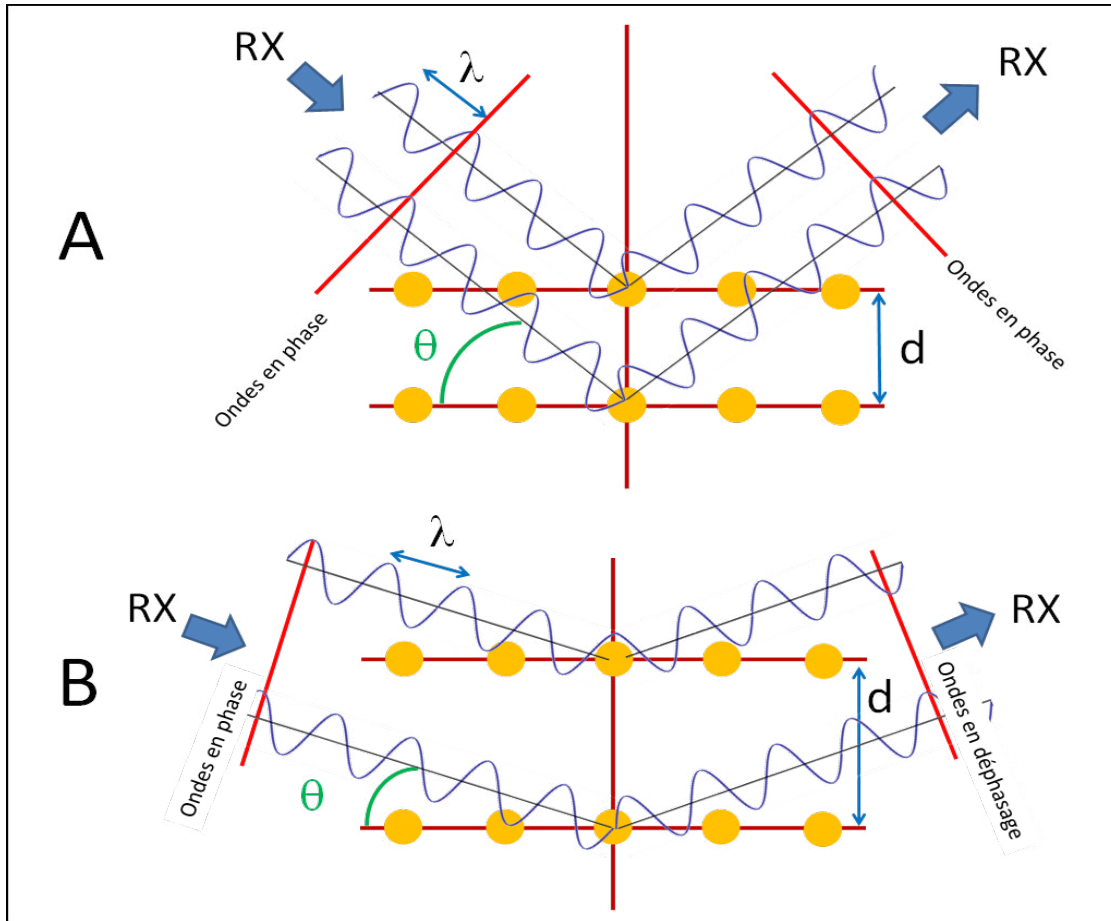


Figure 35: Principe de la DRX. A : interactions constructives conduisant à l'apparition d'un pic de diffraction pour une certaine valeur de  $\theta$  ; B : interactions destructives ne conduisant pas à l'apparition d'un signal de diffraction.

Selon la loi de Bragg, plus l'angle de diffraction est petit, plus la distance de répétition mesurée est grande. Ainsi, la variation de l'angle de diffraction permet de sonder l'organisation de la matière à plusieurs échelles. On parle ainsi de diffusion/diffraction des rayons aux petits angles (SAXS : Small Angles X-ray Scattering ; généralement de  $0,1$  à  $10^\circ$ ) et aux grands angles (WAXS : Wide Angles X-ray Scattering ; supérieur à  $10^\circ$ ) en fonction de la gamme d'angle sondée. La diffraction aux grands angles est communément appelée Diffraction des rayons-X (DRX).

#### *II.2.8.3.2. Protocole*

Les mesures en DRX ont été réalisées dans le laboratoire CRM2 (Cristallographie, Résonance Magnétique et Modélisations) - UMR CNRS 7036 - Institut Jean Barriol – Université de Lorraine en collaboration avec Pierrick Durand.

Un diffractomètre panalytical X'Pert Pro, a été utilisé. Il est basé sur la géométrie Bragg-Brétaño en configuration dite  $\theta$ - $2\theta$ . Il est équipé par un tube en cuivre, un monochromateur Ge (111) à faisceau incident (système diffractant sélectionnant la raie  $K\alpha_1$  avec  $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$ ) et un détecteur rapide X'Celerator.

Les mesures en WAXS ont été collectées en utilisant des fentes de Soller, des fentes de divergence et anti-diffusion programmables. La zone irradiée a été fixée à 10 mm x 10 mm. Le détecteur X'Celerator a été utilisé comme un détecteur de ligne de balayage (1D) avec  $2,122^\circ$  comme longueur active. La collection des données a été réalisée dans la plage d'angles de diffusion  $2$ - $30^\circ$  avec une vitesse de rotation de  $0,0167^\circ / \text{min}$ , pendant 90 min.

Les mesures en SAXS ont été collectées en utilisant des fentes de Soller  $0,02 \text{ rad}$ , une divergence fixée à  $1/16^\circ$  et des fentes anti-diffusion. Le détecteur X'Celerator a été utilisé comme un détecteur de ligne de balayage (1D) avec  $0,518^\circ$  comme longueur active. La collection des données a été réalisée dans la plage d'angles de diffusion  $0,8$ - $12^\circ$  avec une vitesse de rotation de  $0,0167^\circ / \text{min}$  pendant 90 min.

#### *II.2.8.4. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC: Differential Scanning Calorimetry)*

La matière grasse solide est également caractérisée par les températures de fusion et de cristallisation de la structure lipidique cristallisée. Ces paramètres sont déterminés par calorimétrie différentielle à balayage.

##### *II.2.8.4.1. Principe*

La calorimétrie différentielle à balayage ou DSC est une technique thermo-analytique qui permet d'obtenir les températures de transition de phase de lipide et les enthalpies qui y sont associées. Elle mesure les différences des échanges de chaleur entre un échantillon

à analyser et une référence (capsule vide d'aluminium). La calorimétrie différentielle à balayage permet donc de visualiser les transitions exothermiques telles que la cristallisation et les transitions endothermiques comme la fusion.

#### *II.2.8.4.2. Protocole*

L'analyse thermique a été menée en scellant 10 mg d'échantillon de particules séchées (microparticules) ou lyophilisées (SLNs) dans des capsules en aluminium, avec un sertissage mécanique.

La capsule est introduite dans un calorimètre différentiel à balayage équipé d'un capteur en céramique HSS8 de Metter-Toledo. Les études à basses températures ont été faites en utilisant un système de refroidissement à l'azote liquide qui permet d'atteindre 123°K (-150°C) dans le porte d'échantillon.

Deux protocoles différents ont été utilisés pour les deux systèmes (Karité/ Tween 80/ Span 80, Karité/ PL80H/ Tween 80 et assemblage chitosane et SLNs).

Pour le premier système, une seule montée en température de 10°C à 50°C a été effectuée à une vitesse de 5°C/ min, pour pouvoir détecter le point de fusion du beurre de karité et voir l'effet de l'état colloïdal du lipide (nanoparticule) et de l'encapsulation de la curcumine, sur le point de fusion du beurre de Karité à l'état non dispersé et nanodispersé.

Pour le deuxième système, une première montée en température de 5°C à 60°C été effectuée à une vitesse 2°C/ min, pour évaporer l'humidité absorbée par les SLNs lyophilisées en présence du tréhalose et les microparticules de chitosane (CS-MP, CS-SLN et CS-SLN-curcumine). Cette montée est suivie d'une phase de refroidissement de 60°C à 5°C à une vitesse 5°C/ min, pour pouvoir détecter le point de cristallisation des SLNs. La deuxième montée en température de 5°C à 300°C a été réalisée à une vitesse de 10°C/ min, pour pouvoir détecter la dégradation thermique des polysaccharides (chitosane et tréhalose), la transition vitreuse (si elle existe) du chitosane et l'état de la curcumine encapsulée (cristallin ou amorphe).

### *II.2.8.5. Microscopie Electronique à Balayage (MEB)*

#### *II.2.8.5.1. Principe*

Le MEB est un type de microscopie électronique qui produit des images d'un échantillon en l'examinant par un faisceau focalisé d'électrons. Les électrons interagissent avec les atomes de l'échantillon, produisant des signaux divers (ex : électrons secondaires et électrons rétrodiffusés) qui peuvent être détectés et qui contiennent des informations sur la topographie et la composition de la surface de l'échantillon.

#### *II.2.8.5.2. Protocole*

La technique de microscopie électronique à balayage (*Hitachi S-4800, Tokyo, Japon*) a été utilisée pour observer la surface et la morphologie des microparticules de chitosane encapsulant la curcumine. Les microparticules ont été séchées dans un dessiccateur contenant des billes de silice pour capter l'eau. Les particules séchées ont été dispersées dans l'éthanol en utilisant un bain d'ultrasons. Une à deux gouttes des particules dispersées ont été déposées sur un support pour les sécher à l'air libre. Pour rendre conductrices les particules, elles ont été métallisées en recouvrant les particules par une couche de carbone. Les mesures ont été réalisées à 15 kv.

## **Résultats et discussion**

## ***Chapitre III: Résultats et discussion***

### **III.1 Système beurre de karité/curcumine : cristallisation, préparation des SLNs et incorporation de la curcumine.**

Comme présenté dans le chapitre 1, les stabilités chimique et physique des matrices à base de lipides solides en font de bons candidats pour la préparation de vecteurs de principe actifs. Cette approche, à la différence des systèmes à base d'émulsions, nécessite néanmoins de connaître les phénomènes reliés au passage entre l'état liquide sous lequel est réalisé la nanodispersion et l'état solide final. Les différentes phases pouvant être formées par les lipides, décrites dans le chapitre 1, partie 1.3.1.4, augmentent la complexité du phénomène. L'ajout d'une molécule active au sein de la matrice lipidique peut également avoir une influence sur ce passage de l'état liquide à l'état solide final. Il est ainsi nécessaire d'étudier la cristallisation du lipide utilisé pour former les SLNs, seul et en présence du principe actif. L'ajout de la curcumine au système peut en effet avoir des conséquences sur la cristallisation du beurre de karité. Pour cela, une première partie de ce chapitre porte sur la comparaison des cinétiques de cristallisation du beurre de karité sans et avec curcumine à l'état non-dispersé. Une deuxième partie est accordée sur la préparation des SLNs à base de beurre de karité, notamment en utilisant la méthodologie des plans d'expériences afin d'apprécier l'influence de la composition du système sur les propriétés physico-chimiques des nanoparticules. Pour cela, un système simple à base de tensioactifs non-ioniques commerciaux a été formulé. La partie concluant ce chapitre traite de l'ajout de la curcumine dans le beurre de karité sous forme de nanoparticules. L'influence des propriétés physico-chimiques des SLNs (maîtrisée grâce à la deuxième partie) sur la quantité de molécule active restante dans les nanoparticules après l'émulsification et cristallisation des SLNs est notamment abordée.



### III.1.1. Système beurre de karité/curcumine à l'état non dispersé ; solubilité et cristallisation

#### *III.1.1.1. Solubilité de la curcumine dans le beurre de karité*

Avant toute étude portant sur l'influence de l'ajout d'une molécule spécifique sur la cristallisation d'une matrice lipidique, il est nécessaire de déterminer sa solubilité dans le lipide utilisé. Le protocole suivi pour cela est détaillé dans le chapitre 2, partie 3. La solubilité sera également utilisée lors de l'encapsulation de la curcumine au sein des SLNs afin de définir la quantité initiale de curcumine ajoutée dans la formulation. La solubilité à 40°C, température à laquelle le beurre de karité est à l'état liquide, a été déterminée par des mesures d'absorbance mises en relation avec la droite de calibration présentée dans le chapitre 2, partie 2.3. D'après les résultats, la curcumine est soluble dans le beurre de karité à hauteur de **0,33 mg par g** de lipide à 40°C. La solubilité de la curcumine peut être reliée à la masse moléculaire moyenne du lipide. D'après la littérature, les triglycérides à courte chaîne permettent de solubiliser une quantité plus importante de curcumine [280]. Cela s'explique par le fait que la curcumine interagit avec la partie polaire du lipide. Etant donné que les triglycérides à courtes chaînes présentent plus de groupements polaires par unité de masse que les composés à longues chaînes, il semble logique que la curcumine soit moins soluble dans ces derniers. La valeur déterminée dans ce travail est proche de celle obtenue dans l'huile de maïs (acide gras principaux C18:1 et C18:2) égale à 0,30 mg.g<sup>-1</sup> [280].

#### *III.1.1.2. Influence de la curcumine sur la cristallisation du beurre de karité*

L'influence de la présence de la curcumine sur la cristallisation du beurre de karité a été étudiée par diffraction des rayons X aux grands angles (WAXS). Les études portant sur la cristallisation des lipides sont souvent menées en refroidissant l'échantillon préalablement fondu à vitesse contrôlée à l'intérieur même du diffractomètre [281]. L'acquisition des diffractogrammes est ainsi réalisée *in situ* au cours du refroidissement. Par ailleurs, ces expériences sont souvent réalisées en utilisant le rayonnement synchrotron comme source de rayons X dont la puissance permet l'obtention de diffractogrammes avec des temps d'acquisition très courts. Il est ainsi possible de détecter toutes les transitions de

phases en enregistrant des spectres à une fréquence élevée. Le risque d'une acquisition trop longue réside dans le fait que le diffractogramme obtenu peut présenter des informations concernant les phases présentes à la fois en début et en fin d'acquisition si une transition a eu lieu entre temps.

Cette étude a été menée sur un montage de laboratoire moins puissant qu'un appareillage relié à une ligne de lumière synchrotron (voir chapitre 2, partie 8.3). L'acquisition des diffractogrammes n'a pas pu être réalisée *in situ* en contrôlant la vitesse de refroidissement. Le protocole utilisé est présenté sur la Figure 36. Le lipide fondu à 60°C subit une trempe dans l'azote liquide à -196°C pour un refroidissement rapide. L'échantillon est ensuite placé dans le diffractomètre dont la température est maintenue à 20°C. L'acquisition des diffractogrammes débute alors et ce temps est défini comme le temps initial  $t_0$  dans la présentation des résultats. Un diffractogramme est ensuite enregistré toutes les 5 minutes. Plusieurs types de protocoles auraient pu être utilisés et les résultats obtenus dépendent fortement de la manière dont l'échantillon a été refroidi et à quelle température il est analysé. Dans le cas d'une comparaison comme ici, il est très important de respecter un protocole identique pour tous les échantillons.

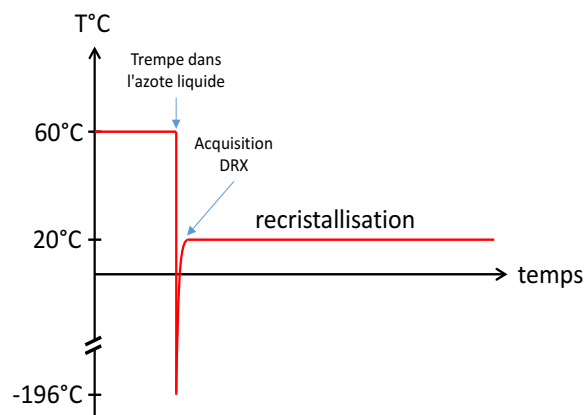


Figure 36: Schéma descriptif du protocole utilisé pour l'étude de la cristallisation du beurre de karité.

La cristallisation du beurre de karité en absence de curcumine a tout d'abord été étudiée. L'évolution du signal de diffraction enregistré aux grands angles en fonction du temps après la trempe de l'échantillon dans l'azote liquide est présentée sur la Figure 37.

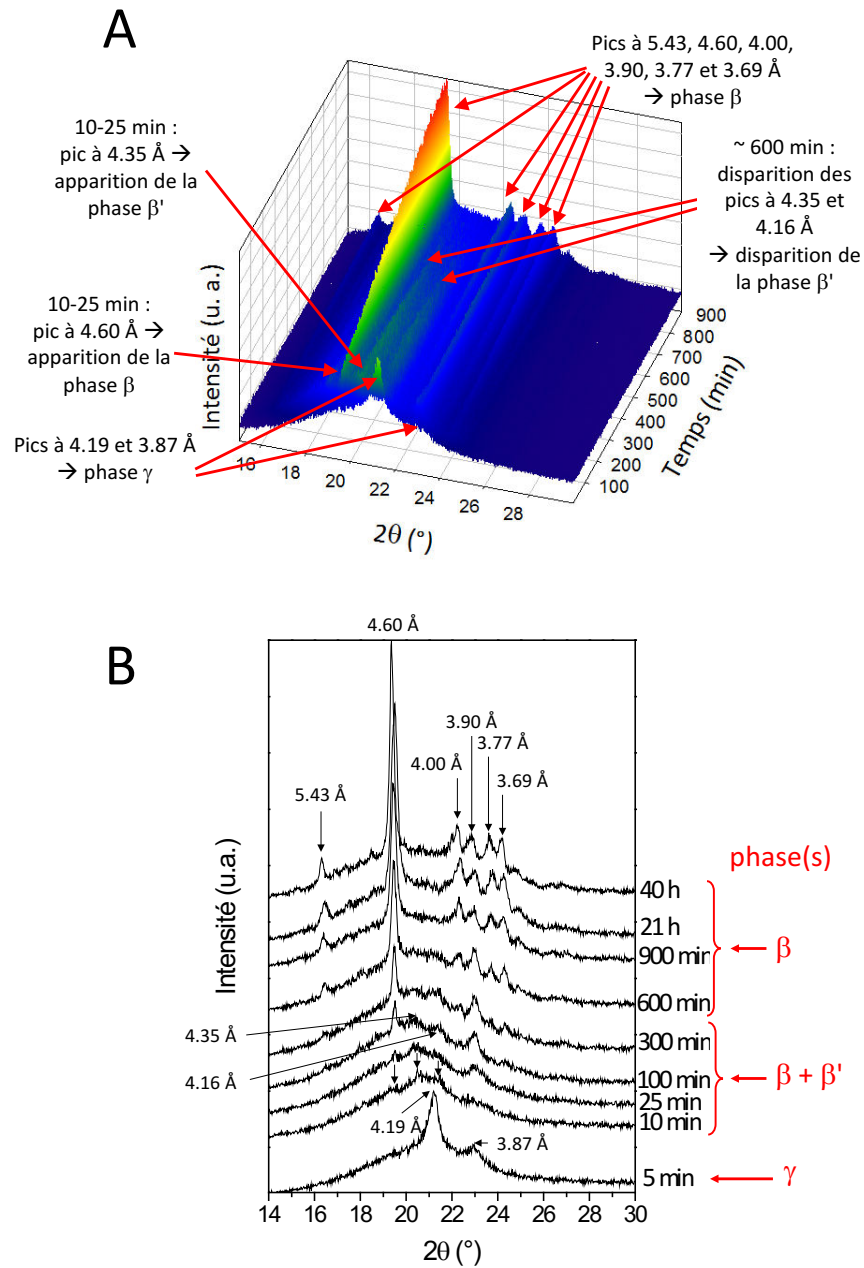


Figure 37: Evolution des diffractogrammes WAXS lors de la recristallisation du beurre de karité. (A) évolution lors des 900 premières minutes et (B) diffractogrammes représentatifs de la cinétique de cristallisation à différents temps.

Le premier spectre enregistré 5 minutes après la sortie de l'échantillon de l'azote liquide met en évidence la présence d'une phase  $\gamma$  avec 2 pics caractéristiques à des valeurs

d'angle de diffraction  $2\theta$  égales à  $21,2^\circ$  et  $23,0^\circ$  correspondant respectivement à des distances de répétitions de 4,19 et 3,97 Å [282] ( $d = \lambda / (2\sin\theta)$ ) avec  $\lambda$  la longueur d'onde des rayons X égale à 1,5406 Å, voir chapitre 2 partie 9.3). Cette phase  $\gamma$  disparaît rapidement et n'est plus détectée sur le diffractogramme enregistré à 10 minutes. A ce temps, le signal de diffraction est très faible et seulement 3 raies de diffraction de faible intensité à  $19,3^\circ$  (4,60 Å),  $20,3^\circ$  (4,35 Å) et  $21,3^\circ$  (4,16 Å) sont détectées (Figure 37.B, flèches sur le diffractogramme à 10 min). L'échantillon est donc majoritairement composé d'une phase amorphe avec un début de cristallisation sous les deux formes  $\beta$  (pic à  $19,3^\circ$ ) et  $\beta'$  (pics à  $20,3$  et  $21,3^\circ$ ) [282]. Ces deux phases coexistent ensuite. L'augmentation de l'intensité des pics de diffraction ainsi que l'apparition de pics supplémentaires à  $22,2^\circ$  (4,00 Å),  $22,8^\circ$  (3,90 Å),  $23,6^\circ$  (3,77 Å) et  $24,1^\circ$  (3,69 Å) caractéristiques de la phase  $\beta$  [282], mettent en évidence un accroissement de la proportion de lipides cristallisés aux dépens de la phase amorphe. La phase  $\beta'$  disparaît ensuite ne laissant apparaître sur le diffractogramme enregistré 600 minutes (10 h) après la trempe à l'azote liquide que les pics correspondant à la phase  $\beta$ . Dès lors, la phase  $\beta$  étant le polymorphe le plus stable, aucune transition de phase n'a lieu. L'augmentation de l'intensité des pics ainsi que l'affinement des raies de diffraction correspondent à l'augmentation de la fraction de lipides cristallisés dans l'échantillon et également à la croissance des cristaux. La position des pics de diffraction ainsi que les distances de répétition correspondantes observées pour le beurre de karité sont résumées dans le Tableau 12.

Tableau 13: Angles de diffraction et distances de répétition correspondantes des différentes phases observées lors de la cristallisation du beurre de karité.

Phases cristallines	Angles de diffraction $2\theta$ (°)	Distances de répétition (Å)
$\gamma$	21,2	4,19
	23,0	3,87
$\beta'$	20,3	4,35
	21,3	4,16
$\beta$	16,3	5,43
	19,3	4,60
	22,2	4,00
	22,8	3,90
	23,6	3,77
	24,1	3,69

Une étude identique a été effectuée en présence de curcumine solubilisée dans le beurre de karité fondu à une concentration égale à sa solubilité. Les diffractogrammes enregistrés au cours de la cristallisation sont présentés sur la Figure 38.

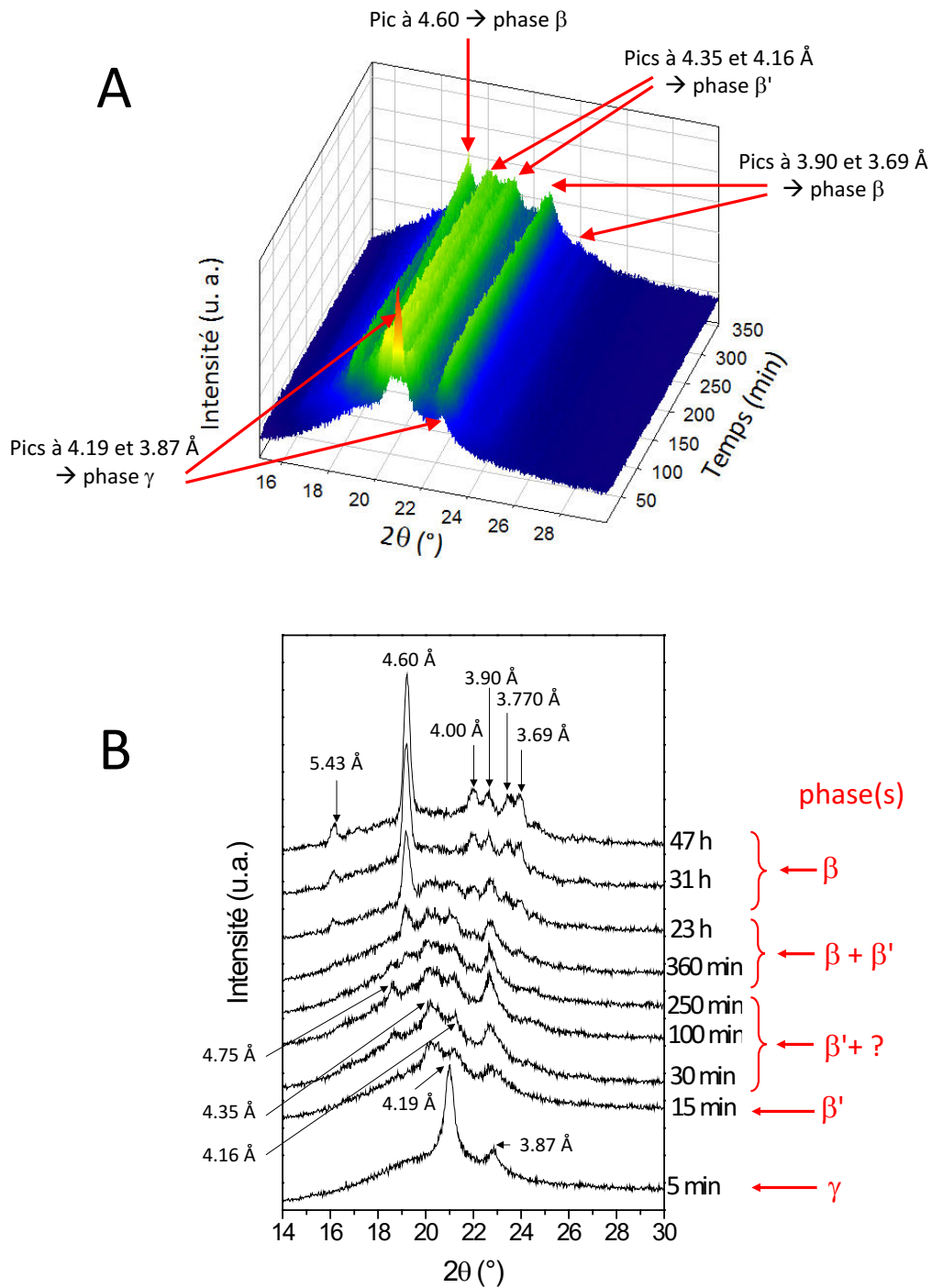


Figure 38: Evolution des diffractogrammes WAXS lors de la recristallisation du beurre de karité en présence de curcumine. (A) évolution lors des 350 premières minutes et (B) diffractogrammes représentatifs de la cinétique de cristallisation à différents temps.

Tout comme dans le cas du beurre de karité seul, le diffractogramme enregistré 5 minutes après la trempe à l'azote met en évidence la présence d'une phase  $\gamma$  en début de cinétique. Au bout de 15 minutes, cette phase  $\gamma$  disparaît au profit d'une phase  $\beta'$ . La faible intensité des pics correspondant prouve qu'une large proportion du lipide est néanmoins sous forme amorphe. Entre 30 et 250 minutes, une raie de diffraction est présente, en plus de celles de la phase  $\beta'$ , à une valeur d'angle  $2\theta$  de  $18,6^\circ$  relative à une distance de répétition de  $4,75 \text{ \AA}$ . La structure conduisant à la présence de ce pic n'a pas été déterminée étant donné qu'aucune étude de la littérature ne mentionne une raie de diffraction à cet angle pour les lipides cristallins. Ce pic n'est néanmoins plus présent à partir de 360 minutes, temps auquel commence à se former la forme  $\beta$  avec l'apparition d'un pic à  $4,60 \text{ \AA}$  en coexistence avec la forme  $\beta'$ . 31 heures après la trempe dans l'azote liquide, le beurre de karité en présence de curcumine est cristallisé uniquement sous la forme  $\beta$ , les pics relatifs à la phase  $\beta'$  ayant disparu. L'augmentation de la taille des cristaux ainsi que de leur nombre au sein de l'échantillon conduit à une augmentation de l'intensité des pics ainsi qu'à la diminution de leur largeur entre 31 et 47 heures.

Ainsi, la curcumine modifie la cinétique de cristallisation du beurre de karité notamment en retardant l'apparition de la phase  $\beta$  qui apparaît après 250 minutes alors que 25 minutes suffisent pour le beurre de karité seul (Figure 39). De même, la présence exclusive de cette phase  $\beta$  après disparition de la phase  $\beta'$  est retardée, passant de 300 minutes à 23 heures.

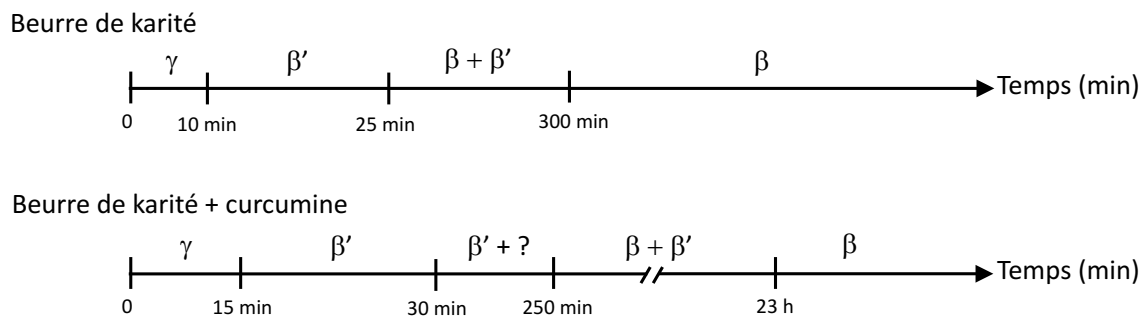


Figure 39: Evolution de la structure cristalline en fonction du temps du beurre de karité seul et en présence de curcumine.

La comparaison des diffractogrammes obtenus en fin d'expérience après 40 et 47 heures passées dans le diffractomètre pour les deux systèmes (Figure 40) démontre le retard dans le phénomène de cristallisation induit par l'ajout de la curcumine. En effet, les pics de diffraction sont moins intenses et plus larges traduisant une proportion de phase cristalline plus faible et des cristaux plus petits dans l'échantillon contenant le polyphénol. La largeur des pics est en effet reliée à la taille des cristaux par la loi de Scherrer [283] :

$$D = K\lambda/B \cos\theta \quad (\text{Eq.8})$$

Avec D : taille du domaine (Å), K : constante de Scherrer dépendante de la géométrie du cristal (0,9 si la forme est inconnue),  $\lambda$ : longueur d'onde des Rayons-X (1,5418 Å), B : largeur à mi-hauteur en °, et  $\theta$ : demi-angle de diffraction relié à la position du pic en °.

Ainsi, plus les cristaux sont grands, plus les pics sont fins. La présence de la curcumine dans la matrice lipidique semble avoir une influence sur la taille des domaines monocristallins du beurre de karité à un temps donné. Il est possible que le polyphénol s'insère dans la matrice lipidique en tant qu'impureté limitant ainsi la croissance des cristaux.

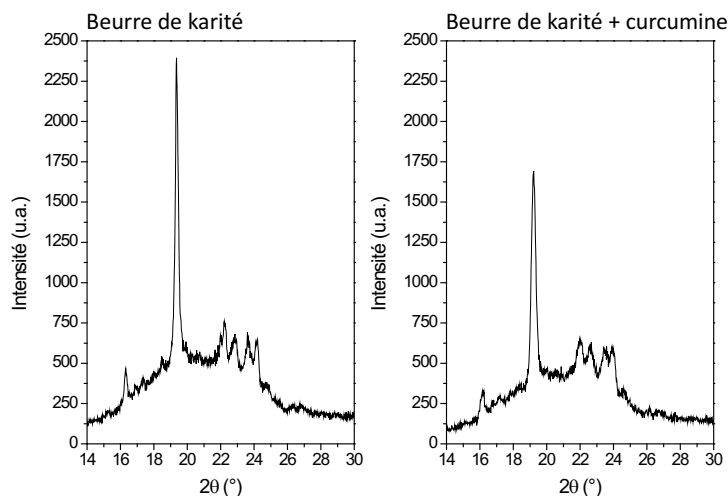


Figure 40: Comparaison des diffractogrammes obtenus pour le beurre de karité seul et pour le beurre de karité en présence de curcumine après respectivement 40 et 47 heures.



Il est également important de constater que les nombreux pics de diffraction de la curcumine à l'état cristallin (Figure 41) ne sont pas détectés sur les diffractogrammes. Ceci confirme le fait que la curcumine est bien solubilisée ou dispersée à l'état monomérique dans la phase lipidique et non sous forme d'agrégat cristallin.

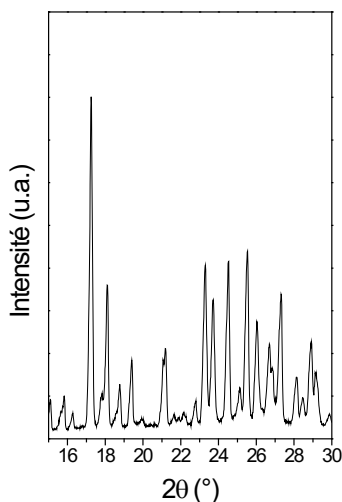


Figure 41: Diffractogramme de la curcumine pure cristallisée.

Malgré le retard observé concernant l'apparition des différentes phases cristallines, l'addition de la curcumine au beurre de karité n'empêche pas sa cristallisation sous la forme  $\beta$ . Par ailleurs, la présence de la curcumine ne modifie pas le nombre ainsi que la position des pics de diffraction. Les propriétés structurales du beurre de karité ne sont ainsi pas affectées par la présence de la curcumine dispersée dans la matrice lipidique.

### III.1.2. Préparation des SLNs à base de beurre de karité : influence de la composition du système ternaire sur les propriétés des nanoparticules.

A la suite des études structurales portant sur la cristallisation du système lipidique, le beurre de karité a été utilisé pour la préparation de SLNs. Le protocole choisit, décrit dans le chapitre 2, partie 2.2, passe par une étape d'émulsification à une température supérieure au point de fusion du lipide. Afin de faciliter cette émulsification et stabiliser le système, l'ajout de tensioactif est nécessaire. Pour cela, nous avons choisi, en relation avec la littérature [284], un mélange de Tween 80 et de Span 80 (composition détaillée dans le

chapitre 2, partie 1 ) en utilisant un ratio massique 90/10. Ce rapport spécifique entre les masses des deux tensioactifs permet en effet d'obtenir les nanoparticules les moins polydisperses et donc les plus stables d'après une étude réalisée précédemment au laboratoire. La nécessité d'utiliser un mélange de ces deux tensioactifs pour obtenir les particules les moins polydisperses peut être expliquée par le concept de balance hydrophile lipophile requise (RHLB pour Required Hydrophilic Lipophilic Balance) d'une huile [285]. Cette théorie relie à chaque huile une valeur de RHLB correspondant à la HLB du tensioactif permettant de formuler les émulsions les plus stables. Ces valeurs sont déterminées empiriquement par l'utilisation de tensioactifs ou de mélanges de tensioactifs d'HLB différentes permettant l'obtention de l'émulsion la plus cinétiquement stable. Un mélange de tensioactifs présente une HLB moyenne dépendant de la HLB de chacun pris séparément et de leur proportion relative. Connaissant la HLB du Tween 80 (HLB = 15) et du Span 80 (HLB = 4,3), un mélange de ces deux tensioactifs dans des proportions massiques 90/10 conduit à un système présentant une HLB moyenne de 13,9 ( $0,9 \cdot 15 + 0,1 \cdot 4,3$ ). Ce mélange étant celui permettant d'obtenir l'émulsion la plus stable, la RHLB du beurre de karité peut ainsi être déterminée comme égale à 13,9. Aucune valeur trouvée dans la littérature ne nous a permis de le confirmer.

L'utilisation de SLNs pour la vectorisation d'une molécule active nécessite une étude préliminaire permettant de contrôler les propriétés physico-chimiques des nanoparticules. La taille des particules peut par exemple avoir un effet important sur l'efficacité d'encapsulation. Comme abordé dans le chapitre 1, plusieurs modèles décrivent la distribution spatiale d'une molécule au sein des SLNs. La distribution peut être homogène dans toute la particule ou suivre des modèles de cœur enrichi ou de couronne enrichie [35, 286]. Dans le cas de ces deux derniers modèles, l'efficacité d'encapsulation varie différemment en fonction de la taille des particules. Une incorporation de la molécule active au sein du cœur des particules conduit à une augmentation de l'efficacité d'encapsulation en fonction de la taille des particules. Dans le cas d'une couronne enrichie, la diminution de la taille des particules, correspondant à une augmentation de la surface de la couronne pour une même quantité de matière (équivalent d'une surface spécifique), conduit théoriquement à une augmentation de l'efficacité d'encapsulation. Le contrôle de

la taille des particules de beurre de karité permettra de tester des SLNs de tailles différentes et de déterminer l'influence du diamètre des particules sur l'efficacité d'encapsulation.

Les méthodes utilisant les plans de mélanges sont des outils intéressants pour étudier les effets de différents paramètres expérimentaux sur les caractéristiques finales d'un système, et ce tout en limitant le nombre d'expériences à effectuer. Grâce à des outils statistiques, il est possible en choisissant judicieusement une série d'essais limités, d'avoir une vision globale de l'influence de la composition d'un système sur ses propriétés. Il est également possible d'aboutir à des modèles permettant de prévoir les caractéristiques du système en fonction des paramètres étudiés. Des plans de mélanges ont déjà été utilisés dans le cas de la préparation de SLNs. L'influence de différents paramètres sur les propriétés de particules préparées par la technique d'émulsification par évaporation de solvant est reportée dans la littérature [287, 288]. Le rapport lipide/solvant, la concentration en lipide ainsi que la température ont été, dans ce cas, considérés comme les paramètres clés dans le contrôle de la taille des particules. Les plans de mélanges sont des plans d'expériences particuliers utilisés pour étudier l'influence de la composition d'un mélange sur ses propriétés. Ils sont largement utilisés dans le domaine de la formulation d'émulsions [289, 290] ou de liposomes [291].

La méthodologie des plans de mélanges a été utilisée afin de mettre en évidence l'influence de la composition du système ternaire (beurre de karité/tensioactifs/eau) sur les propriétés (taille et polydispersité) des SLNs. Le détail du plan utilisé ainsi que le protocole de préparation des SLNs stabilisées par le mélange de Tween 80 et de Span 80 sont présentés dans le chapitre 2, partie 2.5.

L'étude de la composition du système ternaire n'a pas été réalisée sur l'ensemble du domaine de composition. Il n'est en effet pas nécessaire de tester des compositions à fortes teneurs en beurre de karité ou en tensioactifs. Le domaine de composition testé a donc été limité et est défini par : 5-40 % en poids de beurre de karité ; 48-92 % en poids d'eau et entre 1,5 et 19 % en poids de tensioactifs (Figure 42). Des études préalables ont en effet démontré la possibilité d'obtenir des particules dans ce domaine présentant des tailles

différentes. Les réponses étudiées sont la taille des SLNs (% en intensité) ainsi que l'indice de polydispersité (PDI), déterminés par diffusion dynamique de la lumière.

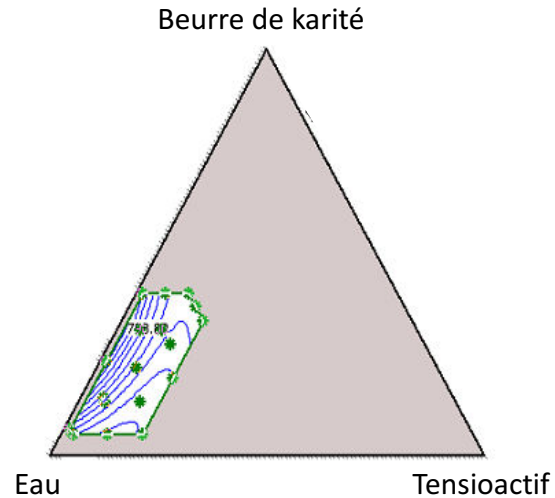


Figure 42: Domaine de composition du plan de mélange sur le diagramme ternaire beurre de karité/eau/tensioactif.

Les 23 compositions testées ainsi que le diamètre et le PDI des SLNs correspondantes sont présentés dans le Tableau 13.

Tableau 14: Composition des 23 expériences et réponses associées (diamètre et PDI).

N° exp.	Fraction en beurre de karité	Fraction en eau	Fraction en tensioactif	Diamètre (nm)	Indice de polydispersité (PDI)
1	0,05	0,76	0,190	84	0,21
2	0,40	0,58	0,015	408	0,48
3	0,05	0,92	0,030	150	0,23
4	0,06	0,92	0,015	305	0,31
5	0,40	0,48	0,120	304	0,26
6	0,33	0,48	0,190	208	0,15
7	0,05	0,84	0,110	72	0,22
8	0,19	0,62	0,190	265	0,26

N°.exp.	Fraction en Beurre de Karité	Fraction en eau	Fraction en tensioactifs	Diamètre (nm)	Indice de polydispersité (PdI)
9	0,23	0,75	0,015	301	0,26
10	0,40	0,53	0,067	1094	0,80
11	0,05	0,92	0,022	1624	0,60
12	0,36	0,48	0,150	201	0,16
13	0,21	0,69	0,093	871	0,50
14	0,13	0,72	0,140	470	0,42
15	0,30	0,63	0,054	316	0,40
16	0,13	0,8	0,061	214	0,20
17	0,14	0,8	0,050	193	0,18
18	0,30	0,58	0,100	170	0,18
19	0,27	0,58	0,140	419	0,19
20	0,10	0,87	0,020	189	0,17
21	0,20	0,76	0,017	194	0,27
22	0,30	0,68	0,038	203	0,26
23	0,40	0,57	0,028	204	0,35

Les tailles des SLNs obtenues varient de 70 nm à plus de 1  $\mu\text{m}$  sur l'ensemble des 23 expériences. Cependant, une part des formulations conduit à plusieurs dispersions polydisperses avec des indices de polydispersité supérieurs à 0,2. Les distributions correspondant aux expériences 7 et 14 sont présentées à titre d'exemple en Figure 43.

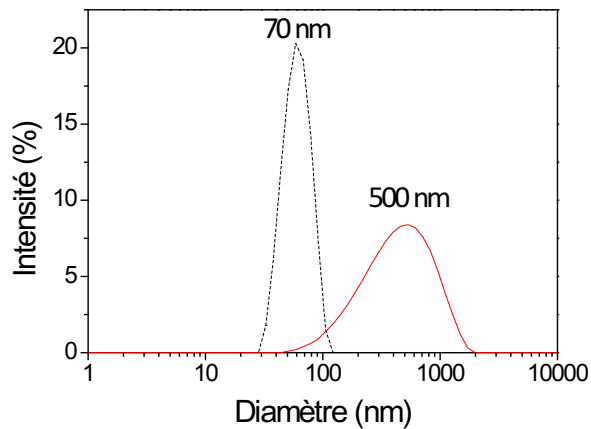


Figure 43: Distributions de tailles en intensité des particules obtenues à partir des expériences 7 (pointillés) et 14 (ligne pleine).

La gamme de tailles de particules ainsi obtenue couvre une gamme relativement large. Les diagrammes de surfaces de réponses obtenues à partir de ces 23 expériences sont présentés en Figure 44.

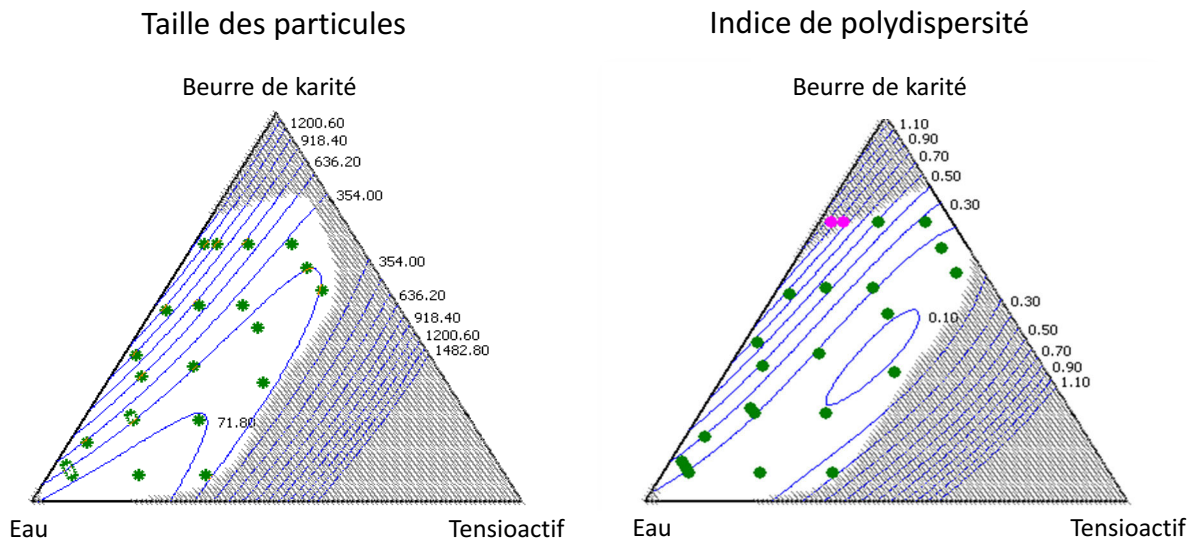


Figure 44: Diagrammes de surfaces de réponse issus du plan de mélange pour la taille des particules et l'indice de polydispersité. La zone blanche correspond au domaine expérimental décrit en Figure 42. Les points violets correspondent aux manipes annulées pour bien affiner le modèle.

D'un point de vue qualitatif, l'évolution de la taille des particules en fonction de la composition du mélange ternaire est en accord avec les résultats attendus. L'augmentation de la fraction en beurre de karité ou la diminution de la quantité de tensioactif conduit à l'obtention de particules plus grandes et *vice versa*. Les plus petites particules sont ainsi obtenues pour de faibles concentrations en beurre de karité (fortes concentrations en eau). La taille des SLNs est ainsi contrôlée par la quantité de tensioactifs pouvant stabiliser l'interface eau/beurre de karité. Plus la quantité de tensioactif est grande, plus l'interface potentiellement stabilisée est grande, et ce pour une quantité de beurre de karité constante. De même, pour une concentration en tensioactifs fixée, l'augmentation de la fraction en beurre de karité conduit à un agrandissement des particules. Du point de vue de la polydispersité des dispersions, les PDI les plus faibles sont obtenus au centre du domaine expérimental.

La méthodologie des plans de mélanges permet de modéliser l'influence de la composition de chaque constituant sur les réponses étudiées. Il est ainsi ensuite possible de prédire les propriétés des particules en fonction des fractions des 3 constituants. Le modèle dépend des coefficients relatifs à la proportion de chaque composé [ $x_{BK}$  (proportion en beurre de Karité),  $x_E$  (proportion en eau) et  $x_{TA}$  (proportion en tensioactif)] et également des interactions entre les proportions ( $x_{BK.xE}$  ;  $x_{BK.xTA}$  ;  $x_{BK.xTA.xE}$  ; etc.). Le plan de mélange a permis de déterminer les équations suivantes modélisant la taille des particules ainsi que le PDI en fonction des fractions de chaque constituant du mélange. Les coefficients de régression pour chaque modèle sont présentés dans le Tableau 15.

$$\begin{aligned} \text{Taille (nm)} = & -4090.x_{BK} - 46.x_E + 7263.x_{TA} + 9824.x_{BK.xE} + 22834.x_{BK.xTA} - 8078.x_E.x_{TA} \\ & - 65365.x_{BK.xE.xTA} \quad R^2 = 0,86 \quad (\text{Eq.9}) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{PDI} = & 2.65.x_{BK} + 0.35.x_E + 10.85.x_{TA} - 2.22.x_{BK.xE} - 22.69.x_{BK.xTA} - 13.41.x_E.x_{TA} + \\ & 1,49.x_{BK.xE.xTA} \quad R^2 = 0,90 \quad (\text{Eq.10}) \end{aligned}$$

Ce modèle permet ainsi de préparer des SLNs de différentes tailles en modifiant simplement la composition du mélange. Il est important d'ajouter ici que ces modèles ne sont valables uniquement dans le domaine de composition testé pour des particules obtenues par le même protocole.

Tableau 15: Coefficients du modèle généré par le logiciel NEMROD.

Coefficients du modèle	Taille	PdI
$\beta_{BK}$	-4090	2,65
$\beta_E$	-46	0,35
$\beta_{TA}$	7263	10,85
$\beta_{BK.E}$	9824	-2,22
$\beta_{BK.TA}$	22834	-22,69
$\beta_{TA.E}$	-8078	-13,41
$\beta_{BK.TA.E}$	-65365	1,49
$R^2$	0,86	0,90

Des expériences complémentaires ont été réalisées afin de tester la validité du modèle. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 16. Ces essais supplémentaires ont été restreints à des compositions conduisant à des valeurs d'indice de polydispersité inférieures ou proches de 0,2 afin de former des dispersions présentant une polydispersité limitée. Les tailles ont été variées de 50 à 200 nm. Afin de valider le modèle, différentes compositions conduisant d'après les équations à des tailles identiques (situées sur les courbes d'isoreponses), ont été testées.



Tableau 16: Composition, tailles et PDI prédits et mesurés des expériences complémentaires.

N°.exp	Composition des SLNs			Taille prédite (nm)	Taille mesurée (nm)	Erreur sur la taille (%)	PDI prédit	PDI mesuré	Erreur sur le PDI (%)
	Beurre de karité (%)	Tensioactifs (%)	Eau (%)						
24	4,2	7,6	88,2	50	44 ± 2	13,6	0,18	0,20 ± 0,01	16,7
25	4,7	1,0	94,3	180	180 ± 6	0,0	0,22	0,15 ± 0,02	31,8
26	4,7	4,8	90,5	100	91 ± 2	9,9	0,19	0,20 ± 0,01	5,3
27	7,6	6,4	86,0	100	113 ± 3	11,5	0,18	0,22 ± 0,01	22,2
28	7,6	9,3	83,1	100	86 ± 1	16,3	0,18	0,22 ± 0,02	22,2
29	7,6	4,3	88,1	200	136 ± 4	47,1	0,22	0,18 ± 0,01	18,2
30	13,7	24,1	62,2	200	230 ± 5	13	0,18	0,19 ± 0,01	5,6

Les tailles des SLNs mesurées par diffusion dynamique de la lumière sont proches des estimations issues du modèle, confirmant ainsi sa validité. Une erreur inférieure à 20 % entre taille réelle et prédite a été relevée à part pour une formulation. Les écarts apparaissent plus importants pour le PDI mais les valeurs restent proches de 0,2.

### III.1.3. Incorporation de la curcumine dans la formulation : influence de la taille des SLNs sur l'efficacité d'encapsulation (EE).

Des formulations identiques à celles correspondantes aux expériences complémentaires au plan de mélanges ont été réalisées en ajoutant au beurre de karité fondu une quantité de curcumine à hauteur de sa solubilité déterminée précédemment (0,33 mg

de curcumine par g de beurre de karité). La quantité de curcumine ne dépend ainsi que de la quantité de karité utilisée pour préparer les SLNs. Il est ainsi possible de comparer les différentes formulations même si les fractions de beurre de karité sont différentes. Les propriétés de taille des particules obtenues ainsi que l'efficacité d'encapsulation [(quantité de curcumine incorporée dans les SLNs/quantité correspondant à la solubilité) \*100 ; voir chapitre 2, partie 2.4) sont présentées dans le Tableau 17.

Tableau 17: Composition, quantité de curcumine ajoutée, tailles et PDI des SLNs et efficacité d'encapsulation.

N°.exp	Composition des SLNs			Masse de curcumine ajoutée (mg)	Taille (nm)	PDI	Efficacité d'encapsulation (%)
	Beurre de karité (%)	Tensioactifs (%)	Eau (%)				
24 bis	4,2	7,6	88,2	0,5	46 ± 1	0,20 ± 0,01	89,0 ± 5,0
25 bis	4,7	1,0	94,3	0,6	170 ± 4	0,14 ± 0,03	30,6 ± 4,3
26 bis	4,7	4,8	90,5	0,6	104 ± 3	0,20 ± 0,01	72,8 ± 6,8
27 bis	7,6	6,4	86,0	1,0	116 ± 3	0,21 ± 0,02	61,0 ± 5,1
28 bis	7,6	9,3	83,1	1,0	91 ± 2	0,23 ± 0,01	68,0 ± 1,4
29 bis	7,6	4,3	88,1	1,0	141 ± 2	0,19 ± 0,01	56,2 ± 0,3
30 bis	13,7	24,1	62,2	1,8	223 ± 5	0,18 ± 0,02	27 ± 4

L'ajout de curcumine à la formulation ne modifie pas les propriétés de taille (taille et PDI) des SLNs qui restent proches des valeurs relevées en absence du polyphénol. Par ailleurs, l'efficacité d'encapsulation varie de 89 à 27 % dans le domaine de taille testée de 46 à 223 nm. Il apparaît ainsi que l'efficacité d'encapsulation soit inversement

proportionnelle au diamètre des SLNs. Cette relation est de plus linéaire dans le domaine de taille testée (Figure 45.A). L'efficacité d'encapsulation peut ainsi être reliée à la taille selon l'équation suivante :

$$EE (\%) = -0,374 * \text{diamètre des SLNs} + 106 \quad R^2=0,93 \quad (\text{Eq.11})$$

Cette relation ne sert ici qu'à confirmer la tendance observée et n'est valable que dans le domaine des tailles testées. Il est néanmoins possible grâce à cette équation ainsi qu'à l'équation 9 (taille en fonction de la composition du système) issue du plan de mélanges, de relier directement l'efficacité d'encapsulation à la composition de la formulation.

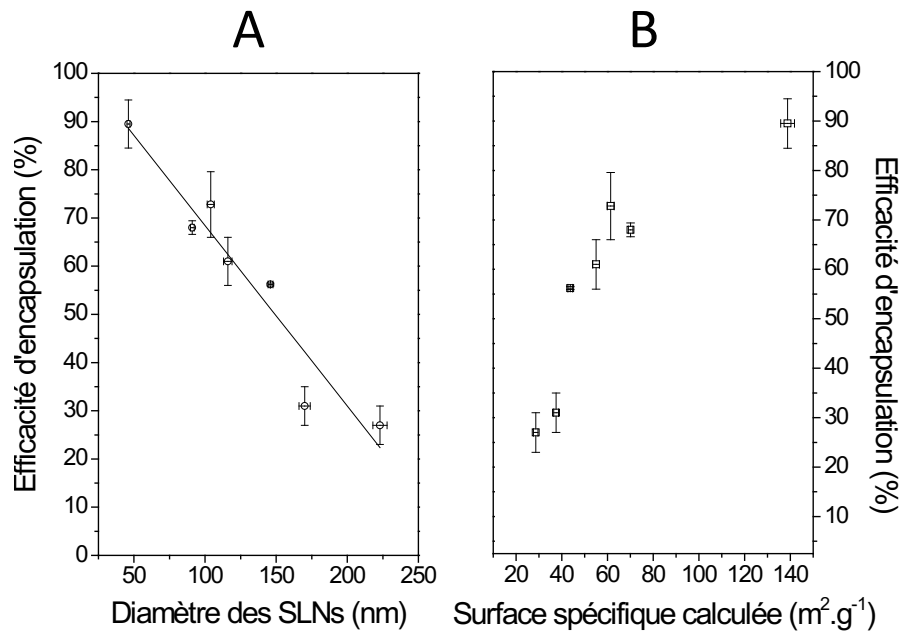


Figure 45: Représentation de l'efficacité d'encapsulation en fonction (A) de la taille des SLNs et (B) de la surface spécifique calculée.

Parmi ces formulations, les comparaisons entre les expériences 25 bis et 26 bis d'une part, et 27 bis, 28 bis et 29 bis d'autre part sont intéressantes. Les proportions en beurre de karité respectives sont en effet identiques. Les quantités de curcumine ajoutées sont donc les mêmes et seules les tailles des particules sont différentes (due aux différences

en terme de quantité d'eau et de tensioactifs). Il est ainsi possible de constater, étant donné les efficacités d'encapsulation différentes, que la quantité de curcumine restante dans les SLNs après émulsification et cristallisation, ne dépend que de la taille des particules. Ainsi, les expériences 25 bis et 26 bis utilisant 4,7 % en poids de karité (0,6 mg de curcumine ajoutée) et conduisant à des tailles de 170 et 104 nm présentent des efficacités d'encapsulation respectivement de 31 et 73%.

D'après les résultats obtenus, il semble que le système étudié se comporte selon le modèle de SLNs à couronne enrichie en molécule encapsulée (voir chapitre 1, partie 1.6). Une diminution de la taille correspond en effet à une augmentation de la surface de la couronne des SLNs. Une analogie peut être effectuée avec la surface spécifique des particules. En admettant que les SLNs soient des particules sphériques, il est possible de facilement calculer la surface spécifique du système :

$S_{spe}$  = surface d'une particule \* nombre de particules dans 1 g

$$S_{spe} (m^2 \cdot g^{-1}) = 4\pi \left(\frac{d}{2}\right)^2 * \frac{1}{\rho * V_{part}} = 4\pi \left(\frac{d}{2}\right)^2 * \frac{1}{\rho * \frac{4}{3}\pi \left(\frac{d}{2}\right)^3} = \frac{6}{\rho * d} \quad (\text{Eq. 12})$$

Avec  $\rho$  = masse volumique du lipide en  $g \cdot m^{-3}$  (karité  $940 g \cdot m^{-3}$ ) et  $d$  = diamètre des particules en m.

L'efficacité d'encapsulation augmente ainsi avec la surface spécifique des particules comme présenté sur la Figure 45.B.

Des interactions entre les groupements polaires de la curcumine et les parties hydrophiles des tensioactifs peuvent favoriser la présence du polyphénol dans une couronne à la périphérie des SLNs et peut ainsi expliquer les évolutions constatées. Ce type d'interaction a été mis en évidence dans une étude portant sur l'influence de la curcumine sur les propriétés de membranes lipidiques [292]. Des interactions entre les groupements hydroxyles de la curcumine et les parties polaires des phospholipides ont été constatées. La curcumine ne serait ainsi pas incorporée dans la matrice lipidique mais placée à la périphérie en interaction avec les molécules tensioactives. Afin de confirmer cette hypothèse, des expériences de caractérisation du beurre de karité sans et avec curcumine

ont été réalisées afin de déterminer si la présence de curcumine modifie les propriétés thermiques et structurales de la matière grasse dans les SLNs. Des études comparatives entre des systèmes sans et avec curcumine ont été réalisées par DSC et DRX.

### III.1.4. Influence de la curcumine sur le profil thermique du beurre de karité à l'état non dispersé et sous forme de SLNs.

Les thermogrammes du beurre de karité à l'état non dispersé et sous forme de SLNs avec et sans curcumine sont présentés dans la Figure 46.

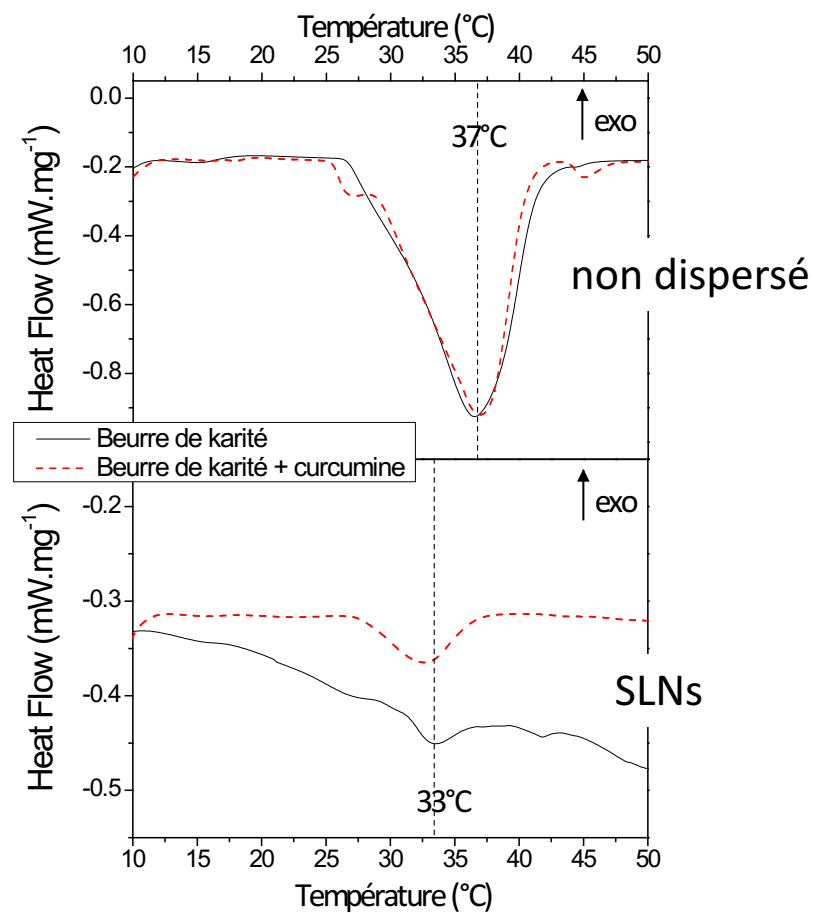


Figure 46: Thermogrammes du beurre de karité à l'état non dispersé (en haut) et sous forme de SLNs (en bas) sans (ligne continue noire) et avec curcumine (ligne pointillée rouge).

A l'état non dispersé, les thermogrammes des deux échantillons présentent un pic de fusion avec un maximum à 37°C. Sous forme de SLNs, ce pic de fusion est déplacé vers des températures plus faibles avec un maximum à 33°C. Cette diminution de la température de fusion du lipide à l'état colloïdal a déjà été mise en évidence dans la littérature [293, 294].

Le résultat principal issu de ces profils thermiques est néanmoins le fait que l'incorporation de la curcumine ne modifie pas les propriétés de fusion du beurre de karité, les thermogrammes obtenus sans et avec curcumine présentant des profils proches.

### III.1.5. Influence de la curcumine sur la structure cristalline du beurre de karité à l'état non dispersé et sous forme de SLNs.

L'influence de l'incorporation du polyphénol dans la matrice lipidique a été étudiée par diffraction des rayons X aux petits angles (SAXS ; détermination de l'empilement longitudinal ou organisation des bicouches) et aux grands angles (WAXS ; empilement latéral ou phase cristalline) dans un premier temps à l'état non-dispersé (Figure 47).

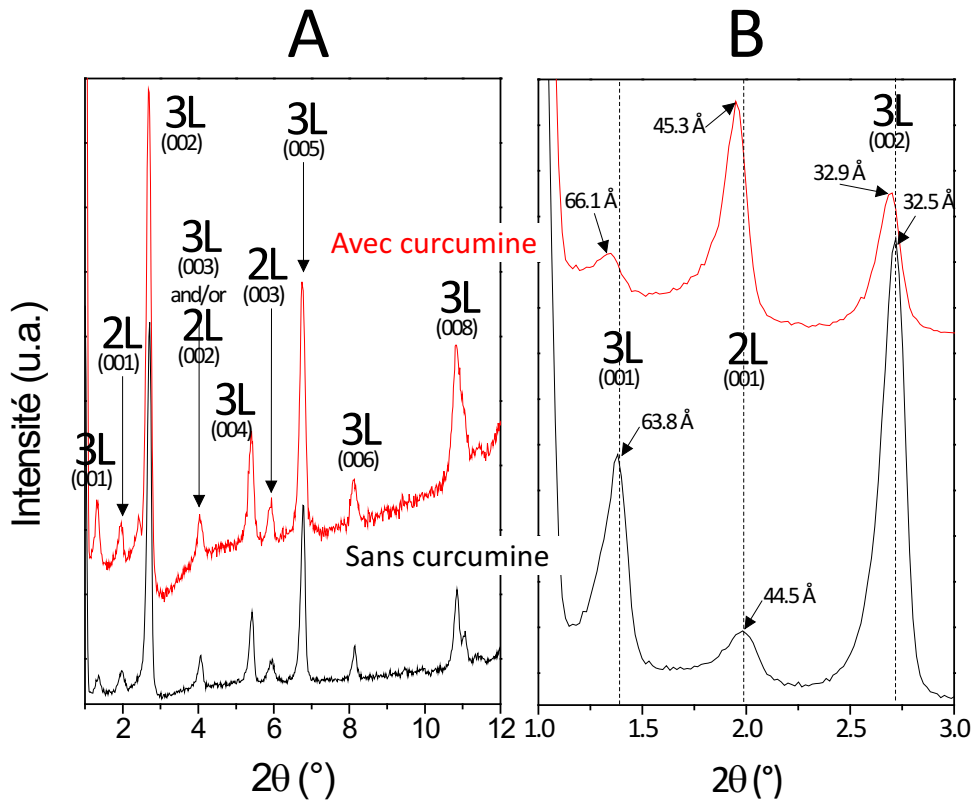


Figure 47: Diffractogrammes enregistrés aux petits angles du beurre de karité sans (ligne noire) et avec curcumine (ligne rouge) à l'état non dispersé.

La gamme d'angle de diffraction  $2\theta$  du spectre présenté en Figure 47.A ( $1^\circ < 2\theta < 12^\circ$ ) permet de caractériser l'empilement longitudinal du beurre de karité comme un mélange de structure 2L et 3L (ligne noire sur la Figure 47.A). Le 1<sup>er</sup> pic aux bas angles relatif à une distance de répétition de 63,8 Å correspond au premier ordre de la structure 3L (indexé 3L<sub>001</sub>). Les pics suivants à respectivement 32, 21, 16, 12,8, 10,7 et 8 Å correspondent aux réflexions d'ordre 2 (3L<sub>002</sub>) ( $64/2 = 32$ ), 3 (3L<sub>003</sub>) ( $64/3 = 21,3$ ), 4 (3L<sub>004</sub>) ( $64/4 = 16$ ), 5 (3L<sub>005</sub>) ( $64/5 = 12,8$ ), 6 (3L<sub>006</sub>) ( $64/6 = 10,7$ ) et 8 (3L<sub>008</sub>) ( $64/8 = 8$ ). Le pic correspondant à une distance de répétition de 45 Å est relatif à l'arrangement de type 2L (indexé 2L<sub>001</sub>), pic suivi des réflexions d'ordre 2 à 21 Å (2L<sub>002</sub> ;  $45/2 = 22,5$  ; pic confondu avec la réflexion 3L<sub>003</sub>) et d'ordre 3 à 15 Å (2L<sub>003</sub> ;  $45/3 = 15$ ). La présence de 2 types d'arrangements coexistant a déjà été mis en évidence pour la matière grasse du lait [295].

Le beurre de karité, avec seulement 2 acides gras majoritaire (stéarique et oléique), contrairement à la variété en acides gras de la matière grasse laitière, présente donc deux types d'empilement longitudinaux, ce qui peut être dû à la présence d'acides gras saturé (formant majoritairement des structures 2L) et insaturé (structure 3L). La configuration 3L semble majoritaire à la vue de l'intensité des pics et du nombre de réflexions supérieures. La présence de la curcumine ne modifie pas l'enchaînement des pics et donc ne modifie pas la structure des bicouches lipidiques. Néanmoins, bien que le mélange de structure 2L et 3L soit conservé, les diffractogrammes complémentaires enregistrés entre des angles de 1 et 3° (Figure 47.B) mettent en évidence l'influence de la curcumine sur la position et les intensités des pics. Un déplacement vers de plus petits angles des pics d'ordre 1 des structures 3L et 2L apparaît. Ainsi, les pics indexés 3L<sub>001</sub> et 2L<sub>001</sub> passent respectivement d'une distance de répétition de 63,8 Å et 44,5 Å en absence de curcumine à 66,1 Å et 45,3 Å lorsque la curcumine est présente dans la matrice lipidique. Ce déplacement traduit ainsi une augmentation de l'espace entre les bicouches lipidiques. Cette observation peut être reliée à l'incorporation du polyphénol au sein de la matrice lipidique, augmentant ainsi la distance de répétition de la structure. L'augmentation de 2,3 Å de la structure 3L ne correspond pas à la taille de la curcumine (approximativement de 16 sur 4-5 Å) [292] mais il est important de noter que les distances de répétition déterminées par DRX correspondent à des moyennes sur toute la matrice lipidique. La quantité de curcumine étant limitée, il semble normal que l'augmentation de cette distance ne corresponde pas exactement à la taille de la molécule. De même, la position de la curcumine au sein de l'empilement des bicouches ne peut être clairement définie. La présence du polyphénol semble également modifier les intensités relatives entre les pics (notamment entre les réflexions 3L<sub>001</sub> et 2L<sub>001</sub>) détectés sur le diffractogramme de la Figure 47.B. Cela peut être relié à une différence de contraste (modification des densités électroniques des milieux diffractant) induite par la présence de la curcumine.

La structure cristalline (empilement latéral des chaînes alkyles) a également été étudiée aux grands angles ( $15^\circ < 2\theta < 30^\circ$ ) (Figure 48). Neufs pics de diffractions sont détectés (Tableau 16) dans cette gamme d'angle dont huit correspondent à une phase  $\beta$ . Le



pic détecté à  $24,61^\circ$  n'a pas été identifié et ne correspond au signal connu d'aucun polymorphe.

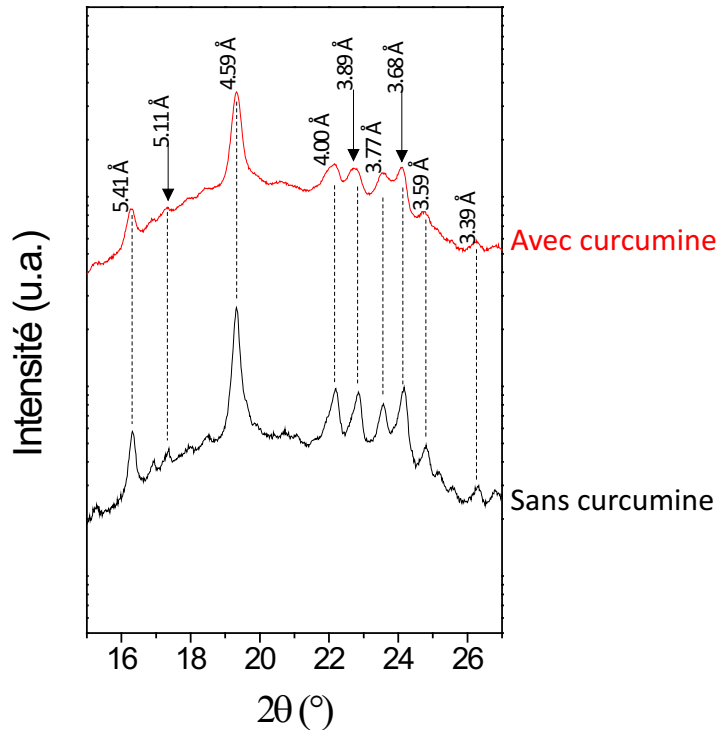


Figure 48: Diffractogrammes enregistés aux grands angles du beurre de karité sans (ligne noire) et avec curcumine (ligne rouge) à l'état non dispersé.

Le beurre de karité ayant eu plus de temps pour cristalliser dans cette expérience que lors de l'étude de sa cristallisation présentée au début de ce chapitre (partie 1), le nombre de pic détectés est plus élevé et la résolution de la phase  $\beta$  est supérieure due à une meilleure cristallisation du lipide. Ce nombre de pic élevé permet de constater que la structure du beurre de karité est analogue à celle du beurre de cacao sous sa forme V (Tableau 18) [282]. Tout comme cela a été observé lors de la cinétique de cristallisation, la présence de la curcumine au sein de la matrice lipidique induit une moins bonne cristallisation du beurre de karité mise en évidence par des pics moins intenses et plus larges.

Tableau 18: Raies de diffractions aux grands angles relevées pour le beurre de karité (Figure 22.B) et distances de répétition correspondantes comparées à celles relevées pour le beurre de cacao (polymorphe  $\beta$  - forme V) [282].

Angle de diffraction $2\theta$ (°)	Beurre de karité Courtes distance (Å)	Beurre de cacao Courtes distances (Å)	Intensité
16,33	5,41	5,40	m
17,29	5,11	5,15	w
19,25	4,59	4,58	vs
-	-	4,23	vvw
22,10	4,00	3,98	s
22,71	3,89	3,87	w
23,43	3,77	3,75	s
24,00	3,68	3,67	s
24,61	3,59	-	-
26,28	3,39	3,39	vw

vvw : very very weak (très très faible); vw: very weak (très faible); w: weak (faible); m: medium (moyen); s: strong (fort); vs: very strong (très fort).

Des expériences de diffraction des rayons X ont également été réalisées sur les SLNs. La comparaison des diffractogrammes aux petits et grands angles du beurre de karité seul non dispersé sans curcumine et sous forme de SLNs sans et avec curcumine est présentée sur la Figure 49. Aux petits angles (Figure 49.A), seules les réflexions correspondantes à l'empilement longitudinal de type 3L sont détectées à l'état nano-dispersé. L'intensité des pics est cependant moins importante qu'à l'état non dispersé. Ceci peut être dû à la quantité plus faible de lipide dans l'échantillon ou à une moins bonne qualité des cristaux [296]. Aucun pic correspondant à une structure 2L n'est présent. Aucune différence en terme de position des pics ou en terme d'intensité n'apparaît entre les diffractogrammes des SLNs sans et avec curcumine.

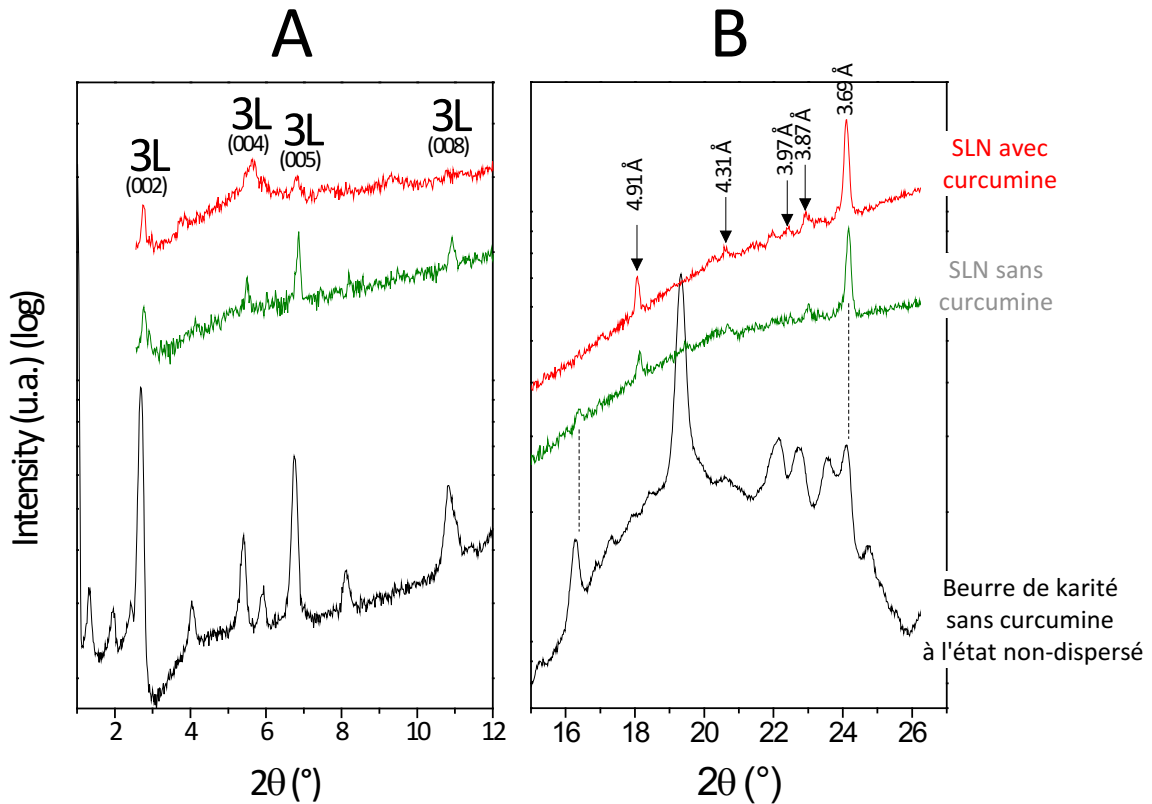


Figure 49: Diffractogrammes enregistrés aux petits (A) et grands (B) angles du beurre de karité non dispersé sans curcumine (ligne noire) et à l'état SLNs sans (ligne verte) et avec curcumine (ligne rouge).

Aux grands angles (Figure 49.B), la signature de la structure cristalline est très différente de celle obtenue à l'état non dispersé. Le pic le plus intense de la phase  $\beta$  à 4,59 Å n'est pas présent sur les diffractogrammes et seulement les trois pics à 3,97, 3,87 et 3,69 Å observés précédemment sont détectés. Il semble donc qu'une phase  $\beta$  soit présente mais les intensités relatives des pics ne correspondent pas aux spectres de l'état non dispersé ni aux données de la littérature. Ces intensités relatives particulières peuvent être dues à l'influence du facteur de forme des nanoparticules. Dans le cas d'une dispersion de lipide solide, le signal obtenu par diffraction des rayons X est le produit du facteur de forme des nanoparticules et du facteur de structure conduisant à l'obtention des pics de Bragg. Il est ainsi possible que le facteur de forme des SLNs présente un minimum dans le domaine

d'angle correspondant aux pics de diffraction de la phase  $\beta$  entraînant ainsi une disparition du pic intense à 4,59 Å et des intensités relatives particulières à plus grands angles.

Cependant, l'information principale de l'étude de diffraction des rayons X sur les SLNs est que les 2 diffractogrammes obtenus sans et avec curcumine sont identiques en terme de position des pics et d'intensités relatives des raies de diffraction. Il semble ainsi que la curcumine n'influence pas la structure du réseau lipidique à l'état nano-dispersé et que le polyphénol n'est pas inclus dans la matrice lipidique à la différence de l'état non dispersé. La structure lipidique des SLNs n'étant pas modifiée, cela concorde ainsi avec la conclusion issue de l'étude des taux d'encapsulation portant sur la localisation de la curcumine à la périphérie des nanoparticules et non dans le cœur lipidique.

### III.1.6. Conclusion

Les études par diffraction des rayons X de la cinétique de cristallisation du beurre de karité seul et en présence de curcumine ont permis de mettre en évidence un retard à la cristallisation induite par la présence du polyphénol dans la matrice lipidique. Néanmoins, les mêmes phases cristallines sont formées. La structure cristalline du beurre de karité déterminée par diffractions des rayons X aux grands angles n'est ainsi pas modifiée par la curcumine. L'utilisation de la méthodologie des plans de mélanges a permis de maîtriser l'influence de la composition du système ternaire sur les propriétés de tailles des SLNs formées par le système beurre de karité/tensioactifs non ioniques/eau. Il a été ainsi possible d'obtenir des particules de tailles contrôlées en modifiant seulement la composition du mélange. Cela nous a permis d'étudier l'influence de la taille des particules sur l'efficacité d'encapsulation de la curcumine par les SLNs. Il apparaît que l'efficacité d'encapsulation diminue lorsque la taille des SLNs augmente. Ceci peut s'expliquer par une localisation de la curcumine à la périphérie des particules. Les analyses thermiques n'ont relevé aucune différence induite par la présence de la curcumine (pas d'influence sur le point de fusion du lipide) contrairement aux expériences de diffraction des rayons X (modification structurale). A l'état non dispersé, la curcumine modifie la structure des bicouches lipidiques alors qu'elle n'impacte aucunement l'arrangement du beurre de karité à l'état

nano-dispersé. Cela confirme le fait que la curcumine se présente à la périphérie des particules plutôt qu'au cœur de celles-ci.

## III.2 Préparation et caractérisation du système NIMs SLNs-chitosane

Ce chapitre est axé sur la préparation du système "nanoparticules dans microparticule" à base de SLNs de beurre de karité encapsulant la curcumine incluse dans une matrice de chitosane de taille micrométrique. Afin d'effectuer l'assemblage par des interactions de type électrostatique, il est nécessaire dans un premier temps de développer une nouvelle formulation de nanoparticules afin de préparer des SLNs présentant une charge de surface négative. Ces particules pourront ensuite interagir avec les charges positives du chitosane en milieu acide pour former l'assemblage. Les SLNs développées dans le premier chapitre sont stabilisées par un mélange de tensioactifs non-ioniques. Elles présentent donc une charge de surface nulle. Cette étude nous a permis de valider le potentiel de ces particules pour la vectorisation de la curcumine mais les SLNs produites ne permettent de former un assemblage avec le biopolymère. Dans ce chapitre, une première partie est focalisée sur l'utilisation de phospholipides pour stabiliser les SLNs, ce qui devrait permettre d'obtenir des particules présentant une charge de surface négative. La deuxième partie porte sur la préparation et la caractérisation des assemblages SLNs-chitosane en présence de curcumine. Deux méthodes de préparation sont présentées pour conduire à la formation du système "nanoparticules dans microparticule" SLNs-chitosane.

### III.2.1. Préparation et caractérisation des SLNs stabilisées par un phospholipide

La préparation de particules présentant une charge de surface négative en plus de permettre l'assemblage avec le chitosane, devrait conduire à l'obtention de dispersions stables dans le temps. Afin de formuler ce système, le choix s'est porté sur des phospholipides de soja pour remplacer en partie le mélange Tween 80 et Span 80.

Par ailleurs, les SLNs neutres sont moins réactives de point de vue biologique que les SLNs chargées, car la membrane biologique de l'organisme humain contient des composés chargés négativement, notamment les phospholipides. La muqueuse intestinale est également chargée car elle est composée majoritairement de mucine [212].

Ce système permettra de réaliser l'assemblage avec le chitosane par gélification ionique, grâce aux interactions électrostatiques qui devraient se former entre le chitosane chargé positivement et les SLNs chargées négativement. La vitesse de libération des SLNs des microparticules de chitosane devrait également être réduite par ces interactions.

#### *III.2.1.1. Préparation des SLNs sans curcumine*

Les SLNs ont été préparées à partir d'un protocole proche de celui utilisé pour préparer les SLNs présentées dans le chapitre 3, partie 1.2. La seule différence porte sur la température utilisée pour préparer les SLNs (52°C) (voir chapitre 2, partie 2.2.1).

Les SLNs ont été caractérisées par DLS pour déterminer la taille, l'indice de polydispersité (PDI) et la charge des particules (potentiel zêta). Le PDI peut être un paramètre à prendre en compte pour juger de la stabilité d'une dispersion. Une valeur de PDI supérieure à 0,2, est souvent prise comme limite au-delà de laquelle un système est défini comme polydispersé [297]. L'idéal est de former un système présentant un PDI inférieure à 0,2, pour éviter le phénomène de mûrissement d'Ostwald qui existe entre des particules de diamètres différents (voir chapitre 1, partie 1.7.2). Ce phénomène entraîne une augmentation de la taille moyenne des particules en dispersion [160]. Le potentiel zêta est la mesure de la charge globale d'un colloïde et peut être également relié à la stabilité du système (Figure 50). Le potentiel zêta possède une valeur critique ( $\pm 30$  mV) qui est généralement considérée comme une ligne de démarcation entre les émulsions stables et instables [152, 298, 299], tandis que des valeurs supérieures à  $\pm 60$  mV indiquent que le système subit une répulsion électrostatique optimale. Les valeurs entre 5 et 15 mV signalent que le système subit une floculation limitée tandis que des valeurs entre 3 et 5 mV indiquent que le système est instable et flocule rapidement [160]. Les tensioactifs stériques permettent de stabiliser les particules même si elles possèdent une faible charge de surface [300].

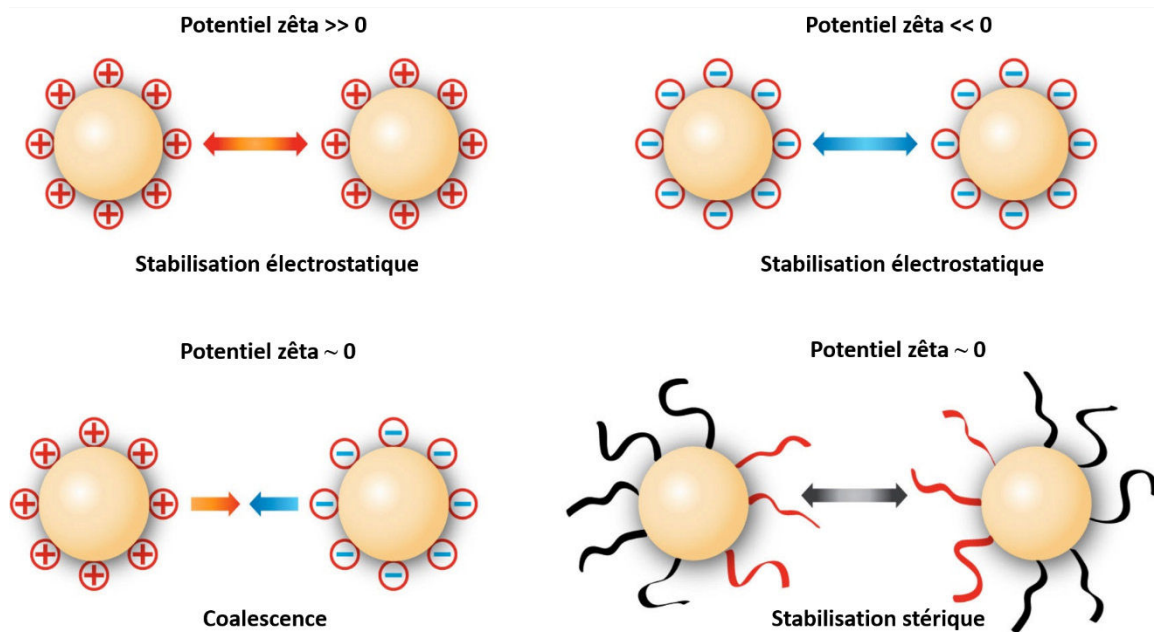


Figure 50: Influence du potentiel zêta sur la répulsion / coalescence des particules [21].

Le but de cette étude est de préparer des SLNs stables, chargées négativement pour l'encapsulation de la curcumine et ensuite pour effectuer l'assemblage avec le chitosane. Pour cela, nous avons choisi des phospholipides saturés de soja comme stabilisant des SLNs. Cependant, il est difficile de stabiliser des nanoémulsions / nanoparticules en utilisant seulement des phospholipides. Ceci est à mettre en relation avec la structure géométrique des phospholipides et de leur position à l'interface. La phosphatidylcholine présente une structure géométrique d'un cône tronqué due à sa partie hydrophile importante et à ses chaînes lipidiques [301]. Cette géométrie est en effet plus favorable pour la formation des bicouches telles que dans des liposomes. La courbure d'une nanoémulsion étant plus importante, les molécules se plaçant à l'interface, doivent présenter une géométrie plus proche du cône. L'hydrogénation des chaînes d'acide gras de la phosphatidylcholine permet d'avoir une structure plus cylindrique, car les chaînes des acides gras saturés sont plus droites [153]. En outre, les phospholipides ont tendance à former des bicouches telles que dans les vésicules, réduisant leur mobilité, et les rendant lents pour couvrir les surfaces nouvellement créées pendant le stockage surtout lors de la transition polymorphique du lipide [153, 301]. Par conséquent, l'ajout d'un co-tensioactif est nécessaire pour augmenter la courbure de la monocouche interfaciale, permettant ainsi



de stabiliser les nanoparticules formées. Le Tween 80 a été choisi comme un co-tensioactif à cause de sa non toxicité, et de son prix abordable comparativement avec d'autres co-tensioactifs tels que les sels biliaries.

Les résultats de la caractérisation des SLNs préparées avec différents ratios lipide / tensioactifs sont regroupés dans le Tableau 19. Trois formulations (envisagées à la vue des résultats obtenus avec le système Tween 80 / Span 80) ont été testées, l'objectif étant de trouver la composition donnant les meilleurs résultats du point de vue distribution de taille, PDI et potentiel zêta (distribution étroite et charge de surface élevée). La quantité de tensioactif totale ainsi que le ratio massique entre le phospholipide (PL) et le Tween 80 ont été variés.

Tableau 19: Compositions et caractérisation des formulations par DLS. Tous les pourcentages sont exprimés en masse (m/m). K : Karité, PL : phospholipides de Soja (PL 80H), T80 : Tween 80, ZP : Zeta Potential (Potentiel Zêta).

Préparations	%K	%TA	PL/T80	Diamètre (nm)	PdI	ZP (mV)
SLN 001	10	5	3 : 1	141 ± 3	0,24 ± 0,01	-44,2 ± 0,4
SLN 002	10	3	3 : 1	152 ± 3	0,16 ± 0,01	-43,1 ± 0,8
SLN 003	10	3	4 : 1	150 ± 3	0,19 ± 0,01	-43,8 ± 0,5

En comparant les deux préparations SLN 001 et 002 on remarque que la diminution de la quantité tensioactifs a conduit à une légère augmentation de la taille des particules de 141 nm vers 152 nm (moins de tensioactif) alors que le PDI diminue de 0,24 à 0,16. Les particules de la préparation 2 sont donc plus stables, avec une valeur de PDI inférieure à 0,2. Le potentiel zêta des deux préparations est proche et inférieur à -30 mV indiquant une répulsion électrostatique suffisante entre les particules. On remarque que l'augmentation du ratio PL/T80 n'a pas d'influence sur la taille et la charge des nanoparticules mais conduit seulement à une légère augmentation du PDI. Ces résultats sont en accord avec les résultats de Helgason *et al.* utilisant la triplamitine en tant que lipide solide et un mélange de phospholipon 80 H et de taurodéoxycholate (sel biliaire) en tant que stabilisant [45]. Le même ratio lipide / tensioactifs (10 : 3, m/m) a été utilisé ici et la taille des particules

obtenues est similaire (150 nm). La seule différence est l'utilisation du tween 80 comme un stabilisateur stérique au lieu du taurodéoxycholate. Les sels biliaires sont des co-tensioactifs efficaces dans les SLNs stabilisées par des phospholipides. Ils peuvent perturber les vésicules phospholipidiques et adsorber rapidement aux régions interfaciales non couvertes pendant la transition polymorphique du lipide pendant le stockage [153]. Le tween 80 est un tensioactif non ionique utilisé comme un stabilisateur stérique en s'adsorbant à l'interface des particules formées et formant une barrière physique qui augmente la distance entre les particules.

Nous avons choisi la préparation SLN 002 comme formulation pour l'encapsulation de la curcumine, puisqu'elle correspond au PDI le plus faible des trois.

#### *III.2.1.2. Encapsulation de la curcumine dans les SLNs*

L'encapsulation de la curcumine dans les SLNs a été faite en ajoutant une certaine quantité de curcumine au beurre de karité fondu à 52°C. Cependant, la solubilité du principe actif diminue pendant la recristallisation du lipide, pour cela il faut mettre le maximum possible de principe actif pour avoir une efficacité d'encapsulation importante [142]. La solubilité maximale de la curcumine, a été déterminée en ajoutant un excès de curcumine au beurre de karité en laissant sous agitation pendant 72h à 52°C. Après centrifugation et dosage de la curcumine dissoute dans le méthanol, nous avons obtenu une solubilité égale à  $0,60 \pm 0,04$  mg / g de lipides. Ainsi, pour chaque gramme de lipide, 0,6 mg de curcumine est solubilisée dans la matrice lipidique. En comparant la solubilité de la curcumine à 40°C (0,33 mg / g) et 52°C, on remarque que la solubilité a presque doublé. L'augmentation de la température qui diminue la viscosité du lipide et augmente la flexibilité des chaînes lipidiques, favorisant ainsi l'interaction de la curcumine avec les têtes polaires des triglycérides et donc à une augmentation de la quantité de curcumine solubilisée dans la matrice lipidique.

Des SLNs ont été préparées dans des conditions identiques à celles présentées précédemment en ajoutant la curcumine dans le beurre de Karité à la solubilité maximale. On remarque que, l'ajout de la curcumine n'a pas d'effet sur la distribution de taille des

particules (Figure 51). Les résultats de la caractérisation par DLS des SLNs en présence de curcumine sont reportés dans le Tableau 20. En parallèle de la distribution de taille, le potentiel zêta n'est pas non plus modifié. Par ailleurs, le dosage de la curcumine encapsulée (voir section matériels et méthodes) met en évidence que plus de 99% de curcumine a été encapsulée dans les SLNs.

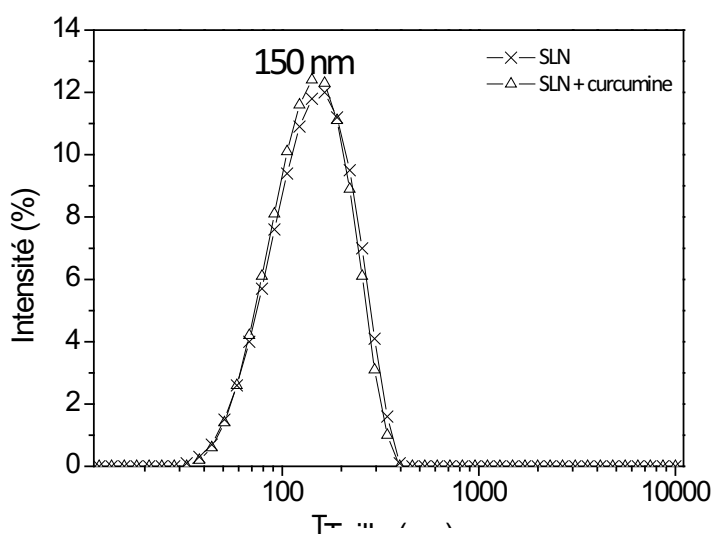


Figure 51: Distribution de la taille des SLNs et SLNs encapsulant la curcumine.

Tableau 20: Caractérisation des SLNs encapsulant la curcumine : taille des particules, PDI, potentiel zêta et efficacité d'encapsulation. La taille des particules est présentée en moyenne  $\pm$  écart-type de 3 répétitions indépendantes. Les moyennes suivies par la même lettre (a) ne sont pas significativement différentes au  $p < 0.05$

Préparations	Curcumine (mg)	%K	%TA	PL/T80	Diamètre (nm)	PdI	ZP (mV)	%EE
SLN 002	-	10	3	3 : 1	152 <sup>a</sup> $\pm$ 3	0,16 <sup>a</sup> $\pm$ 0,01	-43,1 <sup>a</sup> $\pm$ 0,8	-
SLN 004	2,4	10	3	3 : 1	150 <sup>a</sup> $\pm$ 2	0,15 <sup>a</sup> $\pm$ 0,01	-43,3 <sup>a</sup> $\pm$ 1	99,2 $\pm$ 1

La curcumine est hydrophobe ( $\text{Log P}$  (coefficient de partage octanol / eau) = 3,29) et faiblement soluble dans l'eau ( $0,6 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) [302-304]. Durant l'homogénéisation et sonication à haute température le partage de la curcumine dans la phase lipidique est favorisé. Plusieurs études de la littérature ont montré qu'au moins 90% de la curcumine peut être encapsulée dans les SLNs [241, 305, 306]. Néanmoins, il est important de signaler que les molécules de tensioactifs ne sont pas exclusivement localisées à l'interface des SLNs, mais peuvent exister également dans la phase aqueuse sous différentes formes. Le Tween 80 forme des micelles en phase aqueuse (qui ont dû être retirées du milieu continu par filtration-centrifugation), et les phospholipides peuvent former des liposomes. Les micelles et les liposomes sont connus comme des agents de solubilisation de principes actifs pouvant ainsi capter la curcumine expulsée des SLNs. D'après les résultats de diffusion dynamique de la lumière, les micelles de Tween 80 ( $< 10 \text{ nm}$ ) ne sont pas présentes dans la formulation utilisée (absence de pics vers  $10 \text{ nm}$  sur les distributions en nombre), tandis qu'il n'est pas possible de déterminer la présence de liposomes car ils présentent une taille similaire à celle des SLNs. Des études par RMN et ESR permettront de connaître la localisation de la curcumine [2].

Pour étudier la localisation de la curcumine au sein des SLNs et déterminer son effet sur la cristallisation du lipide, des études de DSC et DRX ont été réalisées et seront discutées dans la partie sur l'assemblage SLNs-chitosane.

### III.2.2. Etude de stabilité des SLNs encapsulant la curcumine

La stabilité des SLNs encapsulant la curcumine a été étudiée à l'état dispersé dans l'eau et à l'état lyophilisé en ajoutant du tréhalose en tant que cryoprotecteur. La stabilité a été évaluée en mesurant la taille des particules, l'indice de polydispersité (PDI) ainsi que le potentiel zêta. La variation de ces paramètres au cours du temps donne des informations sur la stabilité des particules. Par exemple, si le potentiel zêta diminue en-dessous d'une valeur limite ( $\pm 25 \text{ mV}$ ), cela correspond à un début de floculation des particules qui s'agglomèrent pour former des objets plus gros. La dispersion de SLNs a été stockée à  $4^\circ\text{C}$ ,

tandis que les SLNs lyophilisées ont été stockées dans un dessiccateur à température ambiante. Les résultats de la stabilité des SLNs sont présentés dans la Figure 52.

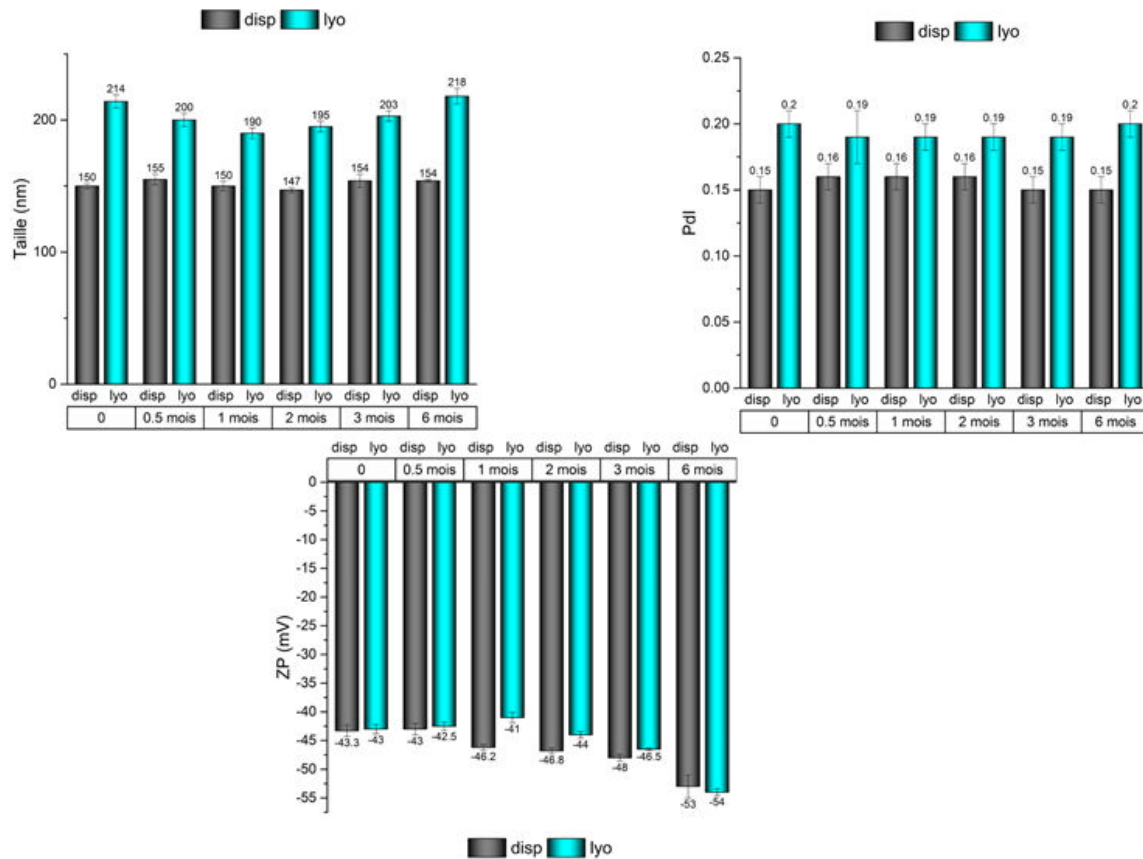


Figure 52: Variation de la taille, du PDI et du potentiel zêta des SLNs encapsulant la curcumine en fonction du temps. Disp : Dispersion de SLNs. Lyo : SLNs lyophilisées. ZP : Zeta potential (potentiel zêta).

On remarque que la taille des SLNs lyophilisées est 1.3 fois plus élevée que celle des SLNs dispersées. Cet effet de la lyophilisation est reporté dans la littérature. Siekmann et Westesen ont étudié l'effet de la lyophilisation sur la taille des SLNs. Glucose, maltose, sucrose et tréhalose ont été utilisés en tant que cryoprotecteurs [307]. Les SLNs lyophilisées en absence d'un cryoprotecteur tendent à s'agréger après lyophilisation. Pour cela, l'ajout d'un cryoprotecteur est crucial pour éviter l'agrégation des nanoparticules. La taille moyenne des SLNs lyophilisées est 1,5-2,4 fois plus élevée que celle de la dispersion

initiale. La taille des SLNs lyophilisées a augmenté 4-6,5 fois lors d'un stockage d'un an tandis que la taille des SLNs dispersées a seulement légèrement augmentée (de 56 à 65 nm). L'instabilité des SLNs lyophilisées peut être expliquée par le contact des particules due à l'absence de l'eau. L'observation par TEM des particules permis de mettre en évidence une structure anisométrique et plaquettaire. La lyophilisation modifie ainsi les propriétés de la couche de tensioactifs en relation avec l'élimination de l'eau et l'augmentation de la concentration en particules favorisant l'agrégation des SLNs. Dans notre cas, les SLNs dispersées et lyophilisées présentent une bonne stabilité pendant six mois de stockage. La taille des particules a légèrement augmenté de 214 nm à 218 nm pour les particules lyophilisées et de 150 à 154 nm pour les particules dispersées. Par ailleurs, le Pdl reste stable pour les deux formulations (0,15 (SLNs dispersées), et 0,2 (SLNs lyophilisées)). En outre, les particules demeurent chargées négativement. Les SLNs présentent une charge assez suffisante (-43 mV) inférieure à -30 mV permettant une bonne répulsion électrostatique et donc permettant d'éviter la floculation. Helgason *et al.*, ont préparé des SLNs encapsulant le  $\beta$ -carotène en utilisant la tripalmitine comme lipide solide et le phospholipon 80H et le taurodéoxycholate comme tensioactif principal et co-tensioactif [45]. Ils ont obtenu des particules stables pendant 21 jours seulement. Il est possible que l'ajout du Tween 80, qui est un stabilisateur stérique permette d'obtenir une stabilité plus élevée que le taurodéoxycholate. Les stabilisateurs stériques sont connus pour leur stabilisation des particules en créant une barrière physique empêchant ainsi l'agrégation des particules [300].

### III.2.3. Assemblages chitosane-SLNs-curcumine sous forme de microparticules

Les SLNs chargées en curcumine nécessitent d'être protégées de l'action des lipases gastriques et intestinales par une encapsulation dans des microparticules de chitosane. Pour cela, le choix s'est porté sur une gélification ionique par un agent de réticulation non toxique le tripolyphosphate (TPP). La composition du système ainsi que le protocole de préparation de l'assemblage micrométrique sont détaillés dans le chapitre 2, partie 2.7.1.

### III.2.3.1. Caractérisation par diffusion statique de la lumière

La réticulation du chitosane par le TPP dans le but d'obtenir des microparticules a tout d'abord été réalisée en absence de SLNs. La distribution de tailles des microparticules obtenue par granulométrie laser présente une seule population de particules avec un maximum centré sur 21  $\mu\text{m}$  (Figure 53).

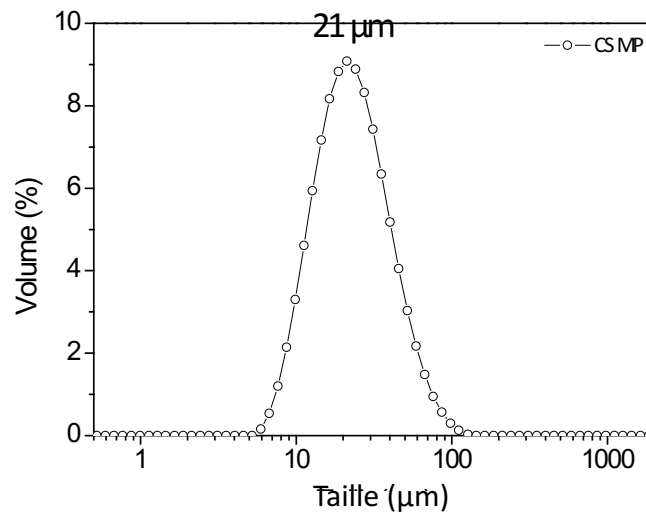


Figure 53: Distribution de la taille des particules de chitosane (CS-MP).

L'influence de l'ajout des SLNs dans le milieu ainsi que l'effet de la concentration en nanoparticules sur la taille des microparticules a ensuite été étudié. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 19. Le facteur de dilution  $F$  correspond à la dilution de la dispersion de SLNs initialement préparées (10% en Karité). L'ajout des SLNs ne modifie pas les propriétés de tailles des microparticules de chitosane qui restent proches de 21  $\mu\text{m}$  (Figure 54). Par ailleurs, la concentration en SLNs n'a pas d'effet significatif sur la taille des microparticules de chitosane sauf dans le cas de la dispersion non diluée ( $F=0$ ) qui conduit à l'obtention d'agrégats macroscopiques. La présence d'un grand nombre de SLNs conduit à une diminution du nombre de groupement  $\text{NH}_3^+$  libre à cause des interactions électrostatiques entre les SLNs et le chitosane. En principe, cela devrait gêner la formation et la réticulation des microparticules par le TPP. C'est ainsi le cas de l'essai réalisé avec les SLNs non diluées ( $F = 0$ ). La dilution de la dispersion de SLNs permet ensuite l'assemblage sous forme de microparticule d'une taille de moyenne de 21  $\mu\text{m}$  quelle que soit la concentration en SLNs. La concentration maximale en SLNs (dilution  $F$  minimale

de 1/5) a donc été choisie pour la suite de l'étude. Par ailleurs, cette composition conduit à la distribution la moins polydispersée avec une valeur de span la plus faible. La présence de curcumine dans les SLNs n'influence pas la taille de l'assemblage (Tableau 21).

Tableau 21: Propriétés de la taille des particules obtenues avec et sans SLNs à des concentrations différentes en SLNs. La lettre C correspond à des échantillons contenant de la curcumine dans les SLNs. F : Facteur de dilution des SLNs. D<sub>10</sub> : 10<sup>e</sup> centile de la distribution. D<sub>50</sub> : taille médiane de la taille des particules. D<sub>90</sub> : 90<sup>e</sup> centile de la distribution. Span : largeur de la distribution de taille des particules. La taille des particules est présentée en moyenne ± écart-type de 3 répétitions indépendantes. Les moyennes suivies par la même lettre (a) ne sont pas significativement différentes au p < 0.05

Préparations	%Karité (m/v)	D <sub>10</sub> (µm)	D <sub>50</sub> (µm)	D <sub>90</sub> (µm)	Span
CS-MP	0	11 ± 0,9	21 <sup>a</sup> ± 2	36,8 ± 1,5	1,27
CS-SLN-C MP (F=0)	10	-	-	-	-
CS-SLN-C MP (F=5)	2	10,6 ± 0,8	21,6 <sup>a</sup> ± 1,6	34,7 ± 0,7	1,12
CS-SLN-C MP (F=25)	0,4	10 ± 1	20 <sup>a</sup> ± 2	36 ± 3	1,3
CS-SLN-C MP (F=50)	0,1	12 ± 0,5	23 <sup>a</sup> ± 1	46 ± 2	1,47
CS-SLN MP (F=5)	2	10,4 ± 0,5	21 <sup>a</sup> ± 1,3	35,2 ± 1	1,17



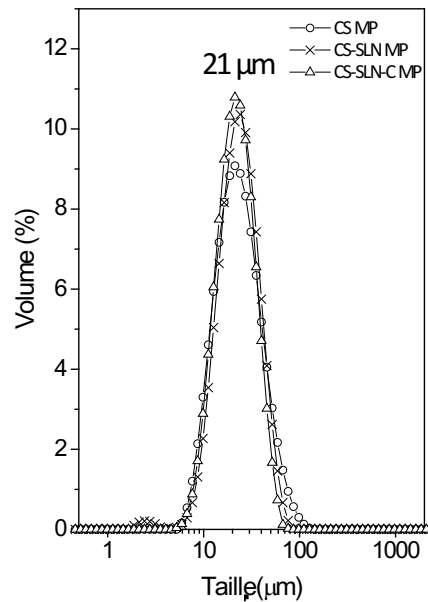


Figure 54: Distribution de taille des particules de chitosane (CS MP), avec SLNs (CS-SLN MP) et SLNs encapsulant la curcumine diluée au 1/5 (CS-SLN-C MP).

Dans cette étude le pH des solutions de TPP et de chitosane est fixé respectivement à 7 et 4, ces valeurs de pH permettant de ne pas former d'agrégats macroscopiques. Il se peut néanmoins que des agrégats microscopiques existent ayant une taille proche de celle des microparticules. Il existe plusieurs agents de réticulation cités dans la littérature utilisés pour réticuler les microparticules de chitosane tels que le glutaraldéhyde (GA), l'éthylène glycol diglycidyl éther (EGDE) et le TPP [308-310]. Les résultats ont montré que GA et EGDE ne sont pas les agents de réticulation idéaux à cause de leur toxicité physiologique. Le TPP est quant à lui un agent non toxique. Les groupements multivalents chargés négativement du TPP réagissent avec les groupements amino ( $\text{NH}_3^+$ ) chargés positivement du chitosane pour former des gels. Mi *et al.*, ont proposé que l'interaction ionique entre le TPP et le chitosane dépend du pH [310]. Lorsque la solution de TPP est basique, les ions  $\text{OH}^-$  et  $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$  diffusent entre les chaînes du chitosane et vont réagir avec les groupements protonés du polysaccharide. La réaction entre les ions  $\text{OH}^-$  et  $\text{NH}_3^+$  se fait par coacervation-inversion de phase (déprotonation des groupements  $\text{NH}_3^+$ ), tandis que la réticulation par le TPP s'effectue par gélification ionique [233]. Néanmoins, lorsque le pH est acide, les ions  $\text{OH}^-$  ne sont pas présents en solution, et seul le TPP réagit avec le chitosane. Cela peut

entraîner l'apparition d'agrégats lors de la préparation de microparticules à pH basique. Il est ainsi possible de contrôler le mécanisme de réticulation des particules de chitosane en contrôlant le pH de la solution de TPP (acide ou basique).

L'encapsulation des SLNs au sein de la matrice de chitosane est prouvée par une centrifugation du système après assemblage (Figure 55). Après centrifugation, un surnageant transparent est obtenu, le culot étant composé des microparticules.

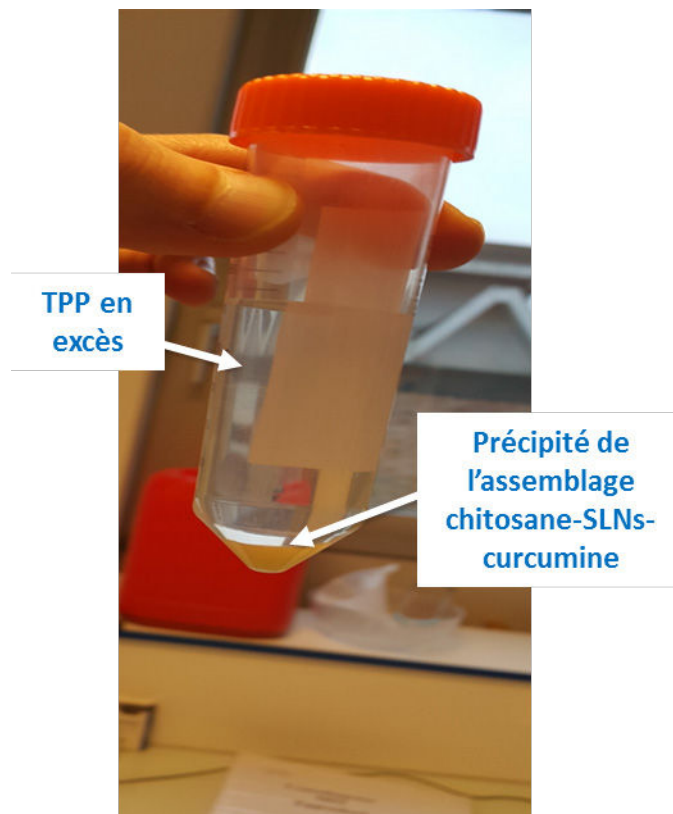


Figure 55: Photo de la récupération de l'assemblage chitosane-SLNs-curcumine dans le culot après centrifugation.

Dans le cas où des SLNs n'auraient pas interagies avec le chitosane et n'auraient pas été encapsulées dans la matrice de biopolymère, le surnageant aurait gardé un aspect turbide caractéristique d'une dispersion de SLNs. L'obtention d'un surnageant transparent confirme ainsi que toutes les SLNs ont été piégées dans le réseau de chitosane.

### III.2.3.2. Caractérisation thermique et structurale

La calorimétrie différentielle à balayage (Differential Scanning Calorimetry, DSC) a été utilisée pour étudier l'effet de l'état colloïdal du lipide et l'ajout de la curcumine sur le profil thermique du beurre de karité à l'état bulk et nanodispersé. Cette technique a permis également de mettre en évidence des possibles modifications du thermogramme des SLNs après leur encapsulation dans les microparticules du chitosane. Ainsi, cette technique peut être utilisée pour étudier l'effet des tensioactifs sur la cristallisation des SLNs et même déterminer le mécanisme de cristallisation des SLNs (nucléation homogène, hétérogène,...) [95, 115, 311].

La figure 56 présente les thermogrammes du beurre de karité à l'état bulk et nanodispersé en présence et en absence de curcumine ainsi que, les profils thermiques des microparticules de chitosane sans et avec SLNs encapsulées.

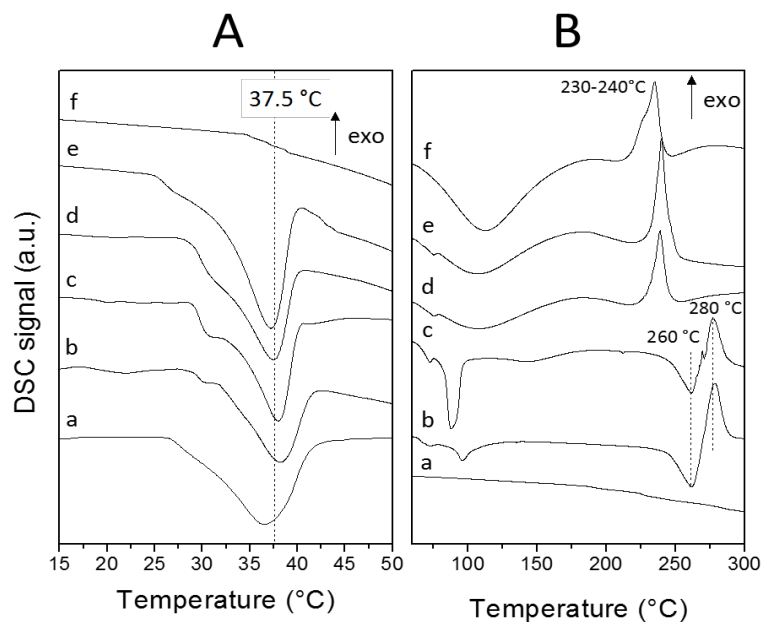


Figure 56: Thermogrammes du beurre de karité à l'état bulk (a), des SLNs lyophilisées en absence (b) et en présence de curcumine (c), des microparticules de chitosane encapsulant des SLNs en absence (d) et en présence de curcumine (e) et des microparticules de chitosane sans SLNs (f). A) Premier chauffage de 5°C à 60°C avec une vitesse de 2°C / min. B) Deuxième chauffage de 5°C à 300°C avec une vitesse de 10°C / min.

Le beurre de karité présente un pic endothermique aux alentours de 37,5°C correspondant à son point de fusion. Les SLNs lyophilisées en absence et en présence de curcumine présente un pic endothermique identique, mettant en évidence que le point de fusion du lipide n'est pas affecté dans ce cas par l'état nanodispersé. Dans notre cas, l'état nano du beurre de karité et même la présence des tensioactifs n'ont pas d'influence sur le point de fusion du beurre de karité, à la différence des résultats obtenus avec le premier système où le point de fusion a été décalé de 37°C (état bulk) vers 33°C (état nanodispersé). Ce décalage a été reporté dans plusieurs publications dans la littérature [53, 96, 312]. Il se peut que le tréhalose ait une certaine influence sur le point de fusion du lipide car il interagit avec les têtes polaires des tensioactifs pour garder les nanoparticules dans un état pseudo-hydraté [169], et l'interaction entre le tensioactif et la matrice lipidique peut prévenir la recristallisation des SLNs [53]. L'effet des tensioactifs a été expliqué par la tension superficielle générée à proximité de la surface des particules, ce qui décale le point de fusion du lipide vers des valeurs plus faibles en comparaison avec le lipide à l'état bulk [313]. Cependant, Qian *et al.*, ont rapportés des points de fusion similaires pour le beurre de cacao à l'état bulk et émulsifié. Ils ont avancé que l'effet « supercooling » ou « surfusion » n'est pas important dans ce cas. Le lipide à l'état bulk et émulsifié possède le même point de fusion. Ce phénomène a déjà été mis en évidence avec de l'huile de palme hydrogénée [95]. Un lipide surfondu est un lipide refroidi au-dessous de son point de cristallisation restant à l'état liquide sans formation des cristaux lipidiques. Cet effet est plus important dans le cas des lipides émulsifiés. Les gouttelettes lipidiques de petites tailles contiennent moins d'impuretés pouvant agir comme des initiateurs de la nucléation lors de la formation des cristaux lipidiques [314, 315]. Ainsi la cristallisation est inhibée et cela conduit à l'obtention de nanoémulsions au lieu de nanoparticules solides. Pour les deux systèmes, l'important est que la curcumine n'influence pas le point de fusion du lipide.

La curcumine présente un pic endothermique à 175°C qui correspond à son point de fusion [257]. Ce pic de fusion n'est pas détecté quand la curcumine est encapsulée dans les SLNs, indiquant que la curcumine encapsulée n'est pas sous forme d'agrégats cristallins mais dispersée dans la matrice lipidique améliorant ainsi sa biodisponibilité [106, 316, 317]. Des résultats similaires ont été rapportés par d'autres chercheurs [106, 318]. Il est

possible que le lipide et les tensioactifs jouent un rôle dans la prévention de cristallisation du principe actif durant la préparation des SLNs [106, 316].

Les SLNs lyophilisées présentent un pic endothermique aux alentours de 100°C correspondant à la déshydratation du tréhalose dihydraté [319]. De plus, les pics exothermiques à 280°C et endothermiques à 260°C viennent de la décomposition du polysaccharide.

Les microparticules de chitosane encapsulant des SLNs en absence et en présence de curcumine, présentent un pic endothermique aux alentours de 37°C qui correspond au point de fusion des SLNs. Ces microparticules présentent également un pic endothermique aux alentours de 100°C correspondant à l'évaporation de l'eau adsorbée sur les microparticules de chitosane à cause de son caractère hydrophile. Plusieurs études ont montré la capacité du chitosane à adsorber l'eau [320, 321]. De plus, un pic exothermique apparaît à 240°C qui correspond à la température de décomposition du chitosane [322].

Les résultats mettent en évidence dans un premier temps que l'ajout de la curcumine aux SLNs ne modifie pas le point de fusion du beurre de karité. Le signal relié au lipide n'est pas affecté par l'assemblage avec le chitosane. De même, le signal correspondant au chitosane n'est pas non plus modifié par la présence des SLNs au sein de l'assemblage. Les propriétés chimiques des différents composés ne sont donc pas affectées par l'assemblage confirmant une interaction électrostatique entre les SLNs et le polymère.

L'influence de la présence de curcumine ainsi que de la formation de l'assemblage sur la structure cristalline du beurre de karité a également été étudiée par DRX. Les diffractogrammes correspondant sont présentés sur la (Figure 57).

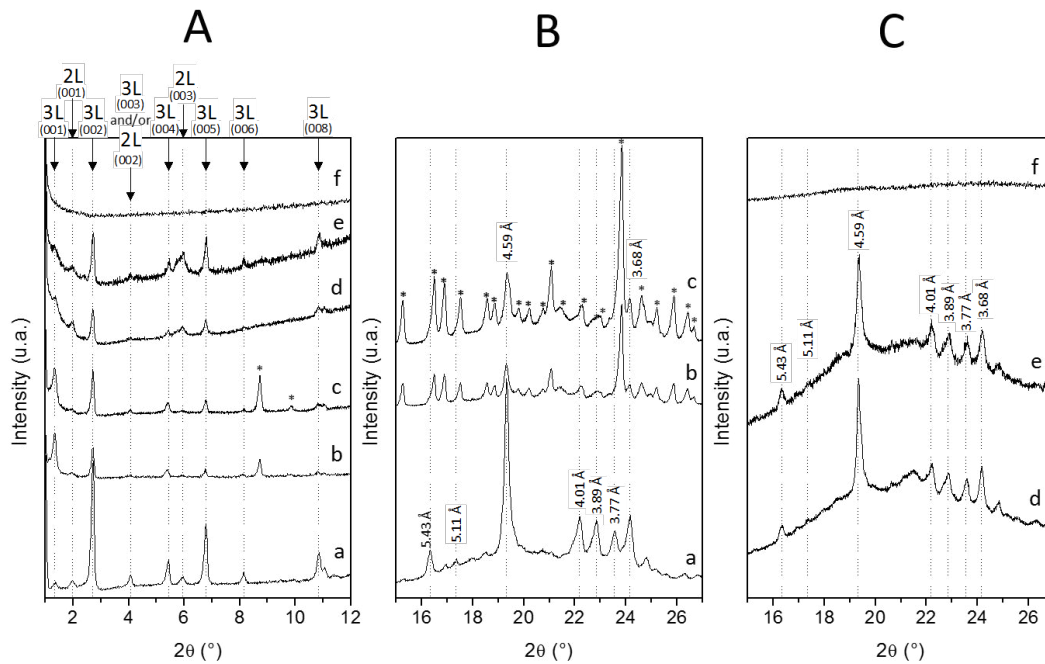


Figure 57 : Diffractogrammes du beurre de karité à l'état bulk (a), des SLNs lyophilisées en absence (b) et en présence de curcumine (c), des microparticules de chitosane encapsulant des SLNs en absence (d) et en présence de curcumine (e) et des microparticules de chitosane sans SLNs (f), aux bas (A) (SAXS) et aux grands angles (B, C) (WAXS). Les pics marqués par \* correspondent aux signaux de diffraction du tréhalose (cryoprotecteur utilisé pendant la lyophilisation des SLNs).

Les signaux de diffraction aux petits angles ( $1^\circ < 2\theta < 12^\circ$ ) permettent de déterminer le type d'empilement des chaînes grasses (2L et 3L). Les deux structures 2L et 3L ont été observées pour le beurre de karité à l'état bulk et nanodispersé, avec 3 réflexions pour le 2L et 7 réflexions pour le 3L. Il est ainsi possible d'en déduire que la structure principale du beurre de karité est un empilement de type 3L. Les triglycérides portant majoritairement des acides gras saturés, présente un empilement de chaînes du type 2L [323]. Quand les triglycérides sont composés de mélanges d'acides (acides gras saturés et insaturés) un changement de l'empilement vers le type 3L se produit [324], ce qui est le cas du beurre de karité qui est composé essentiellement de l'acide oléique (C18 :1) et de l'acide stéarique

(C18 :0). L'encapsulation de la curcumine ne modifie pas le nombre de pics, prouvant ainsi que la structure n'est pas affectée. Néanmoins, ces pics deviennent moins intenses, ce qui peut être traduit par une diminution de la qualité du cristal (domaine monocristallin plus petit).

Les signaux de diffractions aux grands angles ( $15^\circ < 2\theta < 27^\circ$ ) permettent de déterminer la structure cristalline du lipide (phase  $\alpha$ ,  $\beta'$ ,  $\beta$ ). Chaque phase est caractérisée par des pics spécifiques (voire chapitre 3, partie 1.5). Dans notre cas, le beurre de karité à l'état bulk et nanodispersé présente 8 pics de diffraction avec un pic principal à 4,6 Å, indiquant que le beurre de karité est cristallisé dans la phase  $\beta$  la plus stable. L'encapsulation de la curcumine n'a pas affecté le profil de diffraction du beurre de karité, pouvant indiquer, comme avec le système stabilisé par les tensioactifs non-ioniques décrit dans le chapitre précédent (partie 1.5), que la curcumine se trouve dans la couronne et pas dans le cœur lipidique. De plus, la curcumine peut interagir avec la tête polaire des phospholipides par des liaisons hydrogènes entre le groupe  $-OH$  du groupement phénolique de la curcumine et le groupe  $P=O$  des phospholipides [257], ce qui peut expliquer pourquoi la curcumine se trouve à la périphérie des SLNs, proche de la monocouche de tensioactifs et non dans le cœur lipidique. En outre, l'encapsulation des SLNs dans les microparticules de chitosane n'a pas affecté la structure cristalline des SLNs, les diffractogrammes étant identiques. Les microparticules de chitosane ne présentent pas de pic de diffraction ce qui indique que les microparticules sont à l'état amorphe. Ces résultats sont en accord avec les profils thermiques obtenus par DSC dans lesquels les SLNs présentent un seul pic endothermique correspondant au point de fusion de la phase  $\beta$ . De plus, aucun point de fusion n'a été détecté par DSC pour les microparticules de chitosane indiquant que le polymère est à l'état amorphe.

### III.2.4. Caractérisation des microparticules de chitosane par microscopie électronique à balayage (MEB) et microscopie optique.

La morphologie des microparticules de chitosane encapsulant les SLNs a été observée par microscopie électronique à balayage (MEB). La microscopie optique a été utilisée pour visualiser des particules hydratées dans l'eau.

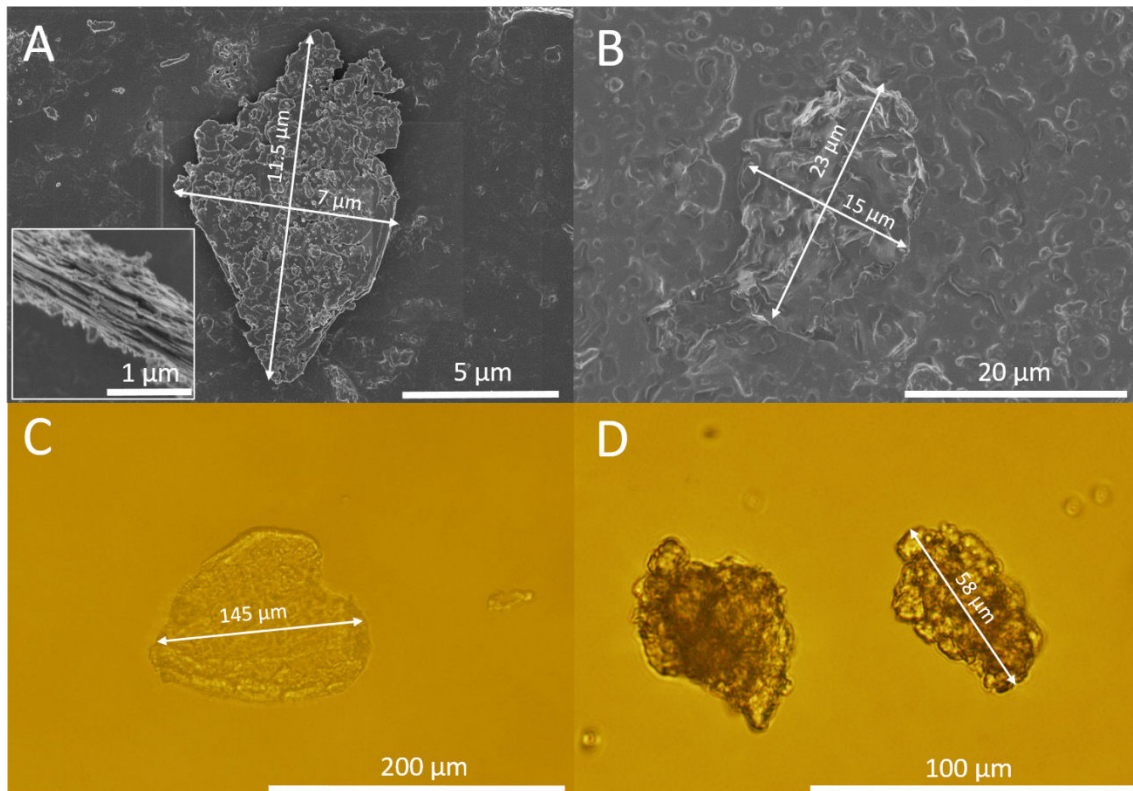


Figure 58: Images de microscopie électronique à balayage (A et B) et microscopie optique (C et D) des microparticules de chitosane avec (B et D) et sans SLNs (A et C) encapsulant la curcumine.

Les microparticules de chitosane sans et avec SLNs présentent en MEB des tailles proches de respectivement (11,5  $\mu\text{m}$  et 23  $\mu\text{m}$ ) (Figure 58 A et B) correspondant à la distribution granulométrique obtenue par diffusion de la lumière (Figure 54). Par ailleurs, les particules hydratées observées par microscopie optique sont plus grandes (145  $\mu\text{m}$  (C), et 58  $\mu\text{m}$  (D)) mais demeurent dans la gamme supérieure de distribution de taille de la Figure 54. La limite maximale de la distribution des microparticules de chitosane sans



SLNs est d'environ 150  $\mu\text{m}$ . La valeur maximale dans le cas de la présence de SLNs est plus faible dans le cas et est d'environ 70  $\mu\text{m}$ .

D'après les images, les particules sont de formes irrégulières et présentent une surface rugueuse. Une structure en feuillet des particules est également mise en évidence (encart Figure 58.A) La surface des particules semble par ailleurs plus lisse et moins anguleuse lorsque des SLNs sont présentes dans le système. Ceci peut être en rapport à la présence de lipide à la surface des particules. Cette migration peut provenir du procédé de préparation des échantillons. Les particules ont été dispersées dans l'éthanol en appliquant des ultrasons afin de faciliter leur séparation avant le dépôt sur plots. Il est possible que ce traitement ait conduit à une dissolution des lipides et qui se sont ensuite redéposés à la surface des particules lors du séchage de l'échantillon. Ce protocole a été choisi car les microparticules tendent à s'agréger après séchage et leur redispersion dans l'eau est très difficile. De plus, les microparticules sont sensibles à la sonication qui peut provoquer leur fragmentation pouvant expliquer l'aspect irrégulier observé.

Le résultat majeur de ces observations concerne les images obtenues par microscopie optique. Alors que les particules de chitosane sans SLNs apparaissent transparentes (Figure 58.C), celles contenant les SLNs sont plus foncées (Figure 58.D). Cette amélioration du contraste prouve ainsi l'encapsulation des SLNs au sein des microparticules. Ce résultat est un argument supplémentaire à l'aspect du système après centrifugation (Figure 55) confirmant l'encapsulation des nanoparticules au sein de la matrice de polymère. Un système NiMs a donc bien été formé.

### III.2.5. Microparticules chitosane-SLNs par encapsulateur

Précédemment, les assemblages micrométriques chitosane-SLNs ont été obtenus par la technique de gélification ionique en utilisant le TPP comme un agent de réticulation dans des conditions d'agitation douces. Le système a été formé en versant le TPP dans la dispersion contenant le chitosane et les SLNs. Cependant, cette méthode souffre de deux inconvénients majeurs qui sont :

- La limitation au niveau des concentrations en chitosane (0.15%) et en TPP (0.05%) utilisables.
- L'obtention de microparticules de formes irrégulières.

Afin d'obtenir des microparticules plus denses (au niveau degré de réticulation) et sphériques, nous avons utilisé un encapsulateur Buchi 390 Pro connu comme étant un bon moyen pour préparer des microparticules biopolymériques [325]. Le protocole est détaillé dans le chapitre 2, partie 2.7.2.2.

Pour obtenir des particules sphériques et monodisperses, le contrôle de la cinétique de gélification est très important. Ce contrôle peut être effectué en variant la concentration des réactifs, en modulant la température ou le pH. Une concentration plus élevée en réactifs signifie des concentrations plus élevées de charges positives et négatives, une gélification plus rapide et donc l'obtention de particules plus denses et plus stables. Pour cette raison, nous avons préparé une solution de chitosane à 0,4% (m/v) au lieu de 0,15% et une solution de TPP à 8% (m/v) au lieu de 0,05%. Du Tween 80 0,05 % (m/v) a également été ajouté à la solution de TPP pour diminuer la tension de surface du bain de réticulation permettant ainsi une bonne réticulation des particules. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 22. Plusieurs buses de diamètres différents ont de plus été utilisées.

On remarque d'après ces résultats, que les particules obtenues par la buse de 120  $\mu\text{m}$  sont monodisperses avec une distribution étroite avec une valeur de span inférieure à 2. La préparation 2 présente le span le plus faible (Span = 0,7) indiquant que les paramètres de l'encapsulateur correspondant (fréquence, débit, et voltage) permettent d'obtenir des particules monodisperses. Les particules obtenues par la buse 300  $\mu\text{m}$ , présentent une distribution très large (Span = 2,4).

Tableau 22: Conditions expérimentales et résultats obtenus par granulométrie laser. D<sub>10</sub>: 10<sup>e</sup> centile de la distribution. D<sub>50</sub>: taille médiane de la taille des particules. D<sub>90</sub>: 90<sup>e</sup> centile de la distribution. Span : largeur de la distribution de taille des particules. La taille des particules est présentée en moyenne ± écart-type de 3 répétitions.

Préparations	% Chitosane (m/v)	Ratio SLN : Chitosane	Fréquence (Hz)	Débit (ml/min)	Voltage (V)	Diamètre de la buse (µm)	D <sub>10</sub> (µm)	D <sub>50</sub> (µm)	D <sub>90</sub> (µm)	Span
1	0,4	1 :10	500	4	950	120	84 ± 1	213 ± 2	390 ± 5	1,4
2	0,4	1 :10	1200	4	850	120	146 ± 3	203 ± 4	283 ± 8	0,7
3	0,4	1 :10	1380	4	900	120	39 ± 5	176 ± 6	330 ± 2	1,6
4	0,4	1 :10	500	7	800	300	95 ± 2	460 ± 20	1100 ± 50	2,4
5	0,4	1 :10	770	7	900	300	174 ± 35	547 ± 10	930 ± 17	1,4
6	0,4	1 :10	800	7	900	300	93 ± 12	520 ± 8	1000 ± 33	1,8

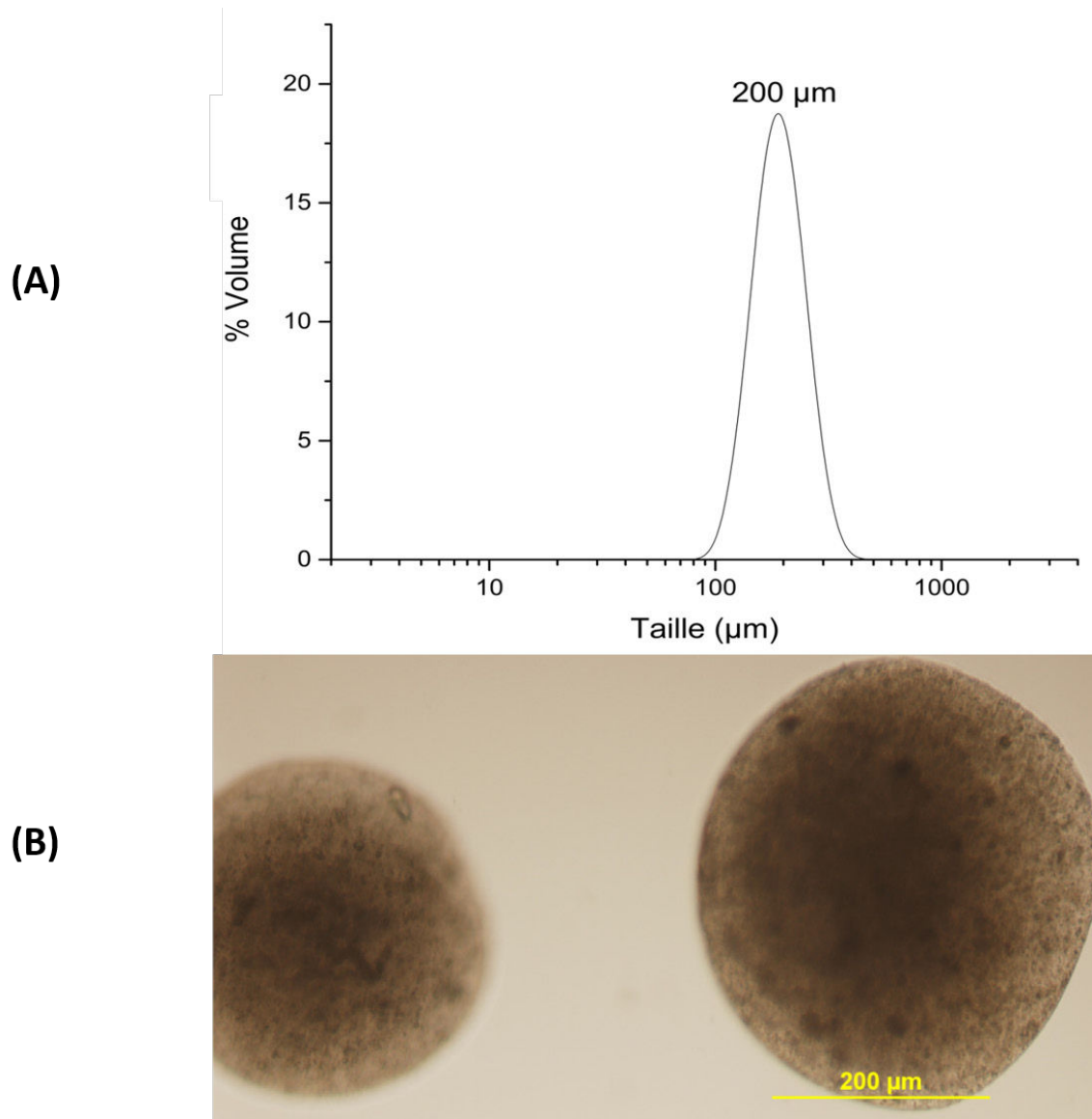


Figure 59: (A) Distribution de la taille des microparticules de chitosane encapsulant des SLNs obtenue par la buse 120  $\mu\text{m}$  (préparation 2). (B) Image de microscopie optique pour des microparticules de chitosane encapsulant des SLNs obtenues avec la buse 120  $\mu\text{m}$ .

Les particules obtenues avec la buse 120  $\mu\text{m}$  (préparation 2), présentent une distribution de taille étroite (Figure 59.A) et sont sphériques (Figure 59.B). L'aspect sombre des particules prouve l'encapsulation des SLNs dans les microparticules de chitosane, les microparticules de chitosane étant transparentes.

Ces résultats préliminaires sont encourageants et d'autres, tests seraient nécessaires pour optimiser la taille et la sphéricité des particules en utilisant la buse de 120 ou de 300  $\mu\text{m}$ .

### III.2.6. Conclusions

L'utilisation de phospholipides de soja comme tensioactif et de Tween 80 en tant que co-tensioactif nous a permis de préparer des SLNs de 150 nm de diamètre présentant une faible polydispersité ( $\text{PDI} = 0.15$ ) ainsi qu'une charge de surface négative ( $-43 \text{ mV}$ ). Ces particules se sont révélées stables pendant au moins 6 mois aux deux états dispersés dans de l'eau et lyophilisés. Aucune modification significative de la taille du PDI et du potentiel zêta n'est détectée pouvant signaler un début de déstabilisation des SLNs.

Les SLNs déjà préparées présentent une charge négative suffisante pour permettre l'assemblage avec le chitosane chargé positivement à pH acide. L'encapsulation des SLNs dans des microparticules de chitosane a été effectuée par gélification ionique en utilisant le tripolyphosphate (TPP) comme un agent de réticulation. Les particules obtenues présentent une taille de 21  $\mu\text{m}$ . L'incorporation des SLNs dans les particules de chitosane n'a pas d'effet sur leur taille.

L'analyse thermique par DSC a montré que l'état nanométrique du lipide n'a pas d'effet sur le point de fusion du lipide. En outre, l'assemblage chitosane-SLNs, n'a pas affecté ni le point de fusion du lipide ni le profil thermique du polymère. La présence de curcumine dans les SLNs ne conduit pas à l'apparition d'un pic endothermique à  $175^\circ\text{C}$  correspondant au point de fusion de la curcumine. Cela indique que la curcumine est dispersée dans la matrice lipidique et non sous forme d'agrégats cristallins.

L'analyse structurale par DRX a mise en évidence que l'assemblage chitosane-SLNs, n'a pas affecté la structure cristalline du lipide. En outre, l'encapsulation de la curcumine dans les SLNs n'a pas d'influence sur sa structure cristalline. Les microparticules de chitosane seules ne présentent aucun pic de diffraction en indiquant que le chitosane est à l'état amorphe.

L'observation de l'assemblage par microscopie électronique à balayage, a montré que les microparticules présentent une forme irrégulière avec une surface rugueuse. L'observation par microscopie optique a permis de prouver l'encapsulation des SLNs au sein des microparticules de chitosane. De plus, les microparticules encapsulant des SLNs présentent une couleur foncée, tandis que les microparticules de chitosane seules sont transparentes.

Par ailleurs, les SLNs ont été encapsulées dans des microparticules de chitosane en utilisant l'encapsulateur Buchi. Cet équipement est très utilisé dans la préparation des particules biopolymériques. Les microparticules obtenues par la buse de 120  $\mu\text{m}$ , présentent une taille de 200  $\mu\text{m}$  avec une distribution étroite (span = 0,7). L'observation des particules par microscopie optique a montré que les particules sont sphériques et foncées indiquant que les SLNs se trouvent au sein des microparticules.

## **Conclusions et perspectives**

## ***Chapitre IV: Conclusions et perspectives***

L'objectif principal de ce travail concernait la préparation d'un vecteur lipopolysaccharidique sous forme de microparticules de chitosane incluant des nanoparticules lipidiques solides encapsulant la curcumine.

La caractérisation physico-chimique de la structure du système lipide-polyphénol a tout d'abord été réalisée à l'état non-dispersé et ensuite à l'état nanométrique. Les cinétiques de recristallisation du beurre de karité par diffraction des rayons X ont mis en évidence que la curcumine modifie la transition de phase du lipide de l'état liquide à l'état cristallin. Une phase  $\beta$  stable est néanmoins obtenue en présence de curcumine même si elle apparaît à des temps plus longs comparés au beurre de karité seul. L'encapsulation de la curcumine dans des SLNs de beurre de karité a ensuite été réalisée. Afin de contrôler les propriétés physico-chimiques du système, une première étape a consisté à utiliser la méthodologie des plans de mélanges afin de déterminer l'influence de la composition du système en lipide, tensioactifs et eau sur les propriétés de tailles des SLNs (taille et indice de polydispersité) en utilisant des tensioactifs non-ioniques. Cette étude a ensuite permis de mettre en évidence l'influence de la taille des particules sur l'efficacité d'encapsulation de la curcumine. Il apparaît que lorsque la taille des SLNs diminue l'efficacité d'encapsulation de la curcumine augmente. Cet effet est expliqué par la localisation de la curcumine dans la couche de tensioactifs (couronne). Les analyses thermiques ont montré que la curcumine n'a pas d'effet sur le point de fusion du beurre de karité, à l'état non dispersé et dispersé. Les analyses par DRX ont permis de constater que la curcumine a modifié la structure du réseau lipidique à l'état non dispersé, notamment au niveau de la structure de la bicouche lipidique, alors qu'elle n'a aucun effet sur l'arrangement du beurre de karité à l'état nano-dispersé. Cela confirme que la curcumine se place à la périphérie des particules, en interaction avec les tensioactifs, ne modifiant ainsi pas le réseau cristallin du beurre de karité.

Afin de pouvoir former un assemblage avec le chitosane, les SLNs doivent présenter une charge de surface négative. Pour cela, un nouveau système basé sur



l'utilisation de phospholipides saturés de soja et d'un co-tensioactif non ionique (Tween 80) a été préparé. Les particules obtenues présentent une taille de 150 nm, une faible polydispersité (PdI = 0,15) ainsi qu'une charge de surface suffisante (potentiel zêta = -43 mV) nécessaire à une bonne répulsion électrostatique conduisant à une bonne stabilité dans le temps. Les particules sont ainsi stables pendant au moins six mois qu'elles soient dispersées dans l'eau ou lyophilisées. Aucune modification significative de la taille, du PdI, et de la charge de surface pouvant correspondre à un début de déstabilisation des particules n'a été signalée.

La préparation de SLNs présentant une charge de surface négative a principalement permis de former un assemblage avec le chitosane. Cet assemblage a été réalisé par gélification ionique en utilisant le tripolyphosphate comme agent de réticulation. Les microparticules de chitosane obtenues présentent une taille moyenne de 21  $\mu\text{m}$  et l'encapsulation des SLNs au sein du réseau du polymère n'a pas d'influence sur la taille des microparticules. La polydispersité des particules est faible avec une valeur de SPAN de 1,2. Cette technique d'encapsulation simple et sans utilisation des solvants organiques a ainsi permis de former le système "nanoparticules dans microparticule" à base de SLNs et de chitosane.

Par ailleurs, cet assemblage ne modifie pas les propriétés des composants du système. Ainsi, l'analyse thermique par DSC a mis en évidence que l'assemblage chitosane-SLNs n'a pas affecté ni le point de fusion du lipide ni le profil thermique du chitosane. En outre, l'absence d'un pic endothermique à 175°C correspondant au point de fusion de la curcumine indique que la curcumine est dispersée au sein de la matrice lipidique au sein de l'assemblage et non sous forme d'agrégats cristallins.

L'analyse structurale par DRX a mis en évidence que la structure cristalline des SLNs n'a pas non plus été modifiée par l'assemblage. Aucun risque d'expulsion de la curcumine n'est donc à craindre dans la préparation de ce type de vecteur étant donné que la structure solide du lipide n'est pas affectée. En outre, les microparticules de chitosane seules sans SLNs ne présentent aucun pic de diffraction, en indiquant que le chitosane est à l'état amorphe. Ces résultats sont en accord avec les profils thermiques obtenus par DSC

dans lesquels les microparticules de chitosane présentent un seul pic de fusion correspondant au point de fusion des SLNs.

L'observation des microparticules par microscopie électronique à balayage a permis de mettre en évidence que les particules présentent une forme irrégulière avec une surface rugueuse. Par ailleurs, l'observation par microscopie optique confirme l'encapsulation des SLNs au sein des microparticules de chitosane. En effet, en présence de SLNs, les particules présentent une couleur foncée alors que les microparticules seulement composées de chitosane apparaissent transparentes.

En parallèle, les SLNs ont été encapsulées dans les microparticules de chitosane en utilisant un encapsulateur Buchi afin de contrôler leur morphologie. Cette technique est très utilisée dans la préparation de microparticules biopolymériques. Les résultats préliminaires ont montré que les microparticules de chitosane obtenues en utilisant une buse de 120  $\mu\text{m}$  présentent les meilleurs résultats du point de vue polydispersité et sphéricité. L'observation par microscopie optique a montré que les particules sont sphériques et foncées indiquant la présence des SLNs au sein des particules. Cette technique semble un bon moyen d'encapsulation des SLNs dans les microparticules de chitosane même si les tailles obtenues sont supérieures à celles obtenues par simple gélification ionique.

Cependant, plusieurs points restent à élucider dans le but d'approfondir ce travail de thèse. D'un point de vue pratique, une amélioration du protocole d'élaboration des microparticules par gélification ionique semble nécessaire. L'utilisation d'une pompe péristaltique injectant le mélange chitosane-SLNs dans la solution de TPP devrait permettre d'obtenir des particules sphériques par cette méthode. De plus, il apparait également important de déterminer un protocole alternatif pour préparer les microparticules à l'observation par MEB qui ne les affecte pas. En outre, il est nécessaire d'optimiser le protocole de préparation des microparticules de chitosane en utilisant l'encapsulateur Buchi qui est un autre moyen d'encapsulation des SLNs dans des microparticules de chitosane.

En ce qui concerne les propriétés physico-chimiques de l'assemblage, des analyses par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) permettrait de caractériser le système une fois l'assemblage réalisé et permettrait de mettre en évidence des modifications de composition ou des interactions (chitosane et SLNs, chitosane-curcumine, phospholipides-curcumine et lipide-curcumine). Cela donnerait des informations supplémentaires sur les interactions mises en jeu. Par ailleurs, des études par RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  ainsi que par RPE (Résonance Paramagnétique Electronique, Electron Spin Resonance, ESR) devraient conduire au site de localisation de la curcumine au sein des SLNs. De plus, il serait également intéressant d'observer les particules par cryo-TEM afin d'étudier leur structure interne pour voir notamment comment les SLNs sont distribuées au sein des microparticules. Des études de gonflement des microparticules à différents pH peuvent être envisagées pour déterminer le taux de gonflement des particules principalement à des pH acides auxquels a lieu la répulsion électrostatique entre les groupements  $\text{NH}_3^+$  et les SLNs, chargées négativement.

D'après ces résultats, nous pouvons dire que nous avons pu préparer un assemblage de taille micrométrique entre des SLNs encapsulant la curcumine et le chitosane en tant que moyen pour protéger et vectoriser les SLNs vers l'intestin. Il serait intéressant d'évaluer le potentiel du système par des tests *in vitro* et *in vivo* pour vérifier l'utilité de l'assemblage.

A plus long terme et pour développer ainsi que compléter ce travail, quelques pistes prometteuses peuvent être envisagées.

Tout d'abord, l'étude du transfert de la curcumine des SLNs et des microparticules encapsulant des SLNs vers le milieu extérieur à différents pH serait intéressante pour mettre en évidence l'effet de l'assemblage sur la vitesse de libération de la curcumine. Ensuite, la stabilité de la curcumine encapsulée dans les SLNs et des SLNs encapsulées dans des microparticules de chitosane doit être vérifiée dans des milieux simulant les sucs gastrique et intestinal sans enzymes. L'étude de la libération de la curcumine à partir des deux systèmes doit être réalisée dans des milieux simulant les sucs gastrique et intestinal en présence de pepsine (enzyme gastrique) et d'extrait de pancréatine (cocktail

enzymatique du suc intestinal) ou en présence de lipase seule. De plus, il semble intéressant de déterminer le pourcentage de curcumine solubilisée dans des micelles mixtes de sels biliaires et de phospholipides. Cela permettrait d'obtenir des informations sur la biodisponibilité relative de la curcumine. Une fois ces tests réalisés, il sera intéressant d'étudier l'activité anti-inflammatoire *in vitro* des deux systèmes sur des cellules intestinales en induisant l'inflammation par ajout des lipopolysaccharides. Cela permettra d'obtenir des informations sur l'efficacité de l'encapsulation de la curcumine et de mettre en évidence si le système a permis de protéger la curcumine contre la dégradation enzymatique, et si l'assemblage a permis d'améliorer l'accumulation de la curcumine au niveau des cellules inflammées. L'accumulation de la curcumine pourra être étudiée par fluorescence. Après les tests *in vitro*, une étude *in vivo* des deux systèmes apparaît nécessaire et ce, sur des souris utilisées comme des modèles inflammatoires. L'activité anti-inflammatoire sera évaluée en dosant le taux d'expression des gènes codant pour des facteurs jouant un rôle primordial dans l'inflammation tels que NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor-Kappa B) et TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ).

En parallèle et afin d'améliorer le système "nanoparticules dans microparticules", d'autres systèmes polymériques pourront être testés. Par exemple, le chitosane gonflant en milieu acide, il peut permettre une libération d'une certaine quantité de SLNs. Pour résoudre ce problème, il peut être envisagé d'ajouter un autre polymère qui ne gonfle pas aux pH acides tels que l'alginate ou la pectine. Des SLNs pourront être encapsulées dans des composites chitosane-alginate ou bien chitosane-pectine.

## **Références bibliographiques**

## ***Références bibliographiques***

1. Kawabata Y, Wada K, Nakatani M, Yamada S, Onoue S: **Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications.** *International Journal of Pharmaceutics* 2011, **420**:1-10.
2. Mehnert W, Maeder K: **Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications.** *Advanced Drug Delivery Reviews* 2012, **64**:83-101.
3. Shah R, Eldridge D, Palombo E, Harding I: *Lipid Nanoparticles: Production, Characterization and Stability.* Springer; 2015.
4. Westesen K: **Novel lipid-based colloidal dispersions as potential drug administration systems—expectations and reality.** *Colloid and Polymer Science* 2000, **278**:608-618.
5. Hillery AM, Lloyd AW, Swarbrick J: *Drug delivery and targeting: for pharmacists and pharmaceutical scientists.* CRC Press; 2002.
6. Reis CP, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F: **Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles.** *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 2006, **2**:8-21.
7. de Mendoza A, Campanero M, Mollinedo F, Blanco-Prieto M: *Lipid nanoparticles in biomedicine.* USA: American Scientific Publishers; 2010.
8. Washington C: **Stability of lipid emulsions for drug delivery.** *Advanced drug delivery reviews* 1996, **20**:131-145.
9. Magenheim B, Levy M, Benita S: **A new in vitro technique for the evaluation of drug release profile from colloidal carriers-ultrafiltration technique at low pressure.** *International journal of pharmaceutics* 1993, **94**:115-123.
10. Fonte P, Nogueira T, Gehm C, Ferreira D, Sarmiento B: **Chitosan-coated solid lipid nanoparticles enhance the oral absorption of insulin.** *Drug delivery and translational research* 2011, **1**:299-308.
11. Ramalingam P, Ko YT: **Enhanced Oral Delivery of Curcumin from N-trimethyl Chitosan Surface-Modified Solid Lipid Nanoparticles: Pharmacokinetic and Brain Distribution Evaluations.** *Pharmaceutical Research* 2015, **32**:389-402.
12. Billerey-Larmonier C, Uno JK, Larmonier N, Midura AJ, Timmermann B, Ghishan FK, Kiela PR: **Protective effects of dietary curcumin in mouse model of**

- chemically induced colitis are strain dependent.** *Inflammatory Bowel Diseases* 2008, **14**:780-793.
13. Westesen K, Siekmann B, Koch MHJ: **Investigations on the physical state of lipid nanoparticles by synchrotron radiation X-ray diffraction.** *Int J Pharm* 1993, **93**:189-199.
  14. Lucks S, Muller R: **Medication vehicles made of solid lipid particles (solid lipid nanospheres - SLN).** In *Book Medication vehicles made of solid lipid particles (solid lipid nanospheres - SLN)* (Editor ed.^eds.). City; 1993.
  15. Gasco MR: **Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution.** In *Book Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution* (Editor ed.^eds.). City: Google Patents; 1993.
  16. Joye IJ, Davidov-Pardo G, McClements DJ: **Nanotechnology for increased micronutrient bioavailability.** *Trends in Food Science & Technology* 2014, **40**:168-182.
  17. Hou D, Xie C, Huang K, Zhu C: **The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs).** *Biomaterials* 2003, **24**:1781-1785.
  18. Schwarz C, Mehnert W, Lucks JS, Muller RH: **Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization.** *Journal of Controlled Release* 1994, **30**:83-96.
  19. Dolatabadi JEN, Hamishehkar H, Eskandani M, Valizadeh H: **Formulation, characterization and cytotoxicity studies of alendronate sodium-loaded solid lipid nanoparticles.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2014, **117**:21-28.
  20. Souto EB, Severino P, Santana MHA, Pinho SC: **Solid lipid nanoparticles: Classical methods of lab production.** *Quimica Nova* 2011, **34**:1762-1769.
  21. Svilenov H, Tzachev C: **Solid Lipid Nanoparticles–A Promising Drug Delivery System.** *Nanomedicine* 2014.
  22. Muller RH, Mader K, Gohla S: **Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery- a review of the state of the art.** *Eur J Pharm Biopharm* 2000, **50**:161-177.
  23. Westesen K, Bunjes H, Koch MHJ: **Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential.** *Journal of Controlled Release* 1997, **48**:223-236.
  24. Guri A, Gulseren I, Corredig M: **Utilization of solid lipid nanoparticles for enhanced delivery of curcumin in cocultures of HT29-MTX and Caco-2 cells.** *Food & Function* 2013, **4**:1410-1419.

25. Muller RH, Runge SA: **Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery.** *SBenita (Ed), Submicron emulsions in drug targeting and delivery, Amsterdam: Harwood Academic Publishers 1998:219-234.*
26. Jenning V, Gysler A, Schafer-Korting M, Gohla S: **Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin.** *Eur J Pharm Biopharm 2000, 49:211-218.*
27. Zana R: *Dynamics of surfactant self-assemblies: micelles, microemulsions, vesicles and lyotropic phases.* CRC press; 2005.
28. Silva AC, Lopes CM, Lobo JM, Amaral MH: **Delivery systems for biopharmaceuticals. Part II: Liposomes, Micelles, Microemulsions and Dendrimers.** *Current Pharmaceutical Biotechnology 2015, 16:955-965.*
29. Adjonu R, Doran G, Torley P, Agboola S: **Whey protein peptides as components of nanoemulsions: A review of emulsifying and biological functionalities.** *Journal of Food Engineering 2014, 122:15-27.*
30. Shah P, Bhalodia D: **Nanoemulsion a pharmaceutical review.** *Sys Rev Pharm 2011, 1:24-31.*
31. Couvreur P, Dubernet C, Puisieux F: **Controlled drug-delivery with nanoparticles-current possibilities and future trends.** *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 1995, 41:2-13.*
32. Aditya N, Ko S: **Solid lipid nanoparticles (SLNs): delivery vehicles for food bioactives.** *RSC Advances 2015, 5:30902-30911.*
33. Yaghmur A, de Campo L, Sagalowicz L, Leser ME, Glatter O: **Control of the internal structure of MLO-based isosomes by the addition of diglycerol monooleate and soybean phosphatidylcholine.** *Langmuir 2006, 22:9919-9927.*
34. Muchow M, Maincent P, Müller RH: **Lipid nanoparticles with a solid matrix (SLN®, NLC®, LDC®) for oral drug delivery.** *Drug development and industrial pharmacy 2008, 34:1394-1405.*
35. Muller RH, Radtke M, Wissing SA: **Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and nanostructured carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations.** *AdvDrug Deliv 2002, 54:131-155.*
36. Muller RH, Radtke M, Wissing SA: **Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs.** *Int J Pharm 2002, 242:121-128.*
37. Manjunath K, Venkateswarlu V, Hussain A: **Preparation and characterization of nitrendipine solid lipid nanoparticles.** *Pharmazie 2011, 66:178-186.*



38. Xue HY, Wong HL: **Tailoring nanostructured solid-lipid carriers for time-controlled intracellular siRNA kinetics to sustain RNAi-mediated chemosensitization.** *Biomaterials* 2011, **32**:2662-2672.
39. Nekkanti V, Venkateshwarlu V, Pillai R: **Preparation, Characterization and In-Vivo Evaluation of Raloxifene Hydrochloride Solid Lipid Nanoparticles.** *Pharmaceutical Nanotechnology* 2013, **1**:68-77.
40. Jain A, Agarwal A, Majumder S, Lariya N, Khaya A, Agrawal H, Majumdar S, Agrawal GP: **Mannosylated solid lipid nanoparticles as vectors for site-specific delivery of an anti-cancer drug.** *Journal of Controlled Release* 2010, **148**:359-367.
41. Yu D-G, Williams GR, Yang J-H, Wang X, Yang J-M, Li X-Y: **Solid lipid nanoparticles self-assembled from electrosprayed polymer-based microparticles.** *Journal of Materials Chemistry* 2011, **21**:15957-15961.
42. Jensen LB, Magnusson E, Gunnarsson L, Vermehren C, Nielsen HM, Petersson K: **Corticosteroid solubility and lipid polarity control release from solid lipid nanoparticles.** *International journal of pharmaceutics* 2010, **390**:53-60.
43. Boonme P, Souto EB, Wuttisantikul N, Jongjit T, Pichayakorn W: **Influence of lipids on the properties of solid lipid nanoparticles from microemulsion technique.** *European Journal of Lipid Science and Technology* 2013, **115**:820-824.
44. Patel BD, Modi RV, Thakkar NA, Patel AA, Thakkar PH: **Development and characterization of solid lipid nanoparticles for enhancement of oral bioavailability of Raloxifene.** *Journal of pharmacy & bioallied sciences* 2012, **4**:S14.
45. Helgason T, Awad TS, Kristbergsson K, Decker EA, McClements DJ, Weiss J: **Impact of Surfactant Properties on Oxidative Stability of beta-Carotene Encapsulated within Solid Lipid Nanoparticles.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009, **57**:8033-8040.
46. Silva LFC, Kasten G, de Campos CEM, Chinelatto AL, Lemos-Senna E: **Preparation and characterization of quercetin-loaded solid lipid microparticles for pulmonary delivery.** *Powder Technology* 2013, **239**:183-192.
47. Kim J-K, Park J-S, Kim C-K: **Development of a binary lipid nanoparticles formulation of itraconazole for parenteral administration and controlled release.** *International journal of pharmaceutics* 2010, **383**:209-215.
48. Potta SG, Minemi S, Nukala RK, Peinado C, Lamprou DA, Urquhart A, Douroumis D: **Development of solid lipid nanoparticles for enhanced solubility of poorly soluble drugs.** *Journal of biomedical nanotechnology* 2010, **6**:634-640.

49. Carlotti ME, Sapino S, Ugazio E, Gallarate M, Morel S: **Resveratrol in solid lipid nanoparticles.** *Journal of Dispersion Science and Technology* 2012, **33**:465-471.
50. Jin S-E, Kim C-K: **Long-term stable cationic solid lipid nanoparticles for the enhanced intracellular delivery of SMAD3 antisense oligonucleotides in activated murine macrophages.** *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* 2012, **15**:467-482.
51. Gokce EH, Korkmaz E, Dellera E, Sandri G, Bonferoni MC, Ozer O: **Resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles versus nanostructured lipid carriers: evaluation of antioxidant potential for dermal applications.** *International journal of nanomedicine* 2012, **7**:1841.
52. Zhuang C-Y, Li N, Wang M, Zhang X-N, Pan W-S, Peng J-J, Pan Y-S, Tang X: **Preparation and characterization of vinpocetine loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for improved oral bioavailability.** *International journal of pharmaceutics* 2010, **394**:179-185.
53. Kovacevic AB, Muller RH, Savic SD, Vuleta GM, Keck CM: **Solid lipid nanoparticles (SLN) stabilized with polyhydroxy surfactants: Preparation, characterization and physical stability investigation.** *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* 2014, **444**:15-25.
54. Shah KA, Joshi MD, Patravale VB: **Biocompatible microemulsions for fabrication of glyceryl monostearate solid lipid nanoparticles (SLN) of tretinoin.** *Journal of biomedical nanotechnology* 2009, **5**:396-400.
55. Hu L, Xing Q, Meng J, Shang C: **Preparation and enhanced oral bioavailability of cryptotanshinone-loaded solid lipid nanoparticles.** *AAPS PharmSciTech* 2010, **11**:582-587.
56. Kasongo KW, Pardeike J, Müller RH, Walker RB: **Selection and characterization of suitable lipid excipients for use in the manufacture of didanosine-loaded solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers.** *Journal of pharmaceutical sciences* 2011, **100**:5185-5196.
57. Battaglia L, Gallarate M, Cavalli R, Trotta M: **Solid lipid nanoparticles produced through a coacervation method.** *Journal of microencapsulation* 2010, **27**:78-85.
58. Chirio D, Gallarate M, Peira E, Battaglia L, Serpe L, Trotta M: **Formulation of curcumin-loaded solid lipid nanoparticles produced by fatty acids coacervation technique.** *Journal of microencapsulation* 2011, **28**:537-548.
59. Pardeike J, Weber S, Haber T, Wagner J, Zarfl H, Plank H, Zimmer A: **Development of an itraconazole-loaded nanostructured lipid carrier (NLC)**

- formulation for pulmonary application.** *International journal of pharmaceutics* 2011, **419**:329-338.
60. Doktorovová S, Araújo J, Garcia ML, Rakovský E, Souto EB: **Formulating fluticasone propionate in novel PEG-containing nanostructured lipid carriers (PEG-NLC).** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2010, **75**:538-542.
  61. Chawla V, Saraf SA: **Rheological studies on solid lipid nanoparticle based carbopol gels of aceclofenac.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2012, **92**:293-298.
  62. Soares S, Fonte P, Costa A, Andrade J, Seabra V, Ferreira D, Reis S, Sarmiento B: **Effect of freeze-drying, cryoprotectants and storage conditions on the stability of secondary structure of insulin-loaded solid lipid nanoparticles.** *International journal of pharmaceutics* 2013, **456**:370-381.
  63. Sarmiento B, Mazzaglia D, Bonferoni MC, Neto AP, do Céu Monteiro M, Seabra V: **Effect of chitosan coating in overcoming the phagocytosis of insulin loaded solid lipid nanoparticles by mononuclear phagocyte system.** *Carbohydrate Polymers* 2011, **84**:919-925.
  64. Kalam MA, Sultana Y, Ali A, Aqil M, Mishra AK, Chuttani K: **Preparation, characterization, and evaluation of gatifloxacin loaded solid lipid nanoparticles as colloidal ocular drug delivery system.** *Journal of drug targeting* 2010, **18**:191-204.
  65. Xie S, Zhu L, Dong Z, Wang Y, Wang X, Zhou W: **Preparation and evaluation of ofloxacin-loaded palmitic acid solid lipid nanoparticles.** *International journal of nanomedicine* 2011, **6**:547.
  66. Kuo Y-C, Ko H-F: **Targeting delivery of saquinavir to the brain using 83-14 monoclonal antibody-grafted solid lipid nanoparticles.** *Biomaterials* 2013, **34**:4818-4830.
  67. Kuo Y-C, Chung J-F: **Physicochemical properties of nevirapine-loaded solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2011, **83**:299-306.
  68. Siddiqui A, Alayoubi A, El-Malah Y, Nazzal S: **Modeling the effect of sonication parameters on size and dispersion temperature of solid lipid nanoparticles (SLNs) by response surface methodology (RSM).** *Pharmaceutical development and technology* 2014, **19**:342-346.
  69. Siddiqui A, Gupta V, Liu Y-Y, Nazzal S: **Doxorubicin and MBO-asGCS oligonucleotide loaded lipid nanoparticles overcome multidrug resistance in**

- adriamycin resistant ovarian cancer cells (NCI/ADR-RES).** *International journal of pharmaceutics* 2012, **431**:222-229.
70. Sanna V, Caria G, Mariani A: **Effect of lipid nanoparticles containing fatty alcohols having different chain length on the ex vivo skin permeability of Econazole nitrate.** *Powder Technology* 2010, **201**:32-36.
71. Siddiqui A, Alayoubi A, Nazzal S: **The effect of emulsifying wax on the physical properties of CTAB-based solid lipid nanoparticles (SLN).** *Pharmaceutical development and technology* 2014, **19**:125-128.
72. Farboud ES, Nasrollahi SA, Tabbakhi Z: **Novel formulation and evaluation of a Q10-loaded solid lipid nanoparticle cream: in vitro and in vivo studies.** *International journal of nanomedicine* 2011, **6**:611.
73. Severino P, Santana MHA, Souto EB: **Optimizing SLN and NLC by 22 full factorial design: Effect of homogenization technique.** *Materials Science and Engineering: C* 2012, **32**:1375-1379.
74. Zhang J, Smith E: **Percutaneous permeation of betamethasone 17-valerate incorporated in lipid nanoparticles.** *Journal of pharmaceutical sciences* 2011, **100**:896-903.
75. Kheradmandnia S, Vasheghani-Farahani E, Nosrati M, Atyabi F: **Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax.** *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 2010, **6**:753-759.
76. Lacerda S, Cerize N, Ré M: **Preparation and characterization of carnauba wax nanostructured lipid carriers containing benzophenone-3.** *International journal of cosmetic science* 2011, **33**:312-321.
77. Dora CL, Putaux J-L, Pignot-Paintrand I, Dubreuil F, Soldi V, Borsali R, Lemos-Senna E: **Physicochemical and morphological characterizations of glyceryl tristearate/castor oil nanocarriers prepared by the solvent diffusion method.** *Journal of the Brazilian Chemical Society* 2012, **23**:1972-1981.
78. Han C, Qi C, Zhao B, Cao J, Xie S, Wang S, Zhou W: **Hydrogenated castor oil nanoparticles as carriers for the subcutaneous administration of tilmicosin: in vitro and in vivo studies.** *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 2009, **32**:116-123.
79. Xie S, Pan B, Wang M, Zhu L, Wang F, Dong Z, Wang X, Zhou W: **Formulation, characterization and pharmacokinetics of praziquantel-loaded hydrogenated castor oil solid lipid nanoparticles.** *Nanomedicine* 2010, **5**:693-701.

80. Mandawgade SD, Patravale VB: **Development of SLNs from natural lipids: application to topical delivery of tretinoin.** *International journal of pharmaceutics* 2008, **363**:132-138.
81. How CW, Rasedee A, Abbasalipourkabir R: **Characterization and cytotoxicity of nanostructured lipid carriers formulated with olive oil, hydrogenated palm oil, and polysorbate 80.** *NanoBioscience, IEEE Transactions on* 2013, **12**:72-78.
82. Rahman HS, Rasedee A, How CW, Abdul AB, Zeenathul NA, Othman HH, Saeed MI, Yeap SK: **Zerumbone-loaded nanostructured lipid carriers: preparation, characterization, and antileukemic effect.** *International journal of nanomedicine* 2013, **8**:2769.
83. Kuo Y-C, Chung C-Y: **Solid lipid nanoparticles comprising internal Compritol 888 ATO, tripalmitin and cacao butter for encapsulating and releasing stavudine, delavirdine and saquinavir.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2011, **88**:682-690.
84. Kim B-D, Na K, Choi H-K: **Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles (SLN) made of cacao butter and curdlan.** *European journal of pharmaceutical sciences* 2005, **24**:199-205.
85. Raffin RP, Lima A, Lorenzoni R, Antonow MB, Turra C, Alves MP, Fagan SB: **Natural Lipid Nanoparticles Containing Nimesulide: Synthesis, Characterization and In Vivo Antiedematogenic and Antinociceptive Activities.** *Journal of Biomedical Nanotechnology* 2012, **8**:309-315.
86. Attama AA, Reichl S, Müller-Goymann CC: **Diclofenac sodium delivery to the eye: in vitro evaluation of novel solid lipid nanoparticle formulation using human cornea construct.** *International journal of pharmaceutics* 2008, **355**:307-313.
87. Zhang L, Hayes DG, Chen G, Zhong Q: **Transparent dispersions of milk-fat-based nanostructured lipid carriers for delivery of  $\beta$ -carotene.** *Journal of agricultural and food chemistry* 2013, **61**:9435-9443.
88. Kapseu C, Nono Y, Parmentier M, Dirand M: **Dellacherie. Fatty acids and triglycerides of Cameroon shea butter.** *ReV Ital Sostanze Grasse* 2001, **78**:31-34.
89. Di Vincenzo D, Maranz S, Serraiocco A, Vito R, Wiesman Z, Bianchi G: **Regional variation in shea butter lipid and triterpene composition in four African countries.** *Journal of agricultural and food chemistry* 2005, **53**:7473-7479.

90. Honfo FG, Akissoe N, Linnemann AR, Soumanou M, Boekel MAJSV: **Nutritional Composition of Shea Products and Chemical Properties of Shea Butter: A Review.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2014, **54**:673-686.
91. Alander J: **Shea butter-a multifunctional ingredient for food and cosmetics.** *Lipid Technology* 2004, **16**:202-205.
92. Alander J, Andersson A-C: **The shea butter family. The complete emollient range for skin care formulations.** *Cosmetics and Toiletries Manufacture Worldwide* 2002, **1**:28-32.
93. Maranz S, Wiesman Z, Garti N: **Phenolic constituents of shea (*Vitellaria paradoxa*) kernels.** *Journal of agricultural and food chemistry* 2003, **51**:6268-6273.
94. Lopez C, Bourgaux C, Lesieur P, Bernadou S, Keller G, Ollivon M: **Thermal and Structural Behavior of Milk Fat: 3. Influence of Cooling Rate and Droplet Size on Cream Crystallization.** *Journal of Colloid and Interface Science* 2002, **254**:64-78.
95. Qian C, Decker EA, Xiao H, McClements DJ: **Impact of lipid nanoparticle physical state on particle aggregation and beta-carotene degradation: Potential limitations of solid lipid nanoparticles.** *Food Research International* 2013, **52**:342-349.
96. Salminen H, Helgason T, Aulbach S, Kristinsson B, Kristbergsson K, Weiss J: **Influence of co-surfactants on crystallization and stability of solid lipid nanoparticles.** *Journal of Colloid and Interface Science* 2014, **426**:256-263.
97. Lopes R, Eleutério CV, Gonçalves LMD, Cruz MEM, Almeida AJ: **Lipid nanoparticles containing oryzalin for the treatment of leishmaniasis.** *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2011, **45**:442-450.
98. Kumar S, Randhawa JK: **Preparation and characterization of Paliperidone loaded solid lipid nanoparticles.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2012, **102**:562-568.
99. Muthuprasanna P, Mishra M, Prabha KS, Rani PS, Babu IAS, Chandiran IS, Arunachalam G, Shalini S: **Basics and Potential Applications of Surfactants - A Review.** *International Journal of PharmTech Research* 2009, **1**:1354-1365.
100. Griffin WC: **Classification of surface-active agents by" HLB".** *J Soc Cosmetic Chemists* 1946, **1**:311-326.

101. Davies J: **A quantitative kinetic theory of emulsion type, I. Physical chemistry of the emulsifying agent.** In *Gas/Liquid and Liquid/Liquid Interface Proceedings of the International Congress of Surface Activity*. 1957: 426-438.
102. Effendy I, Maibach HI: **Surfactants and experimental irritant contact dermatitis.** *Contact dermatitis* 1995, **33**:217-225.
103. Zhang J, Liu J, Li X, Jasti B: **Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles containing silibinin.** *Drug delivery* 2007, **14**:381-387.
104. Montenegro L, Sarpietro M, Ottimo S, Puglisi G, Castelli F: **Differential scanning calorimetry studies on sunscreen loaded solid lipid nanoparticles prepared by the phase inversion temperature method.** *International journal of pharmaceutics* 2011, **415**:301-306.
105. Montenegro L, Trapani A, Latrofa A, Puglisi G: **In vitro evaluation on a model of blood brain barrier of idebenone-loaded solid lipid nanoparticles.** *Journal of nanoscience and nanotechnology* 2012, **12**:330-337.
106. Lv Q, Yu A, Xi Y, Li H, Song Z, Cui J, Cao F, Zhai G: **Development and evaluation of penciclovir-loaded solid lipid nanoparticles for topical delivery.** *International Journal of Pharmaceutics* 2009, **372**:191-198.
107. Ma P, Dong X, Swadley CL, Gupte A, Leggas M, Ledebur HC, Mumper RJ: **Development of idarubicin and doxorubicin solid lipid nanoparticles to overcome Pgp-mediated multiple drug resistance in leukemia.** *Journal of biomedical nanotechnology* 2009, **5**:151.
108. Üner M, Wissing S, Yener G, Müller R: **Influence of surfactants on the physical stability of solid lipid nanoparticle (SLN) formulations.** *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences* 2004, **59**:331-332.
109. Yassin AEB, Anwer MK, Mowafy HA, El-Bagory IM, Bayomi MA, Alsarra IA: **Optimization of 5-fluorouracil solid-lipid nanoparticles: a preliminary study to treat colon cancer.** *International journal of medical sciences* 2010, **7**:398.
110. del Pozo-Rodríguez A, Delgado D, Solinís MÁ, Pedraz JL, Echevarría E, Rodríguez JM, Gascón AR: **Solid lipid nanoparticles as potential tools for gene therapy: in vivo protein expression after intravenous administration.** *International journal of pharmaceutics* 2010, **385**:157-162.
111. Joshi M, Patravale V: **Nanostructured lipid carrier (NLC) based gel of celecoxib.** *International journal of pharmaceutics* 2008, **346**:124-132.
112. Küchler S, Radowski MR, Blaschke T, Dathe M, Plendl J, Haag R, Schäfer-Korting M, Kramer KD: **Nanoparticles for skin penetration enhancement—a**

- comparison of a dendritic core-multishell-nanotransporter and solid lipid nanoparticles.** *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2009, **71**:243-250.
113. Sharma P, Ganta S, Denny WA, Garg S: **Formulation and pharmacokinetics of lipid nanoparticles of a chemically sensitive nitrogen mustard derivative: Chlorambucil.** *International journal of pharmaceutics* 2009, **367**:187-194.
114. Li H, Zhao X, Ma Y, Zhai G, Li L, Lou H: **Enhancement of gastrointestinal absorption of quercetin by solid lipid nanoparticles.** *Journal of Controlled Release* 2009, **133**:238-244.
115. Schoenitz M, Joseph S, Nitz A, Bunjes H, Scholl S: **Controlled polymorphic transformation of continuously crystallized solid lipid nanoparticles in a microstructured device: A feasibility study.** *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2014, **86**:324-331.
116. Shafiq S, Shakeel F, Talegaonkar S, Ahmad FJ, Khar RK, Ali M: **Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation.** *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2007, **66**:227-243.
117. Xie S, Wang S, Zhao B, Han C, Wang M, Zhou W: **Effect of PLGA as a polymeric emulsifier on preparation of hydrophilic protein-loaded solid lipid nanoparticles.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2008, **67**:199-204.
118. Triplett II MD, Rathman JF: **Optimization of  $\beta$ -carotene loaded solid lipid nanoparticles preparation using a high shear homogenization technique.** *Journal of Nanoparticle Research* 2009, **11**:601-614.
119. Müller R, Runge S, Ravelli V, Thünemann A, Mehnert W, Souto E: **Cyclosporine-loaded solid lipid nanoparticles (SLN®): drug-lipid physicochemical interactions and characterization of drug incorporation.** *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2008, **68**:535-544.
120. Cerreto F, Paolicelli P, Cesa S, Amara HMA, D'Auria FD, Simonetti G, Casadei MA: **Solid lipid nanoparticles as effective reservoir systems for long-term preservation of multidose formulations.** *AAPS PharmSciTech* 2013, **14**:847-853.
121. Paolicelli P, Cerreto F, Cesa S, Feeney M, Corrente F, Marianecchi C, Casadei MA: **Influence of the formulation components on the properties of the system SLN-dextran hydrogel for the modified release of drugs.** *Journal of microencapsulation* 2009, **26**:355-364.
122. Gramdorf S, Kumpugdee-Vollrath M, Bilek H, Perlich J: **Influence of emulsifiers on the crystallization of solid lipid nanoparticles (SLN).** *Annual Report HASYLAB, DESY* 2010.



123. Kristl J, Teskac K, Milek M, Mlinaric-Rascan I: **Surface active stabilizer tyloxapol in colloidal dispersions exerts cytostatic effects and apoptotic dismissal of cells.** *Toxicology and applied pharmacology* 2008, **232**:218-225.
124. Kwon TK, Lim KB, Kim J-C: **Solid lipid nanoparticles coated with silk fibroin.** *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 2011, **17**:10-13.
125. Rodríguez Gascón A, Solinís AMA, Del Pozo RA, San D, Diego V, Pedraz Muñoz JL: **Lipid nanoparticles in gene therapy.** In *Book Lipid nanoparticles in gene therapy* (Editor ed.^eds.), vol. EP 2460516. City: Universidad, Del Pais Vasco 2012.
126. Liu D, Liu Z, Wang L, Zhang C, Zhang N: **Nanostructured lipid carriers as novel carrier for parenteral delivery of docetaxel.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2011, **85**:262-269.
127. Alex MA, Chacko A, Jose S, Souto E: **Lopinavir loaded solid lipid nanoparticles (SLN) for intestinal lymphatic targeting.** *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2011, **42**:11-18.
128. Friberg S, Mandell L, Larsson M: **Mesomorphic phases, a factor of importance for the properties of emulsions.** *Journal of Colloid and Interface Science* 1969, **29**:155-156.
129. Friberg S, Mandell L: **Phase equilibria and their influence on the properties of emulsions.** *Journal of the American Oil Chemists Society* 1970, **47**:149-152.
130. Friberg S: **Liquid crystalline phases in emulsions.** *Journal of colloid and interface Science* 1971, **37**:291-295.
131. Rydhag L, Wilton I: **The function of phospholipids of soybean lecithin in emulsions.** *J Am Oil Chem Soc* 1981, **58**:830-837.
132. Mukherjee S, Ray S, Thakur RS: **Solid lipid nanoparticles: A modern formulation approach in drug delivery system.** *Ind J Pharm Sci* 2009, **71**:349-358.
133. Lander R, Manger W, Scouloudis M, Ku A, Davis C, Lee A: **Gaulin homogenization: a mechanistic study.** *Biotechnol Prog* 2000, **16**:80-85.
134. Mullen zA: **Feste Lipid-Nanopartikel mit prolongierter Wirkstoffliberation: Herstellung, Langzeitstabilitat, Charakterisierung, Freisetzungsverhalten und mechanismen.** *PhD Thesis, Free University of Berlin* 1996.
135. Eldem T, Speiser P, Hincal A: **Optimization of spray-dried and congealed lipid microparticles and characterization of their surface morphology by scanning electron microscopy.** *Pharm Res* 1991, **8**:47-54.

136. Speiser P: **Lipidnanopellets als Tragersystem fur Arzneimittel zur peroralem Anwendung.** *European Patent No EP 0167825* 1990.
137. Sjoström B, Bergenstahl B: **Preparation of submicron drug particles in lecithin-stabilized o/w emulsions. I. Model studies of the precipitation of cholesteryl acetate.** *Int J Pharm* 1992, **88**:53-62.
138. Trotta M, Cavalli R, Trotta C, Bussano R, Costa L: **Electrospray technique for solid lipid-based particle production.** *Drug development and industrial pharmacy* 2010, **36**:431-438.
139. Gasco MR: **Solid lipid nanospheres from warm microemulsions.** *Pharm Tech Eur* 1997, **9**:52-58.
140. Fessi H, Puisieux F, Ammoury N, Benita S: **Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement.** *Int J Pharm* 1995, **55**:R1-R4.
141. Mehnert W, Mader K: **Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications.** *Adv Drug Deliv Rev* 2001, **47**:165-196.
142. Pardeshi C, Rajput P, Belgamwar V, Tekade A, Patil G, Chaudhary K, Sonje A: **Solid lipid based nanocarriers: An overview.** *Acta Pharm* 2012, **62**:433-472.
143. Chapman D: **The Polymorphism of Glycerides.** *Chemical Reviews* 1962, **62**:433-456.
144. Wong HL, Li Y, Bendayan R, Rauth MA, Wu XY: **Solid Lipid Nanoparticles for Anti-Tumor Drug Delivery.** 2007.
145. Jennings V, Gohla S: **Comparison of wax and glyceride solid lipid nanoparticles (SLN®).** *International journal of pharmaceutics* 2000, **196**:219-222.
146. Helgason T, Awad TS, Kristbergsson K, McClements DJ, Weiss J: **Effect of surfactant surface coverage on formation of solid lipid nanoparticles (SLN).** *Journal of Colloid and Interface Science* 2009, **334**:75-81.
147. Laserra S, Basit A, Sozio P, Marinelli L, Fornasari E, Cacciatore I, Ciulla M, Türkez H, Geyikoglu F, Di Stefano A: **Solid lipid nanoparticles loaded with lipoyl-memantine codrug: Preparation and characterization.** *International journal of pharmaceutics* 2015, **485**:183-191.
148. Olbrich C, Müller RH: **Enzymatic degradation of SLN – Effect of surfactant and surfactant mixtures.** *Int J Pharm* 1999, **180**:31-39.
149. Waraho T, McClements DJ, Decker EA: **Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions.** *Trends in Food Science & Technology* 2011, **22**:3-13.

150. Dimakou CP, Kiokias SN, Tsaprouni IV, Oreopoulou V: **Effect of processing and storage parameters on the oxidative deterioration of oil-in-water emulsions.** *Food Biophysics* 2007, **2**:38-45.
151. Nuchi CD, McClements DJ, Decker EA: **Impact of Tween 20 hydroperoxides and iron on the oxidation of methyl linoleate and salmon oil dispersions.** *Journal of agricultural and food chemistry* 2001, **49**:4912-4916.
152. Radomska-Soukharev A: **Stability of lipid excipients in solid lipid nanoparticles.** *Adv Drug DelRev* 2007, **59**:411-418.
153. Westesen K, Siekmann B: **Investigation of the gel formation of phospholipid-stabilized solid lipid nanoparticles.** *International Journal of Pharmaceutics* 1997, **151**:35-45.
154. Freitas C, Muller RH: **Correlation between long term stability of solid lipid nanoparticles (SLN) and crystallinity of lipid phase.** *Eur J Pharm Biopharm* 1999, **47**:125-132.
155. Freitas C, Muller RH: **Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability of solid lipid nanoparticle (SLNTM) dispersions.** *Int J Pharm* 1998, **168**:221-229.
156. Freitas C, Muller RH: **Stability determination of solid lipid nanoparticles (SLN) in aqueous dispersion after addition of electrolyte.** *J Microencapsul* 1999, **16**:59-71.
157. Bunjes H, Westesen K, Koch MHJ: **Crystallization tendencies and polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles.** *Int J Pharm* 1996, **129**:159-173.
158. Westesen K, Siekmann B: **Investigation of the gel formation of phospholipid-stabilized solid lipid nanoparticles.** *Int J Pharm* 1997, **151**:35-45.
159. Muller RH, Heinemann S: **Fat emulsions for parenteral nutrition. III. Lipofundin MCT/ LCT regimens for total parenteral nutrition (TPN) with low electrolyte load.** *Int J Pharm* 1994, **101**:175-189.
160. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust J-E, Benoit JP: **Physico-chemical stability of colloidal lipid particles.** *Biomaterials* 2003, **24**:4283-4300.
161. Freitas C, Lucks J, Muller RH: **Effect of storage conditions on long-term stability of "solid lipid nanoparticles" (SLN) in aqueous dispersion.** *Eur J Pharm Sci* 1994, **2**:117-194.
162. Siekmann B, Westesen K: **Thermoanalysis of recrystallization process of melt homogenised glyceride nanoparticles.** *Colloid Surface B* 1994, **3**:159-175.

163. Shulkin PM, Seltzer SE, Davis MA, Adams DF: **Lyophilized liposomes: a new method for long-term vesicular storage.** *Journal of microencapsulation* 1984, **1**:73-80.
164. Schwarz C, Mehnert W: **Freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLN).** *International Journal of Pharmaceutics* 1997, **157**:171-179.
165. Cavalli R, Caputo O, Carlotti ME, Trotta M, Scarnecchia C, Gasco MR: **Sterilization and freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles.** *International Journal of Pharmaceutics* 1997, **148**:47-54.
166. Crowe LM, Womersley C, Crowe JH, Reid D, Appel L, Rudolph A: **Prevention of Fusion and Leakage in Freeze-Dried Liposomes by Carbohydrates.** *Biochimica Et Biophysica Acta* 1986, **861**:131-140.
167. Madden TD, Bally MB, Hope MJ, Cullis PR, Schieren HP, Janoff AS: **Protection of Large Unilamellar Vesicles by Trehalose During Dehydration - Retention of Vesicle Contents.** *Biochimica Et Biophysica Acta* 1985, **817**:67-74.
168. Strauss G, Schurtenberger P, Hauser H: **The Interaction of Saccharides with Lipid Bilayer Vesicles - Stabilization During Freeze-Thawing and Freeze-Drying.** *Biochimica Et Biophysica Acta* 1986, **858**:169-180.
169. Mobley WC, Schreier H: **Phase transition temperature reduction and glass formation in dehydroprotected lyophilized liposomes.** *Journal of Controlled Release* 1994, **31**:73-87.
170. Crowe LM, Crowe JH, Rudolph A, Womersley C, Appel L: **Preservation of Freeze-Dried Liposomes by Trehalose.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1985, **242**:240-247.
171. Aditya N, Aditya S, Yang H, Kim HW, Park SO, Ko S: **Co-delivery of hydrophobic curcumin and hydrophilic catechin by a water-in-oil-in-water double emulsion.** *Food chemistry* 2015, **173**:7-13.
172. Sun Y, Xia Z, Zheng J, Qiu P, Zhang L, McClements DJ, Xiao H: **Nanoemulsion-based delivery systems for nutraceuticals: Influence of carrier oil type on bioavailability of pterostilbene.** *Journal of Functional Foods* 2015, **13**:61-70.
173. Chattopadhyay I, Biswas K, Bandyopadhyay U, Banerjee RK: **Turmeric and curcumin Biological actions and medicinal applications.** *Curr Sci* 2004, **87**:44-50.
174. Gupta SC, Kismali G, Aggarwal BB: **Curcumin, a component of turmeric: From farm to pharmacy.** *Biofactors* 2013, **39**:2-13.

175. Jurenka JS: **Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: A review of preclinical and clinical research.** *Altern Med Rev* 2009, **14**:141-153.
176. Wilken R, Veena MS, Wang MB, Srivatsan ES: **Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma.** *Molecular Cancer* 2011, **10**.
177. Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H: **Curcumin: The Indian solid gold.** *Adv Exp Med Biol* 2007, **595**:1-75.
178. Sreejayan RMN: **Curcuminoids as potent inhibitors of lipid peroxidation.** *J Pharm Pharmacol* 1994, **46**:1013-1016.
179. Masuda T, T M, Hidaka K, Bando H, Takeda Y, Yamaguchi H: **Chemical studies on antioxidant mechanisms of curcumin: analysis of oxidative coupling products from curcumin and linoleate.** *J Agric Food Chem* 2001, **49**:2539-2547.
180. Joe B, Vijaykumar M, Lokesh BR: **Biological properties of curcumin—cellular and molecular mechanisms of action.** *Crit Rev Food Sci Nut* 2004, **44**:97-111.
181. Gupta SC, Prasad S, Kim JH, Patchva S, Webb LJ, Priyadarsini IK, Aggarwal BB: **Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies.** *Natural Product Reports* 2011, **28**:1937-1955.
182. Chan MM, Huang HI, Fenton MR, Fong D: **In vivo inhibition of nitric oxide synthase gene expression by curcumin, a cancer preventive natural product with anti-inflammatory properties.** *Biochem Pharmacol* 1998, **55**:1955-1962.
183. Plummer SM, Holloway KA, Manson MM, Munks RJ, Kaptein A, Farrow S, Howells L: **Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF-kappaB activation via the NIK/IKK signalling complex.** *Oncogene* 1999, **18**:6013-6020.
184. Chan MM: **Inhibition of tumor necrosis factor by curcumin, a phytochemical.** *Biochem Pharmacol* 1995, **49**:1551-1556.
185. Rao CV: **Regulation of COX and LOX by curcumin.** *Adv Exp Med Biol* 2007, **595**:213-226.
186. Koeberle A, Northoff H, Werz O: **Curcumin blocks prostaglandin E2 biosynthesis through direct inhibition of the microsomal prostaglandin E2 synthase-1.** *Mol Cancer Ther* 2009, **8**:2348-2355.
187. Aggarwal S, Takada Y, Singh S, Myers JN, Aggarwal BB: **Inhibition of growth and survival of human head and neck squamous cell carcinoma cells by**

- curcumin via modulation of nuclear factor-kB signaling.** *Int J Cancer* 2004, **111**:679-692.
188. Mukhopadhyay A, Bueso-Ramos C, Chatterjee D, Pantazis P, Aggarwal BB: **Curcumin downregulates cell survival mechanisms in human prostate cancer cell lines.** *Oncogene* 2001, **20**:7597-7609.
189. Siwak DR, Shishodia S, Aggarwal BB, Kuzrock R: **Curcumin-induced antiproliferative and proapoptotic effects in melanoma cells are associated with suppression of IkappaB kinase and nuclear factor kappaB activity and are independent of the B-Raf/mitogen-activated/ extracellular signal-regulated protein kinase pathway and the Akt pathway.** *cancer* 2005, **104**:879-890.
190. Lin YG, Kunnumakkara AB, Nair A, Merritt WM, Han LY, Armaiz-Pena GN, Kamat AA, Spannuth WA, Gershenson DM, Lutgendorf SK, et al: **Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in ovarian carcinoma by targeting the nuclear factor-kappaB pathway.** *Clin Cancer Res* 2007, **13**:3423-3430.
191. Mohandas KM, Desai DC: **Epidemiology of digestive tract cancers in India. V. Large and small bowel.** *Indian J Gastroenterol* 1999, **18**:118-121.
192. Epstein J, Sanderson IR, MacDonald TT: **Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies.** *British Journal of Nutrition* 2010b, **103**:1545-1557.
193. Epstein J, Docena G, MacDonald TT, Sanderson IR: **Curcumin suppresses p38 mitogen-activated protein kinase activation, reduces IL-1 $\beta$  and matrix metalloproteinase-3 and enhances IL-10 in the mucosa of children and adults with inflammatory bowel disease.** *British Journal of Nutrition* 2010a, **103**:824-832.
194. Holt PR, Katz S, Kirshoff R: **Curcumin therapy in inflammatory bowel disease: A pilot study.** *Digestive Diseases and Sciences* 2005, **50**:2191-2193.
195. Tolaimate A, Desbrieres J, Rhazi M, Alagui A: **Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties.** *Polymers* 2003, **44**:7939-7952.
196. Tan SC, Khor E, Tan TK, Wong SM: **The degree of deacetylation of chitosan: advocating the first derivative UV-spectrophotometry method of determination.** *Talanta* 1998, **45**:713-719.
197. Rinaudo M: **Chitin and chitosan: Properties and applications.** *Prog Polym Sci* 2006, **31**:603-632.

198. Gavhane Yogeshkumar N, Gurav Atul S, Yadav Adhikrao V: **Chitosan and Its Applications: A Review of Literature.** *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences* 2013, **4**:312-331.
199. Sorlier P, Denuziare A, Viton C, Domard A: **Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan.** *Biomacromolecules* 2001, **2**:765-772.
200. Duhalt RV, Tinoco R, Antonio PL, Topoleki D, Payn GF: **Enzyme conjugation to the polysaccharide chitosan: smart biocatalysts and biocatalytic hydrogels.** *Bioconjugate Chem* 2001, **12**:301-306.
201. Pa JH, Yu LT: **Light Scattering Study of Chitosan in Acetic Acid Aqueous Solutions.** *MacromolChemPhys* 2001, **202**:985-991.
202. Ueno H, Mori T, Fujinaga T: **Topical formulations and wound healing applications of chitosan.** *Adv Drug DelRev* 2001, **52**:105-115.
203. Kean T, Thanou M: **Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan.** *Advanced Drug Delivery Reviews* 2010, **62**:3-11.
204. Boot RG, Blommaert EF, Swart E, Ghauharali-van der Vlugt K, Bijl N, Moe C, Place A, Aerts JM: **Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase.** *J Biol Chem* 2001, **276**:6770-6778.
205. Stirling JL: **N-diacetylchitobiase activity in Tay–Sachs disease and Sandhoff's disease.** *BiochemJ* 1974, **141**:597-599.
206. Hollak CE, Van Weely S, Van Oers MH, Aerts JM: **Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease.** *J Clin Invest* 1994, **93**:1288-1292.
207. Yang YM, Hu W, Wang XD, Gu XS: **The controlling biodegradation of chitosan fibers by n-acetylation in vitro and in vivo.** *J Mater Sci Mater Med* 2007, **18**:2117-2121.
208. Rao SB, Sharma CP: **Use of chitosan as a biomaterial: Studies on its safety and hemostatic potential.** *Journal of biomedical materials research* 1997, **34**:21-28.
209. Pawel W, Barbara K, Katarzyna H-C-W: **Chitosan as a Lipid Binder: A Langmuir Monolayer Study of Chitosan-Lipid Interactions.** *Biomacromolecules* 2007, **8**:2611-2617.
210. Mertins O, Dimova R: **Insights on the Interactions of Chitosan with Phospholipid Vesicles. Part I: Effect of Polymer Deprotonation.** *Langmuir* 2013a.

211. Mertins O, Dimova R: **Insights on the Interactions of Chitosan with Phospholipid Vesicles. Part II: Membrane Stiffening and Pore Formation.** *Langmuir* 2013b.
212. Silva CA, Nobre TM, Pavinatto FJ, Oliviera ON: **Interaction of chitosan and mucin in a biomembrane model environment.** *Journal of Colloid and Interface Science* 2012, **376**:289-295.
213. Marin FDR, Luquet G, Marie B, Medakovic D: **Molluscan Shell Proteins: Primary Structure, Origin, and Evolution.** *Current Topics in Developmental Biology* 2007, **80**:209.
214. Chuah LH, Billa N, Roberts CJ, Burley JC, Manickam S: **Curcumin-containing chitosan nanoparticles as a potential mucoadhesive delivery system to the colon.** *Pharmaceutical Development and Technology* 2013, **18**:591-599.
215. Bernkop-Schnuerch A, Duennhaupt S: **Chitosan-based drug delivery systems.** *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2012, **81**:463-469.
216. Butcher AL, Offeddu GS, Oyen ML: **Nanofibrous hydrogel composites as mechanically robust tissue engineering scaffolds.** *Trends in Biotechnology* 2014, **32**:564-570.
217. Jiang Q, Reddy N, Yang Y: **Cytocompatible cross-linking of electrospun zein fibers for the development of water-stable tissue engineering scaffolds.** *Acta Biomaterialia* 2010, **6**:4042-4051.
218. Martinez AW, Caves JM, Ravi S, Li W, Chaikof EL: **Effects of crosslinking on the mechanical properties, drug release and cytocompatibility of protein polymers.** *Acta Biomaterialia* 2014, **10**:26-33.
219. Kilicarslan M, Gumustas M, Yildiz S, Baykara T: **Preparation and Characterization of Chitosan-Based Spray-Dried Microparticles for the Delivery of Clindamycin Phosphate to Periodontal Pockets.** *Current Drug Delivery* 2014, **11**:98-111.
220. Chua BY, Al Kobaisi M, Zeng W, Mainwaring D, Jackson DC: **Chitosan Microparticles and Nanoparticles as Biocompatible Delivery Vehicles for Peptide and Protein-Based Immunocontraceptive Vaccines.** *MolPharmaceutics* 2012, **9**:81-90.
221. Karnchanajindanun J, Srisa-ard M, Baimark Y: **Genipin-cross-linked chitosan microspheres prepared by a water-in-oil emulsion solvent diffusion method for protein delivery.** *Carbohydrate Polymers* 2011, **85**:674-680.



222. Harris R, Lecumberri E, Heras A: **Chitosan-Genipin Microspheres for the Controlled Release of Drugs: Clarithromycin, Tramadol and Heparin.** *Marine Drugs* 2010, **8**:1750-1762.
223. Nagpal K, Singh SK, Mishra DN: **Optimization of brain targeted gallic acid nanoparticles for improved antianxiety-like activity.** *International Journal of Biological Macromolecules* 2013, **57**:83-91.
224. Al-Remawi MMA: **Properties of chitosan nanoparticles formed using sulfate anions as crosslinking bridges.** *American Journal of Applied Sciences* 2012, **9**:1091-1100.
225. Mukhopadhyay P, Chakraborty S, Bhattacharya S, Mishra R, Kundu PP: **pH-sensitive chitosan/alginate core-shell nanoparticles for efficient and safe oral insulin delivery.** *International Journal of Biological Macromolecules* 2015, **72**:640-648.
226. Bodnar M, Hartmann JF, Borbely J: **Preparation and characterization of chitosan-based nanoparticles.** *Biomacromolecules* 2005, **6**:2521-2527.
227. Reddy N, Reddy R, Jiang Q: **Crosslinking biopolymers for biomedical applications.** *Trends in Biotechnology* 2015.
228. Mitra A, Dey B: **Chitosan microspheres in novel drug delivery systems.** *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2011, **73**:355-366.
229. Gan Q, Wang T, Cochrane C, McCarron P: **Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery.** *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 2005, **44**:65-73.
230. Tsai ML, Bai SW, Chen RH: **Cavitation effects versus stretch effects resulted in different size and polydispersity of ionotropic gelation chitosan-sodium tripolyphosphate nanoparticle.** *Carbohydrate Polymers* 2008, **71**:448-457.
231. Yang HC, Hon MH: **The Effect of the Degree of Deacetylation of Chitosan Nanoparticles and its Characterization and Encapsulation Efficiency on Drug Delivery.** *Polymer-Plastics Technology and Engineering* 2010, **49**:1292-1296.
232. Li J, Huang QR: **Rheological properties of chitosan-tripolyphosphate complexes: From suspensions to microgels.** *Carbohydrate Polymers* 2012, **87**:1670-1677.
233. Ma LH, Liu CS: **Preparation of chitosan microspheres by ionotropic gelation under a high voltage electrostatic field for protein delivery.** *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 2010, **75**:448-453.

- 
234. Liang HS, Zhou B, He L, An YP, Lin LF, Li Y, Liu SL, Chen YJ, Li B: **Fabrication of zein/quaternized chitosan nanoparticles for the encapsulation and protection of curcumin.** *Rsc Advances* 2015, **5**:13891-13900.
235. Moran MC, Jorge AF, Vinardell MP: **Sustainable DNA Release from Chitosan/Protein Based-DNA Gel Particles.** *Biomacromolecules* 2014, **15**:3953-3964.
236. Matalanis A, Jones OG, McClements DJ: **Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds.** *Food Hydrocolloids* 2011, **25**:1865-1880.
237. Jones OG, McClements DJ: **Functional Biopolymer Particles: Design, Fabrication, and Applications.** *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2010, **9**:374-397.
238. Hudson D, Margaritis A: **Biopolymer nanoparticle production for controlled release of biopharmaceuticals.** *Critical Reviews in Biotechnology* 2014, **34**:161-179.
239. Joshi MD, Mueller RH: **Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives.** *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2009, **71**:161-172.
240. McClements DJ: *Nanoparticle-and microparticle-based delivery systems: Encapsulation, protection and release of active compounds.* CRC Press; 2014.
241. Noack A, Oidtmann J, Kutza J, Mader K: **In vitro digestion of curcuminoid-loaded lipid nanoparticles.** *Journal of Nanoparticle Research* 2012, **14**.
242. Jannin V, Dellera E, Chevrier S, Chavant Y, Voutsinas C, Bonferoni C, Demarne F: **In vitro lipolysis tests on lipid nanoparticles: comparison between lipase/co-lipase and pancreatic extract.** *Drug Development and Industrial Pharmacy* 2014, **0**:1-7.
243. Hiep Minh N, Hwang I-C, Park J-W, Park H-J: **Photoprotection for deltamethrin using chitosan-coated beeswax solid lipid nanoparticles.** *Pest Management Science* 2012, **68**:1062-1068.
244. Luo Y, Teng Z, Li Y, Wang Q: **Solid lipid nanoparticles for oral drug delivery: Chitosan coating improves stability, controlled delivery, mucoadhesion and cellular uptake.** *Carbohydrate Polymers* 2015, **122**:221-229.
245. Thakkar A, Chenreddy S, Wang J, Prabhu S: **Ferulic acid combined with aspirin demonstrates chemopreventive potential towards pancreatic cancer when delivered using chitosan-coated solid-lipid nanoparticles.** *Cell and Bioscience* 2015, **5**.

- 
246. Zhang H, Neau SH: **In vitro degradation of chitosan by bacterial enzymes from rat cecal and colonic contents.** *Biomaterials* 2002, **23**:2761-2766.
247. Lee Y-S, Johnson PJ, Robbins PT, Bridson RH: **Production of nanoparticles-in-microparticles by a double emulsion method: A comprehensive study.** *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2013, **83**:168-173.
248. Chen A-Z, Li Y, Chau F-T, Lau T-Y, Hu J-Y, Zhao Z, Mok DK-w: **Microencapsulation of puerarin nanoparticles by poly(L-lactide) in a supercritical CO<sub>2</sub> process.** *Acta Biomaterialia* 2009, **5**:2913-2919.
249. Bhavsar MD, Tiwari SB, Amiji MM: **Formulation optimization for the nanoparticles-in-microsphere hybrid oral delivery system using factorial design.** *Journal of Controlled Release* 2006, **110**:422-430.
250. Bhavsar MD, Amiji MM: **Gastrointestinal distribution and in vivo gene transfection studies with nanoparticles-in-microsphere oral system (NiMOS).** *Journal of Controlled Release* 2007, **119**:339-348.
251. Bhavsar MD, Amiji MM: **Development of novel biodegradable polymeric nanoparticles-in-microsphere formulation for local plasmid DNA delivery in the gastrointestinal tract.** *AAPS PharmSciTech* 2008, **9**:288-294.
252. Bhavsar MD, Amiji MM: **Oral IL-10 gene delivery in a microsphere-based formulation for local transfection and therapeutic efficacy in inflammatory bowel disease.** *Gene Therapy* 2008, **15**:1200-1209.
253. Kriegel C, Amiji M: **Oral TNF-alpha gene silencing using a polymeric microsphere-based delivery system for the treatment of inflammatory bowel disease.** *Journal of Controlled Release* 2011, **150**:77-86.
254. Chen Z, Liu D, Wang J, Wu L, Li W, Chen J, Cai B-C, Cheng H: **Development of nanoparticles-in-microparticles system for improved local retention after intra-articular injection.** *Drug Delivery* 2014, **21**:342-350.
255. Ohashi K, Kabasawa T, Ozeki T, Okada H: **One-step preparation of rifampicin/poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticle-containing mannitol microspheres using a four-fluid nozzle spray drier for inhalation therapy of tuberculosis.** *Journal of Controlled Release* 2009, **135**:19-24.
256. Dharmala K, Yoo JW, Lee CH: **Development of Chitosan-SLN Microparticles for chemotherapy: In vitro approach through efflux-transporter modulation.** *Journal of Controlled Release* 2008, **131**:190-197.

- 
257. Zhang J, Tang Q, Xu X, Li N: **Development and evaluation of a novel phytosome-loaded chitosan microsphere system for curcumin delivery.** *International Journal of Pharmaceutics* 2013, **448**:168-174.
258. Mizoe T, Ozeki T, Okada H: **Preparation of drug nanoparticle-containing microparticles using a 4-fluid nozzle spray drier for oral, pulmonary, and injection dosage forms.** *Journal of Controlled Release* 2007, **122**:10-15.
259. Laroui H, Dalmaso G, Nguyen HTT, Yan Y, Sitaraman SV, Merlin D: **Drug-Loaded Nanoparticles Targeted to the Colon With Polysaccharide Hydrogel Reduce Colitis in a Mouse Model.** *Gastroenterology* 2010, **138**:843-U877.
260. Pouponneau P, Leroux J-C, Martel S: **Magnetic nanoparticles encapsulated into biodegradable microparticles steered with an upgraded magnetic resonance imaging system for tumor chemoembolization.** *Biomaterials* 2009, **30**:6327-6332.
261. Jelvehgari M, Barar J, Valizadeh H, HEYDARI N: **Preparation and evaluation of poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles-in-microparticles by W/O/W emulsion method.** 2010.
262. Armuzzi A, De Pascalis B, Lupascu A, Fedeli P, Leo D, Mentella MC, Vincenti F, Melina D, Gasbarrini G, Pola P, Gasbarrini A: **Infliximab in the treatment of steroid-dependent ulcerative colitis.** *European review for medical and pharmacological sciences* 2004, **8**:231-233.
263. Rao MP, Manjunath K, Bhagawati ST, Thippeswamy BS: **Bixin loaded solid lipid nanoparticles for enhanced hepatoprotection – Preparation, characterisation and in vivo evaluation.** *International Journal of Pharmaceutics* 2014, **473**:485-492.
264. Davrieux F, Allal F, Piombo G, Kelly B, Okulo JB, Thiam M, Diallo OB, Bouvet J-M: **Near Infrared Spectroscopy for High-Throughput Characterization of Shea Tree (*Vitellaria paradoxa*) Nut Fat Profiles.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010, **58**:7811-7819.
265. Goupy J: *Stratégie de recherche Définition et objectifs: La méthodologie des plans d'expériences* Paris, France: Dunod; 1996.
266. Driesbeke J, Saporta G, Fine J: *Plans d'expériences: applications à l'entreprise.* France: Technip ED; 1997.
267. Goupy J: *Plans d'expériences pour surface de réponse.* Paris, France: Dunod; 1999.
268. Mazerolles G, Mathieu D, Siouffi A: **Computer-assisted optimization with nemrod software.** *Journal of Chromatography A* 1989, **485**:433-451.

269. Fan W, Yan W, Xu Z, Ni H: **Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique.** *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 2012, **90**:21-27.
270. Kašpar O, Jakubec M, Štěpánek F: **Characterization of spray dried chitosan-TPP microparticles formed by two- and three-fluid nozzles.** *Powder Technology* 2013, **240**:31-40.
271. Eskandani M, Barar J, Ezzati Nazhad Dolatabadi J, Hamishehkar H, Nazemiyeh H: **Formulation, characterization, and geno/cytotoxicity studies of galbanic acid-loaded solid lipid nanoparticles.** *Pharmaceutical biology* 2015, **53**:1525-1538.
272. Liu XH, Liang XZ, Fang X, Zhang WP: **Preparation and evaluation of novel octylmethoxycinnamate-loaded solid lipid nanoparticles.** *International journal of cosmetic science* 2015, **37**:446-453.
273. Wang J, Zhu RR, Sun DM, Sun XY, Geng ZS, Liu H, Wang SL: **Intracellular Uptake of Curcumin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles Exhibit Anti-Inflammatory Activities Superior to Those of Curcumin Through the NF-kappa B Signaling Pathway.** *Journal of Biomedical Nanotechnology* 2015, **11**:403-415.
274. Wang J, Wang HY, Zhu RR, Liu Q, Fei J, Wang SL: **Anti-inflammatory activity of curcumin-loaded solid lipid nanoparticles in IL-1 beta transgenic mice subjected to the, lipopolysaccharide-induced sepsis.** *Biomaterials* 2015, **53**:475-483.
275. Battaglia L, Gallarate M, Peira E, Chirio D, Solazzi I, Giordano SMA, Gigliotti CL, Riganti C, Dianzani C: **Bevacizumab loaded solid lipid nanoparticles prepared by the coacervation technique: preliminary in vitro studies.** *Nanotechnology* 2015, **26**.
276. Zhou Y, Zhang G, Rao Z, Yang Y, Zhou Q, Qin H, Wei Y, Wu Xa: **Increased brain uptake of venlafaxine loaded solid lipid nanoparticles by overcoming the efflux function and expression of P-gp.** *Archives of pharmacal research* 2015, **38**:1325-1335.
277. Carriere F, Barrowman JA, Verger R, Laugier R: **Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans.** *Gastroenterology* 1993, **105**:876-888.
278. Heinzen C, Marison I, Berger A, von Stockar U: **Use of vibration technology for jet break-up for encapsulation of cells, microbes and liquids in monodisperse microcapsules.** In *Practical Aspects of Encapsulation Technologies; Braunschweig, Germany.* Edited by Prusse U, Vorlop KD. 2002: 19-25.

279. Meyer M, Heinzelmann H: **Scanning force microscopy**. Springer Verlag 1992:99-149.
280. Ahmed K, Li Y, McClements DJ, Xiao H: **Nanoemulsion- and emulsion-based delivery systems for curcumin: Encapsulation and release properties**. *Food Chemistry* 2012, **132**:799-807.
281. Lopez C, Bourgaux C, Lesieur P, Ollivon M: **Coupling of time-resolved synchrotron X-ray diffraction and DSC to elucidate the crystallisation properties and polymorphism of triglycerides in milk fat globules**. *Lait* 2007, **87**:459-480.
282. Wille RL, Lutton ES: **Polymorphism of Cocoa Butter**. *Journal of the American Oil Chemists Society* 1966, **43**:491-496.
283. Scherrer P: *Göttinger Nachrichten Gesell* 1918, **2**:98.
284. Raffin RP, Lima A, Lorenzoni R, Antonow MB, Turra C, Alves MP, Fagan SB: **Natural Lipid Nanoparticles Containing Nimesulide: Synthesis, Characterization and In Vivo Antiedematogenic and Antiedematogenic and Antinociceptive Activities**. *J Biomed Nanotechnol* 2012, **8**:309-315.
285. Robbers JE, Bhatia VN: **Technique for the rapid determination of HLB and required-HLB values**. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1961, **50**:708-709.
286. Müller RH, Mäder K, Gohla S: **Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art**. *Eur J Pharm Biopharm* 2000, **50**:161-177.
287. Zhang J, Fan Y, Smith E: **Experimental design for the optimization of lipid nanoparticles**. *J Pharm Sci* 2009, **98**:1813-1819.
288. Vitorino C, Carvalho FA, Almeida AJ, Sousa JJ, Pais A: **The size of solid lipid nanoparticles: An interpretation from experimental design**. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 2010, **84**:117-130.
289. Furlanetto S, Cirri M, Piepel G, Mennini N, Mura P: **Mixture experiment methods in the development and optimization of microemulsion formulations**. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2011, **55**:610-617.
290. Kabri T-h, Arab-Tehrany E, Belhaj N, Linder M: **Physico-chemical characterization of nano-emulsions in cosmetic matrix enriched on omega-3**. *J Nanobiotechnol* 2011, **9**:41.
291. Maherani B, Arab-Tehrany E, Kheirilomoom A, Reshetov V, Stebe MJ, Linder M: **Optimization and characterization of liposome formulation by mixture design**. *Analyst* 2012, **137**:773-786.

292. Varshney GK, Saini RK, Gupta PK, Das K: **Effect of Curcumin on the Diffusion Kinetics of a Hemicyanine Dye, LDS-698, across a Lipid Bilayer Probed by Second Harmonic Spectroscopy.** *Langmuir* 2013, **29**:2912-2918.
293. Wang J, Wang H, Zhu R, Liu Q, Fei J, Wang S: **Anti-inflammatory activity of curcumin-loaded solid lipid nanoparticles in IL-1 $\beta$  transgenic mice subjected to the lipopolysaccharide-induced sepsis.** *Biomaterials* 2015, **53**:475-483.
294. Bunjes H, Koch MHJ, Westesen K: **Effect of Particle Size on Colloidal Solid Triglycerides.** *Langmuir* 2000, **16**:5234-5241.
295. Lopez C, Bourgaux C, Lesieur P, Ollivon M: **Coupling of time-resolved synchrotron X-ray diffraction and DSC to elucidate the crystallisation properties and polymorphism of triglycerides in milk fat globules.** *Lait* 2007, **87**:459-480.
296. Lopez C, Ollivon M: **Crystallisation of triacylglycerols in nanoparticles.** *J Therm Anal Calorim* 2009, **98**:29-37.
297. Guterres SS, Fessi H, Barratt G, Devissaguet JP, Puisieux F: **Poly (DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study.** *International Journal of Pharmaceutics* 1995, **113**:57-63.
298. Dickinson E: **Food emulsions and foams: Stabilization by particles.** *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 2010, **15**:40-49.
299. Attama AA, Schicke BC, Paepenmuller T, Muller-Goymann CC: **Solid lipid nanodispersions containing mixed lipid core and a polar heterolipid: Characterization.** *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2007, **67**:48-57.
300. Saupe A, Gordon KC, Rades T: **Structural investigations on nanoemulsions, solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers by cryo-field emission scanning electron microscopy and Raman spectroscopy.** *International Journal of Pharmaceutics* 2006, **314**:56-62.
301. Co E: **Structured Organogels Based on Vegetable Oils and Surfactants-Structures, Characteristics and Applications.** In *Nanotechnologies for Solubilization and Delivery in Foods, Cosmetics and Pharmaceuticals*. Edited by Garti N, Amar-Yuli I. Lancaster: Destech Publications; 2011
302. Kurien BT, Singh A, Matsumoto H, Scofield RH: **Improving the solubility and pharmacological efficacy of curcumin by heat treatment.** *Assay and Drug Development Technologies* 2007, **5**:567-576.

303. DiMauro TM: **Methylated curcumin-resveratrol hybrid molecules for treating cancer.** In *Book Methylated curcumin-resveratrol hybrid molecules for treating cancer* (Editor ed.^eds.). City: Google Patents; 2013.
304. Puglia C, Frasca G, Musumeci T, Rizza L, Puglisi G, Bonina F, Chiechio S: **Curcumin loaded NLC induces histone hypoacetylation in the CNS after intraperitoneal administration in mice.** *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2012, **81**:288-293.
305. Sun J, Bi C, Chan HM, Sun S, Zhang Q, Zheng Y: **Curcumin-loaded solid lipid nanoparticles have prolonged in vitro antitumour activity, cellular uptake and improved in vivo bioavailability.** *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 2013, **111**:367-375.
306. Zhao X, Chen Q, Liu W, Li Y, Tang H, Liu X, Yang X: **Codelivery of doxorubicin and curcumin with lipid nanoparticles results in improved efficacy of chemotherapy in liver cancer.** *International Journal of Nanomedicine* 2015, **10**:257-270.
307. Siekmann B, Westesen K: **Melt-homogenized solid lipid nanoparticles stabilized by the nonionic surfactant tyloxapol. II. Physicochemical characterization and lyophilisation.** *Pharm Pharmacol Lett* 1994, **3**:225-228.
308. Jayakrishnan A, Jameela SR: **Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices.** *Biomaterials* 1996, **17**:471-484.
309. Zeng XF, Ruckenstein E: **Cross-linked macroporous chitosan anion-exchange membranes for protein separations.** *Journal of Membrane Science* 1998, **148**:195-205.
310. Mi FL, Shyu SS, Lee ST, Wong TB: **Kinetic study of chitosan-tripolyphosphate complex reaction and acid-resistive properties of the chitosan-tripolyphosphate gel beads prepared by in-liquid curing method.** *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics* 1999, **37**:1551-1564.
311. Salminen H, Gommel C, Leuenberger BH, Weiss J: **Influence of encapsulated functional lipids on crystal structure and chemical stability in solid lipid nanoparticles: Towards bioactive-based design of delivery systems.** *Food chemistry* 2016, **190**:928-937.
312. Salminen H, Helgason T, Kristinsson B, Kristbergsson K, Weiss J: **Formation of solid shell nanoparticles with liquid omega-3 fatty acid core.** *Food Chemistry* 2013, **141**:2934-2943.



- 
313. Bunjes H, Siekmann B: **Manufacture, characterization, and applications of solid lipid nanoparticles as drug delivery systems.** *Microencapsulation-Methods and Industrial Applications* 2006:213-268.
314. McClements DJ: **Crystals and crystallization in oil-in-water emulsions: Implications for emulsion-based delivery systems.** *Advances in Colloid and Interface Science* 2012, **174**:1-30.
315. Turnbull D, Cormia RL: **Kinetic of crystal nucleation in some normal alkane liquids.** *Journal of Chemical Physics* 1961, **34**:820-&.
316. Morissette SL, Almarsson O, Peterson ML, Remenar JF, Read MJ, Lemmo AV, Ellis S, Cima MJ, Gardner CR: **High-throughput crystallization: Polymorphs, salts, co-crystals and solvates of pharmaceutical solids.** *Advanced Drug Delivery Reviews* 2004, **56**:275-300.
317. Corrigan DO, Healy AM, Corrigan OI: **The effect of spray drying solutions of bendroflumethiazide/polyethylene glycol on the physicochemical properties of the resultant materials.** *International Journal of Pharmaceutics* 2003, **262**:125-137.
318. Venkateswarlu V, Manjunath K: **Preparation, characterization and in vitro release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles.** *Journal of Controlled Release* 2004, **95**:627-638.
319. Lin SY, Chien JL: **In vitro simulation of solid-solid dehydration, rehydration, and solidification of trehalose dihydrate using thermal and vibrational spectroscopic techniques.** *Pharmaceutical Research* 2003, **20**:1926-1931.
320. Dong YM, Ruan YH, Wang HW, Zhao YG, Bi DX: **Studies on glass transition temperature of chitosan with four techniques.** *Journal of Applied Polymer Science* 2004, **93**:1553-1558.
321. Lazaridou A, Biliaderis CG: **Thermophysical properties of chitosan, chitosan-starch and chitosan-pullulan films near the glass transition.** *Carbohydrate Polymers* 2002, **48**:179-190.
322. Obaidat R, Tashtoush B, Bayan M, T. Al Bustami R, Alnaief M: **Drying Using Supercritical Fluid Technology as a Potential Method for Preparation of Chitosan Aerogel Microparticles.** *AAPS PharmSciTech* 2015:1-10.
323. Sato K: **Physical and Molecular Properties of Lipid Polymorphs - A Review.** *Food Structure* 1987, **6**:151-159.
324. Lutton ES: **Lipid structures.** *J Am Oil Chem Soc* 1972, **49**:1-9.

325. Cho AR, Chun YG, Kim BK, Park DJ: **Preparation of alginate–CaCl<sub>2</sub> microspheres as resveratrol carriers.** *Journal of Materials Science* 2014, **49**:4612-4619.

## *Résumé*

Ce travail porte sur la conception d'un système lipo-polysaccharidique sous forme d'un assemblage de taille micrométrique entre des nanoparticules lipidiques solides (SLNs) et un biopolymère. Le but est de formuler un vecteur pouvant : transporter un principe actif hydrophobe, résister aux conditions gastriques, et permettre un relargage contrôlé en conditions spécifiques. Le choix de la molécule active s'est porté sur un polyphénol, la curcumine, pour ses activités anti-oxydantes et anti-inflammatoires. Etant hydrophobe, la curcumine a été encapsulée dans des nanoparticules de beurre de karité qui est un lipide d'origine naturelle et solide à température ambiante. Les systèmes lipidiques ne résistant pas aux conditions gastriques, les nanoparticules ont été incluses dans une matrice de chitosane sous forme d'un assemblage micrométrique contrôlé par des interactions électrostatiques. Ce polymère naturel, chargé positivement grâce à la présence de groupements amines, résiste aux attaques des enzymes gastriques et présente des interactions spécifiques avec la muqueuse intestinale et notamment les mucines permettant ainsi un ciblage vers l'intestin et le côlon.

La première partie de cette étude est focalisée sur le système beurre de karité-curcumine en absence de chitosane. L'effet du polyphénol sur la cristallisation du lipide a tout d'abord été étudié. L'influence de la composition du mélange ternaire (beurre de karité, tensioactif, eau) sur les propriétés des nanoparticules formées a ensuite été étudiée en utilisant la méthodologie des plans de mélanges. Cela a permis de contrôler la taille des SLNs formulées et de mettre ensuite en évidence l'influence de la taille des particules sur le taux d'encapsulation de la curcumine. La seconde partie est axée sur l'assemblage entre les nanoparticules et le chitosane. Des particules micrométriques ont ainsi été obtenues par interactions électrostatiques entre les SLNs encapsulant la curcumine et stabilisées par des phospholipides et le chitosane.

Mots-clés : Nanoparticules lipidiques solides (SLN), chitosane, vectorisation, curcumine, assemblage.

## *Abstract*

This work deals with the design of a lipo-polysaccharidic system as a micrometric assembly between solid lipid nanoparticles (SLNs) and a biopolymer. The aim is to formulate a vector can: carry a hydrophobic active molecule, resist to gastric conditions, and allow a controlled release in specific conditions. Choosing the active molecule is carried on a polyphenol, curcumin, for its antioxidant and anti-inflammatory activities. Being hydrophobic, curcumin was encapsulated in shea butter nanoparticles, which is a natural lipid and solid at room temperature. Lipid nanocarriers are not resistant to gastric conditions; the nanoparticles have been included in a chitosan matrix in the form of a micrometric assembly controlled by electrostatic interactions. This natural polymer, positively charged due to the presence of amine groups, is resistant to attack by gastric enzymes and has specific interaction with the intestinal mucosa and in particular the mucin which can be useful as a carrier for curcumin in colon targeted drug delivery.

The first part of this study focused on shea butter–curcumin system with the absence of chitosan. The effect of polyphenols on the lipid crystallization was studied. The influence of the composition of the ternary mixture (shea butter, surfactant, water) on the properties of the nanoparticles was then investigated by using the response surface methodology. This helped to control the size of SLNs and then to show the influence of particle size on the encapsulation efficiency of curcumin. The second part focuses on the assembling between the nanoparticles and chitosan. Micrometric particles were obtained through electrostatic interactions between SLNs encapsulated curcumin and chitosan.

Keywords: Solid lipid nanoparticles (SLN), vectorization, curcumin, chitosan, assembling.