

Systèmes colloïdaux lipidiques pour l'administration par voie orale

Maxime Girardon

▶ **To cite this version:**

Maxime Girardon. Systèmes colloïdaux lipidiques pour l'administration par voie orale. Chimie. Université de Lorraine, 2019. Français. NNT : 2019LORR0236 . tel-02553608

HAL Id: tel-02553608
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02553608

Submitted on 24 Apr 2020

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

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.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Ecole Doctorale C2MP (Chimie-Mécanique-Matériaux-Physique)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE l'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Chimie »

Par **Maxime GIRARDON**

Systèmes colloïdaux lipidiques pour l'administration par voie orale

Soutenance prévue le 02 décembre 2019

Membres du jury :

Rapporteurs :	Mme Sophie CAZALBOU	Maître de Conférences Université de Toulouse 3, France
	Mme Manuela ZOONENS	Chargée de Recherche Centre National de la Recherche Scientifique Université Sorbonne Paris Cité, France
Examinateurs :	M. Igor CLAROT	Professeur Université de Lorraine, France
	M. Ovidiu ERSEN	Professeur Université de Strasbourg, France
	Mme Andreea PASC	Professeur Université de Lorraine, France Directeur de thèse
	Mme Nadia CANILHO	Maître de Conférences Université de Lorraine, France Co-directeur de thèse
Membre invité :	M. Romain BORDES	Chargé de Recherche Université de Chalmers, Suède

---

Laboratoire Lorrain de Chimie Moléculaire (L2CM), UMR CNRS-UL 7053

Faculté des Sciences et Technologies, Université de Lorraine

BP70239, F-54506 Vandoeuvre-lès-Nancy

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude à Mme Andreea Pasc et Mme Nadia Canilho de m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse sous leur encadrement et au sein de leur laboratoire. Leurs encouragements, leur disponibilité, leur investissement, ainsi que leurs conseils et leurs précieuses connaissances m'ont permis d'acquérir une formation pluridisciplinaire solide et ont participé à la réussite de ce travail. Je les remercie également de leur aide pour la rédaction de ce mémoire de thèse. Merci sincèrement de la formation que vous m'avez dispensé durant ces trois années.

Je tiens à remercier très sincèrement les membres du jury : Madame Sophie CAZALBOU, Maître de Conférences à l'Université Toulouse 3, Madame Manuela ZOONENS, Chargée de Recherche au CNRS, Université Sorbonne Paris cité, Monsieur Igor CLAROT, Professeur à l'Université de Lorraine, Monsieur Ovidiu ERSEN, Professeur à l'Université de Strasbourg, Monsieur Romain Bordes, Chargé de Recherche à l'Université de Chalmers de m'avoir fait l'honneur de juger mon travail.

J'adresse mes remerciements à tous les membres du L2CM et les chercheurs que j'ai rencontrés au cours des trois années pour leur bienveillance et leur contribution tout au long de ce travail. Je tiens à remercier : Philippe Gros, Sabrina Aury, Paul Bazard, Alain Celzard, Christophe Chipot, Catherine Colson, François Dehez, Dominique Dodin, Eric Dumortier, Raphaël Duval, Vanessa Fierro, Tioga Gulon, Francis Hoffman, Dris Ihiawakrim, Sandrine Lamandé-Langle, Florantin Michaux, Maxime Mourer, Nadia Pellegrini-Moïse, Nathalie Petitjean, Jean-Bernard Regnouf-de-Vains, Lionel Richaudeau et Katalin Selmeczi. Je tiens à remercier tout particulièrement Younes Bouizi, Beata Korchowiec, Antonio Monari, Stéphane Parant et Ewa Rogalska pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et de leurs précieux conseils.

Je remercie également Cristina Dehelean de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire de la Faculté de pharmacie de Timișoara en Roumanie. Je remercie également George Andrei, Claudia Geanina Farcas et Loana Zinuca Pavel de leur sympathie et de leur disponibilité.

Je remercie tous les étudiants rencontrés pour les bons moments partagés au laboratoire : Julen Ariztia, Mohamed Darari, Dorian Dupommier, Hugo Gattuso, Jimmy Gouyau, Hiba Hussein, Florian Jonas, Sijin Li, Floriane Mangin, Lucie Pierre, Mohamed Zoubair Saidi. Je remercie plus particulièrement Fernanda Bianca Haffner et Ileana-Alexandra Pavel de leur

disponibilité et de leurs judicieux conseils. Enfin, les derniers mais pas les moindres, merci à Youssef Berro et Timothé Vucko pour les bons moments partagés ensemble et leur bonne humeur.

Bien sûr, je n'oublie pas ma famille, ma sœur, mes parents et ma marraine, et également mes amis de leur soutien.

Table des matières

Contributions scientifiques
Liste des abréviations

Introduction générale **1**

Chapitre I. État de l'art **7**

1.1. Maladies Inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) 9

1.1.1. Épidémiologie et coût des MICI 9
1.1.2. Étiologie des MICI 10

1.2. Le gros intestin et la rectocolite hémorragique (RCH) 18

1.2.1. Anatomie-Physiologie du gros intestin 18
1.2.2. Histologie du gros intestin 18
1.2.3. Topographie de la RCH 20

1.3. Physiopathologie de la RCH : rôle et implication de la barrière intestinale 21

1.3.1. Rôle de la barrière intestinale saine 21
1.3.2. Couche de mucus 21
1.3.3. Épithélium colique 23

1.4. Les phosphatidylcholines (PC) : rôle et implication dans la RCH 25

1.4.1. Les PC dans la barrière intestinale 25
1.4.2. Mécanisme de transport des PC dans la couche de mucus 26
1.4.3. Les PC dans la RCH 27

1.5. RCH : approches thérapeutiques 28

1.5.1. Dérivés salicylés 28
1.5.2. Corticoïdes 29
1.5.3. Immunomodulateurs 30
1.5.4. Anti-TNF 31
1.5.5. Nouveaux traitements naturels pour le traitement de la RCH 31

1.6. Curcumine pour le traitement de la RCH 32

1.6.1. Cibles moléculaires de la curcumine associées à la RCH 32
1.6.2. Activité de la curcumine sur les cellules du système immunitaire 35
1.6.3. Activité de la curcumine sur la barrière épithéliale 36
1.6.4. Potentiel thérapeutique de la curcumine lors de RCH 36
1.6.5. Limitation de la curcumine pour une prise par voie orale 38

1.7. Systèmes colloïdaux lipidiques pour une administration orale 39

1.7.1. Généralités sur les systèmes de délivrance de principes actifs pour une prise orale 39
1.7.2. Considérations générales du tractus digestif lors de RCH 40
1.7.3. Nanoparticules pour le ciblage des zones enflammées 42
1.7.4. Effet de la taille du système de délivrance 42
1.7.5. Effet de la charge de surface des systèmes de délivrance 44
1.7.6. Autres stratégies 45

1.8. Particules lipidiques pour le traitement de la RCH 46

1.8.1. Liposomes 48
1.8.2. Nanoparticules lipidiques solides (SLN) 50
1.8.3. SLN de seconde génération : les NLC (*nanostructured lipid carriers*) 50
1.8.4. Application des SLN et des NLC pour le traitement de la RCH par voie orale 51
1.9. Conclusion et objectifs de la thèse 54
1.10. Références 55

Chapitre II. Interactions curcumine – phospholipides 67
2.1. Introduction 69
2.2. Généralités sur les phospholipides 70
2.2.1. Les phospholipides 70
2.2.2. Organisation des phospholipides en bicouche 71
2.2.3. Organisation des phospholipides en monocouche 74
2.3. État de l'art sur les interactions curcumine – phospholipides 78
2.3.1. Propriétés physico-chimiques de la curcumine (CC) 78
2.3.2. Encapsulation de la curcumine dans des bicouches liposomales 82
2.3.3. Interaction de la curcumine avec des monocouches phospholipidiques 85
2.4. Partie expérimentale 86
2.4.1. Produits 86
2.4.2. Préparation des liposomes 86
2.4.3. Caractérisation physico-chimique de l'interaction de la curcumine avec une bicouche et une monocouche de phospholipide 87
2.4.4. Modélisation moléculaire 90
2.5. Résultats : Interaction de la curcumine avec une bicouche lipidique 94
2.5.1. Détermination de la taille des liposomes chargés en curcumine 94
2.5.2. Spectre d'absorption de la curcumine dans l'eau 96
2.5.3. Spectres d'émission et d'absorption calculés par la chimie théorique 97
2.5.4. Effet de la concentration en curcumine sur les spectres d'absorption 99
2.5.5. Spectre d'émission de fluorescence de la curcumine dans l'eau 100
2.5.6. Effet de la concentration en curcumine sur les spectres d'émission de fluorescence 102
2.5.7. Effet de la température sur l'équilibre tautomérique de la curcumine liposomale 103
2.5.8. Étude des interactions curcumine - lécithine en monocouche 106
2.5.9. Simulation de dynamique moléculaire : interaction curcumine – DOPC 108
2.6. Résultats : Interactions de la curcumine (CC) avec une monocouche lipidique. Rôle du palmitate de cétyle (CP) 110
2.6.1. Isothermes de compression et microscopie à angle de Brewster des composés purs et de leur mélange 110
2.6.2. Dynamique moléculaire 114
2.6.3. Étude de la miscibilité du complexe CP/CC sur une monocouche de 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) 117
2.7. Conclusion 123

2.8. Références 125

Chapitre III. Système de délivrance visant une libération contrôlée de phosphatidylcholines et de curcumine jusqu'au côlon 129

3.1. Introduction 131

3.2. Généralités sur les nanoparticules lipidiques solides (SLN) 132

3.2.1. Préparation des SLN 132
3.2.2. Incorporation du principe actif dans les SLN 133
3.2.3. Digestion enzymatique *in vitro* de la matrice lipidique des SLN 135

3.3. Généralités sur les émulsions de Pickering 136

3.3.1. Angle de contact 136
3.3.2. Détermination de l'angle de contact 137
3.3.3. Énergie d'adsorption 138
3.3.4. Digestion enzymatique *in vitro* des émulsions de Pickering 139

3.4. Partie expérimentale 139

3.4.1. Produits 139
3.4.2. Conditions et Protocoles de formulation des suspensions de SLN 141
3.4.3. Stabilisation de l'interface solide/liquide par des nanoparticules de silice 142
3.4.4. Techniques de caractérisation 143
3.4.5. Détermination de l'efficacité d'encapsulation de la curcumine (CC) 145
3.4.6. Libération de la CC en conditions gastro-intestinales simulées 146

3.5. Résultats : Influence du procédé de formulation sur la localisation des phospholipides (PL) 148

3.5.1. Caractérisation physico-chimique des formulations de type PL-SLN et E/PL-SLN/E 148
3.5.2. Test de digestion *in vitro* pour suivre la dégradation enzymatique des PL encapsulés 150

3.6. Résultats : Stabilisation d'une interface solide/liquide par des nanoparticules solides 153

3.6.1. Modification et caractérisation des nanoparticules de silice (SiNPs) 153
3.6.2. Formulation des nanoparticules lipidiques solides à base de Witocan® P 156
3.6.3. Étude de stabilité des suspensions W-SiNPs-AS_x 157
3.6.4. Effet des SiNPs modifiées sur la taille des suspensions de SLN 159
3.6.5. Effet de la température sur la stabilité des émulsions de Pickering 160
3.6.6. Caractérisation morphologique des suspensions colloïdales par MCBL et cryo-MET 161

3.7. Conclusion 163

3.8. Références 165

Conclusion générale et perspectives 169

Annexes 175

Contributions scientifiques

Articles scientifiques

Triggering Tautomerization of Curcumin by Confinement into Liposomes, *ChemPhotoChem*, **2019**, *3*, 1-9, M. Girardon, S. Parant, A. Monari,* F. Dehez, C. Chipot, E. Rogalska, N. Canilho et A. Pasc*

Lipid-coated mesoporous silica microparticles for the controlled delivery of β-galactosidase into intestines, *J. Mater. Chem. B*, **2018**, *6*, 5633-5639, I. A. Pavel, M. Girardon, S. El Hajj, S. Parant, F. Amadei, S. Kaufmann, M. Tanaka, V. Fierro, A. Celzard, N. Canilho et A. Pasc*

Silica-based systems for oral delivery of drugs, macromolecules and cells, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **2017**, *249*, 346-362, R. Diab, N. Canilho, I. A. Pavel, F.B. Haffner, M. Girardon et A. Pasc*

Core–shell alginate@silica microparticles encapsulating probiotics, *J. Mater. Chem. B*, **2016**, *4*, 7929-7935, F. B. Haffner, M. Girardon, S. Fontanay, N. Canilho, R. E. Duval, M. Mierzwa, M. Etienne, R. Diab et A. Pasc*

Articles en préparation

A way to introducing a bioactive agent into model lipid membranes. The role of cetyl palmitate in the interaction of curcumine with 1,2-dioleoyl-*sn*-3-phosphatidylcholine monolayer, M. Girardon, B. Korchowiec, J. Korchowiec, E. Rogalska, N. Canilho et A. Pasc*

Pickering-like solid lipid particles from edible crystallisable oils and silica nanoparticles, M. Girardon, N. Canilho,[1*] I. A. Pavel, J. Esquena, A. Celzard, O. Ersen et A. Pasc*

Présentations orales :

M. Girardon, I. A. Pavel, N. Canilho, A. Pasc. Vers de nouveaux systèmes de délivrance de principes actifs par application de l'effet de Pickering à l'interface solide/liquide. **Journée de printemps, ED SESAMES**, juin 2017, Vandoeuvre-Lès-Nancy, France.

M. Girardon, N. Canilho, A. Pasc. Silica-based delivery systems for oral delivery of drugs, enzymes and probiotics. **European Materials Research Society spring meeting**, juin 2018, Strasbourg, France.

M. Girardon, N. Canilho, A. Pasc. Silica-based delivery systems for oral delivery of drugs, enzymes and probiotics. **256th ACS National Meeting & Exposition**, août 2018, Boston, Etats-Unis.

Présentations par affiches

M. Girardon, I. A. Pavel, N. Canilho, A. Pasc. Towards new drug delivery carriers by applying Pickering effect at liquid/solid interface. **DocSciLor**, juin 2017, Nancy, France.

M. Girardon, F. B. Haffner, I.A. Pavel, S. Kim, N. Canilho, A. Pasc. Silica-based delivery systems for oral delivery of drugs, enzymes and probiotics. **Journée thématique Matériaux pour la Santé**, janvier 2018, Reims, France.

Liste des abréviations

5-ASA : 5-aminosalicylique
A : Absorbance
A_{coll} : Aire par molécule au point de collapse
AMM : Aire moléculaire moyenne
AS : Acide stéarique
ATG : Analyse thermogravimétrique
BAM : Microscopie à angle de Brewster
c. longa : C*urcuma longa*
CC : Curcumine
CFTR *: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*
CMC : Concentration micellaire critique
COX : Cyclooxygénase
CP : Palmitate de cétyle
cryo-TEM : Cryo-microscopie électronique en transmission
DCs : Cellules dendritiques
DFT : D*ensity functional theory*
D_h : Diamètre hydrodynamique
DHP : Dihexadecyl phosphate
DLS : Diffusion dynamique de la lumière
DM : Dynamique moléculaire
DNBS : Acide diazobenzène sulfonique
DOPC : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DOPG : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1′-rac-glycerol)
DOTAP : 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane
DPPC : 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DSPC : 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DSS : Dextran sulfate de sodium
E/H : Emulsion eau dans huile
E/H/E : Emulsion eau dans huile dans eau
EE : Efficacité d'encapsulation
enz : Enzyme
EPR : Enhanced permeability and retention
ESHT : *Exited-state hydrogen transfer*
FGS : Fluide gastrique simulé
FIS : Fluide intestinal simulé
GR : Récepteur des glucocorticoïdes
GUV : *Giant unilamellar vesicles*
H/E : Emulsion huile dans eau
HLB : *Hydrophilic-lipophilic balance*
IFN : Interféron
IL : Interleukine
JAM : *Junctional adhesion molecule*

LC : Liquide condensé
LE : Liquide expansé
LPC : Lysophosphatidycholines
LPS : Lipopolysaccharide
LS : Lécithine de soja
LUV : *Large unilamellar vesicles*
L-α-PC : L-α-phosphatidylcholine
MC : Maladie de Crohn
MCBL : Microscopie confocale à balayage laser
meta-eABF : *Metadynamics-extended adaptive biasing force*
MICI : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
MLCK : *Myosin light-chain kinase*
MLV : *Multilamellar vesicles*
MUC : Mucine
MWCO : *Molecular Weight Cut Off*
NAMD : *Nanoscale molecular dynamics*
NBD-PC : 1-Oleoyl-2-[12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodecanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine
NF-κB : Nuclear factor-kappa B
NK cell : *Natural killer cell*
NKT : *Natural killer T*
NLC : *Nanostructured lipid carriers*
NTA : *Nanoparticle tracking analysis*
NTO : *Natural transition orbitales*
PA : Principe actif
PAMP : *Pathogen associated molecular pattern*
PC : Phosphatidylcholines
PCL : Polycaprolactone
PCM : *Polarizable continuum medium*
PDI : *Polydispersity index*
PE : Phosphatidylethanolamines
PEO : Poly(oxyde d'éthylène)
PG : Phosphatidylglycérols
PL : Phospholipides
PLGA : Poly(lactic-co-glycolicacid)
PME : *Particle Mesh Ewald*
POPC : 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine
PPAR : *Peroxisome proliferator-activated receptor*
PPO : Poly(oxyde de propylène)
PRR : *Pattern recognition receptor*
PS : Phosphatidylsérines
PZ : Potentiel Zêta
RCH : Rectocolite hémorragique
SiNPs : Nanoparticules de silice

siRNA : *Small interfering RNA*
SLN : *Solid lipid nanoparticles*
SOPC : 1-stearoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine
SUV : *Small unilamellar vesicles*
T_H : Lymphocyte T auxiliaire
THF : Tétrahydrofurane
TLR : *Toll-like receptors*
T_m : Température de transition de phase
TNBS : Acide trinitrobenzène sulfonique
TNF : Facteur de nécrose tumorale
TPMT : Thiopurine S-methyl-transferase
TR-DHPE : 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt
T_{reg} cell : *Regulatory T cell*
VMD : *Variational Mode Decomposition*
W : Witocan®P
Π_{coll} : Pression de surface au point de collapse

Introduction générale

Introduction générale

Les **M**aladies **I**nflammatoires **C**hroniques de l'**I**ntestin (MICI) sont des maladies idiopathiques dont les symptômes apparaissent par intermittence avec des phases de rémission. Les MICI détériorent significativement la qualité de vie du patient et provoquent une morbidité élevée. L'hospitalisation des patients peut être nécessaire en cas de crises sévères. En Europe, 2,5 à 3 millions de personnes sont touchées par une MICI générant un coût en soins directs de santé de 4,6-5,6 milliards d'euros par an. En Amérique du Nord 1,2 millions de personnes souffriraient d'une MICI avec des coûts médicaux directs de plus de 1,2 milliard de dollars au Canada et supérieurs à 6 milliards de dollars aux Etats-Unis, en 2004. Les MICI sont largement représentées par deux maladies distinctes : la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH).

La RCH est caractérisée par une inflammation rectale continue, sans intervalle sain, plus ou moins étendue, pouvant atteindre au maximum le cæcum. La RCH étant incurable, le traitement médical sert majoritairement à induire et maintenir la rémission. Les corticoïdes suppriment très efficacement l'inflammation et produisent un soulagement rapide des symptômes mais ils ne sont pas capables de maintenir la rémission. De plus, de nombreux effets indésirables peuvent survenir lors de traitements aux corticoïdes. Les aminosalicylés sont généralement utilisés en thérapeutique de première ligne dans le traitement de la RCH et permettent de maintenir la rémission. Cependant, seulement 40 à 50% des patients atteignent la rémission avec ce dernier traitement. Dans ce contexte, la recherche de nouvelles molécules anti-inflammatoires paraît être un enjeu majeur. La curcumine, un polyphénol naturel, a démontré une forte propriété anti-inflammatoire. Elle est donc une molécule anti-inflammatoire prometteuse pour le traitement de la RCH. De plus, la RCH est associée à une perte de fonction de la barrière intestinale médiée par une altération des jonctions serrées. La curcumine préviendrait également l'altération de ces jonctions.

Effectivement, le rôle clé de la perturbation des jonctions serrées a aussi été mis en évidence dans la pathogénèse de la RCH. Cette perturbation inhibe le transport des phosphatidylcholines jusqu'à la couche de mucus intestinal. Il en résulte une diminution de l'incorporation de phosphatidylcholines dans la couche de mucus diminuant ainsi sa fonction de barrière. Un tel défaut conduit alors à une augmentation de l'exposition des cellules du

système immunitaire aux antigènes luminaux. L'apport de phosphatidylcholines exogènes permettrait alors de rétablir la composition en phospholipides de la couche de mucus.

Une prise par voie orale de molécules bioactives offre une facilité d'administration. Dans ce cas, l'encapsulation de la curcumine et des phosphatidylcholines est nécessaire pour augmenter leur biodisponibilité au niveau de la région enflammée. Effectivement, cela permettrait d'inhiber la digestion et l'absorption précoce des phosphatidylcholines au niveau de la partie haute du tractus gastro-intestinal et d'outrepasser la faible solubilité et la faible absorption de la curcumine.

Dans ce contexte, **l'objectif général** proposé dans ce travail est double. Dans un premier temps, il s'agit d'étudier l'interaction de la curcumine avec des membranes modèles composées de phosphatidylcholines, en bicouche et en monocouche. Le second objectif est de développer un nouveau système de délivrance combinant l'encapsulation d'un agent anti-inflammatoire et de phosphatidylcholines afin de restaurer la fonction de barrière de la couche de mucus. Ce système de délivrance est développé à partir de particules lipidiques solides dont l'interface solide/liquide est stabilisée par des nanoparticules solides. Pour cela, nous avons stabilisé des nanoparticules solides lipidiques par des nanoparticules de silice en utilisant l'effet de Pickering. La présence de nanoparticules solides à la surface de cette matrice lipidique permettrait d'augmenter la biodisponibilité des molécules bioactives dans la région enflammée. Afin de mettre en évidence la localisation intraparticulaire des phosphatidylcholines et la stabilisation de particules lipidiques par des nanoparticules de silice, le système de délivrance cible a été décomposé en deux systèmes moins complexes.

Pour donner un aperçu de la structure de la thèse, le **chapitre I** présente un bilan bibliographique des travaux effectués sur la rectocolite hémorragique ainsi que sur les systèmes de délivrances lipidiques permettant son traitement. Le contenu du **chapitre II** porte, dans un premier temps, sur l'étude de l'interaction de la curcumine avec une bicouche phospholipidique, *i.e.,* une suspension vésiculaire, exclusivement constituée des deux molécules bioactives d'intérêts. Leur interaction a été étudiée par spectroscopie et en monocouche. Les résultats sont étayés par des calculs de chimie théoriques et de modélisation moléculaire. Dans un second temps, ce chapitre présente l'étude des interactions dans un système ternaire en monocouche, composé de curcumine, de DOPC et d'un céride, le palmitate de cétyle. Ce dernier est choisi pour rigidifier le vecteur cible et assister l'internalisation de la curcumine dans une monocouche lipidique. Le **chapitre III** est quant à

lui, constitué de deux parties distinctes. La première présente les résultats sur l'influence de la stratégie de formulation de particules lipidiques sur la localisation intraparticulaire des phospholipides. La seconde partie porte sur l'étude du concept de stabiliser une interface solide/liquide par des nanoparticules solides en utilisant l'effet de Pickering.

Enfin, une conclusion générale et les perspectives de travail à poursuivre sont données à la fin du manuscrit.

État de l’art

1. État de l'art

1.1. Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI)

Les **M**aladies **I**nflammatoires **C**hroniques de l'**I**ntestin (MICI) sont des maladies idiopathiques, c'est-à-dire de cause inconnue. Cependant, les spécialistes s'accordent sur le fait que les symptômes pathologiques résultent de l'inflammation chronique d'une partie de la paroi du tube digestif. Les épisodes symptomatiques ont la particularité d'apparaître par intermittence avec des phases de rémission. Les MICI dégradent fortement la qualité de vie du patient. Les symptômes associés aux MICI se caractérisent le plus souvent par des douleurs abdominales, une diarrhée fréquente parfois sanglante ou encore une atteinte de la région annale (fissure, abcès). Ces symptômes s'accompagnent souvent d'une perte d'appétit et donc de poids, de fatigue, de carences, etc… Les crises sévères mènent souvent les patients à l'hospitalisation. Ces maladies peuvent être diagnostiquées à tout âge mais elles se manifestent généralement à l'adolescence ou chez le jeune adulte. Les MICI sont largement représentées par deux entités ou formes, la rectocolite hémorragique (RCH) et la maladie de Crohn (MC). Elles comprennent également des formes aux frontières de ces deux premières, dénommées « MICI non-classées ».

Les premiers cas de MICI ont été observés durant l'antiquité.[1] C'est en 1875 que Wilks et Moxon ont introduit le terme de RCH dans le langage médical.[2] L'iléite régionale, correspondant à l'inflammation de l'intestin grêle, fût reconnue en 1932 à la suite d'un article de Crohn *et al.*[3] Cette publication incitait la communauté médicale à reconnaître deux formes distinctes de MICI : la RCH et la MC.

1.1.1. Épidémiologie et coût des MICI

D'un point de vue épidémiologique, les études révèlent que les MICI ne se répartissent pas de façon homogène à travers le monde et au fil du temps. Les pays occidentaux présentent une prévalence plus importante des MICI par rapport aux pays en voie de développement (Figure 1). Cependant, même si les pays occidentaux sont pour le moment les plus concernés, l'incidence, soit l'apparition de nouveaux cas sur une période donnée, augmente considérablement plus vite dans les pays en développement.[4] Les études épidémiologiques semblent donc indiquer une mondialisation de cette pathologie, avec cependant des disparités

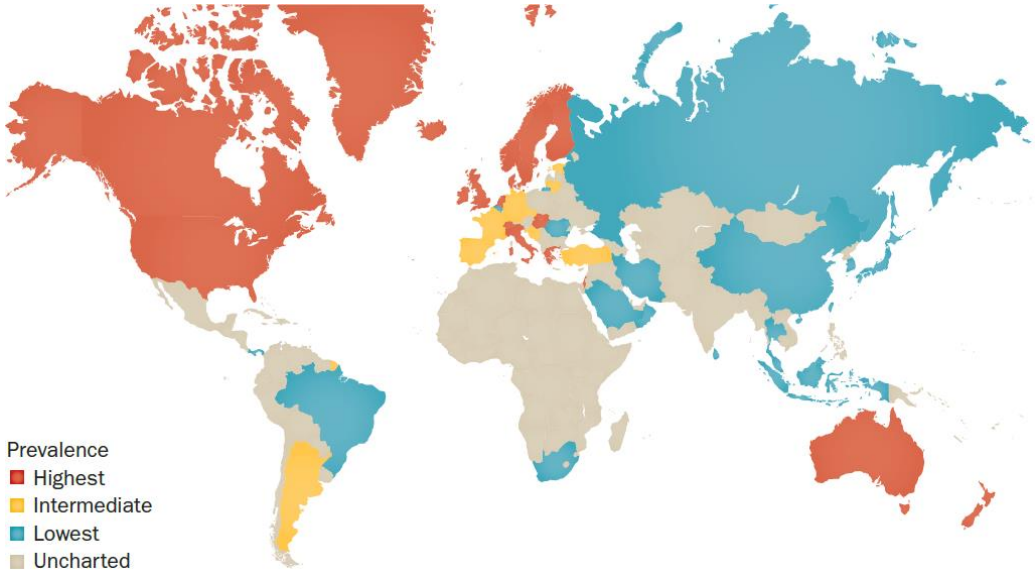


Figure 1. Prévalence globale des MICI en 2015, tirée de G.G. Kaplan,[5] 2015.

entre les différentes régions du globe ce qui révèle entre autres un impact environnemental et/ou génétique sur le développement des MICI.

Enfin, le coût direct et indirect associé aux MICI dans le monde occidental est considérable. En Europe, les MICI touchent 2,5-3 millions de personnes avec un coût en soins directs de santé de 4,6-5,6 milliards d'euros par an. En Amérique du Nord, 1,2 millions de personnes sont touchées par les MICI avec des coûts médicaux directs dépassant 6 milliards de dollars aux États-Unis en 2004 et plus de 1,2 milliard de dollars au Canada. Les principales dépenses directes liées aux MICI sont les hospitalisations, les interventions chirurgicales, les soins ambulatoires ainsi que les produits pharmaceutiques. Même si le coût de la chirurgie a diminué, l'essor des biothérapies (anti-TNFα depuis 2006 dans la RCH) a entraîné une augmentation considérable des dépenses de santé.[5] A cela s'additionnent les coûts indirects liés à la baisse de productivité au travail des personnes atteintes. D'après une étude canadienne, cela génèrerait des dépenses biens supérieures aux coût des soins directs.[6]

1.1.2. Étiologie des MICI

Les MICI sont des maladies complexes issues de causes multiples, au croisement entre la génétique, l'environnement, l'immunité et le microbiote intestinal (ensemble des micro-organismes tels que : archées, bactéries, fungi et aussi virus qui se trouvent dans le tractus digestif humain). Même si l'étiologie des MICI reste encore inconnue, on considère cependant que ce type de maladie se développe chez des individus génétiquement prédisposés et évoluant dans un environnement favorable au développement de la maladie. Aucun de ces

facteurs en soi ne suffit au développement de la maladie. Cependant, l'augmentation de l'incidence et de l'émergence dans des populations auparavant à faible risque fournit des preuves solides de l'effet de l'environnement sur le développement de la MC ou de la RCH. Les progrès en analyse génétique et l'étude du microbiome ont démontré un rôle clef de l'interface entre la réponse immunitaire et le microbiote intestinal (Figure 2). Bien qu'un certain nombre d'associations aient été identifiées, de nouvelles études sont encore nécessaires.

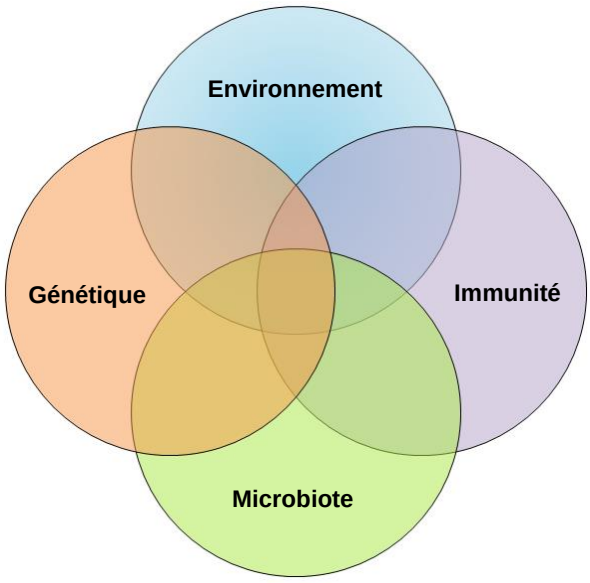


Figure 2. Facteurs responsables de MICI : interactions entre la génétique, l'immunologie, l'environnement et le microbiote intestinal.

1.1.2.1. Facteurs génétiques

Initialement, l'implication des facteurs génétiques dans le développement des MICI a été suggérée par des études d'agrégation familiale ou encore menées sur des jumeaux homozygotes et hétérozygotes.[4] Les études d'agrégation familiale montrent qu'un patient atteint respectivement d'une MC ou d'une RCH déclare des antécédents familiaux de MC dans 2 à 14 % des cas, et de 7 à 11 % dans les cas de RCH. Si les deux parents sont atteints d'une MICI, le risque de développer une MICI avant 30 ans chez l'enfant est de 1 sur 3. Les études menées sur les jumeaux monozygotes montrent une concordance plus importante de développer une MC ou une RCH par rapport aux jumeaux hétérozygotes.

L'analyse du génome de patients atteints de MICI a permis l'identification de 200 loci (emplacement d'un gène sur un chromosome) de prédisposition à ces maladies.[7,8] La grande majorité de ces loci, environ 70%,[8] est partagée entre les deux maladies avec des effets

similaires, bien que certains loci (tels que NOD2 et ATG16L1) soient spécifiquement associés à la MC seule et d'autres uniquement à la RCH.[7] Les gènes de susceptibilité au développement des MICI influent sur : la réponse immunitaire innée, le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale, la réponse immunitaire adaptative, la réparation des lésions, la réponse au stress oxydant et les mécanismes de défense de l'hôte contre les agents pathogènes.[9] Cependant, il convient de noter que les facteurs génétiques seuls ne permettent pas d'expliquer le développement de la MC et de la RCH. D'autres facteurs jouent alors un rôle important dans la pathogenèse des MICI.[10]

1.1.2.2. Dysbiose intestinale

Les MICI ont été associées à une dysbiose,[11,12] définie comme la diminution de la diversité microbienne en raison d'un changement d'équilibre entre les bactéries commensales (bactéries colonisant l'organisme sans provoquer la maladie) et potentiellement pathogéniques.[13] Il est reconnu que le microbiote intestinal a un rôle important dans l'induction, la formation et le fonctionnement du système immunitaire.[14] Ainsi, étudier les déséquilibres du microbiote intestinal est important dans le cadre des MICI. Le microbiote humain sain est représenté par 4 phyla bactériens majoritaires : *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* et *Actinobacteria*.[15] Les changements les plus cohérents dans le cadre des MICI sont une réduction de la diversité du microbiote intestinal, comprenant notamment une diminution de l'abondance des *Firmicutes* en parallèle d'une augmentation de la proportion des *Proteobacteria*.

Par exemple, Dardefeuille-Michaud *et al.*[16] ont identifié des souches d'*Escherichia coli* adhérentes et invasives (AIEC) en amont du côlon (= iléon) présentes dans 22 % des patients souffrant de MC alors qu'elles ne sont présentes qu'à 6 % chez les patients sains. Chez les patients atteints de RCH, Machiels *et al.*[17] ont observé d'une part la diminution d'espèces appartenant au phylum *Firmicutes*, *Roseburia hominis* et *Faecalibacterium prausnitzii*, par rapport aux témoins sains, et d'autre part une réduction d'acides gras à chaîne courte chez les patients atteints de RCH.[17] Ces bactéries auraient des propriétés bénéfiques, dont notamment la production de butyrate[18,19] qui est une source d'énergie importante pour les cellules épithéliales du côlon (colonocytes).[20] De plus, le butyrate possèderait des propriétés immunomodulatrice et anti-inflammatoire.[18,21]

1.1.2.3. Facteurs environnementaux

Le tabagisme est un facteur largement étudié dans le développement des MICI. Les fumeurs actifs sont moins susceptibles de développer une RCH que les non-fumeurs, mais sujet à un risque accru de développer la MC.[22] Le tabagisme est un facteur aggravant en cas de MC, entraînant une augmentation des poussées, des complications plus fréquentes de la maladie et est lié à une hausse du dosage des traitements et des actes chirurgicaux. Inversement, la RCH est généralement une maladie plus bénigne chez les fumeurs par rapport aux non-fumeurs, où l'on observe une diminution du taux d'hospitalisation, des besoins en traitement médicamenteux et chirurgicaux.[23] Cependant, le mécanisme de l'impact du tabagisme sur les MICI reste mal connu, tout comme la raison de son effet protecteur sur la RCH, et son impact délétère sur la MC.[24]

Le rôle de l'appendicectomie (ablation de l'appendice) a également été établi dans l'apparition des MICI. Tout comme le tabagisme, l'appendicectomie à un effet divergent entre la RCH et la MC. Il apparaît que les patients ayant subi une appendicectomie avant l'âge de 20 ans seraient moins disposés à développer une RCH.[25] Inversement, une appendicectomie pratiquée chez un patient avant l'âge de 10 serait un facteur de risque pour le développement de MC.[26]

Le stress et la dépression peuvent influencer l'inflammation intestinale par le biais de divers mécanismes, entraînant la production de cytokines (protéines permettant la communication cellulaire) pro-inflammatoires, l'activation des macrophages et l'altération de la perméabilité intestinale et du microbiote intestinal.[27] Par exemple, chez la souris, l'exposition à un stress social réduit la diversité du microbiote intestinal.[28] De plus, des souris soumises à une injection de réserpine (imitant une dépression) présentent une colite sévère, qui peut être atténuée par l'administration d'un désipramine (un antidépresseur).[29] Des études observationnelles dans de grandes cohortes confirment une association entre les principaux facteurs de stress de la vie, l'anxiété, la dépression et le risque accru de développer une MICI.[30–33] Frolkis *et al.*[33] ont observé que les traitements antidépresseurs étaient sélectivement protecteurs vis-à-vis de la MC ou de la RCH pour des patients ayant un historique de dépression.

L'association entre une activité physique régulière et le développement des MICI a peu été étudiée. Il apparaît tout de même que les professions sédentaires augmenteraient le risque de développer des MICI.[34]

De nombreux autres facteurs environnementaux, tels que la pollution, les antibiotiques, l'alimentation ont été envisagés pour expliquer l'émergence des MICI dans les pays développés. Cependant, leur réelle implication dans le développement des MICI reste controversée.[35] Le tabac et l'appendicectomie restent les deux principaux facteurs environnementaux définis dans le développement des MICI. Les autres facteurs identifiés, d'une importance moindre, soutiennent le caractère multifactoriel des MICI.

1.1.2.4. Implication du système immunitaire

Le système immunitaire est une fonction physiologique chez l'Homme constitué d'un ensemble coordonné d'éléments de reconnaissance et de défense qui discrimine le « soi » du « non-soi ». Le système immunitaire peut être divisé entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'immunité innée intestinale est constituée de la barrière épithéliale et de la couche de mucus intestinal, de cellules immunitaires et des molécules de l'immunité innée. Contrairement à l'immunité adaptatrice, l'immunité innée est non spécifique, c'est-à-dire qu'elle agit en première ligne de défense de l'organisme contre n'importe quel agresseur. Elle permet également l'activation des cellules du système immunitaire adaptatif en présentant des antigènes (substances que le système immunitaire d'un individu reconnaît comme étrangères) aux lymphocytes T-CD 4 naïfs entre autres (lymphocyte n'ayant pas rencontré leur antigène). Les macrophages et les cellules dendritiques (DCs) sont des cellules du système immunitaire inné capables de présenter des antigènes aux lymphocytes naïfs. Une fois activés par la reconnaissance d'un antigène, ces lymphocytes T-CD 4 naïfs seront amplifiés (= expansion clonale) et différenciés en différents sous-groupes tels que les lymphocytes T auxiliaire 1 (T_H1), T_H2 et T_H17. Les cellules de l'immunité innée, de l'immunité adaptatrice et d'autres cellules ou tissus sont capables de communiquer entre elles *via* la synthèse de cytokines. Ces cytokines peuvent par exemple amplifier un message inflammatoire (cytokines pro-inflammatoires) ou l'inhiber (cytokines anti-inflammatoires).

Le tractus gastro-intestinal est exposé en permanence à divers antigènes présents dans les bactéries et l'environnement. À l'état normal, l'homéostasie intestinale (l'équilibre intestinal) est maintenue en supprimant les réponses immunitaires excessives dues aux antigènes étrangers. Lors de MICI, la réponse immunitaire paraît anormale.[36] L'immunologie a dominé la recherche sur la pathogénèse des MICI à partir des années 1970. Cela était justifié compte tenu que les processus inflammatoires de la MC et de la RCH, sont principalement médiés par les cellules immunitaires. Initialement, les recherches étaient axées sur les réponses aux

anticorps, puis sur les lymphocytes T et enfin sur les cytokines. La recherche est actuellement davantage axée sur l'immunité innée.[37]

1.1.2.4.1. Immunité innée

i) Cellules de l'immunité innée

Chez les patients atteints de MICI, les cellules de l'immunité innée présentes au niveau de la muqueuse intestinale enflammée, induisent l'expression de protéines provoquant l'apoptose (= mort cellulaire programmée) des cellules épithéliales en produisant des cytokines pro-inflammatoires tels que le facteur de nécrose tumorale α (TNF-α) et l'interférons-γ (IFN-γ) et, en même temps, ces cytokines inhibent l'expression de protéines anti-apoptotiques. L'action combinée sur les protéines pro- et anti-apoptotiques conduit à une augmentation de la perméabilité de la barrière intestinale et donc à une perte de sa fonction.[38] Les cellules de l'immunité innée incluent les macrophages, les DCs, les granulocytes et les cellules « natural killer ».

Les recherches sur l'immunité innée semblent montrer que les granulocytes neutrophiles (appelés neutrophiles = cellules du système immunitaire inné) contribueraient à la pathogénèse des MICI à travers une variété de mécanismes tels que l'altération des fonctions de la barrière épithéliale et la perpétuation de l'inflammation par la libération de multiples médiateurs inflammatoires.[39] L'implication des macrophages a également été étudiée. Dans la muqueuse intestinale saine, les macrophages humains affichent une signature anergique (= tolérance du système immunitaire), en inhibant la production de cytokines pro-inflammatoires, mais en conservant des activités phagocytaires, bactéricides et toutes les activités compatibles avec les fonctions de « scavenger » (= 'charognard'). Chez les patients atteints de la MC, un sous-ensemble de macrophages, les macrophages CD 14^+, dont le nombre serait largement augmenté dans la muqueuse enflammée et non-enflammée, produiraient davantage de cytokines pro-inflammatoires (TNF-α et IL-23, *interleukine-23*) qui contribueraient de manière synergique à la production d'IFN-γ par les lymphocytes T_H[40]. Comme cité précédemment, les cellules dendritiques (DCs) permettent la présentation d'antigènes aux lymphocytes T-CD 4 naïfs. Cependant, dans la muqueuse colique de patients atteints de RCH, les interactions entre les DCs et les cellules T_H seraient renforcées et augmenteraient la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires.[41]

ii) Molécules de l'immunité innée

Les molécules de l'immunité innée contiennent notamment les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (*Pattern Recognition Receptor*, PRR). Les PRR permettent la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes (*Pathogen Associated Molecular Pattern*, PAMP). Les PAMP sont des motifs moléculaires conservés chez les pathogènes. La reconnaissance des PAMP par les PRR déclenchera alors une réponse inflammatoire. Les récepteurs de type toll (*Toll-like receptors*, TLR) font partis des PRR. Dix membres des récepteurs TLR ont été identifiés chez l'Homme. Parmi eux, TLR4 est activé par la reconnaissance de structures moléculaires conservées telles que les LipoPolySaccharides (LPS ; composants de la membrane externe des bactéries à Gram négatif). Durant la réponse inflammatoire, les TLR4 reconnaissent les PAMP (notamment les LPS) présents au niveau du côlon. Cela induira la libération de médiateurs pro-inflammatoires et le recrutement des cellules du système immunitaire adaptatif. Les PRR permettent le lien entre l'immunité innée et adaptatrice. L'expression du récepteur TLR4 est augmentée dans les tissus intestinaux humains souffrant de RCH et dans un modèle animal de RCH.[42,43]

1.1.2.4.2. Immunité adaptative

La réponse immunitaire adaptative est complémentaire à la réponse innée contre l'invasion de pathogènes. Les lymphocytes T_Hl et T_H2 sont en équilibre dynamique dans des conditions normales. Elles se régulent mutuellement *via* la production de cytokines. La MC est désignée comme condition T_H1 *via* une production élevée de TNF, IL-6 et d'IFN-γ, alors que la RCH a été caractérisée comme une condition T_H2 atypique basée sur une production accrue d'IL-5 et d'IL-13. Ce paradigme T_H1/T_H2 est révisé avec la découverte des cellules T_H17 productrices d'IL-17 et des cellules T_H9 productrices d'IL-9 (Figure 3).[44,45] D'autres études ont également démontré l'implication des lymphocytes NKT (*natural killer T*) produisant l'IL-13 contribuant ainsi à la cytotoxicité épithéliale et au dysfonctionnement de la barrière intestinale lors de RCH.[44]

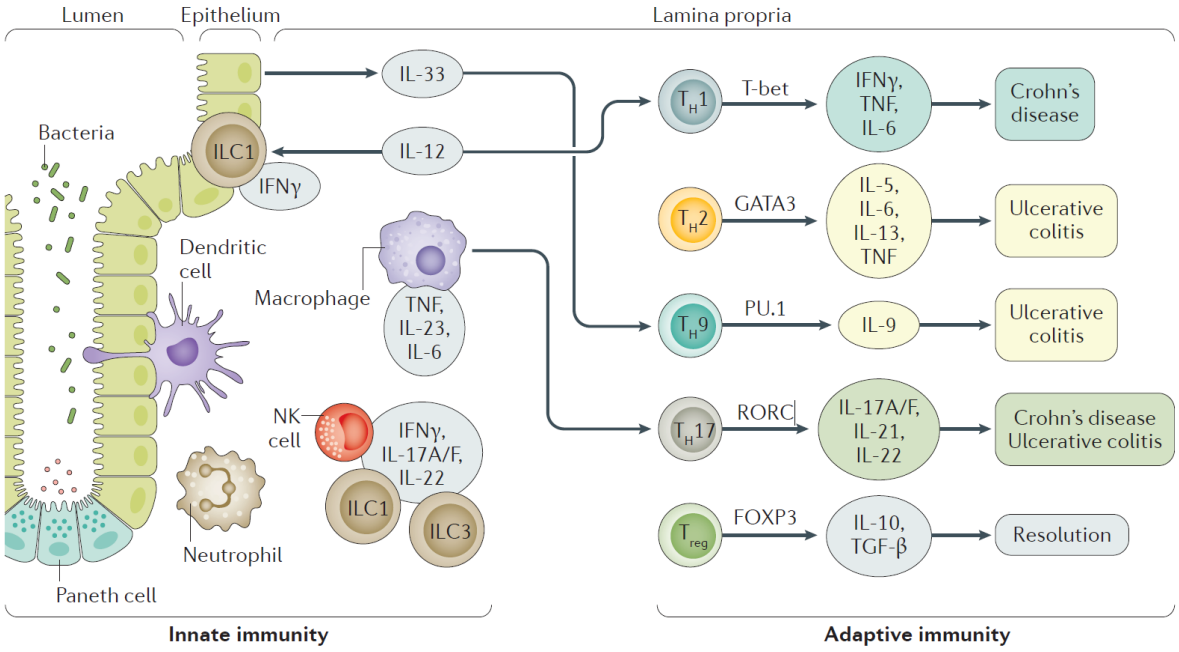


Figure 3. Cellules pro-inflammatoires et profiles cytokiniques des cellules T dans la pathologies des MICI, schéma tiré de Neurath,[45] 2017. Différents sous-groupes de cellules T et leur signature cytokinique qui ont été identifiés chez les patients souffrant de MICI. Les cellules T_H1 et T_H17 ont été identifiées dans la maladie de Crohn. Les cellules T_H2, T_H9 et T_H17 ont été identifiées dans la rectocolite hémorragique. Le profil de cytokines de chaque sous groupe de cellules T est indiqué. **NK cell** pour *natural killer cell* ; **Treg cell** pour *regulatory T cell*.

La classification des MICI selon une balance T_H1/T_H2 a donné lieu à des essais thérapeutiques visant à bloquer le médiateur central de chaque profil, avec des résultats aussi bien décevants que révélateurs. Par exemple, en 2015, le blocage d'IL-13 n'a pas permis d'améliorer la RCH.[46] De la même manière, le blocage de l'IFNγ n'a pas amélioré la MC,[47] et la neutralisation de l'IL-17 l'a, au contraire, aggravé.[48] L'hypothèse simpliste selon laquelle chaque type de MICI serait induit par un type particulier de réponse immunitaire s'est révélée inexacte. De plus, des études expérimentales et cliniques ont montré une fluctuation des réponses T_H1 et T_H2 au cours de l'évolution de la maladie.[49,50] Toutes ces observations sont fondamentales car elles démontrent que la mesure de paramètres immunitaires isolés ne conduit pas nécessairement au développement d'une MICI. Même si le système immunitaire est un acteur principal de l'inflammation intestinale, son rôle dans la pathogénèse des MICI semble avoir pris une place trop importante et il pourra pleinement être compris en l'intégrant avec les autres composants de la pathogénèse des MICI.[37]

1.2. Le gros intestin et la rectocolite hémorragique (RCH)

La RCH et la MC sont les deux principales maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Historiquement ces deux maladies ont été étudiées ensemble car elles ont de nombreux points communs, tels que les symptômes, une inflammation chronique, des dommages structuraux, pour ne citer que les principaux. Cependant, elles présentent des signes cliniques distincts prouvant que ce sont bien deux formes de maladies inflammatoires.

1.2.1. Anatomie-Physiologie du gros intestin

Le gros intestin est le dernier segment du tube digestif, il est situé à la suite de l'intestin grêle. Il s'étend de la valvule iléo-caecale au canal anal. Le gros intestin est composé du côlon et du rectum. Le côlon se divise en 5 segments : le caecum, le côlon ascendant, le côlon transverse, le côlon descendant et le côlon sigmoïde.

Les principales fonctions du gros intestin sont l'absorption d'eau et d'électrolytes, ainsi que la formation et le contrôle de l'évacuation des fèces. Avant son arrivée dans le côlon, le bol alimentaire est digéré dans l'estomac puis dans l'intestin grêle, où environ 90 % d'eau et la grande majorité des éléments nutritifs utiles au fonctionnement de l'organisme sont absorbés. Les substances non digérées et non absorbées, appelées le chyme, arrivent alors au niveau du côlon sous forme liquide. Le rôle du côlon est d'absorber l'eau résiduelle et les électrolytes contenus dans le chyme, ainsi que certaines vitamines (vitamines K et B) produites par le microbiote colique.[51] Le côlon a également pour objectif de transformer le chyme en fèces et de contrôler leur progression jusqu'au rectum. Le transit colique nécessite plusieurs heures à presque 3 jours pour une personne en bonne santé.[51] La fonction principale du rectum est de stocker les selles avant leur évacuation.

1.2.2. Histologie du gros intestin

La paroi du gros intestin se compose de 4 tuniques concentriques, de la couche la plus externe vers la lumière, elles sont dénommées *i)* la sous-séreuse, *ii)* la musculeuse, *iii)* la sous-muqueuse et *iv)* la muqueuse (Figure 4) :

i) **La sous-séreuse** correspond à la couche la plus externe. Elle est constituée d'un tissu conjonctif contenant des adipocytes. Elle est bordée par la séreuse qui est présente sur toute la longueur du côlon mais absente sur la partie basse du rectum où le tissu adipeux est alors nommé mésorectum.

ii) **La musculeuse** est responsable des contractions du gros intestin. Elle est composée de deux couches : une couche longitudinale externe et une couche circulaire interne, constituées de cellules musculaires lisses.

iii) **La sous-muqueuse** est composée d'un tissu conjonctif contenant des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Elle soutient la muqueuse.

iv) **La muqueuse** est la couche la plus interne en contact avec le lumen. La muqueuse du gros intestin est lisse, sans les villosités trouvées dans l'intestin grêle. Elle a uniquement des cryptes appelées cryptes de Lieberkühn (ce sont des invaginations de la muqueuse). L'épithélium des cryptes est principalement constitué de cellules caliciformes (cellules sécrétant le mucus) et de colonocytes. En progressant dans le côlon, le nombre de colonocytes diminue alors que celui des cellules caliciformes augmente. La muqueuse se compose d'un épithélium recouvrant la *lamina propria* qui repose sur une fine couche de fibres musculaires lisses : la *muscularis mucosae* (seulement présente dans la partie haute du rectum). La *lamina propria* est infiltrée de vaisseaux sanguins et également de tissus lymphoïdes. L'épithélium de la muqueuse représente la frontière physique entre l'environnement externe et interne, elle constitue donc une importante barrière de défense du corps humain.

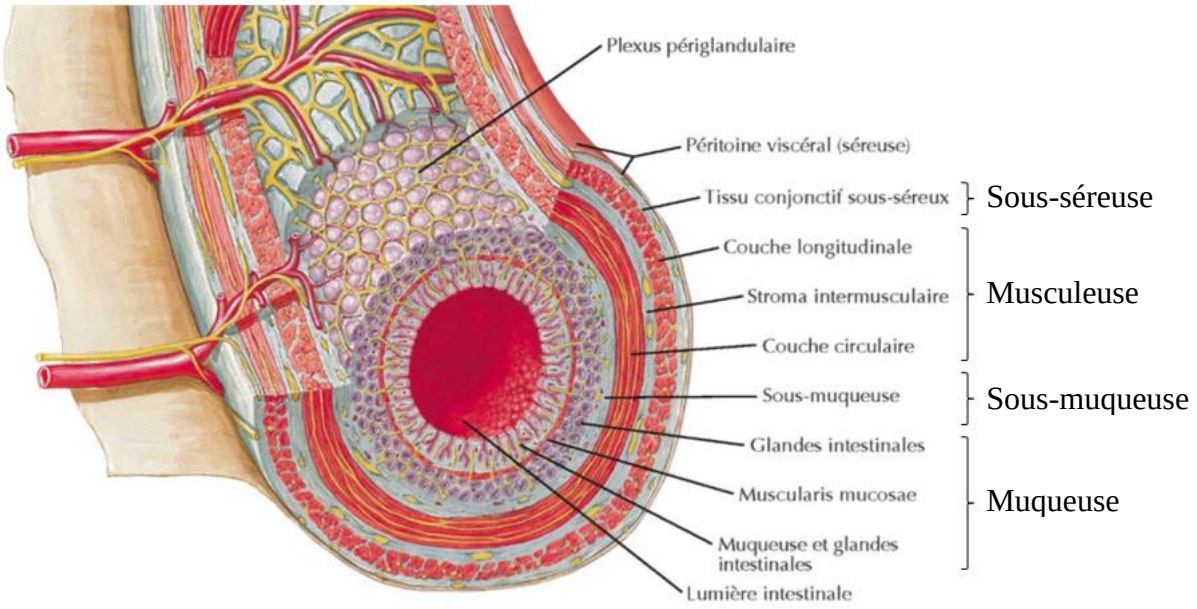


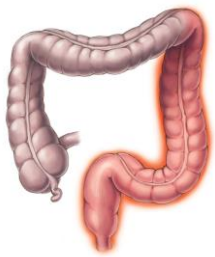
Figure 4. Représentation des tuniques concentriques constituant la paroi du côlon, tirée de Franck N. Netter,[52] 2019. De la couche la plus externe vers la lumière: *i)* la sous-séreuse, *ii)* la musculeuse, *iii)* la sous-muqueuse et *iv)* la muqueuse.

1.2.3. Topographie de la RCH

Contrairement à la MC qui est parcellaire et pouvant atteindre tout le tube digestif, la RCH est caractérisée par une atteinte rectale continue, sans intervalle sain, plus au moins étendue, pouvant atteindre au maximum le cæcum (la première partie du côlon). La présence de lésions anopérinéales ou au niveau de la dernière partie de l'intestin grêle (iléon) n'est pas observée.[53] La classification de Montréal[54] permet de classifier la RCH en trois sous-groupes, selon l'expansion de la maladie (Tableau I).

D'un point de vue histopathologique, la RCH se caractérise par une atteinte non-transmurale (seule la surface de l'épithélium est atteinte) et peut être associée à une architecture de crypte déformée, à une inflammation des cryptes, à la présence d'abcès et d'ulcération dans les cas les plus graves.

Tableau I. Classification de Montréal de l'extension de la RCH. Images reprises de Ungaro *et al.*,[44] 2017.

Étendue	Topographie
E1 : rectite	Atteinte limitée au rectum 
E2 : colite gauche	Atteinte en dessous de l'angle gauche 
E3 : pancolite	Atteinte dépassant l'angle gauche 

1.3. Physiopathologie de la RCH : rôle et implication de la barrière intestinale

1.3.1. Rôle de la barrière intestinale saine

En contact direct avec l'environnement externe, la barrière intestinale joue un rôle essentiel au maintien de l'homéostasie (= maintien de l'équilibre). Elle doit agir comme une barrière semi-perméable, permettant l'absorption des électrolytes et de l'eau provenant de la lumière de l'intestin tout en limitant le transport d'antigènes et de microorganismes potentiellement nocifs. Le maintien de cet équilibre est réalisé par une interaction entre les composants structurels et moléculaires au niveau de la muqueuse, qui opèrent de façon dynamique pour maintenir l'intégrité de la barrière et l'homéostasie immunitaire. Des dommages structuraux de la muqueuse ou des changements plus subtils de la régulation de cette barrière peuvent compromettre son fonctionnement. La barrière intestinale fait référence ici à la couche de mucus et à l'épithélium.

1.3.2. Couche de mucus

1.3.2.1. Rôle de la couche de mucus

La muqueuse colique est protégée des grosses molécules et de l'invasion bactérienne par une barrière qui est une couche de mucus d'environ 830 µm d'épaisseur. Cette couche est particulièrement importante sachant que le côlon contient 10^{13} bactéries.[55] Le mucus colique forme une double couche ; la couche de mucus interne (≈ 120 µm) qui est dense, fermement attachée à l'épithélium et imperméable aux bactéries ; la couche externe, quant à elle, est lâche et perméable aux bactéries (Figure 5).[56,57] La couche de mucus est essentiellement composée de glycoprotéines, de lipides, de protéines et d'acides nucléiques.[58] L'intégrité de la barrière de mucus est principalement maintenue *via* le squelette formé par une famille de glycoprotéines, les mucines. Les couches externe et interne du mucus colique contiennent principalement de la mucine 2 (MUC 2) qui est sécrétée par les cellules caliciformes de l'épithélium. Il est à noter que l'intestin grêle ne comporte qu'une couche de mucus lâche et non attaché à l'épithélium intestinal où la MUC 2 est également la mucine prépondérante.[56] Cette couche labile est capable de se mouvoir jusqu'au rectum à partir de l'iléon.[60]

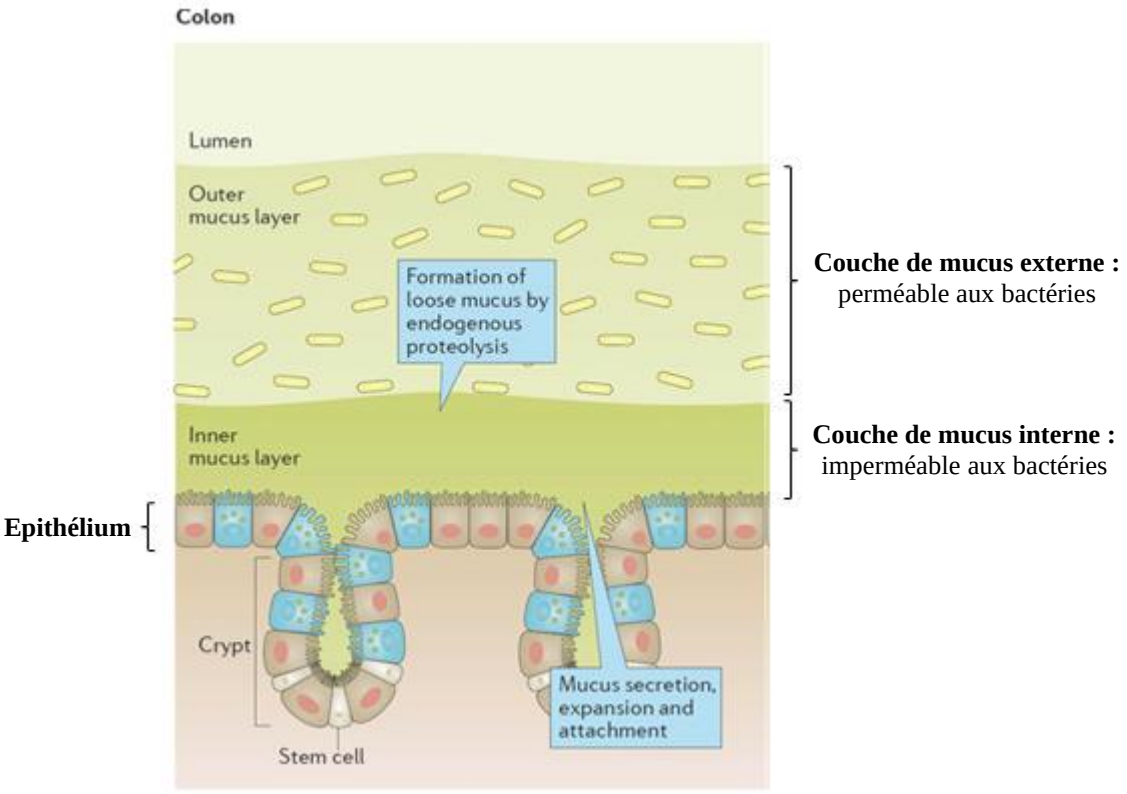


Figure 5. Aperçu général de la couche de mucus colique, tiré de Johansson *et al.*,[59] 2016. Dans le côlon, les bactéries sont localisées dans la couche de mucus externe tandis que la couche interne attachée à l'épithélium est presque exempte de bactéries et protège l'épithélium. *Outer mucus layer*-couche de mucus externe; *inner mucus layer*-couche de mucus interne ; *crypt*-cryptes de Lieberkühn.

1.3.2.2. Altération de la couche de mucus lors de RCH

Tandis que la couche de mucus serait plus épaisse chez les patients atteints de MC, il apparaît que l'épaisseur de cette dernière soit diminuée chez les patients atteints de RCH.[61] Le rôle crucial de la couche de mucus dans le maintien de la barrière intestinale a été démontré sur des souris dépourvues de MUC 2 qui développent alors une colite sévère. Ces souris ne possédant pas de couche de mucus, le microbiote est directement au contact de l'épithélium intestinal.[62,63] Fait intéressant, après l'exposition au dextran sulfate de sodium (DSS), utilisé comme système modèle pour provoquer des atteintes inflammatoires du tube digestif, la couche de mucus interne de côlons murins devenait perméable à la pénétration de bactéries sans que l'épaisseur ne soit modifiée, indiquant donc une altération des propriétés de la couche de mucus.[64] Il est reporté que le DSS a été associé à une augmentation de la perméabilité de l'épithélium et à une disjonction des jonctions serrées,[65] ainsi qu'à une diminution de phospholipides dans le côlon murin.[66] La fonction de barrière de la couche de mucus est notamment liée à son caractère hydrophobe. L'hydrophobicité de la couche de

mucus augmente graduellement du duodénum à l'iléon et reste constante jusqu'au côlon.[67] Braun *et al.*[68] ont montré que l'hydrophobicité de la couche de mucus était diminuée dans le cas de RCH ce qui permettrait ainsi une augmentation de la perméabilité de la couche de mucus aux toxines hydrophiles et aux bactéries luminales.

1.3.3. Epithélium colique

1.3.3.1. Rôle de l'épithélium colique

L'épithélium colique est un médiateur central des interactions entre la muqueuse et l'environnement luminal. Il est situé entre la couche de mucus et la muqueuse colique. Comme cité ci-dessus, le mucus empêche les grosses molécules ou les bactéries de venir au contact de l'épithélium intestinal. Cependant, il ne constitue pas une barrière au flux trans-muqueux d'eau ou de solutés tels que les ions ou encore les molécules pro-inflammatoires (toxines, antigènes). Cela relève de la fonction de l'épithélium qui confère à la muqueuse intestinale des propriétés de perméabilité sélective.[69] L'épithélium est constitué d'une monocouche cellulaire polarisée, formant au niveau apicale (du côté luminal du gros intestin), une frontière continue résultant de l'alignement des cellules juxtaposées. Dans un épithélium intact, cette surface limite le passage de la plupart des solutés hydrophiles en l'absence de transporteurs spécifiques. Cependant, pour limiter les flux trans-muqueux, l'espace paracellulaire doit également être « scellé ». La régulation des transports paracellulaires est réalisée par une série de jonctions intercellulaires[70].

1.3.3.2. Jonctions intercellulaires

L'étanchéité paracellulaire et les fonctions de l'épithélium sont contrôlées par des complexes jonctionnels, qui sont au nombre de trois ; du pôle basolatéral au pôle apical, il y a tout d'abord les desmosomes puis les jonctions adhérentes qui sont sous-jacente au troisième complexe, les jonctions serrées (Figure 6).[65] Les desmosomes et les jonctions adhérentes permettent une forte adhésion intercellulaire maintenant ainsi une bonne proximité cellulaire. Elles sont également des sites de communication intercellulaire.[71] Les jonctions adhérentes sont nécessaires à l'assemblage des jonctions serrées qui scelleront alors l'espace paracellulaire. Les jonctions serrées ou *tight junction* sont les seules à intervenir dans la perméabilité sélective au niveau paracellulaire.[65,72] Les jonctions serrées sont des complexes multi-protéiques composées de 4 protéines transmembranaires : les claudines, les occludines, les tricelullines, et les JAM (*junctional adhesion molecule*).[73]

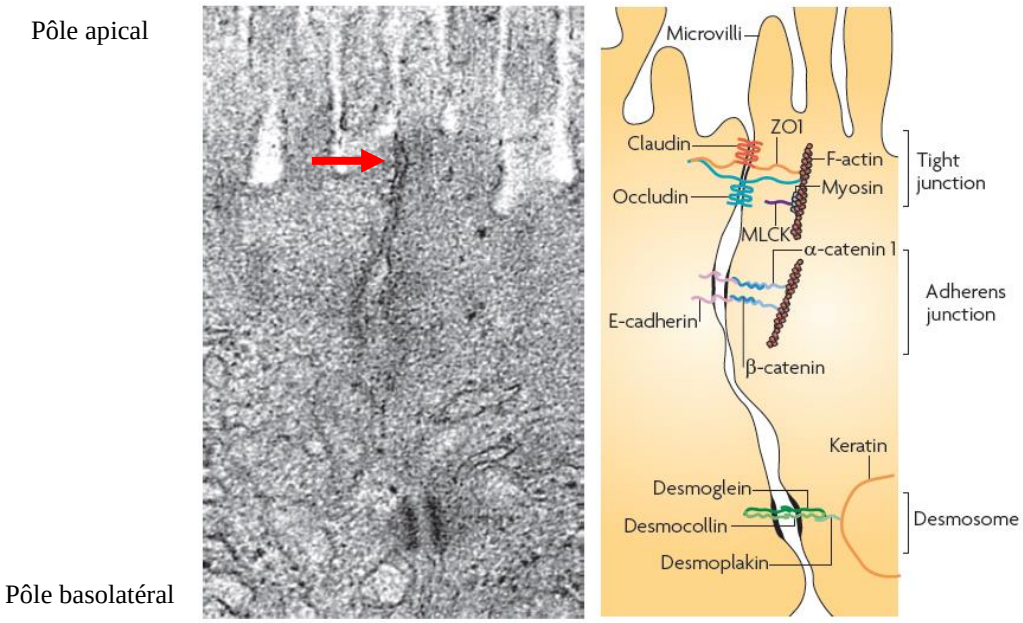


Figure 6. Photographie électronique et schéma des complexes jonctionnels des cellules intestinales épithéliales, tiré de J.R. Turner *et al*.,[65] 2009. Au plus près du pôle apical, la membrane plasmatique des cellules adjacentes semble fusionnée au niveau des tight junction (jonctions serrées, flèche rouge). En dessous les jonctions adhérentes puis les desmosomes sont observables.

1.3.3.3. Altération des jonctions serrées lors de RCH

La RCH est associée à un défaut de la fonction de la barrière épithéliale caractérisé par une absorption réduite et une augmentation des « fuites » de la muqueuse.[70,74] Des études se sont intéressées à l'expression de protéines de la famille des claudines démontrant une expression plus forte de la claudine-2 dans les échantillons de côlon de patients atteint de RCH. Ils ont également observé une réduction concomitante des claudines -3, -4 et -7.[74–76] Une étude génomique de 2014 a permis d'identifier des clusters de gènes gouvernant l'assemblage et la régulation des jonctions serrées, comme étant associés au développement de la RCH.[77] Comme énoncé précédemment, le système immunitaire a également un rôle important dans la déstabilisation de cette barrière. Dans une étude, Stremmel *et al.*[78] ont observé par microscopie électronique à haute résolution (Figure 7 A1), par microscopie optique (Figure 7 A2, A3 et A4) et par microscopie confocale (Figure 7 B1, B2, B3) des échantillons de côlons de patient sains, atteints de RCH ou de MC (Figure 7). Ils ont observé des fentes intercellulaires plus larges et une architecture de cryptes déformées associées à une perte de l'attachement cellule-cellule chez les patients atteints de RCH (Figure A1, A3 et B2) mais pas chez les patients sains ou atteints de MC.

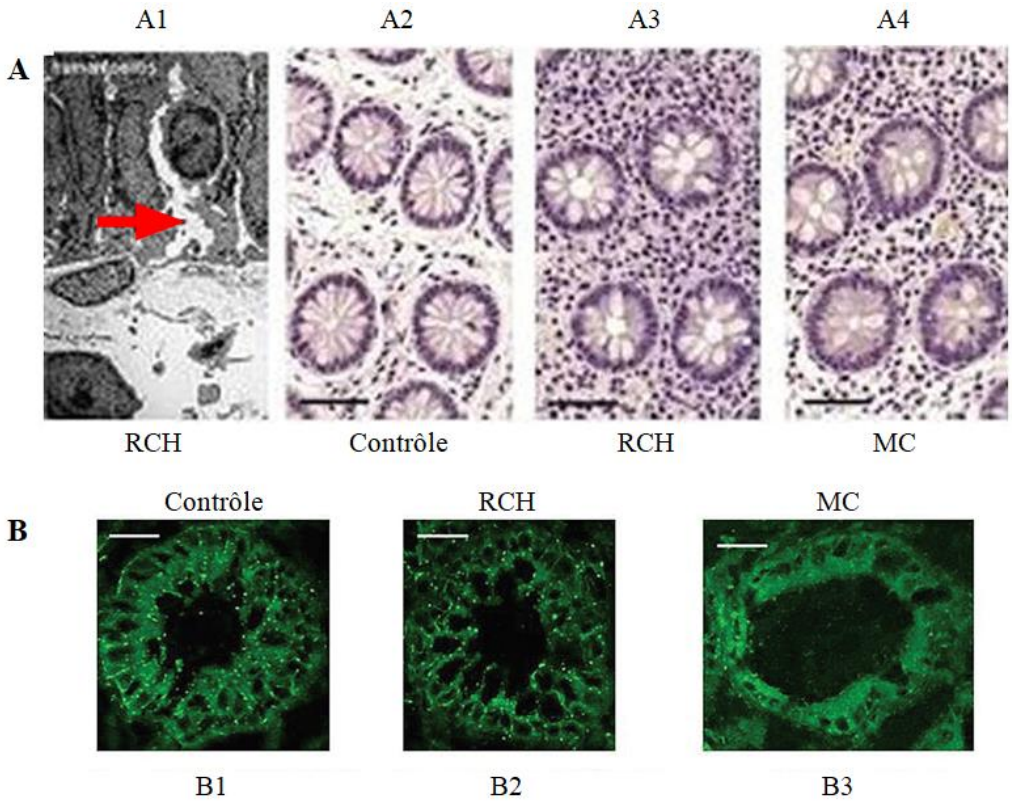


Figure 7. Images de cryptes élargies par la perturbation des jonctions serrées chez des humains atteints de RCH, tirées de Stremmel *et al*.,[78] 2017. (A1) Photographie électronique d'une biopsie du côlon d'un humain atteint de RCH en rémission présentant une perturbation épithéliale (la flèche rouge montre l'élargissement de la fente intercellulaire). Photo de microscopie optique après une coloration à l'hématoxyline et à l'éosine d'une muqueuse non-enflammée avec un élargissement des cryptes chez les patients atteints de RCH (A3) par rapport aux témoins sains (A2) ou aux patients atteints de maladie de Crohn (A4). (B) Exposition au NBD-PC (marqueur fluorescent) de biopsie colique montrant une altération de la coloration paracellulaire et du mucus chez les patients atteints de RCH (B2), mais pas chez les témoins sains (B1) ou chez les patients atteints de maladie de Crohn (B3). Barre d'échelle = 25 µm.

1.4. Les phosphatidylcholines (PC) : rôle et implication dans la RCH

1.4.1. Les PC dans la barrière intestinale

L'intégrité de la couche de mucus est maintenue *via* des interactions entre les mucines et les lipides.[67] Bien que les phospholipides ne soient qu'une part mineure du mucus intestinal, ils sont indispensables au maintien de la fonction de barrière. La composition en phospholipide du tractus digestif a été analysée chez différents animaux tels que le chien, le porc et le rat.[79–81] Il en ressort que les phosphatidylcholines (PC) sont les phospholipides majoritairement présents (35-72%). Les autres phospholipides détectés en proportion mineure sont les phosphatidylethanolamines (10-32%), **L**yso**P**hosphatidy**C**holines (LPC) (5-33%),

phosphatidylinositols (3-5%), phosphatidylglycerols (1-5%), sphingomyélines (5-11%) et phosphatidylsérines (0-5%). Une étude de 2017, menée par Korytowski *et al.*[82] rapporte une forte affinité de la mucine pour le DOPC (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) indépendante d'interaction électrostatique. Effectivement, ils ont démontré par des techniques de diffusion dynamique de la lumière et de microcalorimétrie, que la mucine intestinale, chargée négativement, interagit plus fortement avec les PC zwitterioniques qu'avec des lipides cationiques (DOTAP, 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane), ou anioniques (DOPG, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1′-rac-glycerol)). Cette interaction entre les PC et la mucine établirait alors une forte barrière hydrophobique contre l'invasion bactérienne. Ehehalt *et al.*[60] rapportent que les PC et les LPC représentent plus de 90 % de la fraction de phospholipide du mucus intestinal chez l'humain suggérant alors un transport sélectif pour ces molécules.

1.4.2. Mécanisme de transport des PC dans la couche de mucus

Le mécanisme du transport des PC au niveau de la couche de mucus a été étudié par Ehehalt *et al.*[60] qui ont établi que, chez le rat, la majorité des PC est sécrétée au niveau de la bile mais que l'iléon est également un organe majeur de sécrétion de PC, avec 28 % des PC totales sécrétées dans le lumen intestinal. Le pourcentage de PC sécrétées au niveau du côlon représente seulement 1 %, il a donc été proposé que les PC sécrétées au niveau de l'iléon seraient capables de se déplacer jusqu'au côlon.[85] Ils ont tout d'abord mis en évidence que les PC sont transportées de la circulation systémique vers la couche de mucus au niveau de l'espace paracellulaire à travers les jonctions serrées.[83] Le mécanisme de transport jusqu'au lumen intestinal est le suivant : les PC sont transportées dans le sang par des lipoprotéines qui sont incapables de traverser la barrière endothéliale vasculaire. Cependant, il existe une fraction de PC libres en équilibre avec les PC contenues dans les lipoprotéines qui sont capables de traverser cette barrière. Après avoir traversé l'endothélium vasculaire, les PC sous une forme soluble se retrouvent alors au niveau des jonctions serrées où elles sont transloquées dans la couche de mucus. Le transport serait guidé par un gradient électrique négatif, généré par la sécrétion apicale de Cl^- et HCO_3^- médiée par les protéines CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*). Après le passage à travers les jonctions serrées, les PC sont liées à la MUC 3 puis sont transférées à la MUC 2. La couche de mucus contenant les PC liées aux MUC 2 peut alors se déplacer vers le rectum sous l'impulsion de la motricité colique (Figure 8 A).[83]

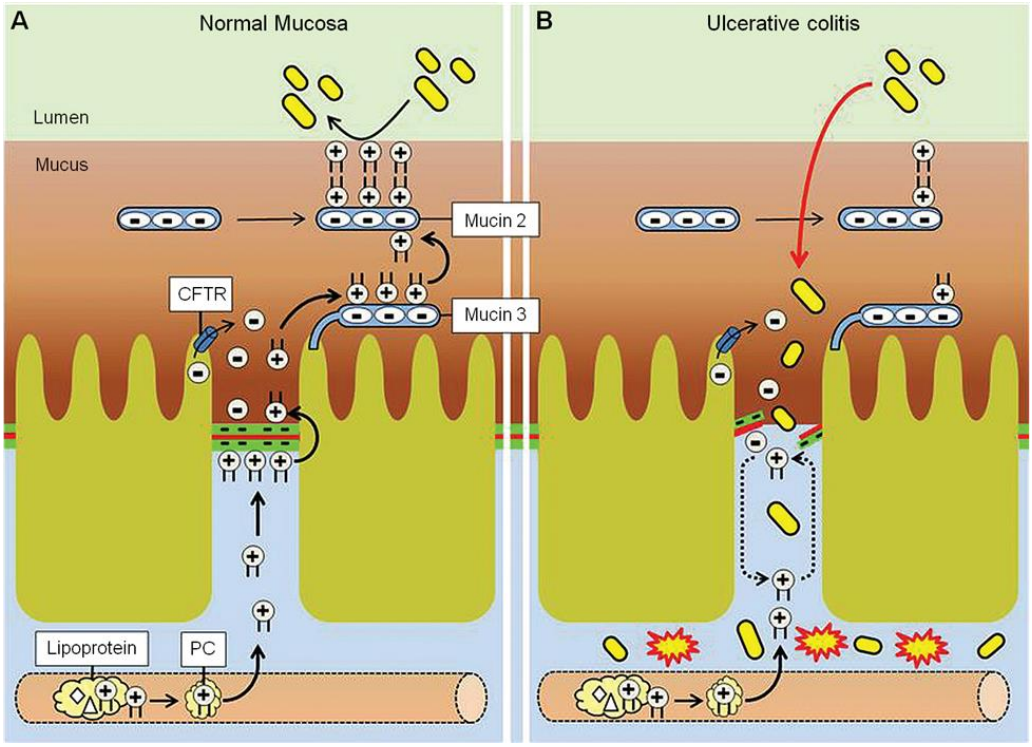


Figure 8. Schéma illustrant le mécanisme physiopathologique proposé de la RCH, schéma tiré de Stremmel *et al.*,[78] 2017. (A) Les phosphatidylcholines (PC) dans le mucus établissent une barrière hydrophobe contre le microbiote intestinal. Les PC proviennent de la fraction libre de PC des lipoprotéines plasmatiques et s'accumulent sélectivement dans le mucus *via* une voie paracellulaire de translocation à travers les jonctions serrées. Le transport est dirigé par un gradient électro-négatif, où les PC se lient à la mucine 3 et l'équilibre est ensuite déplacé vers la mucine 2. Lors de RCH (B), l'altération des jonctions serrées inhibe la sécrétion paracellulaire de PC, résultant ainsi en une faible teneur en PC et donc en une réduction de l'hydrophobicité du mucus. Cela prédispose le côlon à une invasion du microbiote et à une inflammation.

1.4.3. Les PC dans la RCH

1.4.3.1. Altération de la barrière hydrophobe de la couche de mucus

Indépendamment de l'état inflammatoire, les patients souffrant de RCH montrent une diminution de 70 % des PC et des LPC dans la couche de mucus rectal. Il a également été montré que la quantité de PC diminue fortement dans la couche de mucus iléal et colique comparé à des témoins sains ou des patients souffrant de MC.[58,84] La carence en PC dans la couche de mucus a des conséquences fonctionnelles. En effet, en-dessous d'une certaine concentration, la barrière hydrophobe se rompt et devient vulnérable aux attaques bactériennes.[85] La tension de surface de la couche de mucus a été étudiée comme marqueur de cette déficience. Il en ressort que la tension de surface est significativement diminuée dans le cas de patients souffrants de RCH par rapport aux patients atteints MC ou aux contrôles.[68]

1.4.3.2. Mécanisme physiopathologique du transport des PC

Stremmel *et al.*[78] ont mis en évidence le rôle clé de la perturbation des jonctions serrées dans la pathogénèse de la RCH chez des souris génétiquement modifiées. Ces souris expriment des jonctions serrées (*tight junctions)* déficientes, ce qui entraîne alors une diminution de PC dans la couche de mucus. Comme dit précédemment, l'incorporation des PC dans le mucus intestinal à partir de la circulation systémique est régie par une voie de transport paracellulaire *via* les jonctions serrées. Dans le cas de la RCH, les jonctions serrées sont perturbées et ne permettent pas un transport efficace des PC dans le mucus intestinal. Il en résulte une diminution de l'incorporation de PC dans la couche de mucus diminuant ainsi son hydrophobicité. La couche de mucus est alors vulnérable à l'invasion de bactéries du microbiote intestinal et en conséquence cela entraîne une inflammation de la muqueuse (Figure 8 B). Ils rapportent également que l'inflammation peut être prévenue par l'administration orale de PC chez ces souris génétiquement modifiées. Cela est en adéquation avec les résultats d'études cliniques qui montrent que l'apport de PC exogènes est bénéfique chez les patients atteints de RCH.[86–88]

Sur la base de ces résultats, un des objectifs de cette thèse est de concevoir des systèmes lipidiques pour le transport de PC exogènes au niveau du côlon afin de rétablir la composition en phospholipide de la couche de mucus et ainsi restaurer sa fonction de barrière hydrophobe.

1.5. RCH : approches thérapeutiques

La RCH étant une maladie incurable, l'objectif de la prise en charge médicamenteuse est d'induire et de maintenir la rémission.[89] Les traitements les plus courants sont les dérivés salicylés, les corticostéroïdes, les immunomodulateurs et les anti-TNF.[89,90]

1.5.1. Dérivés salicylés

Les aminosalicylés sont généralement utilisés en thérapeutique de première ligne dans le traitement de la RCH. La mésalazine ou acide 5-aminosalicylique (5-ASA) est la molécule la plus utilisée. Elle est également la molécule active de différentes prodrogues ; la sulfasalazine, l'oslalazine et la balsalazide (Figure 9), qui une fois administrées seront métabolisées en 5-

ASA. Ces molécules sont utilisées pour réduire l'inflammation dans le traitement de RCH légère ou modérée et maintenir la rémission. Le 5-ASA est mieux toléré par les patients par rapport à la sulfasalazine bien que des diarrhées et des douleurs abdominales aient été répertoriées.[91] Cependant, seulement 40 à 50% des patients atteignent la rémission avec ce traitement.[92]

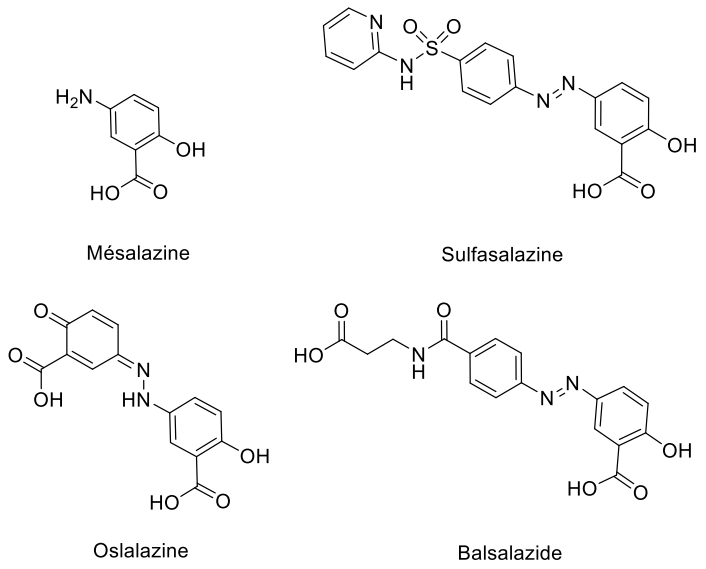


Figure 9. Structures moléculaires de 5-ASA et des prodrogues dérivées.

Les mécanismes d'actions proposés de l'effet anti-inflammatoire du 5-ASA sont divers. Le 5-ASA augmenterait l'expression et l'activation du récepteur nucléaire PPARγ (*peroxisome proliferator-activated receptor* = régulateur négatif de l'inflammation) qui est exprimé dans les cellules épithéliales et immunitaires de la muqueuse colique et serait impliqué dans la régulation de la RCH.[45] Le 5-ASA permet également l'inhibition de la cascade de réactions à partir de l'acide arachidonique par l'inhibition de cyclooxygénases (COX).[93] Les COX permettent la formation de médiateurs de l'inflammation *via* la métabolisation de l'acide arachidonique.

1.5.2. Corticoïdes

Les corticoïdes suppriment très efficacement l'inflammation et produisent un soulagement rapide des symptômes mais ils ne sont pas capables de maintenir la rémission.[89] Ils sont utilisés en seconde ligne dans le cas d'un échec du traitement au 5-ASA ou lors de colite étendue. Cependant, de nombreux effets indésirables peuvent survenir lors de traitements aux corticoïdes. Une thérapie sous corticoïdes de longue durée implique le risque de l'apparition du syndrome de dépendance aux corticoïdes, c'est pourquoi un sevrage est réalisé avec des

doses dégressives de médicament. L'arrêt de la prise de corticoïdes à la rémission peut engendrer une rechute précoce (moins de 3 mois) ou répétée (2 poussées ou plus en 6 mois). Les effets secondaires sont nombreux et comprennent par exemple la prise de poids, la rétention d'eau lors de traitement à court terme, et augmentent le risque de cataracte, d'ostéoporose, de myopathie et d'affections associées à une suppression immunitaire lors de traitement à plus long terme.[91]

Pour autant, un mécanisme d'action serait le suivant : le récepteur des glucocorticoïdes (GR) est un récepteur nucléaire qui est activé après sa liaison avec les corticoïdes ; il est alors transloqué dans le noyau où il agit sur des gènes cibles ; les corticoïdes ont une action anti-inflammatoire et immunosuppressive générant une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-2, IL-6 et d'IFNγ).

1.5.3. Immunomodulateurs

i) Thiopurines

Les thiopurines, telles que l'azathiopurine ou la 6-mercaptopurine, sont des immunosupresseurs utilisés pour le maintien de la rémission induite par les stéroïdes ou en cas de cortico-résistance ou de cortico-dépendance.[44,89] Ces molécules sont des prodrogues dont le métabolisme dépend d'une enzyme, la thiopurine S-methyl-transferase (TPMT). La dose prescrite sera alors dépendante de l'activité de la TPMT retrouvée chez le patient. A l'image des immunosuppresseurs, les thiopurines augmentent le risque d'infections et sont associées au développement de cancer, en particulier les lymphomes ou des cancers de la peau.[94,95]

Le mécanisme d'action des thiopurines est mal connu mais il semblerait que ces médicaments soient métabolisés en 6-thioguanine qui inhiberait ensuite le gène RAC1 conduisant à l'inhibition de l'activation des cellules du système immunitaire inné et adaptatif.[45] Ces médicaments favoriseraient également une activité apoptotique sur les lymphocytes T *via* l'inhibition de RAC1.[96]

ii) Inhibiteur de la calcineurine

L'utilisation des inhibiteurs de la calcineurine telle que la cyclosporine A est réservée à des situations particulières et se limite exclusivement à la colite aigüe sévère réfractaire aux

stéroïdes.[89] Néanmoins, la durée du traitement ne doit pas dépasser 6 mois pour limiter les risques de néphrotoxicité.

1.5.4. Anti-TNF

Les anti-TNF, tels que l'infliximab, l'adalimumab et le golimumab, sont des anticorps qui permettent d'induire et de maintenir la rémission en cas de RCH modérée et sévère. Les anti-TNF sont des inhibiteurs du TNF qui est produit par de nombreuses cellules immunitaires et non-immunitaires de l'intestin enflammé chez les patients souffrants de RCH. Cette cytokine a de nombreux rôles dans la paroi intestinale. Par exemple elle active la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages, elle augmente l'apoptose des cellules épithéliales[97] et régule l'apoptose des lymphocytes T.[98]

Les anti-TNF ne sont utilisés qu'en cas d'échec des traitements conventionnels non-biologiques, incluant les thiopurines. Les anti-TNF ont montré une bonne efficacité de la gestion et du traitement de la RCH. Cependant, seulement 30-50 % des patients souffrant de MICI répondent aux thérapies anti-TNF.[45] Ces traitements sont associés à de nombreux effets indésirables qui peuvent être graves. Ils augmentent notamment le risque d'infection et de mélanome.[99]

1.5.5. Nouveaux traitements naturels pour le traitement de la RCH

Afin de répondre aux limitations des traitements actuels, de nouvelles molécules naturelles ont été étudiées pour le traitement de la RCH. Par exemple, le 6-gingérol, un composant extraits du gingembre, améliore la colite chez l'animal *via* une action anti-oxydante et anti-inflammatoire.[100] Les dérivés indoles naturels tels que l'indigo et l'indirubine extraits de l'indigotier et l'indole-3-carbinol retrouvé dans le brocoli et le chou , ont montré un effet anti-inflammatoire et renforceraient les jonctions serrées de la muqueuse intestinale.[101] Il y a également le magnolol, extrait de *Magnolia officinalis*, qui a démontré un effet anti-inflammatoire chez des souris modèles de RCH.[102] Les probiotiques pourraient aider à contrôler la dysbiose intestinale et à améliorer le fonctionnement du microbiote intestinal. Du fait de leur forte innocuité, les probiotiques ont fait l'objet d'études cliniques mais peu de données montrent une capacité à induire et à maintenir la rémission en cas de RCH.[103]

Parmi ces molécules, la curcumine reste l'un des composés naturels le plus largement étudié par la communauté scientifique. La curcumine est le composant qui donne la couleur jaune orangé au curcuma (aussi appelé safran des Indes) ou au curry. Cette molécule fait

partie de la famille des polyphénols naturels et est isolée du rhizome du *curcuma longa* (*c. longa*), une plante herbacée originaire du sud de l'Asie. Le *c. longa* appartient à la famille des zingibéracées, de la même famille que le gingembre. Une fois son rhizome réduit en poudre, on obtient le curcuma, une épice incontournable de la cuisine indienne. Outre son utilisation culinaire sous forme d'épice, de colorant ou de conservateur, le curcuma est également employé en médecine traditionnelle indienne, la médecine Ayurvédique, pour traiter diverses affections telles que la fièvre, l'arthrite, les problèmes gynécologiques et gastriques, les désordres hépatiques et sanguins, l'acné, le psoriasis, et d'autres infections chroniques.

De plus, le curcuma contient d'autres molécules polyphénoliques appelées curcuminoïdes qui sont en plus de la curcumine (60-70 % en poids d'extrait brut du curcuma), la déméthoxycurcumine (20-27 %), la bisdéméthoxycurcumine (10-15 %) et la cyclocurcumine identifiée plus récemment (Figure 10). D'après les différents travaux effectués, la curcumine a démontré un potentiel thérapeutique contre les maladies inflammatoires, le cancer, les maladies neurodégénératives, la dépression, le diabète, l'obésité et l'athérosclérose et notamment vis-à-vis de la RCH.[104,105]

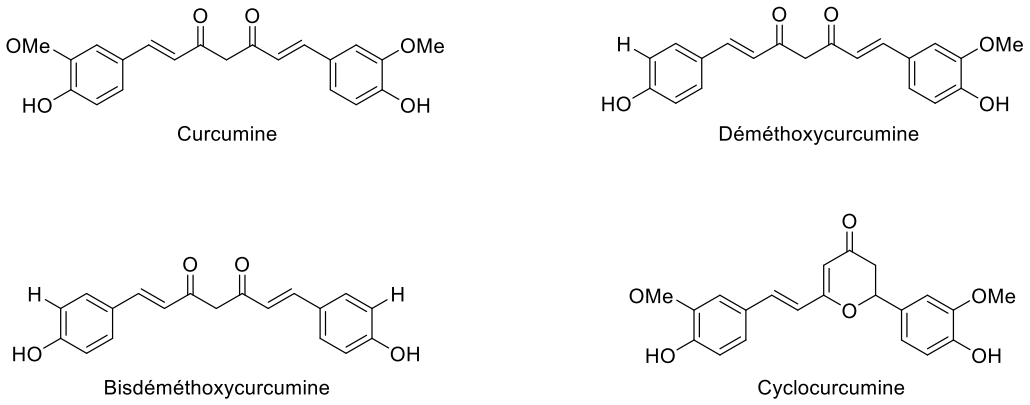


Figure 10. Structure des curcuminoïdes.

1.6. Curcumine pour le traitement de la RCH

1.6.1. Cibles moléculaires de la curcumine associées à la RCH

Comme vu précédemment, l'inflammation joue un rôle clé dans le développement de la RCH. La curcumine peut interagir avec de nombreuses cibles moléculaires telles que NF-κB (*nuclear factor-kappa B*), TLR4, PPARγ et des enzymes comme la cyclooxygénase-2 (COX-2) ou la 5-lipoxygénases qui sont impliquées dans le métabolisme de l'acide arachidonique. La littérature rapporte un grand nombre de cibles de la curcumine comme cela est exposé dans

la publication de Kunnumakkara *et al*.[104] La partie qui suit présente une liste non-exhaustive des cibles de la curcumine.

1.6.1.1. NF-κB (*nuclear factor-kappa B*)

Il apparaît que la curcumine interagirait avec le facteur de transcription NF-κB.[104,105] Ce dernier est nécessaire à l'initiation ou à la régulation de la transcription de gènes. La transcription est un processus de copie du matériel génétique en ARN. NF-κB joue un rôle central dans l'inflammation et son activation est fortement impliquée dans la pathogénicité de la RCH.[106] L'activation de NF-κB peut-être initiée par différents stimuli tels que les cytokines pro-inflammatoires (soit TNFα, IL-1β, IL-2). L'activation de NF-κB induit à son tour la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (tels que TNFα, IL-1β, IL-6 et IL-12) qui sont responsables de l'activation des cellules immunitaires présentes au niveau de la *lamina propria*. Cet enchainement d'activation et de sécrétion perpétue ainsi l'inflammation de la muqueuse colique car le TNFα induit par la voie NF-κB provoquera à son tour l'activation de NF-κB perpétuant alors l'inflammation. D'après certaines études, il semblerait que la curcumine inhibe l'expression de NF-κB. En effet, pour que NF-κB soit activé, il faut que sa molécule inhibitrice IκB soit dégradée. Des études rapportent que la curcumine inhibe la dégradation d'IκB et par conséquent inhibe l'expression de NF-κB (Figure 11).[107,108]

1.6.1.2. TLR4 (Toll Like Receptor 4)

D'autre part, l'expression du récepteur TLR 4 serait augmentée chez les patients souffrant de RCH.[44] Celui-ci reconnait les LPS présents au niveau du côlon. Cette reconnaissance induit alors l'activation de NF-κB qui provoquera à son tour la libération de médiateurs de l'inflammation. Il est rapporté que TLR4 serait une cible de la curcumine qui inhibe l'activation du récepteur en bloquant sa dimérisation et donc sa voie de signalisation en aval.[109] Des études *in vivo* ont montré que la curcumine est capable de réguler la réponse inflammatoire en modulant la voie TLR4/NF-κB (Figure 11).[110,111]

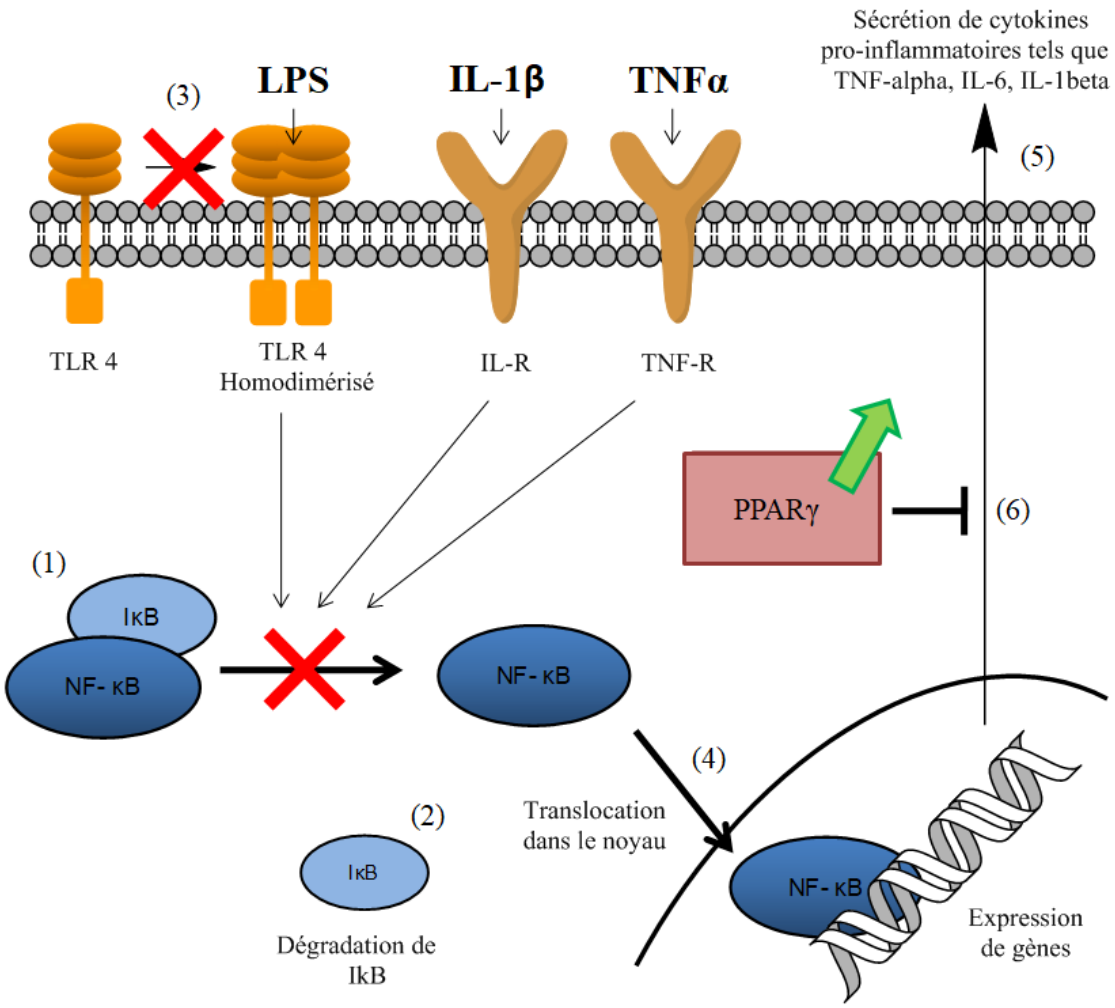


Figure 11. Interaction de la curcumine avec quelques cibles moléculaires. NF-κB est maintenu dans le cytoplasme sous forme inactive associé à IκB. Cette interaction bloque la capacité de NF-κB à être transloqué dans le noyau (1). IκB est dégradé lorsque TNFα ou IL-1β se lient à leur récepteur conduisant à l'activation de NF-κB (2). La reconnaissance de LPS par TLR4 induit l'homodimérisation de TLR4 permettant également l'activation de NF-κB (3). Après son activation, NF-κB est transloqué dans le noyau où il se lie avec des gènes cibles pour induire leur expression (4). Cela conduit à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (5). La curcumine inhibe (✗) la dégradation de IκB empêchant l'activation de NF-κB et donc sa translocation dans le noyau. La curcumine inhibe également (✗) l'homodimérisation de TLR4 et par conséquence l'activation de NF-κB. PPARγ inhibe l'inflammation (6). La curcumine permet d'augmenter l'expression de PPARγ (⇗) ou elle agirait comme un agoniste du récepteur.

1.6.1.3. PPARγ (*peroxisome proliferator-activated receptor γ*)

Par ailleurs, il a été suggéré que le récepteur nucléaire PPARγ serait étroitement lié à la pathogenèse de la RCH. Au niveau des cellules épithéliales coliques, des voies de l'inflammation sont inhibées par PPARγ, notamment la voie NF-κB.[112] Puisque PPARγ est un médiateur anti-inflammatoire, sa surexpression est capable de soulager la colite.[113]

Inversement, la suppression de PPARγ favorise le développement de colite.[114] L'utilisation d'agonistes synthétiques de PPARγ, comme la troglitazone ou la rosiglitazone, a démontré un effet bénéfique chez des modèles de rongeurs souffrants de colite.[115,116] L'administration de rosiglitazone a également induit la rémission chez des patients souffrant de RCH dans une étude clinique.[117] Comme vu précédemment, le récepteur PPARγ est la cible d'une classe de médicaments, les 5-ASA, utilisée pour induire et maintenir la rémission en cas de RCH. Il est démontré que l'expression épithéliale de PPARγ est diminuée au cours de la RCH.[118] La curcumine agirait également sur le récepteur PPARγ. Le mécanisme d'action de la molécule est encore mal connu, il ressort cependant que la curcumine permettrait d'augmenter l'expression de PPARγ au niveau des cellules de l'épithélium colique et/ou elle agirait comme un agoniste de ce récepteur (Figure 11).[119–121]

1.6.2. Activité de la curcumine sur les cellules du système immunitaire

La curcumine a été identifiée comme le constituant le plus actif du curcuma et a démontré une forte propriété anti-inflammatoire. D'après la littérature, la curcumine affecte également la fonction et la différenciation de nombreuses cellules immunitaires impliquées dans la pathogénicité de la RCH. Selon Cong Y.*et al.*,[122] la fonction de présentation d'antigène des cellules dendritiques est inhibée en présence de curcumine induisant alors une diminution de la libération de cytokines pro-inflammatoires de la part du système immunitaire adaptatif. Sous l'action de la curcumine, ces cellules stimuleront également la différenciation des cellules Treg (lymphocyte T régulateur) intestinales, qui dans des modèles de colite murine, préviennent le développement de la RCH.[122] Dans des modèles de colite chez le rat, la curcumine permet de réguler la balance T_H1/T_H2 au niveau de la muqueuse colique.[123] La curcumine inhibe également l'activation de NF-κB des macrophages, entravant alors la production de nombreuses cytokines pro-inflammatoires telles que IL-12, IFN-γ, IL-1β et de TNFα.[124] La curcumine réduit également l'infiltration des neutrophiles au niveau des sites inflammatoires en affectant la formation du gradient de chimiokines (cytokines contrôlant la migration des cellules du système immunitaire).[125] En plus de son effet sur les cellules immunitaires, la curcumine altère la production générale de cytokines tels que : TNFα,[126] d'IFN-γ,[127] d'IL-1,[128] et d'IL-17,[129] tout en augmentant la production de cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et TGF-β).[123]

1.6.3. Activité de la curcumine sur la barrière épithéliale

Comme énoncé précédemment, la pathogénèse de la RCH est associée à une perte de fonction de la barrière épithéliale médiée par une altération des jonctions serrées. Les cytokines TNFα et l'IL-1β ont un rôle prépondérant dans la déstabilisation de la barrière intestinale indépendamment de leur effet pro-apoptotique sur les cellules épithéliales intestinales lors d'inflammation.[130,131] En effet, ces cytokines altèrent les jonctions serrées et augmentent la perméabilité paracellulaire en redistribuant et en relocalisant les protéines transmembranaires telles que les claudines, les occludines, les JAM et les tricellulines.[132] Le mécanisme d'action de ces cytokines serait médié par l'augmentation de la transcription et de l'expression de la kinase des chaînes légères de la myosine (MLCK, *Myosin light-chain kinase*) qui contribuent à la perturbation des jonctions serrées. Le TNFα induit l'augmentation de l'expression de MLCK *via* l'activation de NF-κB. Pour cela, IκB est dégradé permettant ainsi la translocation nucléaire de NF-κB et conduisant à la transcription et l'expression de MLCK favorisant l'ouverture des jonctions serrées.[133]

Il a été rapporté que la curcumine prévient l'augmentation de la perméabilité des jonctions serrées en présence de TNFα dans un modèle cellulaire intestinal humain (Caco-2). Cette propriété a été attribuée à l'effet inhibiteur de la curcumine sur NF-κB.[134] L'IL-β, quant à elle, induirait l'augmentation de l'expression de MLCK *via* l'activation d'une kinase (p38 MAPK). Une étude de 2017 a démontré que la curcumine permettrait d'inhiber la voie de signalisation induite par l'IL-β en inhibant la production d'IL-β et l'activation de la voie p38 MAPK.[135]

Ghosh *et al.*[136] rapportent que la curcumine serait capable de réduire l'espace paracellulaire et donc de rétablir la fonction de la barrière en augmentant l'expression de la claudine-1 et de la ZO-1 (= protéine cytoplasmique permettant la liaison de diverses protéines membranaires, comme les occludines, au cytosquelette d'actine).

1.6.4. Potentiel thérapeutique de la curcumine lors de RCH

La curcumine semble avoir de nombreuses propriétés chez l'animal suggérant un potentiel effet thérapeutique lors de RCH. Dans ce cadre, des études cliniques ont été menées, notamment de 2006 à 2017, en vue de déterminer son effet pharmacologique lors de RCH douce à modérée chez l'Homme. Durant ces études, la curcumine était administrée comme adjuvant à la mésalazine (anti-inflammatoire), c'est-à-dire, afin de compléter ou de renforcer l'action de cette dernière. Lang *et al.*[137] montrent que l'addition journalière de 3 g de

curcumine à la mésalazine induisait une rémission clinique et endoscopique supérieure par rapport au groupe de patients traités avec le placébo additionné à la mésalazine (*pour info : essai contrôlé aléatoire, effectué sur 50 patients, en double aveugle et contre placebo, les 50 patients ne répondaient pas à la dose maximale de mésalazine après deux semaines de traitement oral et topique*). Dans une autre étude, Singla et *al.*[138] ont évalué l'efficacité d'une préparation standardisée de curcumine (NCB-02 ; comportant 72 % de curcumine, 18,08 % de déméthoxycurcumine et 9,42 % de bisdéméthoxycurcumine) en lavement. Les auteurs de cette étude rapportent que le groupe de patients traités avec la préparation NCB-02 montrait aussi une réponse clinique par une rémission clinique et endoscopique supérieure au groupe traité avec le placebo *(pour info : étude contrôlée aléatoire, en double aveugle et contre placebo sur 45 patients souffrant de RCH douce à modérée traités avec NCB-02 en addition de mésalazine ou par le placebo en addition de mésalazine par voie orale)*. Hanai *et al.*[139] se sont intéressés à la capacité de la curcumine à maintenir la rémission chez des patients avec une RCH quiescente. Cet essai clinique a été mené sur 89 patients avec une RCH quiescente dans les mêmes conditions citées précédemment. Ainsi, sur les 43 patients traités avec 2 g par jour de curcumine en addition de mésalazine ou de sulfasalazine, 2 patients (4,65 %) ont eu une rechute après 6 mois de traitements tandis que 8 patients (20,51 %) ont présenté une rechute avec le placebo en addition de mésalazine ou de sulfasalazine. Cette étude indiquerait que la curcumine serait un bon candidat pour maintenir la rémission en cas de RCH. Ils rapportent également que la curcumine permettrait de diminuer la morbidité associée à la RCH. Cependant, Kedia *et al.*[140] rapportent dans leur étude (*contrôlée aléatoire en double aveugle et contre placebo*), qu'une faible dose de curcumine (0,450 g/jour) n'est pas efficace pour induire une réponse ou une rémission clinique de la part de patients souffrant d'une RCH douce à modérée.

L'utilisation de la curcumine pour le traitement de la RCH semble prometteuse, de plus l'ensemble des essais cliniques rapporte que la curcumine, aux doses administrées, n'induit pas d'effets indésirables graves et serait bien tolérée. Une étude clinique de phase I rapporte que l'administration de curcumine jusqu'à 8 g par jour pendant trois mois n'est pas toxique chez l'Homme.[141] Cependant, il est encore prématuré pour conclure sur l'effet thérapeutique de la curcumine sur la RCH. Deux méta-analyses, de 2018, sur la curcumine administrée en tant qu'adjuvant lors de RCH concluent que les bases de données disponibles ne permettent pas de statuer de manière franche sur la contribution de la curcumine à obtenir une rémission et une amélioration de la réponse clinique chez les patients atteints de RCH douce à

modérée.[142,143] Ces études rapportent que de nouveaux essais thérapeutiques seraient nécessaires afin d'obtenir une taille d'échantillon suffisante, des doses en curcumine adéquates et de limiter les biais afin de standardiser les protocoles et de conforter les résultats des essais cliniques.

1.6.5. Limitation de la curcumine pour une prise par voie orale

La curcumine présente d'intéressantes propriétés pour le traitement de la RCH. Cependant, de nombreuses études rapportent une faible solubilité, une forte dégradation au pH alcalin, une mauvaise absorption et un métabolisme rapide de la curcumine réduisant considérablement sa biodisponibilité.[144] Effectivement, de nombreuses études chez l'animal et l'Homme rapportent des concentrations en curcumine de l'ordre du $ng.mL^{-1}$ après une administration orale.[144] Par exemple, une étude clinique de phase I montre une faible concentration de curcumine dans le sérum (50,5 $ng.mL^{-1}$) après une administration orale d'une forte dose de curcumine (12 g).[145] Wahlang *et al.*[146] se sont intéressés au transport de la curcumine à travers l'épithélium intestinal, en utilisant un model *in vitro* de cellules Caco-2. Ils rapportent une faible perméabilité de la monocouche de cellules Caco-2 pour la curcumine. Ils justifient ces résultats par une métabolisation de la curcumine absorbée et également par une fraction de curcumine retenue dans la membrane cellulaire. En accord avec Zeng *et al.*,[147] ils excluent le rôle des systèmes d'efflux (= mécanisme par lequel les cellules rejettent à l'extérieur des composés) pour justifier la faible biodisponibilité de la curcumine. Zeng *et al.* rapportent également une faible absorption et la faible perméabilité d'une monocouche de cellules Caco-2 pour la curcumine. Fait intéressant, Frank *et al.*[148] montrent une augmentation du transport (3,8 fois) de la curcumine solubilisée dans une solution micellaire à travers une monocouche de cellules Caco-2. Cela est en accord avec une augmentation de la biodisponibilité (185 fois) de la curcumine préparée dans une formulation à base du tensioactif Tween 80 chez l'Homme.[149]

Sur la base de ces résultats, un des objectifs de la thèse est d'étudier l'interaction de la curcumine avec des modèles de membrane et de concevoir des systèmes lipidiques pour le transport et l'absorption de curcumine au niveau du côlon afin d'en limiter l'inflammation.

1.7. Systèmes colloïdaux lipidiques pour une administration orale

1.7.1. Généralités sur les systèmes de délivrance de principes actifs pour une prise orale

Les voies d'administration de principes actifs sont dépendantes de la localisation de l'inflammation dans le tractus digestif. En cas de RCH, les zones affectées peuvent s'étendre du rectum et au maximum, à toute la longueur du côlon. Les formulations rectales telles que les lavements ou les suppositoires peuvent atteindre le rectum et la partie inférieure du côlon ascendant. Cependant, celles-ci sont inefficaces en cas de pancolite, c'est-à-dire, lorsque l'ensemble du côlon est affecté. Une administration par voie orale est alors considérée comme plus adaptée d'autant plus qu'elle permet une meilleure compliance des patients avec un coût de mise en œuvre plus faible. Cependant, la prise orale de médicament conduit à une absorption précoce du principe actif (P.A.) au niveau de l'intestin grêle. La molécule active y subira l'effet de premier passage hépatique, conduisant à sa métabolisation et son inactivation, avant de rejoindre la circulation systémique où seulement une faible fraction du principe actif atteindra la région enflammée.

L'objectif des systèmes de délivrance dans une stratégie de traitement de la RCH est de réduire l'absorption intestinale, permettant ainsi de diminuer les effets secondaires du principe actif et d'augmenter leur concentration au niveau des sites inflammatoires. Cela permettra aussi d'augmenter son activité thérapeutique et de réduire la fréquence et les doses de la prise d'un médicament. En règle générale, l'encapsulation de principe actif pour une prise orale permet *i*) de prévenir ou réduire la dégradation précoce du principe actif qui conduit à une perte d'activité pharmacologique *ii*) d'augmenter la concentration locale en principe actif au niveau du site de la maladie en contrôlant sa libération dans le temps et l'espace *iii*) et de diminuer la toxicité et les effets secondaires liés au principe actif. Paul Ehrlich (1854-1915), prix Nobel de physiologie en 1908, fût le premier à formuler le concept de « Magic Bullet ». Cette stratégie pionnière vise à cibler des agents pathogènes ou des cellules cancéreuses afin de maximiser l'effet thérapeutique du principe actif tout en réduisant les effets secondaires liés au médicament.[150] Plus de cent ans après, ce concept reste d'actualité. Les connaissances dans la physiopathologie de la RCH permettent le développement de systèmes innovants de libération de principe actif.

1.7.2. Considérations générales du tractus digestif lors de RCH

Traditionnellement, les systèmes de délivrance conventionnels de P.A. par voie orale agissent selon différentes stratégies pour cibler le côlon. En effet, libérer les principes actifs aux sites d'intérêts expose notamment l'enveloppe protectrice aux conditions physiologiques du tractus gastro-intestinal telles que le pH luminal, le temps de transit, et le microbiote intestinal (*via* la production d'enzymes).[151] Cependant, les changements physiopathologiques lors de RCH qui sont également dépendants de la gravité de la maladie, peuvent limiter les stratégies établies mais une bonne connaissance de ces nouvelles conditions pourrait mener à de nouvelles stratégies pour augmenter la concentration en P.A. au niveau des régions coliques enflammées (Tableau II).

Tableau II. Changements pathophysiologiques du tractus gastro-intestinal en cas de RCH

	Témoin sain	**RCH**	**Références**
pH luminal			
• Intestin grêle	5,5-7,5	Non modifié	152
• Côlon	6,1-7,5	4,8-7,3	152
Temps de transit			
• Intestin grêle	3-4 h	Non modifié	153
• Côlon	6-70 h	24 h	153
Flore bactérienne colique	10^{13} bactéries	Diversité altérée	11,55
Fonction de la barrière intestinale	normale	Jonction serrées anormales	77,78
Couche de mucus	normale	Epaisseur diminuée Diminution de PC	61,84

1.7.2.1. Temps de transit intestinal

Chez les personnes saines, le temps de transit au niveau de l'intestin est de 3-4 h indépendamment de l'état d'alimentation de la personne (jeûne ou alimentée). Puis le passage dans le côlon peut durer de 6 à 70 h. En cas de RCH active, le temps de transit colique, c'est-à-dire dans le côlon, est diminué à 24 h en moyenne contrairement à celui de l'intestin grêle qui paraît être invariable.[153] Ce temps de transit diminué peut être en partie attribué à une fréquence de diarrhée augmentée.[154] Ces conditions raccourciraient alors le temps de séjour

des systèmes de délivrance au niveau des régions enflammées coliques diminuant ainsi leur efficacité.

1.7.2.2. pH gastro-intestinal

Chez les témoins sains, le pH de l'intestin grêle est de 5,5-7,5 et augmente graduellement jusqu'à atteindre 6,5-7,5 au niveau de l'iléon. Le pH diminue alors de la partie basse de l'iléon jusqu'au niveau du caecum. Le pH augmente ensuite dans le côlon gauche et dans le rectum à 6,1-7,5.[152] Les valeurs de pH montrent une grande variabilité interindividuelle mais elles dépendent aussi de l'état de la maladie chez le porteur de RCH. Effectivement, contrairement au pH de l'intestin grêle qui ne varie pas en cas de RCH active, le pH luminal du côlon quant à lui diminue[152] avec des valeurs de pH qui ont été relevées à 2,3 au moment d'une RCH active.[155] Une diminution du pH colique en cas de RCH engendrerait alors une libération incomplète du principe actif à partir des systèmes de délivrance dépendants du pH, réduisant ainsi leur efficacité.

1.7.2.3. Microbiote intestinal

Le côlon humain présente une grande diversité de bactéries qui produisent de nombreuses enzymes nécessaires à la fermentation des aliments non digérés au niveau de l'intestin grêle tels que les glucuronidases, les galactosidases, les désaminases, les azoréductases etc…[156] Ces enzymes sont la cible de certaines prodrogues comme la sulfaselazine qui contient le 5-ASA comme métabolite actif. Ces protéines permettent également le clivage des systèmes de délivrance à base de polysaccharides, permettant la libération du principe actif au niveau du côlon. Cependant, comme dit précédemment, la RCH est associée à une diminution de la diversité bactérienne et donc à une altération de la diversité des enzymes bactériennes cibles.[157]

1.7.2.4. Barrière intestinale enflammée

Comme cité dans la première partie de ce chapitre, lors de RCH, la barrière intestinale est caractérisée par une structure altérée incluant une perméabilité accrue de l'épithélium attribuable à une dérégulation des jonctions serrées et même à une perte totale de l'épithélium au niveau d'ulcération. La couche de mucus montre quant à elle, une diminution de son épaisseur[61] ainsi qu'une modification de sa composition en PC.[84] Ces caractéristiques physiopathologiques de l'épithélium colique sont également accompagnées par une invasion

des cellules de l'immunité au niveau de la muqueuse enflammée telles que les neutrophiles, les macrophages et les cellules dendritiques.[158]

1.7.3. Nanoparticules pour le ciblage des zones enflammées

L'essor de la nanomédecine a permis le développement des systèmes de délivrance à l'échelle nanométrique ayant pour objectif le traitement de différentes maladies, dont la RCH. La nanomédecine fait référence à l'application des technologies à l'échelle nanométrique pour le diagnostic, le traitement et la prévention de maladies.[159] Le terme nanoparticule (NP) réfère quant à lui à des particules d'une taille <100 nm, et par abus de langage, à des particules submicroniques (<1000 nm).[160] La capacité des nanoparticules (liposomes, particules polymériques, lipidiques, …) à agir efficacement comme des systèmes de délivrance pour le traitement de RCH est directement en lien avec leurs propriétés physico-chimiques induites notamment par leur taille et leurs propriétés de surface. L'ensemble de ces propriétés permettent de cibler préférentiellement les zones enflammées du côlon, passivement ou activement en ciblant des récepteurs cellulaires. Ces systèmes ont un effet bénéfique par rapport aux formulations conventionnelles car ils permettent un meilleur ciblage, une meilleure bio-distribution dans les tissus visés, et ainsi moins d'effets secondaires. Ces systèmes de délivrance ont montré un effet thérapeutique similaire ou amélioré à des concentrations en principe actif plus faibles par rapport aux formulations conventionnelles.[158,161]

1.7.4. Effet de la taille du système de délivrance

En 1985, Hardly *et al.*[162] ont montré que réduire la taille des formulations pharmaceutiques (25 mm vs 0,5 à 1,8 mm) permet d'augmenter le temps de séjour au niveau du côlon humain. En 2001, Lamprecht *et al.*[163] ont induit une RCH chez des rats avec de l'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS), puis des particules polymériques de 0,1 ; 1 et 10 µm leur ont été administrées par voie orale. D'après leurs résultats, il y aurait une accumulation préférentielle des particules dans un côlon enflammé plutôt que dans un côlon sain. Ils détectent aussi une accumulation supérieure des particules de 100 nm par rapport aux particules de tailles micrométriques dans le côlon enflammé. Il est à noter que les particules de cette étude portaient une charge de surface négative. Vong *et al.*[164] rapportent des résultats similaires après une administration par voie orale, de particules de polystyrène de 40, 100, 500 et 1000 nm, chez des souris modèles de colite. Effectivement, ils ont observé une accumulation préférentielle des particules de 40 et 100 nm au niveau des sites enflammés du côlon. La

réduction de la taille des systèmes de délivrance permettrait de cibler préférentiellement les régions enflammées, et donc, d'augmenter la concentration locale en principes actifs au niveau des lésions inflammatoires. L'apport de nanoparticules pour le traitement de la RCH a été étudié par Lamprecht *et al.*[165] Effectivement, ils ont démontré un effet anti-inflammatoire prolongé et une réduction de l'absorption systémique de rolipram chargé dans des particules polymériques (474 et 332 nm) en comparaison à une solution de rolipram. Ces particules ont été administrées par voie orale chez des rats exprimant une colite. Les résultats ont montré une accumulation efficace du principe actif dans les régions enflammées ainsi qu'une activité pharmacologique prolongée. Cela a été attribué au temps de résidence des NP qui, de par leur taille, a pu être prolongé dans le côlon.

En effet, les lésions inflammatoires engendrent une augmentation de la perméabilité de la barrière intestinale permettant le passage, passif, des NP dans la muqueuse enflammée par l'effet EPR pour « *Enhanced Permeability and Retention* ».[166] Il est également rapporté que réduire la taille des nanoparticules permet d'augmenter leur absorption par les cellules du système immunitaire dont leur nombre est largement augmenté dans la muqueuse enflammée.[167] Par exemple, les cellules dendritiques et les macrophages ont la capacité d'absorber des particules < 4 µm par phagocytose (= absorption de particules étrangères).[158] Réduire la taille des particules permet également d'augmenter le temps de résidence colique, qui est largement diminué en cas de RCH, notamment à cause des diarrhées.[154] Les formulations conventionnelles ne possèdent pas ces avantages et sont majoritairement conçues afin de délivrer le principe actif dans une région du tube digestif selon certaines conditions (temps, pH, enzyme bactérienne).

Fait surprenant, Schmidt *et al.*[168] ont étudié le potentiel des nano- et des microparticules à être absorbées dans la muqueuse rectale de patients humains souffrant de RCH. Ils rapportent qu'il y a une accumulation des microparticules au niveau de la muqueuse colique enflammée tandis que les nanoparticules n'étaient détectables qu'à l'état de trace dans la muqueuse de ces patients. Cela a été attribué à la translocation des NP dans des tissus plus profonds. La contradiction obtenue entre l'Homme et l'animal révèle une différence de la dépendance de la taille des systèmes de délivrance pour cibler les régions enflammées et demanderait davantage d'études pour comprendre la disparité des résultats.

1.7.5. Effet de la charge de surface des systèmes de délivrance

Réduire la taille à l'échelle nanométrique des systèmes de délivrance permettrait de cibler passivement les lésions de l'épithélium colique. Cependant, d'autres facteurs permettent de moduler les effets de taille. Effectivement, Jubeh *et al.*[169] ont étudié les propriétés d'adhésion de liposomes multilamellaires (800 nm) cationiques, neutres ou anioniques (potentiel de charge de surface allant de 76 mV à -66 mV), sur des modèles de colite induite chez le rat *ex vivo*. D'après les résultats, une adhérence préférentielle des liposomes anioniques pour le tissu enflammé serait deux fois supérieure aux liposomes cationiques ou neutres. Ils révèlent également que l'augmentation de la densité de charge des liposomes anioniques serait corrélée à une augmentation de l'adhérence des liposomes sur le tissu enflammé. Quant aux liposomes cationiques, ils adhèreraient trois fois plus à la muqueuse saine par rapport aux liposomes anioniques ou neutres. La modulation de la charge de surface permettrait d'affiner la stratégie d'une diminution de la taille pour le traitement de la RCH. Les charges de surface pourraient influencer les interactions avec les composants du tractus digestif et pourraient donc théoriquement permettre de cibler les régions enflammées du côlon.

1.7.5.1. Système de délivrance chargé négativement

Les systèmes de délivrance chargés négativement adhèrent préférentiellement aux tissus enflammés *via* des interactions électrostatiques dues à la présence de nombreuses protéines chargées positivement au niveau des régions inflammatoires. Effectivement, les régions enflammées des patients souffrants de RCH montrent une augmentation de protéines chargées positivement sécrétées par les cellules du système immunitaire[170] et d'une surexpression de transferrine dans la région enflammée.[171] En cas de RCH, la couche de mucus peut être diminuée, cependant il est indispensable aux nanoparticules de traverser cette première barrière afin de pénétrer la muqueuse enflammée. Contrairement aux particules chargées positivement, les nanoparticules anioniques sont capables de diffuser dans la couche de mucus à cause d'une diminution des interactions électrostatiques avec les mucines chargées négativement.

Par exemple, Beloqui *et al.*[154] ont démontré que des vecteurs lipidiques nanostructurés (NLC) chargés en budesonide (=corticostéroïde) étaient capables de réduire significativement l'inflammation après une administration orale chez des souris modèles de colite. Ces NLC sont chargés négativement (-40 mV) avec une taille d'environ 200 nm. Ils ont également montré une forte accumulation des NP au niveau du côlon mais ils soulignent également la

présence de ces NP dans l'intestin grêle. De plus, les NP pénètrent la muqueuse lors de colite, alors qu'elles resteraient dans la couche de mucus chez les souris saines.

1.7.5.2. Système de délivrance chargé positivement

Contrairement aux systèmes de délivrance anioniques, les systèmes chargés positivement révèlent une faible pénétration dans le tissu enflammé colique ainsi qu'une adhérence préférentielle pour la muqueuse saine à cause des interactions entre la muqueuse chargée négativement et le système de délivrance chargé positivement.[151] Effectivement la mucine porte une charge négative permettant l'adhérence de ses systèmes de délivrance. Cependant, cela pourrait favoriser un meilleur contact avec la surface de la muqueuse, ce qui facilitera leur absorption cellulaire et le relargage du principe actif. Cette meilleure adhérence permet également un temps de résidence plus important du principe actif dans le côlon.[161]

Par exemple, Niebel *et al*.[172] ont étudié l'efficacité de particules polymériques cationiques (Eudragit RS) de 120 nm chargées en clodronate dans deux modèles de colite murine après une administration rectale. Seul, le clodronate est inefficace pour traiter l'inflammation, mais en association avec les NP cationiques, il permet d'atténuer l'inflammation dans les deux modèles de colites. Cependant, l'interaction avec la mucine empêcherait le transport des NP cationiques à travers la couche de mucus et risquerait une libération prématurée du principe actif. Fait surprenant, en 2017, Iqbal *et al.*[173] ont préparé des nanoparticules (≈ 110 nm) de poly(éthylène glycol)-bloc-poly(acide lactique-co-glycolique) chargées en siRNA (*small interfering RNA*) dont la charge de surface est positive, neutre ou négative (+31 mV à -17 mV). Après une administration par voie orale chez des modèles de colite murine, ils rapportent des résultats contradictoires vis-à-vis de la littérature avec une accumulation préférentielle des nanoparticules chargées positivement au niveau des régions inflammatoires du côlon et celles-ci seraient également plus efficaces pour traiter l'inflammation.

1.7.6. Autres stratégies

Même si les stratégies dépendantes de la taille ou de la charge de surface des nanoparticules semblent être des critères d'élaboration permettant un meilleur ciblage des régions enflammées, des résultats antagoniques sont pour autant publiés. Ce manque d'uniformité des résultats est principalement dû aux modèles utilisés où la majorité des expériences sont tantôt menées *ex vivo* ou *in vivo* avec une administration rectale.[161] D'autres stratégies thérapeutiques sont continuellement proposées comme une modification de surface

des systèmes de délivrance par l'ajout d'une couche de poly(ethylène glycol) ou chitosan connu pour favoriser, respectivement, la muco-pénétration ou la muco-adhésion des particules au niveau des sites enflammés.[151,174] Wilson *et al.*[175] ont, quant à eux, tiré avantage de la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour *reactive oxygene species*) au niveau des régions enflammées du côlon. Pour cela, ils ont formulé des nanoparticules polymériques qui se dégradent en réponse aux ROS. Par ailleurs, le ciblage actif des zones enflammées *via* la fonctionnalisation de la surface des NP avec des ligands spécifiques de récepteurs de surface cellulaire pourrait permettre d'augmenter le ciblage, et donc la concentration locale en principe actif et de diminuer ainsi les effets secondaires.[176]

D'une manière générale, il ressort de ces études que diminuer la taille du système de délivrance à l'échelle nanométrique permet de cibler préférentiellement les régions enflammées du côlon lors de RCH et d'obtenir une activité pharmacologique du principe actif prolongée. Une charge de surface négative permettrait une accumulation des NPs au niveau de la muqueuse enflammée tandis que les systèmes de délivrance cationiques favoriseraient une interaction avec la couche de mucus.

1.8. Particules lipidiques pour le traitement de la RCH

Les systèmes de délivrance de taille nanométrique pour une administration orale ont démontré, lors d'études précliniques, la capacité de cibler préférentiellement les régions atteintes par la RCH par rapport aux régions saines du côlon. Ces résultats ont généré de nombreuses stratégies d'élaboration de systèmes de délivrance tels que des particules polymériques, des particules lipidiques ou encore des nanoparticules inorganiques permettant une augmentation de l'efficacité de traitements conventionnels (Tableau III). Par exemple, Moulari *et al.*[177] ont étudié l'efficacité d'une administration orale de 5-ASA chargée dans des nanoparticules de silice (140 nm et potentiel Zeta négatif) dans un modèle de colite murin. Ils ont montré une adhésion du système de délivrance sélectif au tissu enflammé créant un réservoir de médicament, diminuant ainsi la disponibilité du principe actif aux tissus sains. Ils rapportent que l'encapsulation dans ce système de délivrance permet de réduire la dose de 5-ASA administrée par rapport à une solution de 5-ASA. Ali *et al.*[178] ont démontré l'apport d'une encapsulation de budésonide dans des nanoparticules polymériques dépendant du pH

grâce à un enrobage d'Eudragit®. Il a été constaté que la délivrance par des nanoparticules de PLGA (poly(lactic-co-glycolicacid)) enrobées d'une couche d'Eudragit® atténuait la colite induite de manière significative par rapport aux nanoparticules de PLGA ordinaires, qui étaient elles aussi, plus efficaces qu'un traitement avec du budésonide libre.

Parmi ces systèmes de délivrance, les nanoparticules lipidiques solides (SLN) semblent prometteuses. En tant que particules lipidiques, elles allient les avantages d'une matrice biocompatible et biodégradable en raison de leur nature[179] et permettent une production à grande échelle sans l'utilisation de solvants organiques.[180] Parmi les particules lipidiques, on retrouve également les liposomes, qui sont des vésicules composées exclusivement de molécules lipidiques, les émulsions et microémulsions et les NLC (*nanostructured lipid carriers*).

Tableau III. Vue d'ensemble d'études précliniques prometteuses utilisant des systèmes de délivrance nanoparticulaires encapsulant des traitements conventionnels de la RCH pour une administration orale

Principe Actif	**Système de délivrance**	**Taille (nm)**	**Potentiel Zéta (mV)**	**Ref.**
5-ASA	PCL	200-350	neutre	181
	silice	140	Chargée négativement	177
	silice	90	-	182
Budésonide	PLGA/Eudragit® S 100	260-280	-	183
	NLC	280	-40	154
	PLGA revêtu avec Eudragit® S 100	240	-30	178
	Eudragit® FS30D/RS100	250	-	184
Dexaméthasone/ cholesterol butyrate	SLN	75	-	185
Cyclosporine A	PLGA	160	-30	186

5-ASA : acide 5-aminosalicylique ; SLN : *solid lipid nanoparticles* ; NLC : *nanostructured lipid carriers* ; PCL : polycaprolactone ; PLGA : poly(lactic-co-glycolicacid)

1.8.1. Liposomes

Les liposomes sont des vésicules artificielles sphériques composées d'une ou plusieurs bicouches phospholipidiques (LUV ou MLV) entourant un compartiment aqueux. Les phospholipides sont des molécules amphiphiles, possédant une partie hydrophile (la tête polaire) et une partie hydrophobe (les chaines acyles). En solution, ils vont s'auto-organiser dans la configuration thermodynamique la plus favorable : les têtes polaires sont exposées au contact de l'eau tandis que les chaînes aliphatiques vont se regrouper et former un espace hydrophobe. Leur taille varie de 20 nm à quelques micromètres.

1.8.1.1. Application des liposomes pour le traitement de la RCH

Du fait de leur biocompatibilité, de la possibilité d'encapsuler des substances actives hydrophiles (dans le compartiment aqueux) et hydrophobes (dans la bicouche phospholipidique), et de leurs propriétés physico-chimiques ajustables (taille, charge de surface etc..), la capacité des liposomes à être utilisés comme système de délivrance de principe actif lors de RCH a été explorée (Tableau IV). Les liposomes ont démontré la capacité de cibler les régions enflammées du côlon *ex vivo* notamment grâce à la modulation de leur charge de surface,[169,171] et de délivrer des principes actifs au niveau des sites inflammatoires. Par exemple, Jubeh *et al*.[187] ont encapsulé des antioxydants dans des liposomes anioniques d'une taille de 400 nm. Ils ont montré que ces formulations étaient plus efficaces pour traiter une colite induite chez le rat que les antioxydants libres. Ils ont attribué cela à une meilleure adhérence des liposomes chargés négativement, à l'épithélium enflammé favorisant un temps de résidence plus important et donc une absorption plus importante des antioxydants dans la muqueuse enflammée. Kesisoglou *et al*.[188] quant à eux, ont montré que l'encapsulation de 5-ASA dans les liposomes réduit son absorption systémique chez des souris saines et permet une concentration plus importante du principe actif dans un tissu enflammé par rapport à un tissu sain.

Les suspensions liposomales conventionnelles montrent un fort potentiel pour une utilisation en tant que système de délivrance dans le traitement de la RCH car ils permettent, *in vivo*, le ciblage des régions enflammées, une augmentation de la concentration en principe actif dans les régions enflammées et une réduction de leur absorption systémique. Cependant, ces derniers révèlent une faible stabilité dans les conditions rudes du tractus digestif limitant alors administration par voie orale.

Tableau IV. Etude pré-clinique utilisant des liposomes comme système de délivrance par **voie intra-colique** pour le traitement de RCH.

Principe Actif	**Composition**	**Méthode**	**Taille (nm)**	**Potentiel Zeta (mV)**	**EE (%)**	**Modèle d'étude**	**Résultats/Ref.**
-	- PC - DODAB (chargé +) - DSPG (chargé -) - Cholestérol	Hydratation de film fin	MLV 800	76 à -66	-	*Ex vivo* Colite induite par DNBS chez le rat	Les liposomes cationiques adhèrent 3 fois plus à la muqueuse saine. Liposomes anioniques adhèrent deux fois plus à la muqueuse enflammée que les neutres ou cationiques. Adhérence liée à la densité de charge de surface. (**2003)**[169]
Antioxydant	- PC - PG - Cholestérol	Hydratation de film fin	MLV 400	-66	55 à 85	*In vivo* Colite induite par DNBS chez le rat	Antioxydants encapsulés plus efficaces que les antioxydants libres. (**2006)**[187]
Oligonucléotide antisens CD40	- POPC - Cholestérol	Hydratation de film fin	-	-	-	*In vivo* Colite induite par DNBS chez le rat	Suppression de la réaction inflammatoire. Liposomes permettent aux CD 40 de traverser la muqueuse. (**2005)**[189]
5-ASA	- Lécithine d'œuf - PG - Cholestérol	Évaporation de solvant	LUV Entre 0,5 et 1,5 µm		25-35	*In vivo* Colite induite par DSS chez le rat	Absorption systémique réduite de la 5-ASA. Augmentation de la 5-ASA au niveau des régions enflammées. (**2005)**[188]
Carnitine	- POPC	Injection d'éthanol	85	-	-	*In vivo* Colite induite par TNBS chez le rat	Carnitine encapsulée améliore significativement la colite induite. (**2006**)[190]
-	- PC - PG - Cholestérol	Injection d'éthanol	420	-35 à -4	-	*Ex vivo* Colite induite par DNBS chez le rat	Transferrine est induite dans les régions enflammées de RCH. La transferrine permet l'accumulation préférentielle des liposomes anioniques sur les régions enflammées. Mais pas pour les liposomes neutres. (**2009**)[171]

EE (%) : efficacité d'encapsulation (%) ; PC : phosphatidylcholines ; DODAB *:* *Dimethyldioctadecylammonium bromide* ; DSPG : 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol ; PG : phosphatidylglycérols ; POPC : 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine ; MLV : *multilamellar vesicles* ; LUV : *Large unilamellar vesicles ;* DNBS : acide diazobenzène sulfonique ; DSS : Dextran sulfate de sodium ; TNBS : Acide trinitrobenzène sulfonique.

1.8.1.2. Limitations de l'utilisation des suspensions liposomales conventionnelles pour une administration orale

Après une administration orale, les liposomes conventionnels (non modifiés) sont soumis aux conditions gastro-intestinales pouvant leur être délétères, car ils subiront les effets combinés du pH acide de l'estomac, des sels biliaires et des lipases pancréatiques présentes au niveau de l'intestin et menant à une diminution de la concentration en liposomes et à une libération précoce des substances actives encapsulées.[191] Par exemple, une incubation de 120 min dans un fluide intestinal simulé induit des dommages de la membrane liposomale indiquant une hydrolyse partielle des phospholipides de la bicouche par les lipases pancréatiques. De plus, l'augmentation de la concentration en sels biliaires s'avère aussi néfaste pour l'intégrité de la membrane.[192] Les sucs pancréatiques, qui contiennent des enzymes lipolytiques telles que les lipases, les phospholipases A2 et des cholestérol estérases hydrolysent les phospholipides contenus dans les liposomes conduisant à la perte de leur structure.[191] Les sels biliaires ont une action détergente permettant la formation de micelles contenant des phospholipides afin de promouvoir l'activité des lipases intestinales. Les sels biliaires pourraient également s'insérer dans la bicouche liposomale rendant ainsi la membrane plus fluide, ce qui conduirait également à une libération précoce du principe actif.[192]

1.8.2. Nanoparticules lipidiques solides (SLN)

Les SLN sont des systèmes de délivrance prometteurs pour la délivrance de principe actif lors de RCH. Ils sont généralement constitués de lipides solides à température ambiante stabilisés par la présence de tensioactifs ou de co-tensioactifs. L'utilisation d'une matrice lipidique solide offre une meilleure maitrise de la libération de principes actifs *via* une mobilité réduite au sein d'une telle matrice.

1.8.3. SLN de seconde génération : les NLC (*nanostructured lipid carriers*)

Une seconde génération de SLN, nommée les NLC (*nanostructured lipid carriers*), a été développée afin de lutter contre les faiblesses des systèmes homologues, notamment pour augmenter la quantité de principe actif encapsulé et aussi contrôler l'expulsion des composés bioactifs durant le stockage. Ils sont composés tout comme les SLN de lipides solides mais ils incluent également des lipides liquides à température ambiante. L'incorporation d'un lipide liquide à la matrice solide de la nanoparticule augmente le nombre d'imperfections facilitant

l'incorporation du principe actif tout en préservant la stabilité du système de délivrance. Ils offrent donc une meilleure incorporation de principe actif dans la matrice lipidique et permettent de réduire l'expulsion du principe actif durant le stockage dû à un indice de cristallinité plus faible et à des transitions polymorphiques plus lentes.[193,194]

1.8.4. Application des SLN et des NLC pour le traitement de la RCH par voie orale

Les nanoparticules lipidiques (SLN et NLC) paraissent être des systèmes de délivrance prometteurs pour le traitement de la RCH. En effet, elles allient les avantages d'une matrice biocompatible et biodégradable en raison de leur nature lipidique,[179] d'une protection du principe actif, d'une libération davantage contrôlée par rapport aux émulsions et permettent une production à grande échelle sans l'utilisation de solvants organiques.[180] Ces bénéfices ont conduit à la réalisation d'études pré-cliniques utilisant ces systèmes de délivrance afin de traiter par voie orale des colites induites chez l'animal (Tableau V et VI).

Par exemple, en 2016, Beloqui *et al.*,[195] ont encapsulé de la curcumine dans trois systèmes de délivrance lipidiques différents : des systèmes de délivrance de principe actif auto-nanoémulsifiants, des nanocapsules recouvertes de protamines (= polypeptide augmentant la pénétration cellulaire) et des NLC. Lors d'une administration *in vivo* de ces systèmes de délivrance chez des modèles de colite induite chez la souris à une concentration en curcumine de 1,9 $mg.kg^{-1}$, seules les NLC étaient capables de diminuer significativement l'inflammation. Plus récemment, en 2019, Sharma *et al.*[196] ont réalisé des SLN à partir d'acide stéarique et de tristéarine permettant l'encapsulation de curcumine. Ils ont montré qu'une administration par voie orale de ce système de délivrance chez des cochons d'Inde, à une dose de curcumine de 15 $mg.kg^{-1}$, permet de traiter significativement la colite induite. Ils relèvent également une forte concentration de curcumine dans les tissus enflammés confirmant une bonne rétention du système de délivrance et/ou une pénétration dans la muqueuse enflammée.

Ces résultats montrent le potentiel des nanoparticules lipidiques à être utilisées comme système de délivrance en cas de RCH. Effectivement, au-delà de leur biocompatibilité ou de la facilité de production sans l'utilisation de solvant, ils permettent d'augmenter la biodisponibilité d'un principe actif et de contrôler sa libération dans le temps et dans l'espace, permettant ainsi une libération soutenue et ciblées du principe actif principalement au niveau des régions enflammées en cas de RCH. Ces propriétés permettent également de diminuer l'absorption systémique du médicament et donc de diminuer ses effets secondaires.

Tableau V. Etudes pré-cliniques utilisant des SLN comme système de délivrance par voie orale pour le traitement de RCH.

Principe Actif	Composition	Méthode	Taille (nm)	Potentiel Zeta (mV)	EE (%)	Model d'étude	Résultats/Ref.
Cyclosporine A*	- Precirol - Taurocholate de sodium - PC - Tween 80 - Pluronic® F127	Homogénéisation à chaud suivi par ultrasonication	121 – 202	-30 à -15	98	*In vitro* Cellules Jurkat	Effet immunosuppresseur dépendant de la dose des formulations. (**2015**) [197]
Cyclosporine A	- Precirol - Taurocholate de sodium - PC - Tween 80 - Pluronic® F127	Homogénéisation à chaud suivi par ultrasonication	200	-28 à -16	97	*In vivo* Colite induite par DSS chez la souris	Les formulations ne sont pas efficaces pour réduire l'inflammation colique. (**2016**)[198]
Dexamethasone/ cholesterol butyrate	- Epikuron™ 200 - Sodium glycocholate - PC	Microemulsion à chaud	160	-28	-	*In vivo* Colite induite par DSS chez la souris	La combinaison dexamethasone et butyrate co-chargé dans des SLN est efficace pour réduire l'inflammation. Effet anti-inflammatoire supérieur lorsque les PA sont combinés par rapport à l'utilisation séparée de l'un ou de l'autre. (**2017**)[185]
Curcumine (15 $mg.kg^{-1}$)	- Acide stéarique - Tristéarine - Lécithine de soja - Pluronic F123 - Alcool polyvinylique	emulsification /évaporation de solvants suivis par ultrasonication	190	-28	83	*In vivo* Colite induite par DSS chez le cochon d'Inde	La formulation montre un effet anti-inflammatoire supérieur par rapport à la curcumine seule. La formulation est davantage localisée au niveau de la région enflammée. (**2019**)[196]

EE (%) : efficacité d'encapsulation (%) ; PC : phosphatidylcholines ; SLN : *solid lipid nanoparticles* ; DSS : Dextran sulfate de sodium

Tableau VI. Etudes pré-cliniques utilisant des NLC comme système de délivrance par voie orale pour le traitement de RCH.

Principe Actif	Composition	Méthode	Taille (nm)	Potentiel Zeta (mV)	EE (%)	Model d'étude	Résultats/Ref.
Budésonide	- Precirol ATO®5 - Miglyol 812 - Tween 80 - Poloxamer 188	Homogénéisation à haute pression	204	-40	95	*In vivo* Colite induite par DSS chez la souris	Budésonide encapsulé dans les NLC réduit plus efficacement l'inflammation par rapport au budesonide en solution. Temps de résidence augmenter dans le colon. **(2013)**[154]
Curcumine (1,9 $mg.kg^{-1}$)	- Precirol ATO® - Miglyol 812N/F - Tween 80 - Kolliphor® P188	Homogénéisation à haute pression	280	-10	95	*In vivo* Colite induite par DSS chez la souris	Compare NLC, SNEDDS et NC. Seul les NLC montrent un effet anti-inflammatoire in vivo. **(2016)**[195]
Vitamine D3	- PC - PS - Monostéarate de glycerol - Pluronic F127	Emulsification évaporation de solvant avec ultrasonication	110	-17	60	*In vivo* Colite induite par DSS chez la souris	La formulation permet une présence de vitamine D3 prolongée. (**2018)**[199]
Budésonide	- Compritol ATO 888 - Labrafac WL 1349 - Stearylamine - Span 80 - Polysorbate 80 - Poloxamer 188 - D-mannose	Homogénéisation à haute pression	NLC nues : 284 Mannose en surface : 302	NLC nues : 13 Mannose en surface 8	NLC nues : 93 Mannose en surface 91	*In vivo* Colite induite par DSS chez le rat	La formulation recouverte en surface par du mannose montre une meilleur sélectivité des régions enflammées et des propriétés anti-inflammatoires supérieures par rapport à la formulation sans mannose en surface. (**2018)**[200]

EE (%) : efficacité d'encapsulation (%) ; PC : phosphatidylcholines ; PS : phosphatidylsérines ; NLC : *nanostructured lipid carriers* ; DSS : Dextran sulfate de sodium ; NC : nanocapsules ; SNEDDS : *self-nanoemulsifying drug délivery systems*

1.9. Conclusion et objectifs de la thèse

La rectocolite hémorragique fait partie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, dont les épisodes symptomatiques ont la particularité d'apparaître par intermittence avec des phases de rémission. Actuellement, en France, le Vidal recommande différents traitements selon l'activité et les complications liées à la maladie. Cependant, la RCH reste une maladie incurable et l'efficacité des traitements est encore modeste, souvent accompagnés de nombreux effets secondaires, parfois graves.

Dans ce contexte, l'utilisation combinée de curcumine, qui a démontré un fort potentiel anti-inflammatoire, et de phosphatidylcholines exogènes, permettant de rétablir la fonction de barrière hydrophobe de la couche de mucus, semble être une solution de choix pour le traitement de la RCH. Malgré leur fort potentiel thérapeutique, ces deux molécules souffrent d'une faible biodisponibilité lors d'une prise par voie orale.

Dans ce cas, l'encapsulation de curcumine et de phosphatidylcholines dans des systèmes de délivrance permettrait d'inhiber la digestion et l'absorption précoce des phosphatidylcholines au niveau de la partie haute du tractus gastro-intestinal et d'outrepasser la faible solubilité et la faible absorption de la curcumine. De nombreux systèmes de délivrance sont rapportés dans la littérature, parmi eux, les systèmes de délivrance lipidiques semblent être les plus prometteurs. Effectivement, de par leur nature lipidique, ils offrent une excellente biocompatibilité.

Parmi les systèmes de délivrance lipidiques, on peut citer les liposomes (non-modifiés), qui semblent avoir une bonne capacité à cibler les régions enflammées du côlon. Cependant, ces derniers sont sensibles aux dures conditions gastro-intestinales en cas de RCH après une administration orale. Les nanoparticules lipidiques solides, quant à elles, ont montré leur capacité à cibler la région enflammée du côlon, tout en assurant une libération prolongée des principes actifs après une administration orale.

Ainsi, comprendre les interactions entre la curcumine et les phospholipides permettrait d'améliorer l'efficacité thérapeutique de la curcumine, permettant ainsi d'améliorer son absorption au niveau de la muqueuse du côlon. De plus, la réalisation de particules lipidiques de tailles submicroniques, les SLN, permettrait de contrôler la libération de curcumine et de phosphatidylcholines au niveau de la région enflammée du côlon et d'assurer une libération prolongée.

1.10. Références

1. D. J. Mulder, A. J. Noble, C. J. Justinich, and J. M. Duffin, *J. Crohns Colitis*, **2014**, *8*, 341.

2. S. S. Wilks and W. Moxon, "*Lectures on Pathological Anatomy*", **1875**, Lindsay and Blakiston.

3. B. B. Crohn, L. Ginzburg, and G. D. Oppenheimer, *JAMA.*, **1932**, *99*, 1323.

4. N. A. Molodecky, I. S. Soon, D. M. Rabi, W. A. Ghali, M. Ferris, G. Chernoff, E. I. Benchimol, R. Panaccione, S. Ghosh, H. W. Barkema, and G. G. Kaplan, *Gastroenterology*, **2012**, *142*, 46.

5. G. G. Kaplan, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **2015**, *12*, 720.

6. A. Rocchi, E. I. Benchimol, C. N. Bernstein, A. Bitton, B. Feagan, R. Panaccione, K. W. Glasgow, A. Fernandes, and S. Ghosh, *Can. J. Gastroenterol.*, **2012**, *26*, 811.

7. L. Jostins, S. Ripke, R. K. Weersma, R. H. Duerr, D. P. McGovern, K. Y. Hui, J. C. Lee, L. Philip Schumm, Y. Sharma, C. A. Anderson, J. Essers, M. Mitrovic, K. Ning, I. Cleynen, E. Theatre, S. L. Spain, S. Raychaudhuri, P. Goyette, Z. Wei, C. Abraham, J.-P. Achkar, T. Ahmad, L. Amininejad, A. N. Ananthakrishnan, V. Andersen, J. M. Andrews, L. Baidoo, T. Balschun, P. A. Bampton, A. Bitton, G. Boucher, S. Brand, C. Büning, A. Cohain, S. Cichon, M. D'Amato, D. De Jong, K. L. Devaney, M. Dubinsky, C. Edwards, D. Ellinghaus, L. R. Ferguson, D. Franchimont, K. Fransen, R. Gearry, M. Georges, C. Gieger, J. Glas, T. Haritunians, A. Hart, C. Hawkey, M. Hedl, X. Hu, T. H. Karlsen, L. Kupcinskas, S. Kugathasan, A. Latiano, D. Laukens, I. C. Lawrance, C. W. Lees, E. Louis, G. Mahy, J. Mansfield, A. R. Morgan, C. Mowat, W. Newman, O. Palmieri, C. Y. Ponsioen, U. Potocnik, N. J. Prescott, M. Regueiro, J. I. Rotter, R. K. Russell, J. D. Sanderson, M. Sans, J. Satsangi, S. Schreiber, L. A. Simms, J. Sventoraityte, S. R. Targan, K. D. Taylor, M. Tremelling, H. W. Verspaget, M. De Vos, C. Wijmenga, D. C. Wilson, J. Winkelmann, R. J. Xavier, S. Zeissig, B. Zhang, C. K. Zhang, H. Zhao, M. S. Silverberg, V. Annese, H. Hakonarson, S. R. Brant, G. Radford-Smith, C. G. Mathew, J. D. Rioux, E. E. Schadt, M. J. Daly, A. Franke, M. Parkes, S. Vermeire, J. C. Barrett, and J. H. Cho, *Nature*, **2012**, *491*, 119.

8. J. Z. Liu, S. van Sommeren, H. Huang, S. C. Ng, R. Alberts, A. Takahashi, S. Ripke, J. C. Lee, L. Jostins, T. Shah, S. Abedian, J. H. Cheon, J. Cho, N. E. Dayani, L. Franke, Y. Fuyuno, A. Hart, R. C. Juyal, G. Juyal, W. H. Kim, A. P. Morris, H. Poustchi, W. G. Newman, V. Midha, T. R. Orchard, H. Vahedi, A. Sood, J. Y. Sung, R. Malekzadeh, H.-J. Westra, K. Yamazaki, S.-K. Yang, J. C. Barrett, B. Z. Alizadeh, M. Parkes, T. BK, M. J. Daly, M. Kubo, C. A. Anderson, and R. K. Weersma, *Nat. Genet.*, **2015**, *47*, 979.

9. B. Khor, A. Gardet, and R. J. Xavier, *Nature*, **2011**, *474*, 307.

10. Z. Kmieć, M. Cyman, and T. J. Ślebioda, *Adv. Med. Sci.*, **2017**, *62*, 1.

11. F. Imhann, A. Vich Vila, M. J. Bonder, J. Fu, D. Gevers, M. C. Visschedijk, L. M. Spekhorst, R. Alberts, L. Franke, H. M. van Dullemen, R. W. F. Ter Steege, C. Huttenhower, G. Dijkstra, R. J. Xavier, E. A. M. Festen, C. Wijmenga, A. Zhernakova, and R. K. Weersma, *Gut*, **2018**, *67*, 108.

12. A. D. Kostic, R. J. Xavier, and D. Gevers, *Gastroenterology*, **2014**, *146*, 1489.

13. J. Ni, G. D. Wu, L. Albenberg, and V. T. Tomov, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **2017**, *14*, 573.

14. Y. Belkaid and T. W. Hand, *Cell*, **2014**, *157*, 121.

15. R. E. Ley, M. Hamady, C. Lozupone, P. J. Turnbaugh, R. R. Ramey, J. S. Bircher, M. L. Schlegel, T. A. Tucker, M. D. Schrenzel, R. Knight, and J. I. Gordon, **2008**, *320*, 6.

16. A. Darfeuille-Michaud, J. Boudeau, P. Bulois, C. Neut, A.-L. Glasser, N. Barnich, M.-A. Bringer, A. Swidsinski, L. Beaugerie, and J.-F. Colombel, *Gastroenterology*, **2004**, *127*, 412.

17. K. Machiels, M. Joossens, J. Sabino, V. De Preter, I. Arijs, V. Eeckhaut, V. Ballet, K. Claes, F. Van Immerseel, K. Verbeke, M. Ferrante, J. Verhaegen, P. Rutgeerts, and S. Vermeire, *Gut*, **2014**, *63*, 1275.

18. L. Zhou, M. Zhang, Y. Wang, R. G. Dorfman, H. Liu, T. Yu, X. Chen, D. Tang, L. Xu, Y. Yin, Y. Pan, Q. Zhou, Y. Zhou, and C. Yu, *Inflamm. Bowel Dis.*, **2018**, *24*, 1926.

19. S. H. Duncan, R. I. Aminov, K. P. Scott, P. Louis, T. B. Stanton, and H. J. Flint, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **2006**, *56*, 2437.

20. W. E. Roediger, *Gut*, **1980**, *21*, 793.

21. S. Tedelind, F. Westberg, M. Kjerrulf, and A. Vidal, *World J. Gastroenterol.*, **2007**, *13*, 2826.

22. S. S. Mahid, K. S. Minor, R. E. Soto, C. A. Hornung, and S. Galandiuk, *Mayo Clin. Proc.*, **2006**, *81*, 1462.

23. P. L. Lakatos, T. Szamosi, and L. Lakatos, *World J. Gastroenterol.*, **2007**, *13*, 6134.

24. J. Cosnes, C. Gower–Rousseau, P. Seksik, and A. Cortot, *Gastroenterology*, **2011**, *140*, 1785.

25. R. E. Andersson, G. Olaison, C. Tysk, and A. Ekbom, *N. Engl. J. Med.*, **2001**, *344*, 808.

26. R. E. Andersson, G. Olaison, C. Tysk, and A. Ekbom, *Gastroenterology*, **2003**, *124*, 40.

27. B. L. Bonaz and C. N. Bernstein, *Gastroenterology*, **2013**, *144*, 36.

28. M. T. Bailey, S. E. Dowd, J. D. Galley, A. R. Hufnagle, R. G. Allen, and M. Lyte, *Brain. Behav. Immun.*, **2011**, *25*, 397.

29. J. Ghia, P. Blennerhassett, Y. Deng, E. F. Verdu, W. I. Khan, and S. M. Collins, *Gastroenterology*, **2009**, *136*, 2280.

30. C. N. Bernstein, S. Singh, L. A. Graff, J. R. Walker, N. Miller, and M. Cheang, *Am. J. Gastroenterol.*, **2010**, *105*, 1994.

31. A. N. Ananthakrishnan, H. Khalili, A. Pan, L. M. Higuchi, P. de Silva, J. M. Richter, C. S. Fuchs, and A. T. Chan, *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, **2013**, *11*, 57.

32. A. Bitton, P. L. Dobkin, M. D. Edwardes, M. J. Sewitch, J. B. Meddings, S. Rawal, A. Cohen, S. Vermeire, L. Dufresne, D. Franchimont, and G. E. Wild, *Gut*, **2008**, *57*, 1386.

33. A. D. Frolkis, I. A. Vallerand, A.-A. Shaheen, M. W. Lowerison, M. G. Swain, C. Barnabe, S. B. Patten, and G. G. Kaplan, *Gut*, **2018**, *68*, 1606.

34. A. Sonnenberg, *Gut*, **1990**, *31*, 1037.

35. F. Carbonnel, P. Jantchou, E. Monnet, and J. Cosnes, *Gastroentérologie Clin. Biol.*, **2009**, *33*, S145.

36. H. S. P. de Souza and C. Fiocchi, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **2016**, *13*, 13.

37. H. S. P. de Souza, C. Fiocchi, and D. Iliopoulos, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **2017**, *14*, 739.

38. G. Bouma and W. Strober, *Nat. Rev. Immunol.*, **2003**, *3*, 521.

39. J. C. Brazil, N. A. Louis, and C. A. Parkos, *Inflamm. Bowel Dis.*, **2013**, *19*, 1556.

40. N. Kamada, T. Hisamatsu, S. Okamoto, H. Chinen, T. Kobayashi, T. Sato, A. Sakuraba, M. T. Kitazume, A. Sugita, K. Koganei, K. S. Akagawa, and T. Hibi, *J. Clin. Invest.*, **2008**, *118*, 2269.

41. M. L. Drakes, T. G. Blanchard, and S. J. Czinn, *J. Leukoc. Biol.*, **2005**, *78*, 1291.

42. E. Cario and D. K. Podolsky, *Infect. Immun.*, **2000**, *68*, 7010.

43. C. F. Ortega-Cava, S. Ishihara, M. A. K. Rumi, K. Kawashima, N. Ishimura, H. Kazumori, J. Udagawa, Y. Kadowaki, and Y. Kinoshita, *J. Immunol.*, **2003**, *170*, 3977.

44. R. Ungaro, S. Mehandru, P. B. Allen, L. Peyrin-Biroulet, and J.-F. Colombel, *The Lancet*, **2017**, *389*, 1756.

45. M. F. Neurath, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **2017**, *14*, 269.

46. S. Danese, J. Rudziński, W. Brandt, J.-L. Dupas, L. Peyrin-Biroulet, Y. Bouhnik, D. Kleczkowski, P. Uebel, M. Lukas, M. Knutsson, F. Erlandsson, M. B. Hansen, and S. Keshav, *Gut*, **2015**, *64*, 243.

47. W. Reinisch, D. W. Hommes, G. Van Assche, J. F. Colombel, J. P. Gendre, B. Oldenburg, A. Teml, K. Geboes, H. Ding, L. Zhang, M. Tang, M. Cheng, S. J. H. Van Deventer, P. Rutgeerts, and T. Pearce, *Gut*, **2005**, *55*, 1138.

48. W. Hueber, B. E. Sands, S. Lewitzky, M. Vandemeulebroecke, W. Reinisch, P. D. R. Higgins, J. Wehkamp, B. G. Feagan, M. D. Yao, M. Karczewski, J. Karczewski, N. Pezous, S. Bek, G. Bruin, B. Mellgard, C. Berger, M. Londei, A. P. Bertolino, G. Tougas, S. P. L. Travis, and for the Secukinumab in Crohn's Disease Study Group, *Gut*, **2012**, *61*, 1693.

49. D. M. Spencer, G. M. Veldman, S. Banerjee, J. Willis, and A. D. Levine, *Gastroenterology*, **2002**, *122*, 94.

50. S. Kugathasan, L. J. Saubermann, L. Smith, D. Kou, J. Itoh, D. G. Binion, A. D. Levine, R. S. Blumberg, and C. Fiocchi, *Gut*, **2007**, *56*, 1696.

51. A. E. Bharucha and M. Camilleri, "*Surgery of the Alimentary Tract*", 8th ed., **2019**, Vol. 2, Shackelford's, 1676.

52. F. H. Netter, "*Atlas d'anatomie humaine*", 7ème ed., **2019**, Elsivier-Masson.

53. D. C. Baumgart and W. J. Sandborn, *The Lancet*, **2007**, *369*, 1641.

54. J. Satsangi, M. S. Silverberg, S. Vermeire, and J. F. Colombel, *Gut*, **2006**, *55*, 749.

55. M. E. V. Johansson, M. Phillipson, J. Petersson, A. Velcich, L. Holm, and G. C. Hansson, *Med. Sci.*, **2008**, *105*, 15064.

56. M. E. V. Johansson, H. Sjövall, and G. C. Hansson, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **2013**, *10*, 352.

57. C. Atuma, V. Strugala, A. Allen, and L. Holm, *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.*, **2001**, *280*, 922.

58. A. Braun, I. Treede, D. Gotthardt, A. Tietje, A. Zahn, R. Ruhwald, U. Schoenfeld, T. Welsch, P. Kienle, G. Erben, W.-D. Lehmann, J. Fuellekrug, W. Stremmel, and R. Ehehalt, *Inflamm. Bowel Dis.*, **2009**, *15*, 1705.

59. M. E. V. Johansson and G. C. Hansson, *Nat. Rev. Immunol.*, **2016**, *16*, 639.

60. R. Ehehalt, C. Jochims, W.-D. Lehmann, G. Erben, S. Staffer, C. Reininger, and W. Stremmel, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids*, **2004**, *1682*, 63.

61. R. D. Pullan, G. A. Thomas, M. Rhodes, R. G. Newcombe, G. T. Williams, A. Allen, and J. Rhodes, *Gut*, **1994**, *35*, 353.

62. A. Velcich, W. Yang, J. Heyer, A. Fragale, C. Nicholas, S. Viani, R. Kucherlapati, M. Lipkin, K. Yang, and L. Augenlicht, *Science*, **2002**, *295*, 1726.

63. M. Van der Sluis, B. A. E. De Koning, A. C. J. M. De Bruijn, A. Velcich, J. P. P. Meijerink, J. B. Van Goudoever, H. A. Büller, J. Dekker, I. Van Seuningen, I. B. Renes, and A. W. C. Einerhand, *Gastroenterology*, **2006**, *131*, 117.

64. M. E. V. Johansson, J. K. Gustafsson, K. E. Sjöberg, J. Petersson, L. Holm, H. Sjövall, and G. C. Hansson, *PLoS ONE*, **2010**, *5*, 12238.

65. J. R. Turner, *Nat. Rev. Immunol.*, **2009**, *9*, 799.

66. D. D. Eichele and K. K. Kharbanda, *World J. Gastroenterol.*, **2017**, *23*, 6016.

67. L. M. Lichtenberger, *Annu. Rev. Physioi.*, **1995**, *57*, 565.

68. A. Braun, U. Schönfeld, T. Welsch, M. Kadmon, B. Funke, D. Gotthardt, A. Zahn, F. Autschbach, P. Kienle, M. Zharnikov, M. Grunze, W. Stremmel, and R. Ehehalt, *Int. J. Colorectal Dis.*, **2011**, *26*, 989.

69. L. Shen, C. R. Weber, D. R. Raleigh, D. Yu, and J. R. Turner, *Annu. Rev. Physiol.*, **2011**, *73*, 283.

70. M. A. Odenwald and J. R. Turner, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **2017**, *14*, 9.

71. T. Suzuki, *Cell. Mol. Life Sci.*, **2013**, *70*, 631.

72. S. Tsukita, M. Furuse, and M. Itoh, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2001**, *2*, 285.

73. N. A. Hering, M. Fromm, and J.-D. Schulzke, *J. Physiol.*, **2012**, *590*, 1035.

74. H. Schmitz, C. Barmeyer, M. Fromm, N. Runkel, H.-D. Foss, C. J. Bentzel, E.-O. Riecken, and J.-D. Schulzke, *Gastroenterology*, **1999**, *116*, 301.

75. S. Prasad, R. Mingrino, K. Kaukinen, K. L. Hayes, R. M. Powell, T. T. MacDonald, and J. E. Collins, *Lab. Invest.*, **2005**, *85*, 1139.

76. T. Oshima, H. Miwa, and T. Joh, *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **2008**, *23*, S146.

77. D. F. McCole, *Inflamm. Bowel Dis.*, **2014**, *20*, 1829.

78. W. Stremmel, S. Staffer, M. J. Schneider, H. Gan-Schreier, A. Wannhoff, N. Stuhrmann, A. Gauss, H. Wolburg, A. Mahringer, A. Swidsinski, and T. Efferth, *J. Crohns Colitis*, **2017**, *11*, 1247.

79. B. D. Butler, L. M. Lichtenberger, and B. A. Hills, *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.*, **1983**, *244*, 645.

80. W. Bernhard, A. D. Postle, M. Linck, and K.-F. Sewing, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.*, **1995**, *1255*, 99.

81. K. DeSchryver-Kecskemeti, R. Eliakim, S. Carroll, W. F. Stenson, M. A. Moxley, and D. H. Alpers, *J. Clin. Invest.*, **1989**, *84*, 1355.

82. A. Korytowski, W. Abuillan, F. Amadei, A. Makky, A. Gumiero, I. Sinning, A. Gauss, W. Stremmel, and M. Tanaka, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, **2017**, *1859*, 959.

83. W. Stremmel, S. Staffer, H. Gan-Schreier, A. Wannhoff, M. Bach, and A. Gauss, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids*, **2016**, *1861*, 1161.

84. R. Ehehalt, J. Wagenblast, G. Erben, W. -D. Lehmann, U. Hinz, U. Merle, and W. Stremmel, *Scand. J. Gastroenterol.*, **2004**, *39*, 737.

85. W. Stremmel, R. Ehehalt, S. Staffer, S. Stoffels, A. Mohr, M. Karner, and A. Braun, *Dig. Dis.*, **2012**, *30*, 85.

86. W. Stremmel, R. Ehehalt, F. Autschbach, and M. Karner, *Ann Intern Med.*, **2007**, *147*, 603.

87. M. Karner, A. Kocjan, J. Stein, S. Schreiber, G. von Boyen, P. Uebel, C. Schmidt, L. Kupcinskas, I. Dina, F. Zuelch, G. Keilhauer, and W. Stremmel, *Am. J. Gastroenterol.*, **2014**, *109*, 1041.

88. W. Stremmel, U. Merle, A. Zahn, F. Autschbach, U. Hinz, and R. Ehehalt, *Gut*, **2005**, *54*, 966.

89. C. N. Bernstein, A. Eliakim, S. Fedail, M. Fried, R. Gearry, K.-L. Goh, S. Hamid, A. G. Khan, I. Khalif, S. C. Ng, Q. Ouyang, J.-F. Rey, A. Sood, F. Steinwurz, G. Watermeyer, and A. LeMair, *J. Clin. Gastroenterol.*, **2016**, *50*, 803.

90. B. Bressler, J. K. Marshall, C. N. Bernstein, A. Bitton, J. Jones, G. I. Leontiadis, R. Panaccione, A. H. Steinhart, F. Tse, B. Feagan, W. Afif, E.-J. Bernard, M. Borgaonkar, S. Devlin, R. Fedorak, G. C. Nguyen, R. Penner, L. Peyrin-Biroulet, W. Reinisch, C. H. Seow, R. Sy, L. Targownik, P. Thomson, G. Van Assche, and C. Williams, *Gastroenterology*, **2015**, *148*, 1035.

91. K. A. Head and J. S. Jurenka, *Altern. Med. Rev.*, **2003**, *8*, 37.

92. M. Harbord, R. Eliakim, D. Bettenworth, K. Karmiris, K. Katsanos, U. Kopylov, T. Kucharzik, T. Molnár, T. Raine, S. Sebastian, H. T. de Sousa, A. Dignass, and F. Carbonnel, *J. Crohns Colitis*, **2017**, *11*, 769.

93. M. Iacucci, S. de Silva, and S. Ghosh, *Can. J. Gastroenterol.*, **2010**, *24*, 127.

94. T. Dassopoulos, S. Sultan, Y. T. Falck–Ytter, J. M. Inadomi, and S. B. Hanauer, *Gastroenterology*, **2013**, *145*, 1464.

95. L. Beaugerie, N. Brousse, A. M. Bouvier, J. F. Colombel, M. Lémann, J. Cosnes, X. Hébuterne, A. Cortot, Y. Bouhnik, J. P. Gendre, T. Simon, M. Maynadié, O. Hermine, J. Faivre, and F. Carrat, *The Lancet*, **2009**, *374*, 1617.

96. I. Tiede, G. Fritz, S. Strand, D. Poppe, R. Dvorsky, D. Strand, H. A. Lehr, S. Wirtz, C. Becker, R. Atreya, J. Mudter, K. Hildner, B. Bartsch, M. Holtmann, R. Blumberg, H. Walczak, H. Iven, P. R. Galle, M. R. Ahmadian, and M. F. Neurath, *J. Clin. Invest.*, **2003**, *111*, 1133.

97. K. Juuti-Uusitalo, L. J. Klunder, K. A. Sjollema, K. Mackovicova, R. Ohgaki, D. Hoekstra, J. Dekker, and S. C. D. van IJzendoorn, *PLoS ONE*, **2011**, *6*, e22967.

98. R. Atreya, M. Zimmer, B. Bartsch, M. J. Waldner, I. Atreya, H. Neumann, K. Hildner, A. Hoffman, R. Kiesslich, A. D. Rink, T. T. Rau, S. Rose–John, H. Kessler, J. Schmidt, and M. F. Neurath, *Gastroenterology*, **2011**, *141*, 2026.

99. G. R. Lichtenstein, P. Rutgeerts, W. J. Sandborn, B. E. Sands, R. H. Diamond, M. Blank, J. Montello, L. Tang, F. Cornillie, and J.-F. Colombel, *Am. J. Gastroenterol.*, **2012**, *107*, 1051.

100. F. Zhang, N. Ma, Y.-F. Gao, L.-L. Sun, and J.-G. Zhang, *Phytother. Res.*, **2017**, *31*, 1427.

101. S. Sugimoto, M. Naganuma, and T. Kanai, *J. Gastroenterol.*, **2016**, *51*, 853.

102. L. Zhao, H. Xiao, H. Mu, T. Huang, Z. Lin, L. Zhong, G. Zeng, B. Fan, C. Lin, and Z. Bian, *Molecules*, **2017**, *22*, 1218.

103. R. Chibbar and L. A. Dieleman, *J. Clin. Gastroenterol.*, **2015**, *49*, 50.

104. A. B. Kunnumakkara, D. Bordoloi, G. Padmavathi, J. Monisha, N. K. Roy, S. Prasad, and B. B. Aggarwal, *Br. J. Pharmacol.*, **2017**, *174*, 1325.

105. B. Kocaadam and N. Şanlier, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2017**, *57*, 2889.

106. S. Schreiber, S. Nikolaus, and J. Hampe, *Gut*, **1998**, *42*, 477.

107. C. Jobin, C. A. Bradham, M. P. Russo, B. Juma, A. S. Narula, D. A. Brenner, and R. B. Sartor, *J. Immunol.*, **1999**, *163*, 3474.

108. Y.-T. Jian, G. F. Mai, J. D. Wang, Y. L. Zhang, R. C. Luo, and Y. X. Fang, *World J. Gastroenterol.*, **2005**, *11*, 1747.

109. H. S. Youn, S. I. Saitoh, K. Miyake, and D. H. Hwang, *Biochem. Pharmacol.*, **2006**, *72*, 62.

110. A. Lubbad, M. A. Oriowo, and I. Khan, *Mol. Cell. Biochem.*, **2009**, *322*, 127.

111. H. Zhu, C. Bian, J. Yuan, W. Chu, X. Xiang, F. Chen, C. Wang, H. Feng, and J. Lin, *J. Neuroinflammation*, **2014**, *11*, 59.

112. M. Ricote, A. C. Li, T. M. Willson, C. J. Kelly, and C. K. Glass, *Nature*, **1998**, *391*, 79.

113. G. Pedersen and J. Brynskov, *Am. J. Gastroenterol.*, **2010**, *105*, 1595.

114. M. Adachi, R. Kurotani, K. Morimura, Y. Shah, M. Sanford, B. B. Madison, D. L. Gumucio, H. E. Marin, J. M. Peters, H. A. Young, and F. J. Gonzales, *Gut*, **2005**, *55*, 1104.

115. C. G. Su, X. Wen, S. T. Bailey, W. Jiang, S. M. Rangwala, S. A. Keilbaugh, A. Flanigan, S. Murthy, M. A. Lazar, and G. D. Wu, *J. Clin. Invest.*, **1999**, *104*, 383.

116. J. D. Ramakers, M. I. Verstege, G. Thuijls, A. A. Te Velde, R. P. Mensink, and J. Plat, *J. Clin. Immunol.*, **2007**, *27*, 275.

117. J. D. Lewis, G. R. Lichtenstein, J. J. Deren, B. E. Sands, S. B. Hanauer, J. A. Katz, B. Lashner, D. H. Present, S. Chuai, J. H. Ellenberg, L. Nessel, and G. D. Wu, *Gastroenterology*, **2008**, *134*, 688.

118. L. Dubuquoy, E. Å. Jansson, S. Deeb, S. Rakotobe, M. Karoui, J.-F. Colombel, J. Auwerx, S. Pettersson, and P. Desreumaux, *Gastroenterology*, **2003**, *124*, 1265.

119. S. Xu, B. Jiang, H. Wang, C. Shen, H. Chen, and L. Zeng, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **2017**, *2017*, 1.

120. M. Zhang, C. Deng, J. Zheng, J. Xia, and D. Sheng, *Int. Immunopharmacol.*, **2006**, *6*, 1233.

121. M. Mazidi, E. Karimi, M. Meydani, M. Ghayour-Mobarhan, and G. A. Ferns, *World J. Methodol.*, **2016**, *6*, 112.

122. Y. Cong, L. Wang, A. Konrad, T. Schoeb, and C. O. Elson, *Eur. J. Immunol.*, **2009**, *39*, 3134.

123. M. Zhang, C. Deng, J. Zheng, and J. Xia, *Acta Pharmacol. Sin.*, **2006**, *27*, 1071.

124. K. Burge, A. Gunasekaran, J. Eckert, and H. Chaaban, *Int. J. Mol. Sci.*, **2019**, *20*, 1912.

125. C. B. Larmonier, M. T. Midura-Kiela, R. Ramalingam, D. Laubitz, N. Janikashvili, N. Larmonier, F. K. Ghishan, and P. R. Kiela, *Inflamm. Bowel Dis.*, **2011**, *17*, 503.

126. B. B. Aggarwal, S. C. Gupta, and B. Sung, *Br. J. Pharmacol.*, **2013**, *169*, 1672.

127. M. T. Midura-Kiela, V. M. Radhakrishnan, C. B. Larmonier, D. Laubitz, F. K. Ghishan, and P. R. Kiela, *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.*, **2012**, *302*, 85.

128. Y. S. Kim, M. R. Young, G. Bobe, N. H. Colburn, and J. A. Milner, *Cancer Prev. Res. (Phila. Pa.)*, **2009**, *2*, 200.

129. V. Y. L. Ung, R. R. Foshaug, S. M. MacFarlane, T. A. Churchill, J. S. G. Doyle, B. C. Sydora, and R. N. Fedorak, *Dig. Dis. Sci.*, **2010**, *55*, 1272.

130. R. Al-Sadi, M. Boivin, and T. Ma, *Front. Biosci.*, **2009**, 2765.

131. F. Wang, W. V. Graham, Y. Wang, E. D. Witkowski, B. T. Schwarz, and J. R. Turner, *Am. J. Pathol.*, **2005**, *166*, 409.

132. R. Sreedhar, S. Arumugam, R. A. Thandavarayan, V. Karuppagounder, and K. Watanabe, *Drug Discov. Today*, **2016**, *21*, 843.

133. D. Ye, I. Ma, and T. Y. Ma, **2006**, *290*, 9.

134. T. Y. Ma, G. K. Iwamoto, N. T. Hoa, V. Akotia, A. Pedram, M. A. Boivin, and H. M. Said, *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.*, **2004**, *286*, 367.

135. J. Wang, S. S. Ghosh, and S. Ghosh, *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.*, **2017**, *312*, 438.

136. S. S. Ghosh, H. He, J. Wang, T. W. Gehr, and S. Ghosh, *Tissue Barriers*, **2018**, *6*, 1425085.

137. A. Lang, N. Salomon, J. C. Y. Wu, U. Kopylov, A. Lahat, O. Har-Noy, J. Y. L. Ching, P. K. Cheong, B. Avidan, D. Gamus, I. Kaimakliotis, R. Eliakim, S. C. Ng, and S. Ben-Horin, *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, **2015**, *13*, 1444.

138. V. Singla, V. Pratap Mouli, S. K. Garg, T. Rai, B. N. Choudhury, P. Verma, R. Deb, V. Tiwari, S. Rohatgi, R. Dhingra, S. Kedia, P. K. Sharma, G. Makharia, and V. Ahuja, *J. Crohns Colitis*, **2014**, *8*, 208.

139. H. Hanai, T. Iida, K. Takeuchi, F. Watanabe, Y. Maruyama, A. Andoh, T. Tsujikawa, Y. Fujiyama, K. Mitsuyama, M. Sata, M. Yamada, Y. Iwaoka, K. Kanke, H. Hiraishi, K. Hirayama, H. Arai, S. Yoshii, M. Uchijima, T. Nagata, and Y. Koide, *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, **2006**, *4*, 1502.

140. S. Kedia, V. Bhatia, S. Thareja, S. Garg, V. P. Mouli, S. Bopanna, V. Tiwari, G. Makharia, and V. Ahuja, *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.*, **2017**, *8*, 147.

141. S. C. Gupta, S. Patchva, and B. B. Aggarwal, *AAPS J.*, **2013**, *15*, 195.

142. M. Grammatikopoulou, K. Gkiouras, X. Theodoridis, E. Asteriou, A. Forbes, and D. Bogdanos, *Nutrients*, **2018**, *10*, 1737.

143. U. Iqbal, H. Anwar, and A. A. Quadri, *Am. J. Med. Sci.*, **2018**, *356*, 350.

144. P. Anand, A. B. Kunnumakkara, R. A. Newman, and B. B. Aggarwal, *Mol. Pharm.*, **2007**, *4*, 807.

145. C. D. Lao, M. T. Ruffin, D. Normolle, D. D. Heath, S. I. Murray, J. M. Bailey, M. E. Boggs, J. Crowell, C. L. Rock, and D. E. Brenner, *BMC Complement. Altern. Med.*, **2006**, *6*, 10.

146. B. Wahlang, Y. B. Pawar, and A. K. Bansal, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2011**, *77*, 275.

147. Z. Zeng, Z. L. Shen, S. Zhai, J. L. Xu, H. Liang, Q. Shen, and Q. Y. Li, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2017**, *117*, 123.

148. J. Frank, C. Schiborr, A. Kocher, J. Meins, D. Behnam, M. Schubert-Zsilavecz, and M. Abdel-Tawab, *Plant Foods Hum. Nutr.*, **2017**, *72*, 48.

149. C. Schiborr, A. Kocher, D. Behnam, J. Jandasek, S. Toelstede, and J. Frank, *Mol. Nutr. Food Res.*, **2014**, *58*, 516.

150. K. Strebhardt and A. Ullrich, *Nat. Rev. Cancer*, **2008**, *8*, 473.

151. J. Youshia and A. Lamprecht, *Expert Opin. Drug Deliv.*, **2016**, *13*, 281.

152. S. G. Nugent, D. Kumar, and D. F. Evans, *Gut*, **2001**, *48*, 571.

153. E. L. McConnell, H. M. Fadda, and A. W. Basit, *Int. J. Pharm.*, **2008**, *364*, 213.

154. A. Beloqui, R. Coco, M. Alhouayek, M. Á. Solinís, A. Rodríguez-Gascón, G. G. Muccioli, and V. Préat, *Int. J. Pharm.*, **2013**, *454*, 775.

155. J. Fallingborg, L. A. Christensen, B. A. Jacobsen, and S. N. Rasmussen, *Dig. Dis. Sci.*, **1993**, *38*, 1989.

156. A. A. Date, J. Hanes, and L. M. Ensign, *J. Controlled Release*, **2016**, *240*, 504.

157. L. J. Mohan, J. S. Daly, B. M. Ryan, and Z. Ramtoola, *Scand. J. Gastroenterol.*, **2019**, *54*, 18.

158. E.-M. Collnot, H. Ali, and C.-M. Lehr, *J. Controlled Release*, **2012**, *161*, 235.

159. R. Duncan and R. Gaspar, *Mol. Pharm.*, **2011**, *8*, 2101.

160. S. R. Mudshinge, A. B. Deore, S. Patil, and C. M. Bhalgat, *Saudi Pharm. J.*, **2011**, *19*, 129.

161. S. Hua, E. Marks, J. J. Schneider, and S. Keely, *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.*, **2015**, *11*, 1117.

162. J. G. Hardy, C. G. Wilson, and E. Wood, *J. Pharm. Pharmacol.*, **1985**, *37*, 874.

163. A. Lamprecht, U. Schäfer, and C. M. Lehr, *Pharm. Res.*, **2001**, *18*, 788.

164. L. B. Vong, T. Tomita, T. Yoshitomi, H. Matsui, and Y. Nagasaki, *Gastroenterology*, **2012**, *143*, 1027.

165. A. Lamprecht, N. Ubrich, H. Yamamoto, P. Maincent, Y. Kawashima, and C.-M. Lehr, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2001**, *299*, 775.

166. B. Xiao and D. Merlin, *Expert Opin. Drug Deliv.*, **2012**, *9*, 1393.

167. A. Lamprecht, H. Yamamoto, H. Takeuchi, and Y. Kawashima, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2005**, *315*, 196.

168. C. Schmidt, C. Lautenschlaeger, E.-M. Collnot, M. Schumann, C. Bojarski, J.-D. Schulzke, C.-M. Lehr, and A. Stallmach, *J. Controlled Release*, **2013**, *165*, 139.

169. T. T. Jubeh, Y. Barenholz, and A. Rubinstein, *Pharm. Res.*, **2004**, *21*, 447.

170. M. Carlson, R. Hallgren, and P. Venge, *Am. Coll. of Gastroenterology*, **1999**, *94*, 8.

171. B. Tirosh, N. Khatib, Y. Barenholz, A. Nissan, and A. Rubinstein, *Mol. Pharm.*, **2009**, *6*, 1083.

172. W. Niebel, K. Walkenbach, A. Béduneau, Y. Pellequer, and A. Lamprecht, *J. Controlled Release*, **2012**, *160*, 659.

173. S. Iqbal, X. Du, J. Wang, H. Li, Y. Yuan, and J. Wang, *Nano Res.*, **2018**, *11*, 2872.

174. H. Duan, S. Lü, C. Gao, X. Bai, H. Qin, Y. Wei, X. Wu, and M. Liu, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **2016**, *145*, 510.

175. D. S. Wilson, G. Dalmasso, L. Wang, S. V. Sitaraman, D. Merlin, and N. Murthy, *Nat. Mater.*, **2010**, *9*, 6.

176. N. G. Kotla, S. Rana, G. Sivaraman, O. Sunnapu, P. K. Vemula, A. Pandit, and Y. Rochev, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2018**, *169*, 409.

177. B. Moulari, D. Pertuit, Y. Pellequer, and A. Lamprecht, *Biomaterials*, **2008**, *29*, 4554.

178. H. Ali, B. Weigmann, M. F. Neurath, E. M. Collnot, M. Windbergs, and C.-M. Lehr, *J. Controlled Release*, **2014**, *183*, 167.

179. M. D. Joshi and R. H. Müller, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2009**, *71*, 161.

180. R. Shegokar, K. K. Singh, and R. H. Müller, *Int. J. Pharm.*, **2011**, *416*, 461.

181. D. Pertuit, B. Moulari, T. Betz, A. Nadaradjane, D. Neumann, L. Ismaïli, B. Refouvelet, Y. Pellequer, and A. Lamprecht, *J. Controlled Release*, **2007**, *123*, 211.

182. H. Tang, D. Xiang, F. Wang, J. Mao, X. Tan, and Y. Wang, *Mol. Med. Rep.*, **2017**, *15*, 1117.

183. A. Makhlof, Y. Tozuka, and H. Takeuchi, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2009**, *72*, 1.

184. J.-W. Yoo, M. Naeem, M. Choi, J. Cao, S. Yoon, M.-S. Kim, Y. Jung, J. Lee, H. R. Moon, M. Ikram, and Y. Lee, *Drug Des. Devel. Ther.*, **2015**, *9*, 3789.

185. C. Dianzani, F. Foglietta, B. Ferrara, A. C. Rosa, E. Muntoni, P. Gasco, C. Della Pepa, R. Canaparo, and L. Serpe, *World J. Gastroenterol.*, **2017**, *23*, 4200.

186. A. Melero, C. Draheim, S. Hansen, E. Giner, J. J. Carreras, R. Talens-Visconti, T. M. Garrigues, J. E. Peris, M. C. Recio, R. Giner, and C.-M. Lehr, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2017**, *119*, 361.

187. T. T. Jubeh, M. Nadler-Milbauer, Y. Barenholz, and A. Rubinstein, *J. Drug Target.*, **2006**, *14*, 155.

188. F. Kesisoglou, S. Y. Zhou, S. Niemiec, J. W. Lee, E. M. Zimmermann, and D. Fleisher, *Pharm. Res.*, **2005**, *22*, 1320.

189. D. Gao, A. H. Wagner, S. Fankhaenel, T. Stojanovic, S. Schweyer, S. Panzner, and M. Hecker, *Gut*, **2005**, *54*, 70.

190. G. D'Argenio, M. Calvani, A. Casamassimi, O. Petillo, S. Margarucci, M. Rienzo, I. Peluso, R. Calvani, A. Ciccodicola, N. Caporaso, and G. Peluso, *FASEB J.*, **2006**, *20*, 2544.

191. H. He, Y. Lu, J. Qi, Q. Zhu, Z. Chen, and W. Wu, *Acta Pharm. Sin. B*, **2019**, *9*, 36.

192. W. Liu, A. Ye, W. Liu, C. Liu, J. Han, and H. Singh, *Food Chem.*, **2015**, *175*, 16.

193. R. H. Müller, M. Radtke, and S. A. Wissing, *Int. J. Pharm.*, **2002**, *242*, 121.

194. I. Katouzian, A. Faridi Esfanjani, S. M. Jafari, and S. Akhavan, *Trends Food Sci. Technol.*, **2017**, *68*, 14.

195. A. Beloqui, P. B. Memvanga, R. Coco, S. Reimondez-Troitiño, M. Alhouayek, G. G. Muccioli, M. J. Alonso, N. Csaba, M. de la Fuente, and V. Préat, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **2016**, *143*, 327.

196. M. Sharma, S. Sharma, and J. Wadhwa, *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.*, **2019**, *47*, 45.

197. M. J. Blanco-Prieto, M. Guada, V. Sebastian, S. Irusta, E. Feijoo, and M. del C. Dios-Vieitez, *Int. J. Nanomedicine*, **2015**, *10*, 6541.

198. M. Guada, A. Beloqui, M. Alhouayek, G. G. Muccioli, M. del C. Dios-Viéitez, V. Préat, and M. J. Blanco-Prieto, *Int. J. Pharm.*, **2016**, *503*, 196.

199. K. Zai, M. Hirota, T. Yamada, N. Ishihara, T. Mori, A. Kishimura, K. Suzuki, K. Hase, and Y. Katayama, *J. Controlled Release*, **2018**, *286*, 94.

200. G. K. Sinhmar, N. N. Shah, N. V. Chokshi, H. N. Khatri, and M. M. Patel, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **2018**, *44*, 1078.

Interactions

curcumine - phospholipides

2. Interactions curcumine - phospholipides

2.1. Introduction

Les phospholipides sont, à la fois, des constituants de choix pour développer des vecteurs de principes actifs, dont la curcumine, et les principaux constituants des membranes biologiques, cibles de certains médicaments ou alors passage obligatoire de certains principes actifs (PA) avant d'atteindre leur cible. En effet, les vecteurs phospholipidiques qui sont généralement des liposomes, ont été largement étudiés comme systèmes d'encapsulation et de libération de la curcumine par voie orale. Cependant, les liposomes de phospholipides ne sont pas des structures colloïdales très stables dans les conditions gastro-intestinales. C'est pourquoi, ce type de vecteurs nécessite des modifications structurales ou l'ajout d'additifs pour rigidifier leur membranes et assurer ainsi l'acheminement et la libération des principes actifs jusqu'aux régions d'intérêts. Le vecteur a donc pour but de préserver les PA de la dégradation durant le transport. Une fois les principes actifs libérés, le passage à travers les membranes est une étape clé, dans le cas des MICI, le passage à travers la muqueuse intestinale. Ainsi, étudier les interactions entre la curcumine et les phospholipides qui constituent le vecteur permettrait, à la fois, d'améliorer l'efficacité du transport et les mécanismes d'absorption des PA et donc leur biodisponibilité.

Dans ce chapitre nous allons décrire dans un premier temps quelques généralités sur les phospholipides et leur mode d'organisation, en bicouches liposomales ou en monocouches lipidiques, car ces systèmes sont considérés comme des modèles de membranes biologiques. Nous allons ensuite présenter quelques caractéristiques physico-chimiques sur la curcumine et sur les interactions curcumine-phospholipides. Enfin, les résultats exposés et discutés dans ce chapitre se focaliseront sur l'étude des interactions entre la curcumine et des vésicules de lécithine de soja. Puis, sur l'étude des interactions dans un système ternaire, composé de curcumine, de DOPC et d'un céride, le palmitate de cétyle. Ce dernier a été choisi pour rigidifier le vecteur phospholipidique et favoriser l'internalisation de la curcumine dans la monocouche lipidique.

2.2. Généralités sur les phospholipides

Les phospholipides sont des molécules amphiphiles composées de deux chaînes aliphatiques (dites lipidiques) pouvant être saturées ou insaturées et d'un groupement phosphate de nature polaire. La famille des phospholipides est divisée en deux sous-groupes, les phosphoglycérides et les sphingomyélines (Figure 1). Cette distinction a été faite à cause de la nature chimique du groupe de jonction entre les chaînes carbonées et la tête polaire phosphatée.

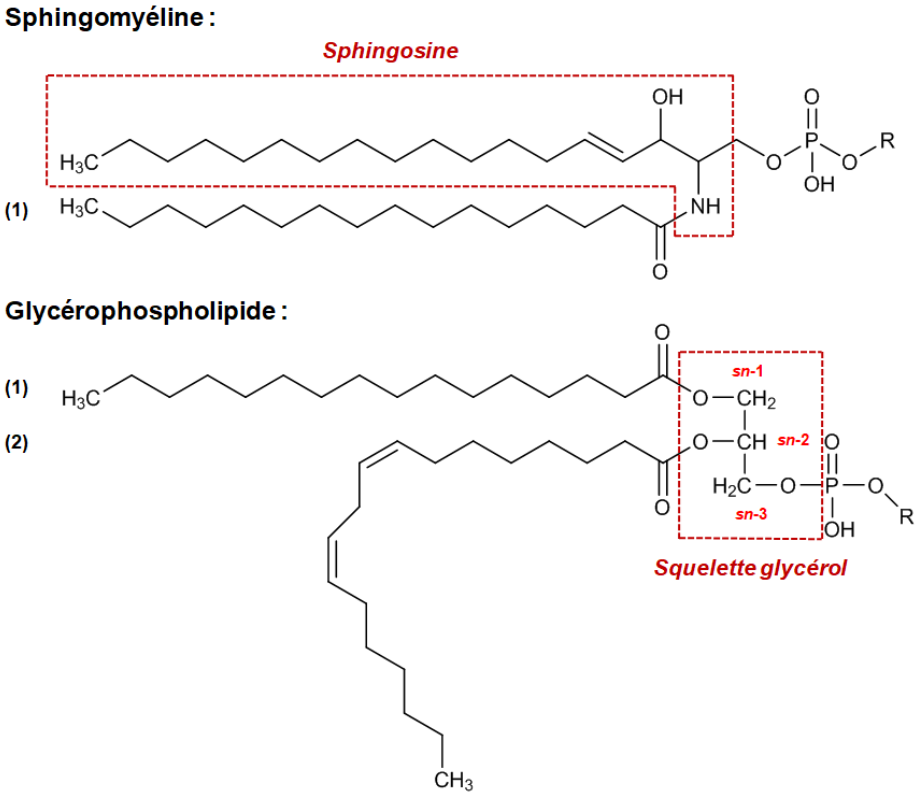


Figure 1. Structure chimique d'une sphingomyéline et d'un glycérophospholipide. (1) Chaînes d'acide gras saturé ou insaturé (2)

2.2.1. Les phospholipides

La plupart des phospholipides sont des phosphoglycérides où deux fonctions alcool du glycérol sont estérifiées en position *sn*-1 et *sn*-2 par des acides gras, formant ainsi la partie hydrophobe des phospholipides. La troisième fonction alcool est estérifiée par l'acide phosphorique, lui-même pouvant porter différents groupements polaire (éthanolamine, glycérol, choline, sérine, inositol), et constituer ainsi la tête polaire du phospholipide (Tableau I). Les phospholipides sont donc des molécules amphiphiles bicaténaires qui en solution aqueuse s'organisent en liposome pour minimiser l'interaction des chaînes grasses avec l'eau.

Tableau I. Exemples de groupements chimiques associés au groupement phosphate des phospholipides

Nom	Formule chimique
Phosphatidyléthanolamine (PE)	$-CH_2-CH_2-NH_3^+$
Phosphatidylglycérol (PG)	$-CH_2-CHOH-CH_2OH$
Phosphatidylcholine (PC)	$-CH_2-CH_2-N(CH_3)_3^+$
Phosphatidylsérine (PS)	$-CH_2-CH(COO^-)-NH_3^+$

2.2.2. Organisation des phospholipides en bicouche

De par leur caractère amphipathique et leur géométrie, le principal mode d'organisation des phospholipides est en bicouche, les liposomes unilamélaires étant le modèle le plus simpliste.

En fonction du mode de préparation, plusieurs types de liposomes peuvent être formés avec des tailles et des structures internes différentes. Les liposomes formés d'une seule bicouche concentrique entourant un compartiment aqueux sont nommés vésicules unilamellaires. Les vésicules multilamellaires (*multilamellar vesicles* ou MLV) quant à elles sont constituées de plusieurs bicouches concentriques, communément appelées structure en oignon.[1]

Les vésicules unilamellaires peuvent également être classifiées selon leur taille : les *petites* avec une taille comprise entre 20 et 100 nm (*small unilamellar vesicles* ou SUV), les *grandes* dont la taille varie de 100 à 1000 nm (*large unilammellar vesicles* ou LUV) et les *géantes* présentant une taille supérieure à 1 µm (*giant unilamellar vesicles* ou GUV).[2,3]

Les bicouches peuvent adopter des états physiques différents appelés phases lipidiques (Figure 2).

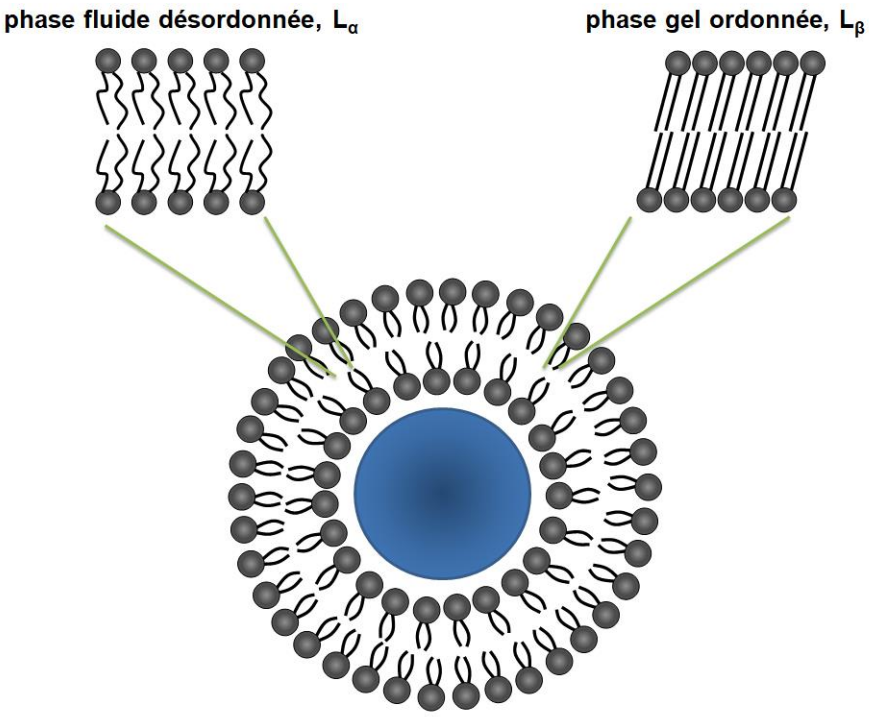


Figure 2. Représentation schématique d'un liposome unilamellaire. Les zooms dans la bicouche phospholipidique liposomale schématisent une phase fluide désordonnée (ou L_α) et une phase gel ordonnée (ou L_β)

2.2.2.1. Température de transition de phase des phospholipides

Lorsque les vésicules sont composées d'un seul type de lipides, l'augmentation de la température du système conduit à une transition de phase et à une réorganisation réversible des lipides d'une configuration dite phase gel ordonnée (L_β ou de configuration *trans*) vers une phase fluide désordonnée (L_α ou de configuration gauche) (Figure 2). La température à laquelle se fait cette transition est appelée « température de transition de phase » ou T_m. A une température inférieure à T_m, les chaînes hydrocarbonées sont ordonnées, parallèles entre elles, étirées au maximum et peu mobiles. Lorsque la température se rapproche de T_m, la mobilité moléculaire accroît, ainsi que la probabilité d'une isomérisation trans-gauche. Au-delà de T_m, les bicouches passent dans un état « fluide » où les chaînes hydrocarbonées sont désordonnées. La température de transition de phase dépend de la longueur et de la saturation des chaînes des phospholipides. Ainsi, T_m augmente avec la longueur de la chaîne hydrocarbonée et inversement, diminue avec l'augmentation du nombre de liaisons insaturées ou encore avec la ramification. Si les phospholipides à deux chaînes insaturées (cas du DOPC) sont dans une phase fluide à température ambiante, les phospholipides à deux chaînes saturées ont une température de transition de phase comprise généralement entre 40 et 50 °C.

2.2.2.2. Fluidité membranaire

En solution, les bicouches des liposomes ont un caractère dynamique. Effectivement, les phospholipides peuvent diffuser librement dans la membrane, tourner librement autour de leur axe, perpendiculairement au plan de la membrane ou diffuser latéralement. Au sein de la bicouche, les phospholipides sont capables de passer d'une monocouche à l'autre par mouvement de « flip-flop » (= diffusion transversale). Cependant ce processus, fréquent dans les membranes biologiques sous l'action des flipases, est moins fréquent et lent dans les liposomes synthétiques. Des échanges inter-liposomaux peuvent également se produire.[4]

L'aptitude des phospholipides à diffuser dans la membrane définit la fluidité membranaire. Une bicouche phospholipidique dans un état gel ordonné se caractérise par une diminution de la fluidité par rapport à son état désordonné de type fluide. La perméabilité et la fluidité des liposomes augmentent lorsque la bicouche passe d'un état « gel » ordonné à une phase fluide désordonnée. La température influence donc fortement l'organisation de la bicouche phospholipidique augmentant ainsi la perméabilité des liposomes ce qui entraînerait un relargage prématuré du ou des principes actifs encapsulés à cause de l'altération de la paroi liposomale.[4]

2.2.2.3. Addition de « tampons » de fluidité

La fluidité des bicouches peut être modifiée soit en variant le ratio entre les lipides saturés et insaturés soit en ajoutant des molécules (non nécessairement lipidiques) qui peuvent s'intercaler entre les chaînes grasses ou alors entre les têtes polaires, modifiant ainsi l'empilement (le *packing*) et donc la fluidité. Dans ce contexte, le cholestérol est largement utilisé dans les suspensions liposomales car il permet à la fois d'augmenter ou de diminuer la fluidité selon les phospholipides constituant les bicouches. Il s'intercale dans la membrane en exposant son groupement hydroxyle vers la phase aqueuse et sa partie apolaire parallèlement aux chaînes hydrocarbonées.[5] Le cholestérol permet ainsi un meilleur empilement des lipides au-dessus de la T_m, ce qui augmente la rigidité de la phase fluide ; et inversement, il permet de fluidifier les lipides de la membrane en phase gel.[6]

2.2.3. Organisation des phospholipides en monocouche

Étant amphiphiles, les phospholipides peuvent s'organiser en monocouche aux interfaces, et notamment s'organiser en film à celle entre l'air et l'eau, nommée film de Langmuir. Dans cette configuration, les têtes polaires hydrophiles, sont immergées dans la phase aqueuse tandis que les queues hydrophobes sont dirigées vers l'air. La balance de Langmuir est communément utilisée pour étudier en compression les différents états physiques des lipides (gaz, liquide expansé, liquide condensé ou solide) dans le film formé à l'interface air/eau.

2.2.3.1. Monocouche de Langmuir

De manière générale, les monocouches de Langmuir sont obtenues en épandant à l'interface air/eau une solution de molécules amphiphiles solubilisées dans un solvant organique volatil et non miscible à l'eau (comme le chloroforme). La balance de Langmuir est composée d'une cuve en Téflon® surmontée de deux barrières limitant la surface d'étalement des lipides aux dimensions formées par les bords de la cuve et les barrières mobiles. La présence de phospholipides à la surface de l'eau modifie alors sa tension superficielle. La compression symétrique des barrières réduit la surface disponible autour des phospholipides et donc l'aire disponible par molécule (Figure 3).

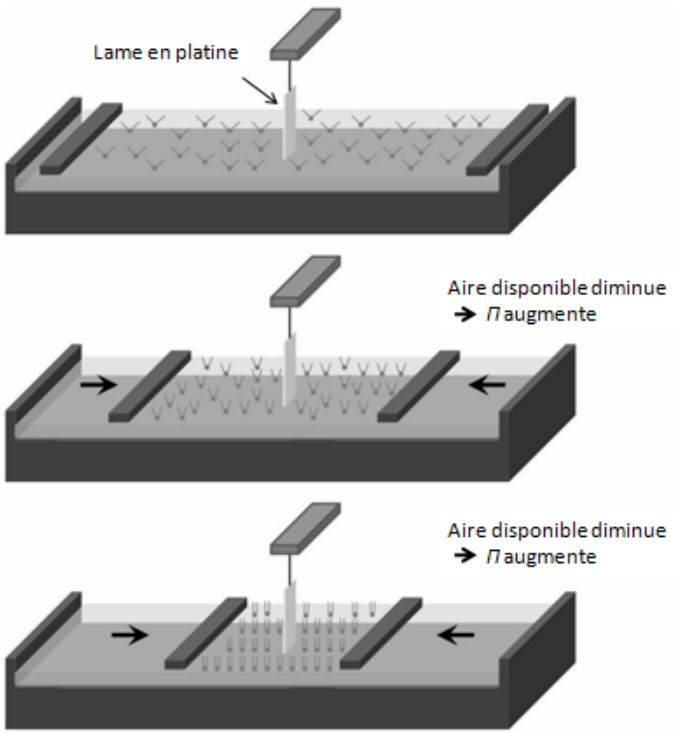


Figure 3. Principe de la compression des films monomoléculaires par la technique de Langmuir, schéma extrait de la thèse de Robin,[7] 2014.

Sous l'effet de la compression, l'ordre des molécules amphiphiles augmente et la tension superficielle diminue (et donc la pression de surface augmente). Cette tension superficielle est mesurée à l'aide d'une électro-balance à laquelle est reliée une lame en platine (plaque de Wilhelmy) partiellement immergée entre les deux barrières pendant la compression du film (Figure 3). La pression de surface (Π) est définie comme la différence entre la tension superficielle du liquide pur (γ_0) et celle du liquide recouvert par un film monomoléculaire (γ) selon l'équation 1 :

$$\Pi = \gamma_0 - \gamma \qquad \text{Equation 1}$$

L'association de la plaque de Wilhelmy et de la balance de Langmuir permet donc de suivre la pression de surface (Π) en fonction de l'aire moléculaire moyenne (A) occupée par un phospholipide à une interface air/eau. Il est ainsi possible de tracer l'isotherme de compression ; pression de surface-aire par molécule (Π-A).

2.2.3.2. Compressibilité d'une monocouche

Lors de la compression, la monocouche lipidique passe par différentes phases d'organisation. Afin de déterminer la nature de ces phases, la valeur du module de compressibilité peut être calculée. La compressibilité de la monocouche (C_s) est déterminée à partir de l'isotherme de compression selon l'équation 2 :

$$C_s = -A\left(\frac{\partial \mathrm{A}}{\partial \Pi}\right)_T \qquad \text{Equation 2}$$

Dans cette équation, A est l'aire moléculaire moyenne donnée à une pression de surface Π et à une température T. L'inverse de la compressibilité (C_s^{-1}), aussi appelé module de compressibilité, rend compte de la capacité de déformation de la monocouche. L'augmentation de C_s^{-1} exprime un film plus rigide, et inversement, une diminution indique un film plus fluide. La valeur maximale de C_s^{-1} correspond également à l'empilement le plus compact des molécules dans la monocouche.

Le comportement d'un lipide en monocouche dépend principalement de ses propriétés physiques et chimiques, de la température et de la composition de la sous-phase. Par exemple, différents états de la monocouche peuvent exister en fonction de la longueur des chaînes hydrocarbonées et des forces cohésives ou répulsives existantes entre les têtes polaires.[8] Par exemple, Dynarowicz-Ł, atka *et al.*[9] ont observé l'effet de la saturation des chaînes acyles sur la compressibilité de monocouches à une interface air/eau à 20 °C en comparant trois

phospholipides : le 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (deux chaînes saturées, DSPC), le 1-stearoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (une chaîne insaturée, SOPC), le 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (deux chaines insaturées, DOPC). La valeur du module de compressibilité est maximale pour le DSPC (330 $mN.m^{-1}$) et diminue à environ 100 $mN.m^{-1}$ lors de l'introduction d'une (SOPC) ou de deux (DOPC) insaturations. Il apparaît alors que l'insaturation des chaînes acyles du phospholipide tend à diminuer l'empilement des molécules et donc la rigidité du film.

2.2.3.3. Détermination des phases lipidiques

Comme montré dans la Figure 4, les isothermes de compression permettent de mettre en évidence les différents états de la monocouche lipidique. L'ensemble de ces phases lipidiques n'est pas nécessairement observé pour tous les phospholipides.

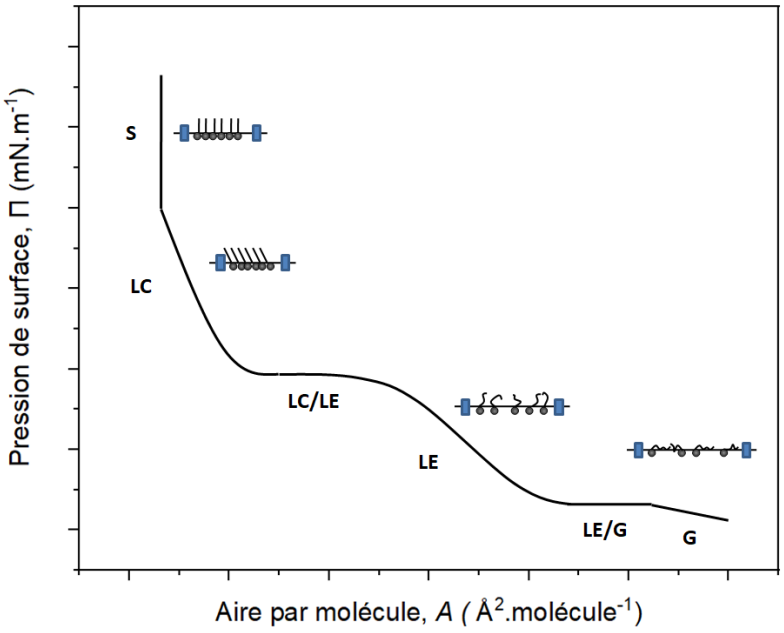


Figure 4. Représentation schématique d'un isotherme de compression de molécules amphiphiles à une interface air/eau, d'après Kagener *et al.*,[10] 1999. G : gaz ; LE : Liquide Expansé ; LC : Liquide Condensé ; S : solide.

La **phase gaz** correspond à une très grande aire par molécule (*A*). Les molécules sont éloignées et n'exercent aucune force les unes sur les autres. Les valeurs de pression de surface et de C_s^{-1} sont nulles.[11,12]

Sous compression, la diminution de l'aire par molécule entraîne une condensation des molécules et une augmentation de la pression de surface. Les chaînes acyles du lipide restent désorganisées mais elles se redressent et commencent à interagir entre elles. Cette phase est appelée **phase liquide expansé** (LE). La valeur du module de compressibilité est d'environ 50-100 $mN.m^{-1}$.[11,12]

En poursuivant la compression, le passage de la phase liquide expansé à une **phase liquide condensé** (LC) peut être observé. Cette phase est caractérisée par un arrangement compact des têtes polaires et un agencement parallèle/oblique entre les chaînes alkyles par rapport à l'interface. Cette phase est atteinte pour des valeurs de C_s^{-1} supérieures à 100 $mN.m^{-1}$.[11,12]

La dernière phase est la **phase solide**. Elle correspond à un fort empilement des chaînes de lipides. Les valeurs de module de compressibilité de cette phase sont généralement supérieures à 250 $mN.m^{-1}$.[11,12]

Enfin, une compression supplémentaire du film entraîne le collapse de la monocouche, qui est alors désorganisée et conduit à la formation d'agrégats tridimensionnels. Les valeurs de la pression de surface et de C_s^{-1} chutent.[11,12]

Hormis pour la phase gaz, la compression de chaque phase entraîne une augmentation de la pression de surface. Dans notre exemple, des transitions de phase G/LE et LE/LC sont discriminées sur l'isotherme de compression par l'apparition d'un plateau, où la valeur de pression de surface est constante lors de la diminution de l'aire moléculaire moyenne. Ces transitions de phases, qui sont dépendantes de la température et de la nature du lipide, correspondent à la coexistence de deux phases, ici, G et LE ainsi que LE et LC, respectivement.

2.2.3.4. Effet de la température sur une monocouche de phospholipide

En fonction de la température, certaines phases de l'isotherme de compression peuvent ne plus être observées. Pour illustrer cet effet, nous prendrons comme exemple les travaux menés par Toimil *et al.*[13] qui ont étudié l'effet de la température sur les différentes phases du 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) (Figure 5).

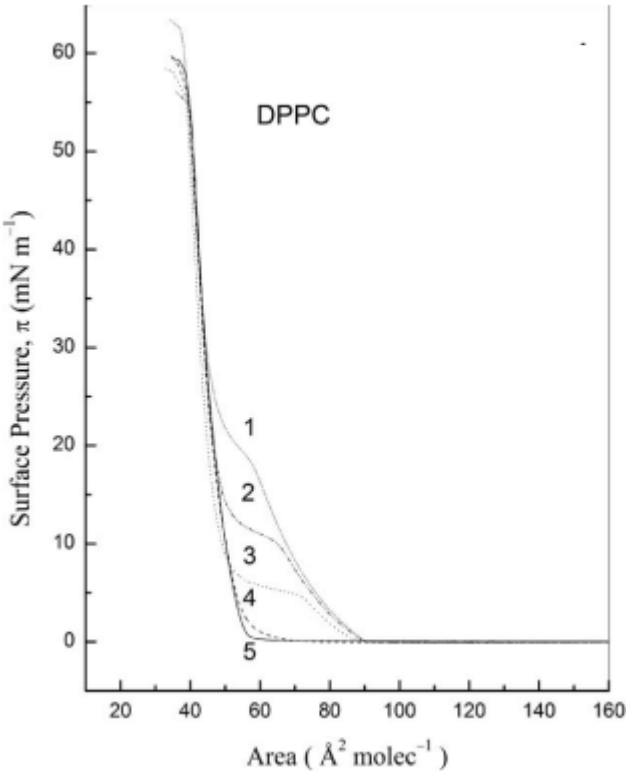


Figure 5. Isotherme *Π-A* d'un film de DPPC à différentes températures, tiré de Toimil *et al*.,[13] 2010. Courbe 1, 30 °C ; courbe 2, 25 °C ; courbe 3, 20 °C ; courbe 4, 15 °C ; courbe 5, 10 °C.

Il apparaît que la pression de surface correspondant au plateau et donc à la transition de phase LE-LC augmente avec la température. Ceci est aussi le cas pour certains acides gras comme l'acide myristique.[14] Cette augmentation de pression est accompagnée par une diminution de la largeur du plateau jusqu'à sa disparition.

2.3. État de l'art sur les interactions curcumine - phospholipides

2.3.1. Propriétés physico-chimiques de la curcumine (CC)

D'un point de vue chimique, la molécule de curcumine (CC) possède deux noyaux phénoliques connectés par un motif *β*-dicétone-*α,β*-insaturée (Figure 6). Les propriétés physico-chimiques de la curcumine, et notamment ses propriétés optiques, sont gouvernées par l'équilibre céto-énolique. En effet, le motif dicétonique peut subir une tautomérisation (migration d'un hydrogène du méthylène di-cétonique sur l'oxygène cétonique) qui conduit à la formation de l'énol. L'équilibre entre les deux isomères dépend généralement de la polarité du solvant[15], de la température[16,17] et du pH[16,17] de la solution (Figure 6).

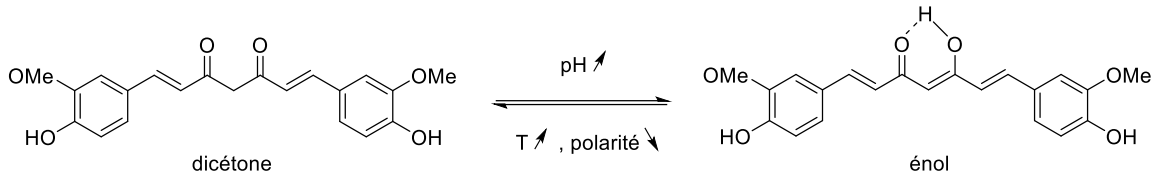


Figure 6. Formes tautomères de la curcumine et les facteurs influençants son équilibre tautomérique.

Certains travaux montrent que cet équilibre peut également être influencé par le micro-environnement. Par exemple, Dutta *et al.*[18,19] ont montré que des tensioactifs anioniques ou cationiques, à une concentration inférieure à leur CMC (concentration micellaire critique), stabilisent davantage la forme dicétone par complexation entre la CC et la tête polaire du tensioactif. En revanche, à des concentrations en tensioactif supérieures à la CMC, la forme énol de la curcumine est stabilisée dans le cœur hydrophobe de la micelle (Figure 7 A). L'encapsulation dans des γ-cyclodextrines permet également de stabiliser la forme dicétone de la curcumine (Figure 7 B).[20]

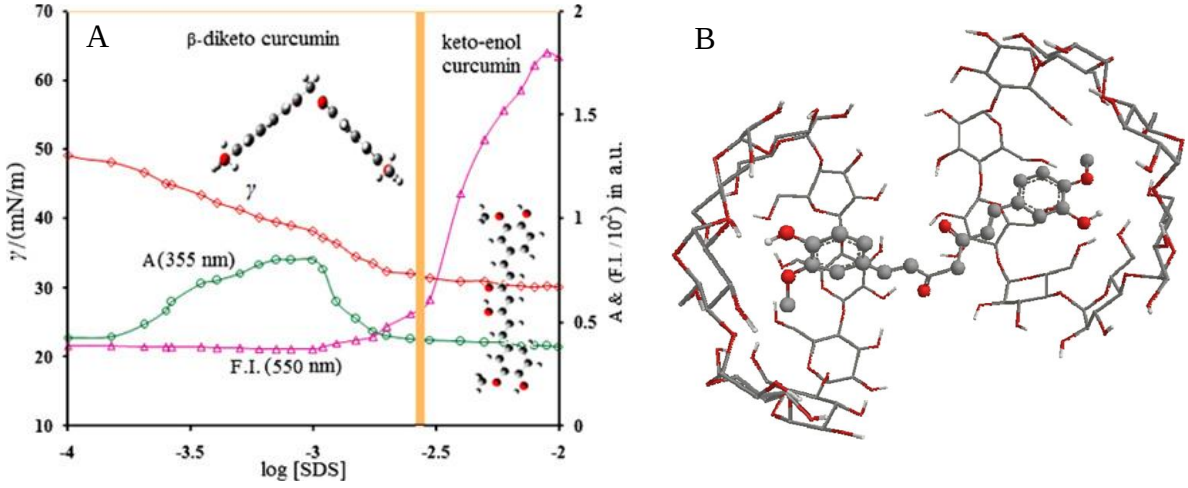


Figure 7. (A) **Stabilisation de la forme β-dicétone de la curcumine à une concentration en SDS inférieure à sa CMC**, Dutta *et al.*,[18] 2013. (B) **Schéma du complexe γ-cyclodextrine/curcumine**, López-Tobar *et al.*,[20] 2012.

La caractérisation physico-chimique des tautomères se fait essentiellement grâce à leurs propriétés optiques, notamment dans un milieu complexe où l'utilisation de la RMN reste difficile. En effet, la spectroscopie UV-visible et la spectroscopie de fluorescence sont des techniques de choix pour étudier l'impact de l'environnement sur le comportement physique et chimique de la molécule de curcumine. Ces techniques ont ainsi permis d'étudier l'effet du solvant (protique/aprotique, polaire/apolaire),[15,21,22] de la température ou encore de l'encapsulation[16,17] sur l'équilibre céto-énolique. Elles ont également permis de mettre en

évidence les interactions entre la curcumine et des protéines[23] ou des liposomes de lécithine,[24] ou encore d'étudier sa cinétique de dégradation.[25]

2.3.1.1. Caractérisation des formes tautomères de la curcumine par spectroscopie UV-Visible

Typiquement, le spectre d'absorption de la curcumine dans l'eau présente deux bandes d'absorption, correspondant respectivement à l'absorption des motifs féruloyles conjugués (de la forme énol) et aux motifs féruloyles non-conjugués (de la forme céto). Dans l'eau, le maximum d'absorption apparaît à 427 nm et correspond à une transition π-π* de la forme énol, tandis que, les transitions π-π* et n-π* conduisent à un épaulement à 360 nm attribué à la forme céto. Selon le solvant, le spectre d'absorption de la curcumine s'étends entre 350 à 480 nm et présente des bandes d'intensité relatives variables (Figure 8), dues à la fois au moment dipolaire du solvant et au déplacement de l'équilibre de tautomérisation céto-énolique. Ainsi, l'augmentation de la polarité du solvant résulte en la disparition graduelle de la première bande d'absorption (~ 370-380 nm), qui correspondrait à l'absorption de la forme céto ; les spectres sont également élargis dans le domaine visible (> 480 nm). Par ailleurs, il a été montré que les spectres d'absorption de la forme énol présentent des maxima d'absorption variant entre 406 et 430 nm dans les solvants polaires ou apolaires alors que la forme cétone conduit à un épaulement de 370 à 380 nm dans les solvants non polaires (Figure 8).[15,26]

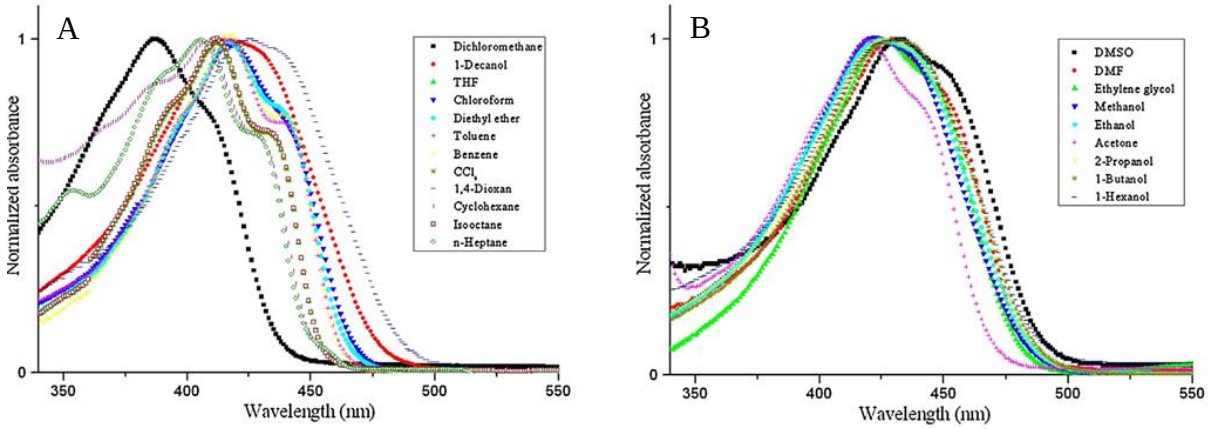


Figure 8. Spectres d'absorption de la curcumine mesurés dans des solvants présentant des polarités différentes, d'après Sadigh *et al.*,[15] 2017 : A) solvants non polaires, B) solvants polaires.

De manière générale, la position du maximum d'absorption des différentes formes de la curcumine est affectée par le changement de polarité du milieu du fait de la solvatation de la curcumine (solvatochromisme). En effet, dans ce cas, la forme céto présente un faible déplacement bathochrome (absorption vers de plus grandes longueurs d'onde, ou vers le

rouge) avec l'augmentation de la polarité du solvant. La forme énol, quant à elle, subit un déplacement bathochrome dans les solvants polaires alors qu'un déplacement hypsochrome (absorption vers de plus faibles longueurs d'onde, ou vers le bleu) est attribué à un environnement apolaire.[15]

2.3.1.2. Caractérisation des formes tautomères de la curcumine par spectroscopie de fluorescence

Les spectres d'émission de la curcumine sont également dépendants de la polarité du solvant comme indiqué dans la Figure 9 ; puisque dans les solvants apolaires, le maximum d'émission de la forme énol est déplacé vers le bleu, et inversement, dans les solvants polaires, il est déplacé vers le rouge.[15] Dans l'eau, la forme énol de la curcumine présente un maximum d'émission à ~ 550 nm.[26]

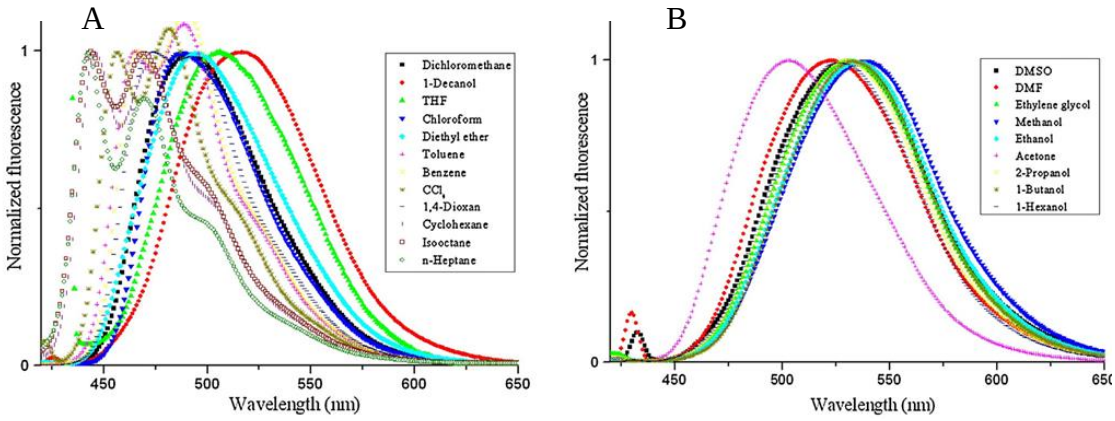


Figure 9. Spectres d'émission de la curcumine mesurés dans des solvants présentant des polarités différentes, d'après Sadigh *et al.*,[15] 2017: A) solvants non polaires, B) solvants polaires.

Concernant le caractère fluorescent de la forme dicétone, celui-ci est peu rapporté dans la littérature. Cependant, Mouslmani *et al.*[27] ont étudié la fluorescence de la curcumine encapsulée dans des nanocapsules de polyallylamine. Sous une excitation à 355 nm, ils observent l'émission de la forme énol (~ 540 nm) et un second pic d'émission à ~ 456 nm. Il a aussi été montré qu'une augmentation de la température peut favoriser la forme céto non-conjuguée. Par exemple, Moussa *et al.*[17] observent que lors d'une excitation à 355 nm, la curcumine encapsulée dans des liposomes de rhamnolipides présente un pic d'émission de la forme énol à ~ 503 nm et également un pic supplémentaire, décalé de 73 nm vers le bleu, à ~ 430 nm, dont l'intensité augmente avec l'augmentation de la température. Les travaux de Mouslmani *et al.* et de Moussa *et al.* attribuent ces émissions à une désactivation radiative sans subir l'ESHT (*excitated-state hydrogen transfert*), ce qui est possible uniquement pour la

forme céto (Figure 10).[17,27] Il est à noter que ces deux exemples révèlent un déplacement hypsochrome de l'émission de fluorescence de la forme énol (~ 540 et 503 nm) par rapport à la curcumine dans l'eau (~ 550 nm), suggérant un changement d'environnement de la curcumine et confirmant ainsi son encapsulation. Par ailleurs, Bhatia *et al.*[16] ont observé l'effet de la température sur l'équilibre tautomérique de la curcumine solubilisée dans une solution aqueuse contenant 5 % d'éthanol. Lors d'une excitation à 350 nm, ils ont observé un déplacement hypsochrome du signal d'émission de fluorescence de la forme énol, de ~ 550 à ~ 500 nm à forte température (50 °C). Cela a été attribué au déplacement de l'équilibre des formes tautomères vers la forme dicétone dû à l'augmentation de la température.

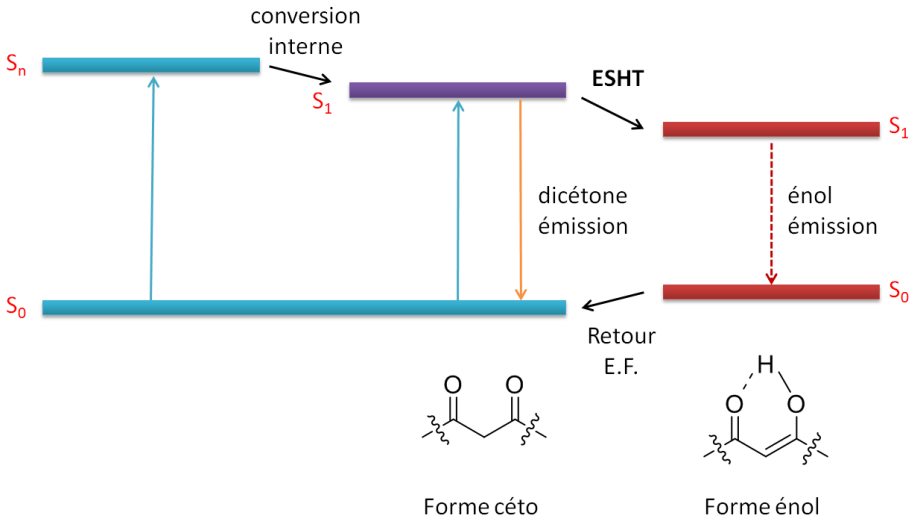


Figure 10. Processus d'absorption et de désactivation de l'état excité de la CC sous les formes céto et énol d'après Mouslmani *et al.*[27]

2.3.2. Encapsulation de la curcumine dans des bicouches liposomales

Les liposomes, en tant que système d'administration de médicaments, peuvent améliorer l'activité thérapeutique et la stabilité des principes actifs. L'influence de la composition des liposomes sur la fluidité de la membrane a été étudiée par Coderch *et al.*[6] et Calvagno *et al.*[28] Ils ont déterminé une différence significative dans les profils de libération du principe actif en fonction de deux facteurs : (*i*) la fluidité de la bicouche et (*ii*) la force d'interaction entre le principe actif et le lipide formant la suspension liposomale.

2.3.2.1. Fluidité de la bicouche

Hasan *et al.*[29] ont étudié par anisotropie de fluorescence l'interaction de la curcumine avec des lécithines de soja, de saumon et de colza. Ils ont observé que la présence de curcumine augmente la fluidité membranaire de tous les liposomes. La forme énol de la curcumine étant rigide et planaire, sa présence peut affaiblir les interactions entre les chaînes alkyles des phospholipides. Son incorporation perturberait alors l'arrangement des phospholipides au sein de la bicouche. Ils ont également observé une diminution de la taille des liposomes lors de l'encapsulation de curcumine qui proviendrait d'une forte interaction entre la curcumine et la lécithine entraînant une compaction du cœur des liposomes.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Niu *et al.*[24] qui ont étudié la variation de l'anisotropie de fluorescence en fonction de la concentration de curcumine encapsulée dans des liposomes de L-α-phosphatidylcholine (L-α-PC). Ils observent alors une diminution de l'anisotropie avec l'augmentation de la concentration en curcumine. Étant donné que les résultats de Barry *et al.*[30] suggèrent l'existence de liaisons hydrogène entre le groupement phénolique de la curcumine et le groupement phosphate du lipide ainsi que des interactions de van der Waals entre les cycles aromatiques de la curcumine et les chaînes acyles du phospholipide ; la diminution de l'anisotropie de fluorescence avec l'augmentation de la concentration en curcumine indiquerait une perturbation de l'empilement des phospholipides de la bicouche lorsque la concentration en curcumine augmente.

D'après ces études, il semblerait donc qu'à forte concentration, la curcumine modifierait la fluidité de la bicouche liposomale.

2.3.2.2. Interaction entre la curcumine et une bicouche liposomale

Patra *et al.*[31] ont étudié l'interaction entre des vésicules de DPPC et la curcumine en déterminant la valeur du coefficient de partition (*Kp*) de la curcumine. *Kp* fournit des informations sur la fraction de curcumine associée aux liposomes. Ils estiment la valeur de *Kp* à 1,1 x 10^6 indiquant une forte affinité de la curcumine pour les liposomes de DPPC en phase gel. Le coefficient de partition augmente avec la température, car il a été relevé à 2,65 x 10^6 à la température de transition de phase du phospholipide et à 4,30 x 10^6, au-dessus de la température de transition de phase du DPPC. Par ailleurs, ils rapportent également qu'au rapport équimolaire *curcumine : lipide*, la température de transition de phase du lipide est plus faible que celle à plus faible concentration en curcumine (1 : 50 ou 1 : 25). Ils justifient ces

résultats par la présence de curcumine entre les chaînes acyles du DPPC réduisant ainsi l'empilement dans la phase gel.

Quant à Hung *et al.*,[32] ils rapportent des valeurs similaires de *Kp* de la curcumine pour des liposomes de DOPC ($1{,}3 \times 10^6$). Ils se sont également intéressés aux profils de densités électroniques de la bicouche par diffraction de rayon X. Pour cela, ils ont étudié différents rapports *curcumine : DOPC* (de 1 :400 à 1 :3). Pour lesquels ils ont constaté un amincissement de la membrane. Dans leur cas, ce phénomène est dépendant de la concentration en curcumine puisqu'à faible concentration l'effet d'amincissement de la membrane est plus marqué qu'à plus fortes concentrations.

En se basant sur les travaux de Hung *et al.*,[32] Sun *et al*.[33] montrent par leur étude que les interactions curcumine-bicouches lipidiques (de DOPC) suivent le même modèle que celui des peptides amphiphiles. Leurs résultats suggèrent qu'à faible concentration, la curcumine se lie à l'interface des liposomes, puis elle s'insérerait plus profondément dans la région hydrocarbonée de la bicouche phospholipidique à des concentrations supérieures.

2.3.2.3. Phytosomes : complexe phospholipide - curcumine

Plus récemment, les phytosomes ont été développés. Ils permettent la conjugaison de composés phytochimiques à des phospholipides tels que les phosphatidylcholines et ce, dans le but de produire des complexes moléculaires pouvant améliorer l'absorption et la biodisponibilité de principes actifs, tels que la curcumine. Contrairement aux liposomes, les phytosomes possèdent un groupement du composé phytochimique directement lié à la tête polaire du phospholipide. Cette différence peut conduire à un meilleur profil d'absorption orale et une meilleure stabilité des phytosomes par rapport aux liposomes.[34]

La curcumine phytosomale est généralement préparée par addition de phospholipides à une solution hydro-alcoolique de curcumine, sous reflux. Les phytosomes peuvent alors être isolés par précipitation, lyophilisation ou atomisation. Un complexe curcumine phospholipide est ainsi obtenu.[34]

Par exemple, dans une étude, l'administration orale de 340 mg de curcumine phytosomale chez le rat permet une augmentation de la concentration plasmatique en curcumine cinq fois supérieure à la curcumine non formulée.[35] De plus, Cuomo *et al*.[36] ont étudié chez l'Homme l'absorption orale d'un mélange de curcuminoïdes non formulés ou sous forme phytosomale,

complexé avec de la lécithine de soja (Merival). L'absorption des curcuminoïdes était environ 29 fois plus élevée dans de Meriva que pour les curcuminoïdes non formulés.

2.3.3. Interaction de la curcumine avec des monocouches phospholipidiques

Peu d'études ont exploré l'interaction entre la curcumine et une monocouche de phospholipide en utilisant la balance de Langmuir. Par exemple, Karewicz *et al.*[37] se sont intéressés à l'interaction de la curcumine avec un film de L-α-Phosphatidylcholine (L-α-PC) extrait d'œuf. Ils observent que l'addition de curcumine à la monocouche de lipide entraîne une augmentation de la valeur du module de compressibilité (105 $mN.m^{-1}$ *vs* 93 $mN.m^{-1}$). Cet effet suggère que la curcumine rigidifie la monocouche de L-α-PC.

Ils se sont également intéressés à l'interaction de la curcumine avec un mélange binaire composé de L-α-PC et de dihexadecyl phosphate (DHP) qui lui-même fluidifie la monocouche phospholipidique. Ils ont également étudié l'interaction avec un mélange ternaire composé du phospholipide, de DHP et de cholestérol, qui, quant à lui, augmente l'ordre dans la monocouche du mélange binaire. L'addition de curcumine dans le mélange binaire confirme son effet rigidifiant. En revanche, en présence de cholestérol, la curcumine perturbe l'effet d'ordre du cholestérol et fluidifie la monocouche. Le caractère fluidifiant ou condensant de la curcumine sur les monocouches a été aussi observé sur des suspensions liposomales réalisées à partir des mélanges binaire et ternaire. En présence de curcumine, la taille des liposomes du mélange binaire diminue et inversement, elle augmente, pour ceux formés par le mélange ternaire. Il apparaitrait, dans ce cas, que l'effet condensant de la curcumine en monocouche se traduirait par une diminution de la taille des suspensions liposomales et inversement, par une augmentation de la taille des liposomes sous l'effet fluidisant de la CC.

Dans une autre étude, Xu *et al.*[38] se sont intéressés à l'interaction entre la curcumine et une monocouche de DPPC à une interface air/eau. Ils ont notamment observé que la curcumine fluidisait la monocouche de DPPC. Ils ont également suggéré une interaction attractive entre le DPPC et la curcumine, gouvernée par la création de liaisons hydrogène entre le groupement ammonium du DPPC et les groupements phénoliques de la CC. Cette hypothèse est contradictoire avec l'étude de Barry *et al.*[30] qui excluent la possibilité d'une interaction électrostatique entre les groupements méthoxyle et hydroxyle de la curcumine avec le groupement choline de la phosphatidylcholine lors de l'encapsulation de curcumine dans des vésicules de DPPC.

2.4. Partie expérimentale

2.4.1. Produits

La curcumine (CC) d'une haute pureté (98,5 %) provient de chez Sigma-Aldrich (Figure 11).

La lécithine de soja (LS) d'origine commerciale (pureté de 97 %, Acros Organics) utilisée pour le travail présenté dans ce chapitre est un mélange contenant 65-75 % de phospholipides avec des triglycérides et 33-35 % d'huile de soja. Les phospholipides les plus abondants sont des phosphatidylcholines, des phosphatidyéthanolamines et des phosphatidylinositols.[39] La 1,2-dioléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (DOPC, 99%, Sigma-Aldrich) a été utilisée comme phosphatidylcholine modèle dans la partie théorique (Figure 11).

Le palmitate de cétyle (Sigma-Aldrich, 99 %), abrégé CP, est un ester gras utilisé afin de rigidifier la membrane liposomale (Figure 11).

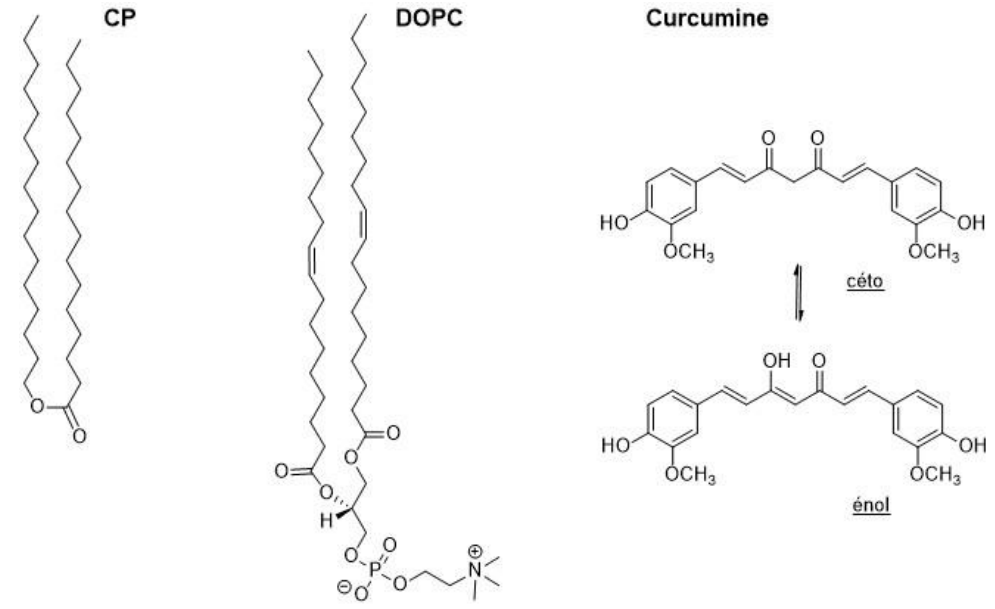


Figure 11. Structure moléculaire du palmitate de cétyle (CP), de la 1,2-dioléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (DOPC) et des tautomères de la curcumine (CC).

2.4.2. Préparation des liposomes

Les liposomes de lécithine de soja ont été obtenus par l'hydratation d'un film lipidique suivie par ultrasonication. Pour cela, la LS et la CC sont solubilisées ensemble dans du tétrahydrofurane puis le solvant est évaporé à l'évaporateur rotatif sous vide afin d'obtenir un film lipidique. Le film est ensuite hydraté avec 20 mL d'eau à 60 °C de sorte à ce que la

concentration finale en LS soit de 0,5 mg.mL^{-1}. La dispersion lipidique est ensuite passée à la sonde à ultrason durant 30 min (30W, SONOPULS HD 2200, Bandelin). Dans le cadre de cette étude les liposomes préparés contiennent entre 0 et 8 µM de CC. La suspension liposomale est ensuite filtrée sur un filtre de polyéthersulfone de 0,450 µm afin d'éliminer toute particule de taille supérieure.

2.4.3. Caractérisation physico-chimique de l'interaction de la curcumine avec une bicouche et une monocouche de phospholipide

2.4.3.1. Détermination de la taille des liposomes

La taille moyenne des liposomes a été déterminée par deux techniques de mesure : la diffusion dynamique de la lumière (DLS) (Zetasizer3000 HSA, Malvern) et la NTA pour *Nanoparticle Tracking Analysis* (NS300 Nanosight, Malvern).

2.4.3.2. Mesure des spectres d'absorption et d'émission

Les spectres d'absorption UV/visible ont été enregistrés à 25 °C avec un spectrophotomètre Perkin-Elmer Lambda 1050 UV-Vis-proche IR en utilisant une longueur de chemin optique de 1 cm. Tous les spectres ont été normalisés par rapport à l'absorption de la solution de liposomes ne contenant pas de CC, pour s'affranchir de l'absorption de la lécithine car celle-ci contient originellement des traces d'un pigment marron.

Les spectres de fluorescence obtenus après l'irradiation de l'échantillon ont été enregistrés avec un spectrofluorimètre Jobin Yvon Fluorologue-3 et les signaux ont été traités avec le programme FluorEssence. La source d'excitation est une lampe Xenon 100 W, et le détecteur utilisé est un R-928 opérant à un voltage de 950 V. La largeur des fentes d'émission et d'excitation ont été fixées à 2 nm pour toutes les solutions, exceptée pour la mesure de CC dans l'eau où la fente d'émission a été réglée à 5 nm. Toutes les solutions ont été préparées dans l'eau.

2.4.3.3. Isothermes de compression *Π-A* des monocouches

Les isothermes de compression (pression de surface-aire, *Π-A*) ont été réalisées avec une cuve KSV NIMA – Biolin Scientific, cuve en téflon®, thermostatée, d'une surface effective de 377 cm^2 et équipée de deux barrières hydrophiles (Delrin®, compression symétrique). Les isothermes de compression ont été réalisées pour étudier ***i)*** l'interaction entre la curcumine et la lécithine de soja (système binaire) et ***ii)*** les interactions dans un système ternaire, composé

de CC, de DOPC et de CP qui a été choisi pour rigidifier le vecteur et favoriser l'internalisation de la curcumine dans la monocouche lipidique. Les isothermes de compression ont été mesurées pour les composés purs et leurs mélanges, à différents ratios molaires. La pression de surface a été suivie en utilisant une plaque de Wihelmy en platine. Avant chaque mesure, la surface de la sous-phase est nettoyée par aspiration sous balayage. Ensuite le film est épandu sur la sous-phase. Les solutions sont épandues avec une seringue Hamilton sur la surface libre de l'eau et laissées 15 min afin de permettre l'évaporation du solvant et d'atteindre l'équilibre de la monocouche. Toutes les isothermes sont enregistrées sous compression symétrique de la monocouche à une vitesse constante des barrières de 5 $mm.min^{-1}$. Dans le cas des mélanges binaires ou ternaires, la pression de surface est représentée par rapport à l'aire moléculaire moyenne, qui était obtenue en divisant l'aire de la surface totale par le nombre de molécules épandues sur la surface de la sous-phase. Pour chaque composition de monocouche, les mesures ont été répétées aux moins trois fois. Les isothermes *Π-A* ont été enregistrées à ***i)*** 25 ± 0,1 °C et à ***ii)*** à 18, 25 et 32 ± 0,1 °C pour le système ternaire. L'écart-type obtenu à partir des isothermes de compression était de ± 0,5 $Å^2$ pour l'aire moléculaire (*A*) et de ± 0,2 $mN.m^{-1}$ pour la pression de surface. Les isothermes de compression permettent de déterminer le module de compressibilité[40], C_s^{-1}, tel que décrit par l'équation 3 :

$$C_s^{-1} = -A\left(\frac{\partial \Pi}{\partial A}\right)_T \qquad \text{Equation 3}$$

2.4.3.4. Analyses thermodynamiques

L'énergie de Gibbs du mélange, ΔG^{mix}, est calculée à partir des isothermes *Π-A* des mélanges ternaires[41] en utilisant la formule suivante :

$$\Delta G^{mix} = \int_0^{\Pi}[A_{12} - (x_1A_1 + x_2A_2)]d\Pi \qquad \text{Equation 4}$$

Où A_{12} est l'aire moléculaire moyenne dans la monocouche du mélange ternaire (DOPC/CP/CC) à une pression de surface donnée, A_1 et A_2 sont l'aire moléculaire moyenne du DOPC pure et du mélange CP/CC, respectivement, à la même pression de surface, et x_1 et x_2 sont les fractions molaires du DOPC pur et du mélange CP/CC, respectivement, dans le film. Ici, le modèle thermodynamique appliqué aux monocouches est extrapolé à partir du model en « bulk ». Dans ce travail, ΔG^{mix} est définie comme un excès d'énergie relative par rapport à l'énergie additive des composants présents dans le film, selon

$\Delta G^{mix} = G - (x_1G_1 + x_2G_2)$. Donc, les valeurs de ΔG^{mix} dans la monocouche peuvent être positives ou négatives. Cela n'est pas le cas en « bulk » où la valeur de ΔG^{mix} est toujours négative pour des composants miscibles et égale à zéro pour un système immiscible.[41,42]

2.4.3.5. Microscopie à angle de Brewster

La morphologie des films composés à partir des constituants du mélange ternaire a été visualisée avec une cuve de Langmuir KSV 2000 combinée à un microscope à angle de Brewster (KSV Optrel BAM 300, Helsinki) *via* une interface informatique. Les dimensions de la cuve Teflon® étaient de 58 x 6,5 x 1 cm ; les autres conditions expérimentales sont décrites dans la partie ci-dessus « Isothermes de compression *Π-A* des monocouches».

2.4.3.6. Principe de la microscopie à angle de Brewster (BAM)

La microscopie à angle de Brewster est basée sur le principe de réfringence d'un faisceau monochromatique *p*-polarisé, à l'interface air/eau, (Figure 12). La lumière *p*-polarisée n'est pas réfléchie par une interface homogène et propre lorsqu'elle arrive sous un angle incident θ_B, aussi appelé angle de Brewster. Cet angle vaut ~ 53° pour une interface air/eau (Figure 12 A). Lorsque des diélectriques tels que des molécules amphiphiles sont placées à l'interface, la condition de Brewster est modifiée générant la réflexion de la lumière (Figure 12 B). A cet angle, l'intensité relative du faisceau réfléchi (I) est proportionnelle au carré de l'épaisseur du film moléculaire (d) comme indiqué par l'équation 5 :

$$I = \left|R_p\right|^2 = \alpha . d^2 \qquad \text{Equation 5}$$

Où R_p est la composante incidente dans le plan d'incidence de la lumière réfléchie et α est un coefficient de proportionnalité.

Un dispositif de transfert de charges (caméra CCD), sensible à l'intensité de la lumière réfléchie, enregistre des charges électriques proportionnelles à la quantité de lumière reçue (Figures 12 C et D). Ces charges sont traduites en code monochrome. Ainsi, le contraste des images BAM est observé lorsqu'il y a des différences locales d'indice de réfraction dues à des différences de densité moléculaire locale. Le couplage de la technique de Langmuir avec la saisie d'images BAM permet de mettre en évidence le changement morphologique d'un film monomoléculaire au cours de sa compression.

Le BAM utilisé est équipé d'un laser 10 mW à la longueur d'onde de 632,8 nm.

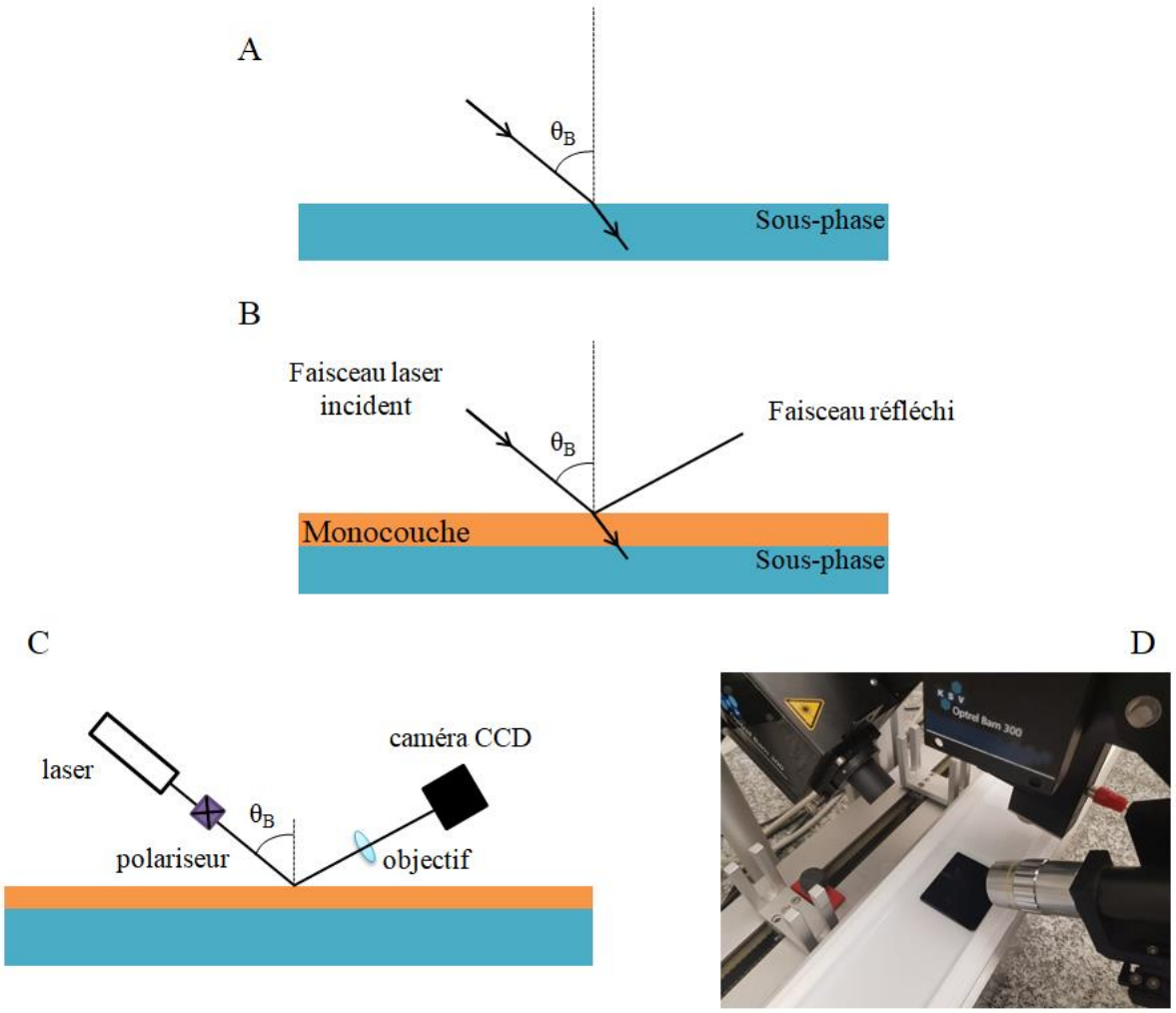


Figure 12. Microscopie à angle de Brewster. (A) Condition de Brewster à l'interface air/eau. (B) Réflexion du faisceau incident due à la présence d'un film monomoléculaire à l'interface. (C et D) Émission et traitement du signal diffracté par la caméra CCD.

2.4.4. Modélisation moléculaire

2.4.4.1. Spectres d'émission et d'absorption de la curcumine calculés par la chimie théorique (modélisation réalisée par A. Monari, LPCT, Univ. Lorraine)

Tous les calculs de chimie quantique ont été effectués à l'aide de Gaussian09 D01 révisé. Les spectres d'absorption et les géométries de l'état fondamental de la curcumine (CC) sous sa forme céto et énol ont été optimisés par la théorie de densité fonctionnelle (DFT, *density functional theory*) en utilisant la fonction de corrélation d'échange ωB97XD et la base de Pople double-ζ6-31 +G (d, p). Les fréquences de vibration ont également été déterminées et la solution aqueuse a été modélisée par un milieu à *continuum* polarisable (PCM *polarizable continuum medium*) à réponse linéaire.[43] Les spectres d'absorption ont été calculés par

l'addition de transitions verticales obtenues à partir de 100 'prises instantanées', elles mêmes extraites de la distribution de Wagner obtenue à partir des fréquences vibratoires.[44–46] La réorganisation de la densité électronique a été analysée en termes d'orbitales de transition naturelles (NTO *natural transition orbitales*)[47] après le traitement de la gaussienne *via* le code Nancy_EX. Le caractère de transfert de charge a été quantifié à l'aide de l'index ϕ_S appliqué dans Nancy_EX.[48,49] Les valeurs de ϕ_S proches de 1,0 indiquent une excitation locale, tandis que les valeurs proches de 0,0 indiquent un transfert de charge important. Pour le calcul des spectres d'émissions, l'état excité le plus bas (S1) des formes céto et énol a été optimisé et les fréquences vibratoires ont été déterminées à l'aide du même niveau théorique que pour l'état fondamental. Il est à noter que cette approche permet de prendre en compte les effets vibratoires et dynamiques sur la fluorescence. Mais elle ne fournit pas de rendement quantique exact, car seul le rendement radiatif est pris en compte *via* le calcul des forces de l'oscillateur, *i.e.* la transition du moment dipolaire, alors que tous les processus non-radiatifs sont négligés.

2.4.4.2. Simulation de dynamique moléculaire à l'équilibre des tautomères de la curcumine dans une bicouche (modélisation réalisée par F. Dehez, LPCT, Univ. Lorraine)

Les champs de force de la curcumine pour les formes céto et énol ont été paramétrés en utilisant le programme CGENFF.[50] La bicouche lipidique, décrite par le champ de force CHARMM,[51] est constituée de 128 molécules de DOPC (1,2-dioléoyl-sn glycéro-3-phosphocholine), totalement hydratées. Les paramètres dièdres de l'énol ont été ajustés pour conserver la géométrie plane de la molécule après optimisation par DFT. La dicétone et l'énol sont positionnés aléatoirement dans la phase aqueuse. Pour chaque système, une trajectoire de 800 ns a été créée, laissant assez de temps pour l'insertion de la curcumine dans la bicouche et pour un bon échantillonnage du complexe bicouche-curcumine. Des conditions périodiques aux limites ont été appliquées. La température et la pression ont été maintenues constantes à 300 K et 1 atm en appliquant, la dynamique de Langevin amortie et l'algorithme du piston de Langevin, respectivement. Le schéma de répartition de la masse d'hydrogène a été utilisé. Toutes les masses d'hydrogène non aqueuses ont été multipliées par 3, tout en diminuant les masses des atomes lourds liés pour préserver la masse totale du système. Les équations de mouvement ont été intégrées en utilisant le système pas à pas multiples r–RESPA, avec un pas de 4 et 8 fs pour les interactions à courte et longue distance, respectivement. Les interactions de van der Waals non liantes ont été progressivement ramenées à zéro entre 10 et

12 Å. L'algorithme PME (*Particle Mesh Ewald*) a été utilisé pour rendre compte des interactions électrostatiques à longue portée. Toutes les simulations de dynamiques moléculaires ont été effectuées en utilisant NAMD (*Nanoscale Molecular Dynamics*),[52] tandis que les trajectoires ont été analysées et représentées à l'aide de VMD (*Variational Mode Decomposition*).[53]

2.4.4.3. Calculs d'énergie libre de la partition des tautomères de la curcumine dans une bicouche (modélisation réalisée par C. Chipot, LPCT, Univ. Lorraine)

Le profil d'énergie libre associé à la partition de la curcumine dans la bicouche a été cartographié en utilisant un algorithme récent, de force de polarisation adaptative de métadynamique étendue (*metadynamics-extended adaptive biasing force*, meta-eABF).[54] La coordonnée de transition a été définie comme la projection sur la direction z de l'espace cartésien, *i.e.*, étant donc la normale à la membrane de la distance séparant le centre de masse de la curcumine de celle de la bicouche lipidique. La distance totale de perméation a été de 80 Å, *i.e.*, $-40 \leqslant z \leqslant +40$ Å. Le chemin a été défini discret en cases larges de 0,1 Å, dans lesquelles des échantillons de la force locale, agissant le long de z, étaient accumulés. L'échantillonnage total pour la curcumine s'élève à 1,5 µs, pour les deux formes, céto et énol.

2.4.4.4. Dynamique moléculaire de monocouches constituées de DOPC, de CP et de CC (modélisation réalisée par J. Korchowiec, Fac. de pharmacie, Univ. Jagiellonian, Cracovie, Pologne)

Les structures géométriques des deux formes céto et énol localisées au niveau de théorie B3LYP/6-311G (d,p) sont représentées dans la Figure 13. La correction de dispersion de Grimme a été prise en compte. Tous les calculs ont été effectués en utilisant la dernière version du programme Gaussian 09. La forme énol (Figure 13 A) est rigide et légèrement plus stable que la forme céto (Figure 13 B). L'enthalpie libre de la forme énol est inférieure de 4 kcal/mol dans le vide (T = 293 °K et p = 1 bar). La stabilisation plus importante peut être attribuée à l'effet de conjugaison des liaisons π et la formation de liaisons hydrogène dans la partie centrale de la molécule. La forme céto est plus flexible que la forme énol (rotation impliquant les liaisons du groupement central $–CH_2–$). Les deux structures ont été utilisées pour dériver les paramètres du champ de force CHARMM. Les paramètres ont été vérifiés par des calculs typiques de solvants explicites (l'eau pour les formes énol et céto de la curcumine). La dynamique moléculaire permet de localiser deux conformères supplémentaires de la forme céto. Ces conformères sont montrés dans la Figure 14. Les deux

structures ont été réoptimisées au niveau de la théorie B3LYP/6-311(d,p). Il s'avère que le conformère donnant lieu à des interactions de π-stacking est la forme céto la plus stable dans le vide. Le modèle de solvant implicite (B3LYP/6-311G**), appelé modèle de *continuum* polarisable modifie le classement, et le conformère illustré dans la Figure 13 B est le plus stable. Néanmoins, la forme énol reste la forme la plus stable. L'enthalpie libre de la forme énol est inférieure de 2 kcal.mol^{-1} par rapport à la forme céto (T = 293 °K et p = 1 bar). Les isomères céto et énol coéxistent en solution. Comme montré dans le chapitre II, l'équilibre mutuel dépend de l'environnement (pH, le type de solvant et la température).

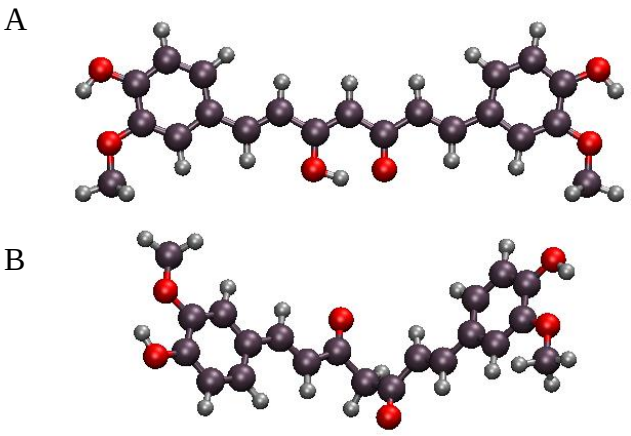


Figure 13. Vue schématique de la forme énol (A) et céto (B) de la curcumine localisées au niveau de théorie B3LYP/6-311G(d,p).

Le système de dynamique moléculaire appliqué dans cette étude consiste en deux monocouches épandues sur les côtés opposés d'un bloc d'eau. Chaque monocouche est constituée de 100 molécules réparties sur une grille bidimentionelle. La rotation de chaque molécule le long de l'axe z était aléatoire. Dans les monocouches à deux composants, les molécules étaient à l'équimolarité et ont été choisies de manière aléatoire. Les têtes polaires du DOPC et du CP étaient immergées dans l'eau tandis que les queues hydrophobes étaient dirigées vers le vide. Les systèmes suivants ont été considérés : DOPC, CP, DOPC/CP, DOPC/CC, CP/CC. Les calculs pour les isomères céto et énol de la curcumine ont été réalisés séparément.

Les simulations de dynamique moléculaire ont été réalisées avec le programme NAMD. Le champ de force all-atom CHARMM36 a été appliqué. Le modèle TIP3P a été supposé pour les molécules d'eau. Le thermostat et le barostat de Langevin ont été utilisés pour contrôler la température et la pression. Les interactions de van der Waals ont été désactivées à partir de 12 Å. L'énergie électrostatique était calculée avec la méthode PME. Un pas de 1 fs était utilisé

dans toutes les simulations. Les calculs ont été effectués avec des conditions aux limites périodiques imposées au système. La taille initiale de la boîte dans la direction z était de 1000 Å. Les répliques translationnelles dans cette direction ont été séparées par un bloc de vide afin de minimiser les interactions électrostatiques à longue distance. Tous les systèmes moléculaires ont été minimisés. Les simulations initiales ont été réalisées en ensemble canonique durant 5 ns. Les simulations finales ont été réalisées à une température de 293 K et une pression de 1 bar, ainsi qu'à une tension de surface de 20 $mN.m^{-1}$ et maintenues constantes. Les (N,T,p_n,γ) simulations étaient équilibrées durant 40 ns. Les données rapportées ont été calculées à l'aide de cycles de production de 10 ns.

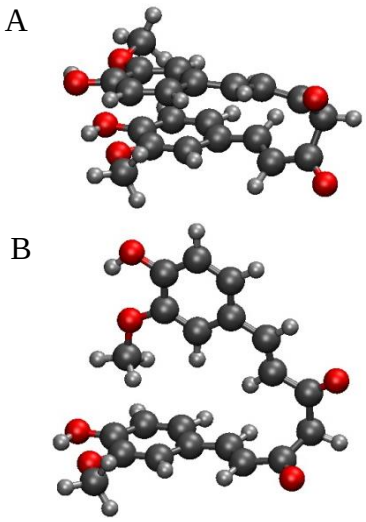


Figure 14. Vues schématiques des conformères empilés (A) forme en T interne (B) de la forme céto de la curcumine localisés au niveau de la théories B3LYP/6-311G(d,p) .

2.5. Résultats : Interaction de la curcumine avec une bicouche lipidique

2.5.1. Détermination de la taille des liposomes chargés en curcumine

Les liposomes de lécithine ont été préparés comme décrits précédemment par hydratation de film puis sonication, avec une concentration en CC allant de 0 à 8 µM. La taille des vésicules a été mesurée par deux techniques complémentaires où la première est basée sur la mesure de l'intensité de la lumière diffusée et la deuxième sur la comptabilisation par analyse d'images du nombre de particules et de leur dimension. Les deux méthodes montrent une population monodisperse (*PolyDispersityIndex*, PDI < 0,3) centrée entre ~ 90 et 130 nm selon la concentration en CC. La taille des particules, obtenue en DLS, diminue nettement avec

l'augmentation de la concentration en curcumine passant d'un diamètre hydrodynamique (D_h) de 129 ± 5 nm pour un liposome vide (0 µM CC) à 98 ± 5 nm à partir d'une teneur de 1µM en CC, puis les valeurs atteignent un plateau (Figure 15). Il semblerait donc que l'augmentation de la concentration en curcumine entraîne une diminution de la taille des liposomes. Cette tendance est confirmée par NTA, même si une diminution globale de la taille est observée par rapport à l'analyse en DLS. Effectivement, la Figure 15 montre une diminution de la taille des liposomes avec l'augmentation de la concentration en CC, passant de 121 nm pour les liposomes non chargés en CC (0 µM CC) à 85 nm pour une concentration en curcumine de 1µM, puis, là encore, les valeurs des diamètres semblent atteindre un plateau.

La diminution en taille des vésicules chargées pourrait être une première indication de l'interaction entre la curcumine et la bicouche lipidique.

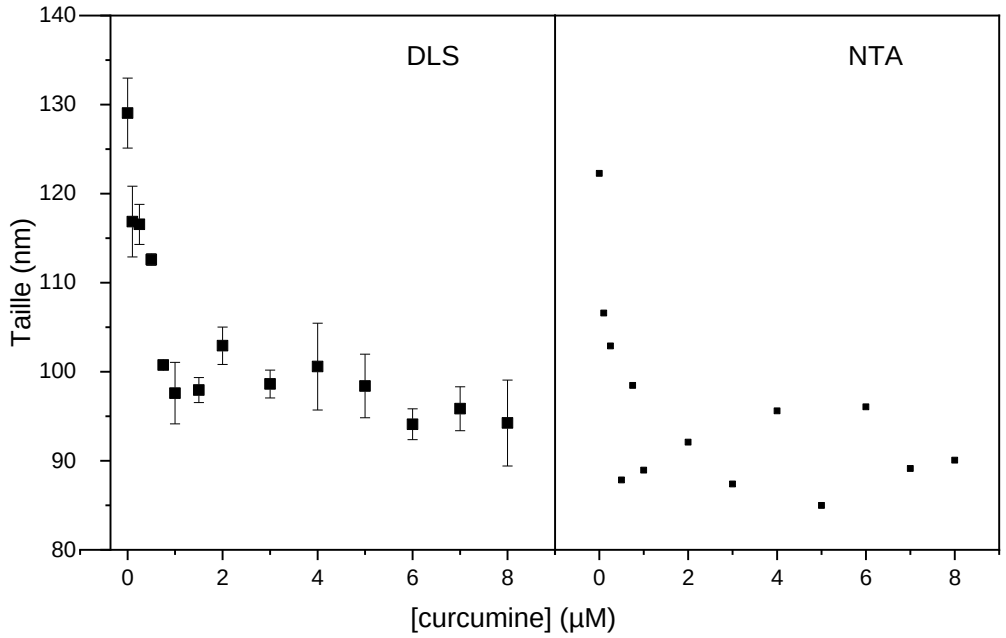


Figure 15. Evolution de la taille des vésicules en fonction de la concentration en CC déterminée par DLS et NTA. Détermination du diamètre hydrodynamique par DLS et du diamètre par NTA.

2.5.2. Spectre d'absorption de la curcumine dans l'eau

Les propriétés spectrales de la curcumine sont dues aux groupements feruloyles qui sont conjugués dans la forme énol et non-conjugués dans la forme céto. Le spectre UV-visible de la curcumine dans l'eau (Figure 16 A) présente un large pic d'absorption centré à 375 nm qui, déconvolué, révèle deux pics d'absorption dont l'intensité maximum est centrée à ~ 430 nm et ~ 355 nm (Figure 16 B et C), correspondant respectivement à la forme énol et céto co-existantes en solution aqueuse.[55] Ces observations sont également confirmées par la modélisation moléculaire. En effet, la faible différence d'énergie entre les structures optimisées des deux isomères dans l'eau atteste de leur possible coexistence à température ambiante en milieu aqueux (Figure 17 A).

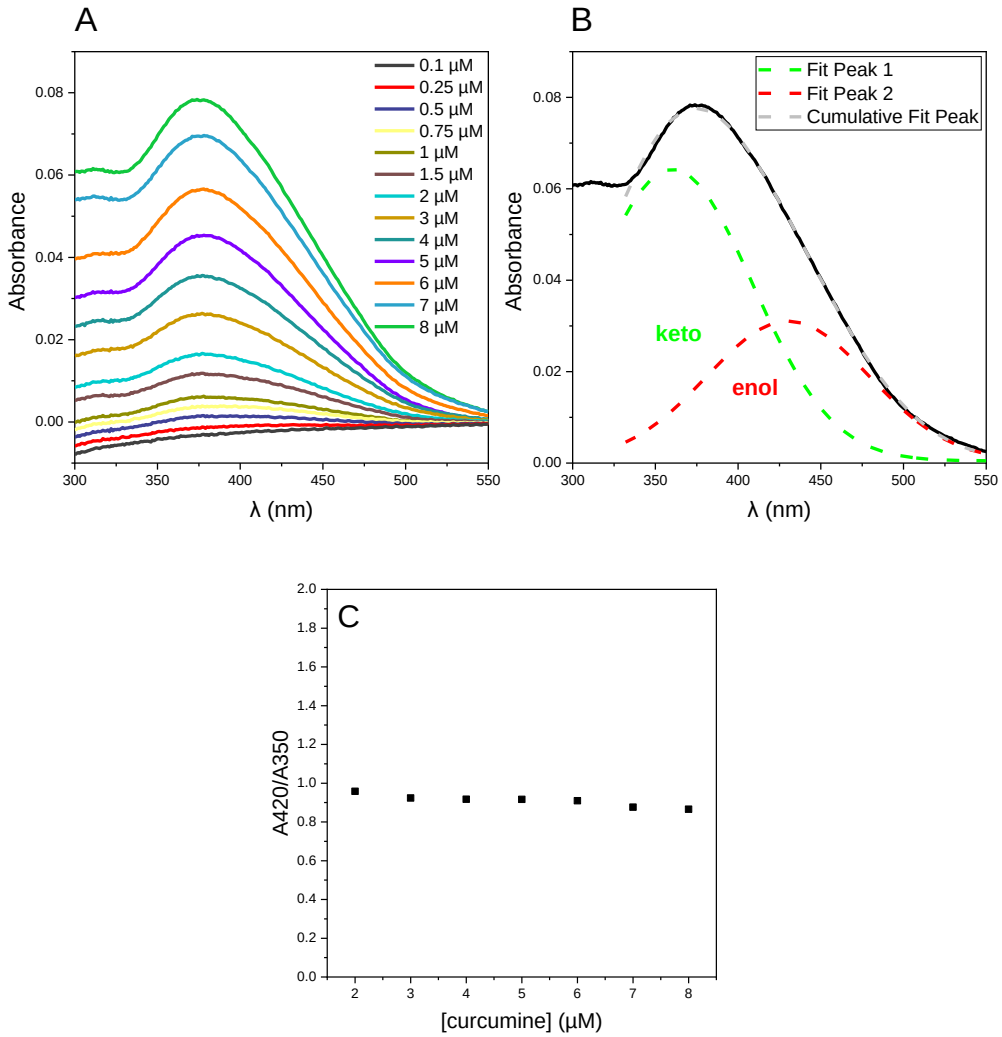


Figure 16. Spectres d'absorption obtenus pour différentes concentrations en curcumine dans l'eau à 25 °C : (A) données expérimentales, (B) courbe expérimentale à 8 µM de CC dans l'eau (noir), courbe de déconvolution résultante (gris), spectres simulés (verte et rouge), (C) évolution du rapport d'intensité d'absorption énol/céto (Abs_{420}/Abs_{350}) en fonction de la concentration en CC.

2.5.3. Spectres d'émission et d'absorption calculés par la chimie théorique

Les spectres d'absorption simulés pour les deux tautomères en tenant compte des effets vibrationnel et dynamique par échantillonnage d'une distribution de Wagner sont en accord avec les résultats expérimentaux (Figure 17 A). Le modèle de conjugaison plus étendue de la forme énol donne lieu à un décalage vers le rouge comme observé expérimentalement. D'autre part, on observe sur le spectre simulant une distribution équimolaire des deux formes, une large couverture du spectre UVA (315-400 nm) et une partie du spectre visible jusqu'à la région du vert (~500 nm). Plus particulièrement, il est important de souligner qu'à une longueur d'onde centrée à ~300 nm, les deux formes céto et énol peuvent absorber des photons et être excitées simultanément.

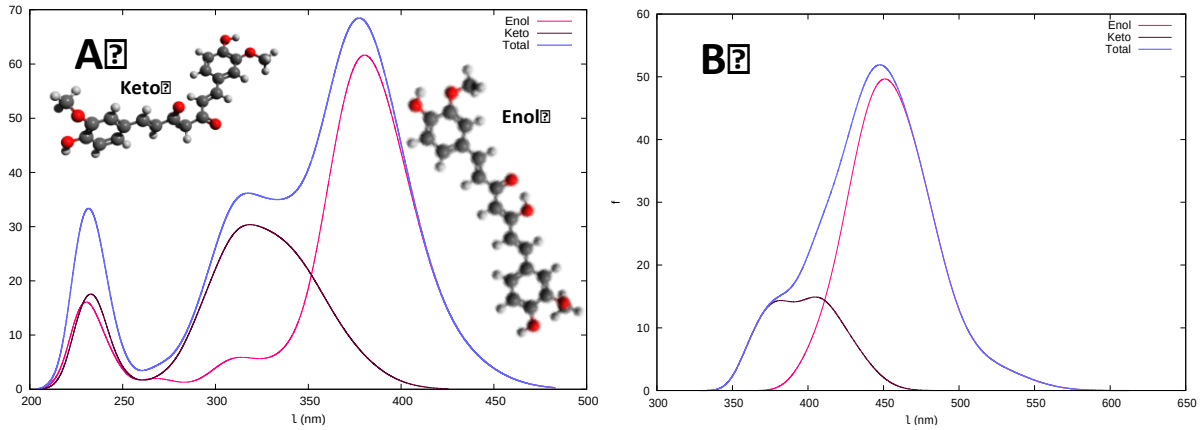


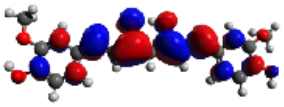
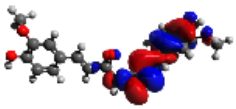
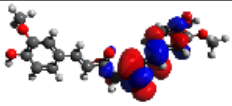
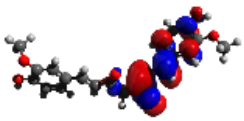
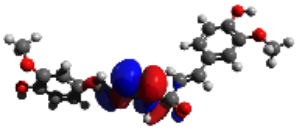
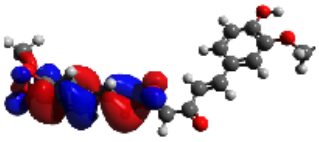
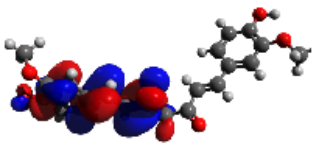
Figure 17. A) Géométrie moléculaire optimisée de l'état fondamental pour la forme céto et énol de la curcumine, ainsi que les spectres d'absorption calculés correspondant aux tautomères (signaux rose et violet) et à une distribution équimolaire des deux espèces (bleu). (B) Spectre d'émission calculé pour la forme céto et énol de la curcumine.

La nature des états excités peut être analysée en considérant les orbitales naturelles de transitions (NTOs *natural transition orbitals*), comme indiqué dans le Tableau II.

Le spectre de basse énergie de la forme énol est caractérisé par un premier état excité ayant une force de l'oscillateur élevée et de nature π–π*, cet état S_1 se trouvant à 3,33 eV de l'état fondamental S_0. Un second état excité, S_2, porte une énergie légèrement plus importante (3,97 eV) et peut être facilement classé comme une transition n-π*. Fait intéressant, en raison de la délocalisation importante des orbitales π*, le second état excité possède un caractère de transfert de charge relativement important comme en témoigne la faible valeur de l'indice topologique ϕ_S. La rupture de la planarité et l'abaissement de la symétrie globale complexifient le panorama de la forme céto, dont le spectre de basse énergie est décrit par

quatre états quasi-dégénérés couvrant un intervalle compris entre 3,89 et 4,11 eV. Les états de basse énergie ont également des forces de l'oscillateur comparables et sont de nature mixte n-π*/π–π*, en raison encore une fois de la rupture de la symétrie.

Tableau II. Energies de transition verticale calculées pour la géométrie à l'état fondamental S_0 pour les formes céto et énol de la curcumine. Les valeurs correspondantes à la force de l'oscillateur (f), à l'indice topologique (ϕ_S) et les couples NTOs décrivant les transitions sont également indiquées.

ΔE ev (λ nm)	f	ϕ_S	Occ NTO (hole)	Virt NTO (particle)
			Enol	
3.33 (372)	2.048	0.8		
3.97 (313)	0.002	0.3		
			Keto	
3.89 (320)	0.438	0.7		
3.89 (319)	0.721	0.7		
4.01 (309)	0.000	0.6		
4.11 (301)	0.519	0.8		

D'autre part, les différents alignements des états excités de basse énergie se reflètent dans un spectre d'émission simulé très différents pour les deux isomères (Figure 17). En tenant compte des règles de Kasha, lors de l'absorption d'un photon d'énergie suffisamment élevée, une molécule initialement dans son état fondamental singulet S_0 est excitée dans n'importe quels autres états électroniques supérieurs (noté S_n où n>1) et peut revenir à son état fondamentale *via* une transition radiative, c'est-à-dire par émission de lumière, seulement à partir de l'état excité de plus bas énergie S_1. En effet, préalablement à l'émission, des

relaxations vibrationelles et électroniques non radiative ont lieu. La forme énol donne, en effet, une bande beaucoup plus décalée vers le rouge que dans le cas de la forme céto. De plus, la force de l'oscillateur pour la transition $S_1 \rightarrow S_0$ calculée pour la forme énol est globalement plus importante que celle correspondant à la forme céto. Il est également intéressant de noter que la plus grande flexibilité de la forme céto est liée à une bande d'émission plus large.

2.5.4. Effet de la concentration en curcumine sur les spectres d'absorption

Lorsque la CC est encapsulée dans les liposomes, l'intensité d'absorption des deux tautomères augmente avec l'augmentation de la concentration en CC (Figure 18 A) devenant supérieure à celle de la CC dans l'eau (Figure 16 A). Fait intéressant, dans l'eau, le ratio entre l'énol et la céto reste constant indépendamment de la concentration en CC (Figure 16 C). Tandis que dans les liposomes, une forte augmentation est observée au-dessus de 2 µM. A partir de cette concentration, le rapport d'intensité d'absorption des bandes à 420 nm (énol) et 350 nm (céto) augmente linéairement avec l'augmentation de la concentration en CC (Figure 18 B). On suppose que cette rupture peut être attribuée au déplacement de l'équilibre tautomérique vers la forme énol avec l'augmentation de la concentration en curcumine dans les liposomes.

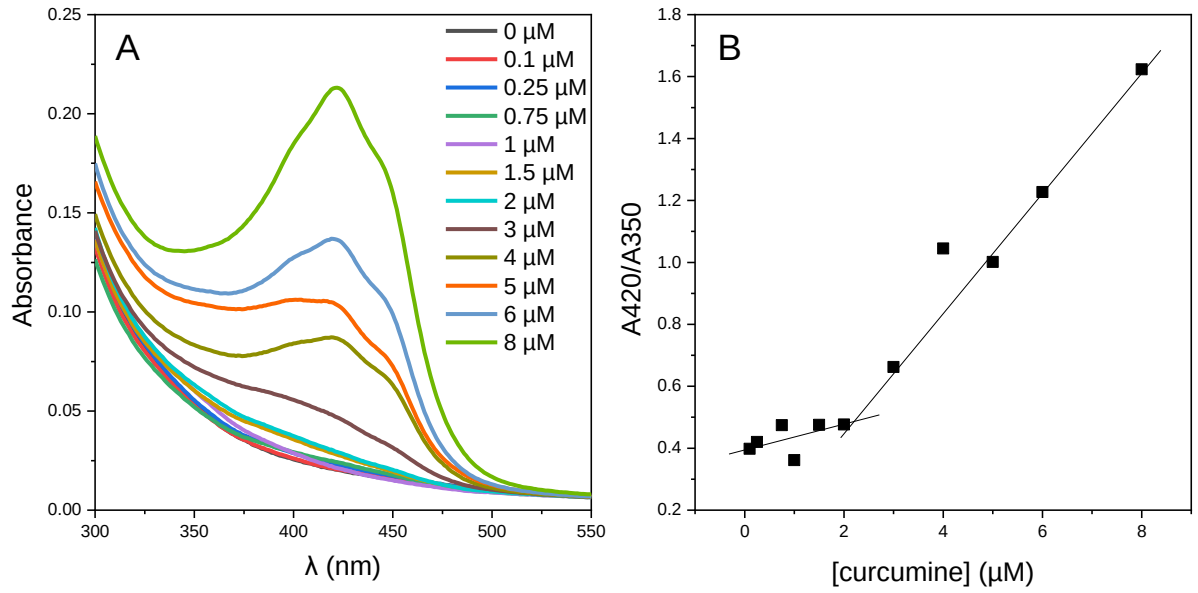


Figure 18. Spectres d'absorption UV-Vis des vésicules chargées en CC de 0 à 8 µM (A) et évolution du ratio Abs_{420}/Abs_{350} en fonction de la concentration en CC (B). Les spectres sont mesurés dans l'eau à 25 °C.

Cette hypothèse est en accord avec celle rapportée par Moussa *et al.*[17] qui ont étudié l'encapsulation de la CC dans des micelles de rhamnolipides mais en désaccord avec Niu *et al.*[24] Ces derniers émettent l'hypothèse que l'absorption de la bande à ~ 350 nm de la curcumine dans l'eau disparaît avec l'encapsulation dans des liposomes de lécithine et attribuent cela à une diminution des interactions entre la CC et l'eau au profit d'une interaction entre la CC et la bicouche.

2.5.5. Spectre d'émission de fluorescence de la curcumine dans l'eau

Afin de confirmer le déplacement de l'équilibre des formes tautomères de la CC, des mesures de la fluorescence à l'état d'équilibre (*steady-state fluorescence*) ont été réalisées. Les propriétés de fluorescence de la CC ont d'abord été mesurées dans l'eau, environnement qui est connu pour diminuer l'écart énergétique entre les formes énol et céto, notamment à cause des fortes interactions intramoléculaires C=O···H-O-H···O=C stabilisant la forme céto (Figure 19 A).[25,56] Les spectres de fluorescence ont été mesurés à deux longueurs d'onde d'excitation, 338 et 418 nm, correspondant respectivement à l'absorption des formes céto et énol dans l'eau. Quelle que soit la longueur d'onde d'excitation, la fluorescence de la curcumine dans l'eau est très faible, puisque la molécule y est peu soluble (Figures 19 B et C). Lors de l'excitation à 418 nm, la curcumine présente un large spectre d'émission avec une intensité maximum centrée à ~ 537 nm, ce qui est cohérent avec les valeurs obtenues dans la littérature.[26] La longueur d'onde d'émission est interprétée comme une première relaxation de la CC *via* le transfert d'hydrogène à l'état excité (ESHT *exited-state hydrogentransfer*). Fait plus intéressant, lors d'une excitation à 338 nm, le spectre d'émission de la curcumine dans l'eau montre un signal différent, qui après déconvolution, révèle deux pics d'émission dont les intensités maximales sont situées à ~ 537 nm comme précédemment et ~ 475 nm (Figure 19 B). Comme énoncé dans l'introduction de ce chapitre, en accord avec Mouslmani *et al.*[27] et Moussa *et al.*,[17] cette émission décalée vers le bleu est attribuée à une désactivation radiative sans subir l'ESHT. Ce qui est uniquement possible par la forme céto. Les signaux d'émissions de la curcumine dans l'eau sont donc attribués aux tautomères énol (~ 537 nm) et céto (~ 475 nm).

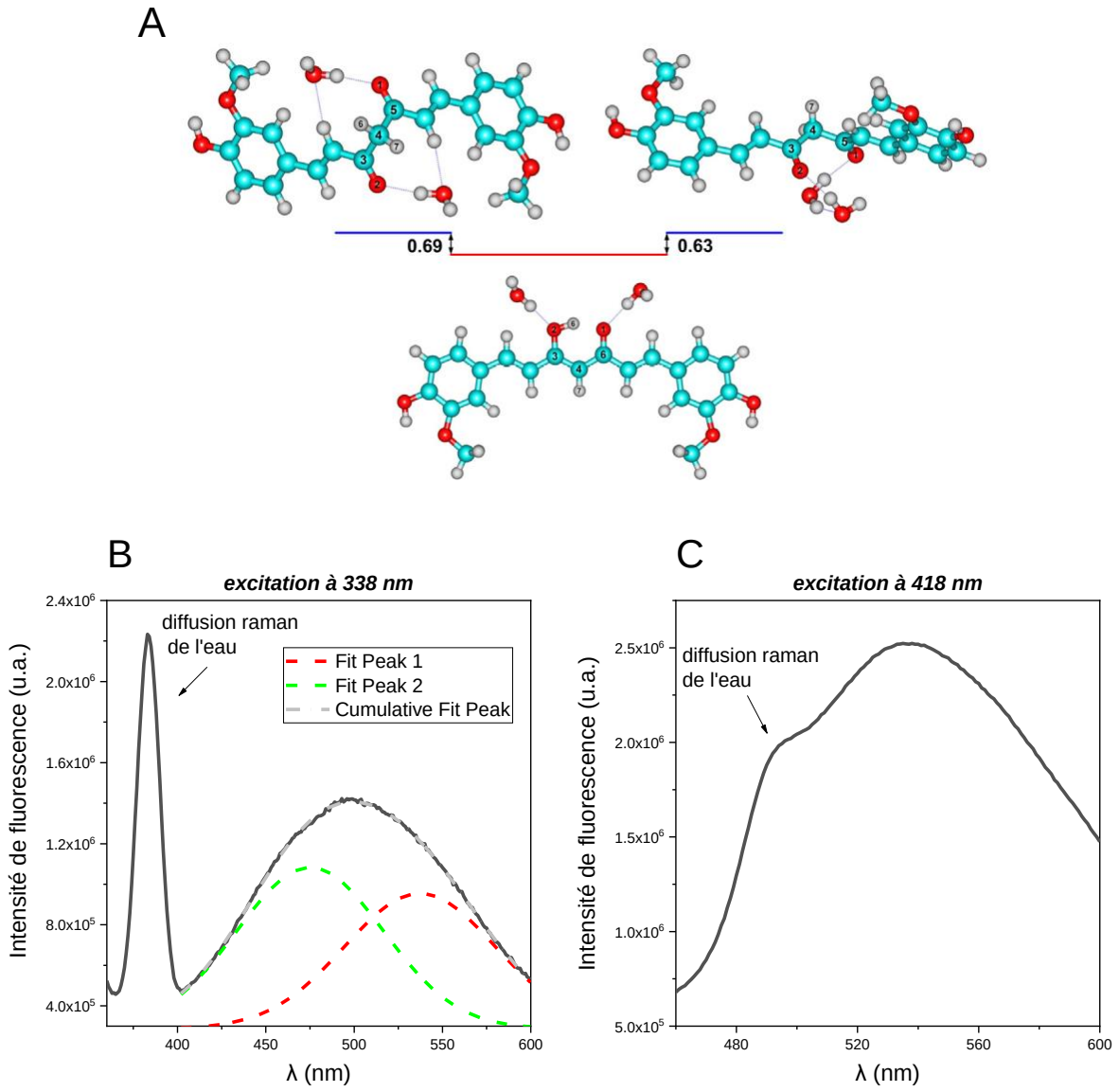


Figure 19. (A) Energie relative (kcal/mol) de prédictions théorique des complexes de la forme céto et énol de la curcumine avec deux molécules d'eau dans une boîte à eau, schéma tiré de Manolova *et al.*,[56] 2014. (B) et (C) Spectres de fluorescence de la CC dans l'eau à 25 °C après une excitation à 338 nm et 418 nm. Largeurs des fentes d'émission fixées à 5 nm. Spectres expérimentaux (noir) ; spectres calculés (rouge et vert) ; déconvolution résultante du spectre (gris).

2.5.6. Effet de la concentration en curcumine sur les spectres d'émission de fluorescence

La Figure 20 montre les spectres de fluorescence obtenus après excitation à 338 nm et 418 nm de la CC encapsulée dans des vésicules à des concentrations allant de 0 à 8 µM. Quelle que soit la longueur d'onde d'excitation, l'intensité de fluorescence de la CC en présence de liposomes est significativement augmentée par rapport à l'intensité de fluorescence de la CC seule dans l'eau.

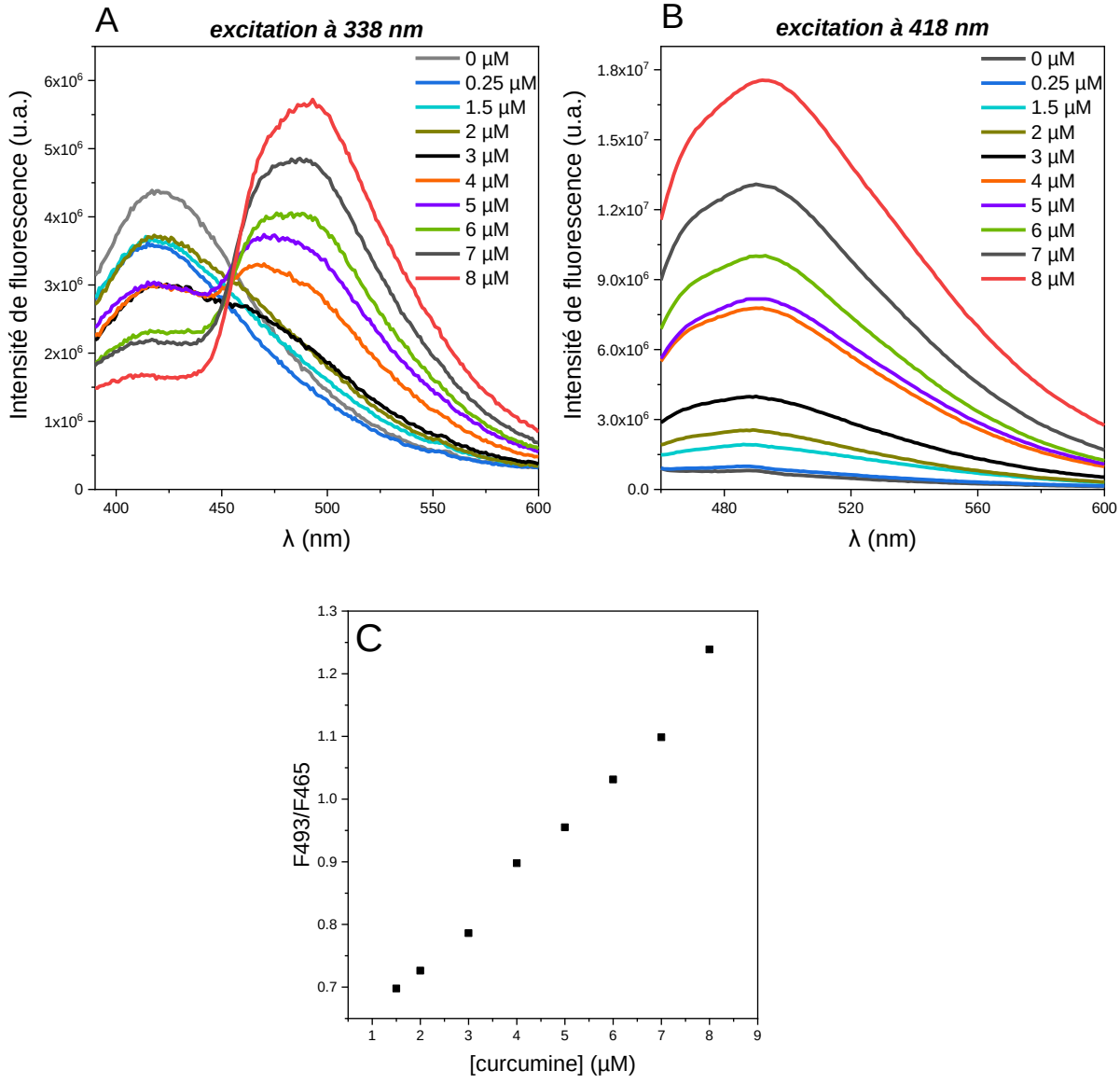


Figure 20. Spectres de fluorescence de la curcumine encapsulée dans les vésicules à différentes concentrations en CC (0-8 µM) après une excitation à 338 nm (A) et 418 nm (B). Ratio de l'intensité de fluorescence des formes énol et céto (F_{493}/F_{465}) en fonction de la concentration en CC lors d'une excitation à 338 nm (C). Les spectres ont été enregistrés dans l'eau à 25 °C.

D’autre part, on peut noter une allure différente des signaux de fluorescence en fonction de la concentration en CC et de la longueur d’onde d’excitation (338 ou 418 nm). En effet, lors d’une excitation à 418 nm (Figure 20 B), le maximum d’émission initialement situé à ~ 537 nm de la curcumine dans l’eau est décalé de 44 nm vers le bleu (493 nm) lors de son encapsulation dans les liposomes. De plus, l’intensité de fluorescence augmente avec l’augmentation de la concentration en CC. Ces observations confirment globalement l’encapsulation de la curcumine dans les vésicules. Au contraire, lors d’une excitation à 338 nm (Figure 20 A), les spectres de fluorescence montrent un profil différent. On peut constater qu’aux faibles concentrations en CC, un épaulement est observé à ~ 465 nm alors qu’aux plus hautes concentrations la longueur d’onde maximale d’émission se décale à 493 nm, et donc, vers la forme énol, tandis que le pic à ~ 465 nm disparaît. Enfin, la représentation graphique du ratio d’intensité relative F_{493}/F_{465} suite à une excitation à 338 nm, suggère que l’augmentation de la concentration déplace l’équilibre des tautomères vers la forme énol (Figure 20 C). Évidemment, dans le cas d’une excitation à 418 nm, seulement la forme énol est excitée, et par conséquent, seule l’augmentation de sa contribution à la fluorescence est observée, quelle que soit la concentration en CC.

2.5.7. Effet de la température sur l’équilibre tautomérique de la curcumine liposomale

2.5.7.1. Effet de la température sur les spectres d’absorption

Un déplacement de l’équilibre des tautomères peut également être induit par une variation de la température, comme on peut l’observer sur les spectres d’absorption présentés dans la Figure 21 A. Effectivement, avec l’augmentation de la température de 10 à 45 °C, l’intensité du pic à 420 nm diminue, tandis que l’absorption à 350 nm augmente. Un point isobestique est observé à 375 nm, confirmant l’équilibre des deux tautomères (Figure 21 B). Avec l’augmentation de la température au-dessus de 45 °C, l’absorption à 350 nm devient proéminente, et le ratio A_{350}/A_{420} augmente (Figure 21 C). Cependant, on peut remarquer une diminution globale de l’absorption à 350 et 420 nm lors du refroidissement de 65 °C à 25 °C. Cela pourrait être attribué à la dégradation partielle de la CC durant le processus de chauffage.

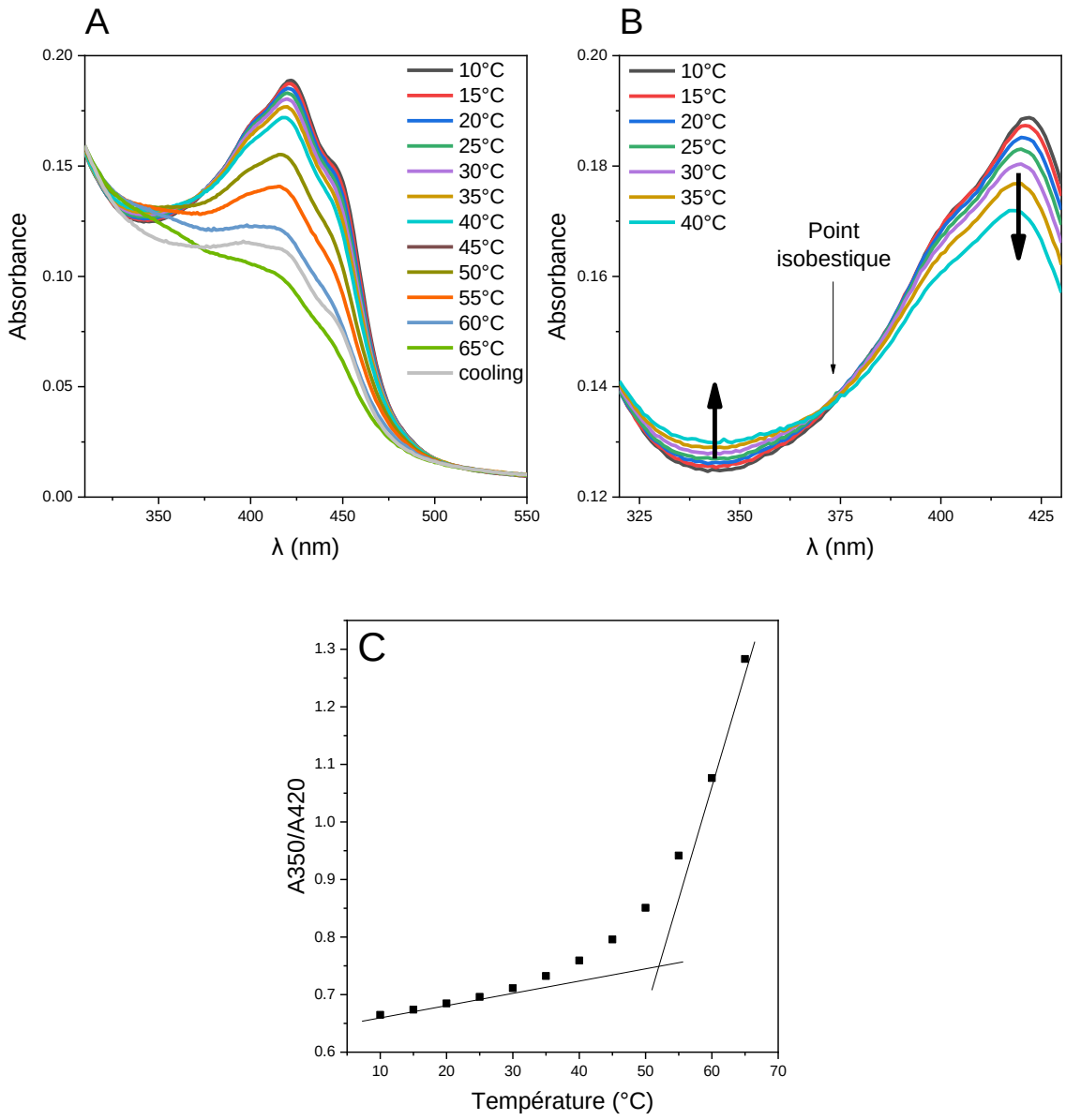


Figure 21. Effet de la température sur les spectres d'absorption de la curcumine encapsulée dans les vésicules (A). (B) Zoom sur le point isobestique pour l'ensemble des spectres d'absorption acquis entre 10 et 40 °C. Spectres obtenus à dans l'eau. (C) Variation en fonction de la température du ratio A_{350}/A_{420} pour 8µM de curcumine encapsulée.

2.5.7.2. Effet de la température sur les spectres d'émission de fluorescence

Les Figures 22 A et B montrent la dépendance des spectres de fluorescence avec la température lors d'une excitation à 318 et 418 nm, indiquant que l'augmentation de température est corrélée à une extinction générale de fluorescence. Cependant, lors d'une excitation à 338 nm (Figure 22 A), l'intensité de la bande énol (centré sur 493 nm) diminue davantage que la bande correspondant à la forme céto (centré sur 465 nm). Effectivement, à une température de 60 °C, l'intensité des deux bandes d'émissions devient presque équivalente. Par conséquent, les variations d'intensité relative (F_{465}/F_{493}) confirment, une fois de plus, que l'augmentation de la température déplace l'équilibre tautomérique vers la forme céto (Figure 22 C).

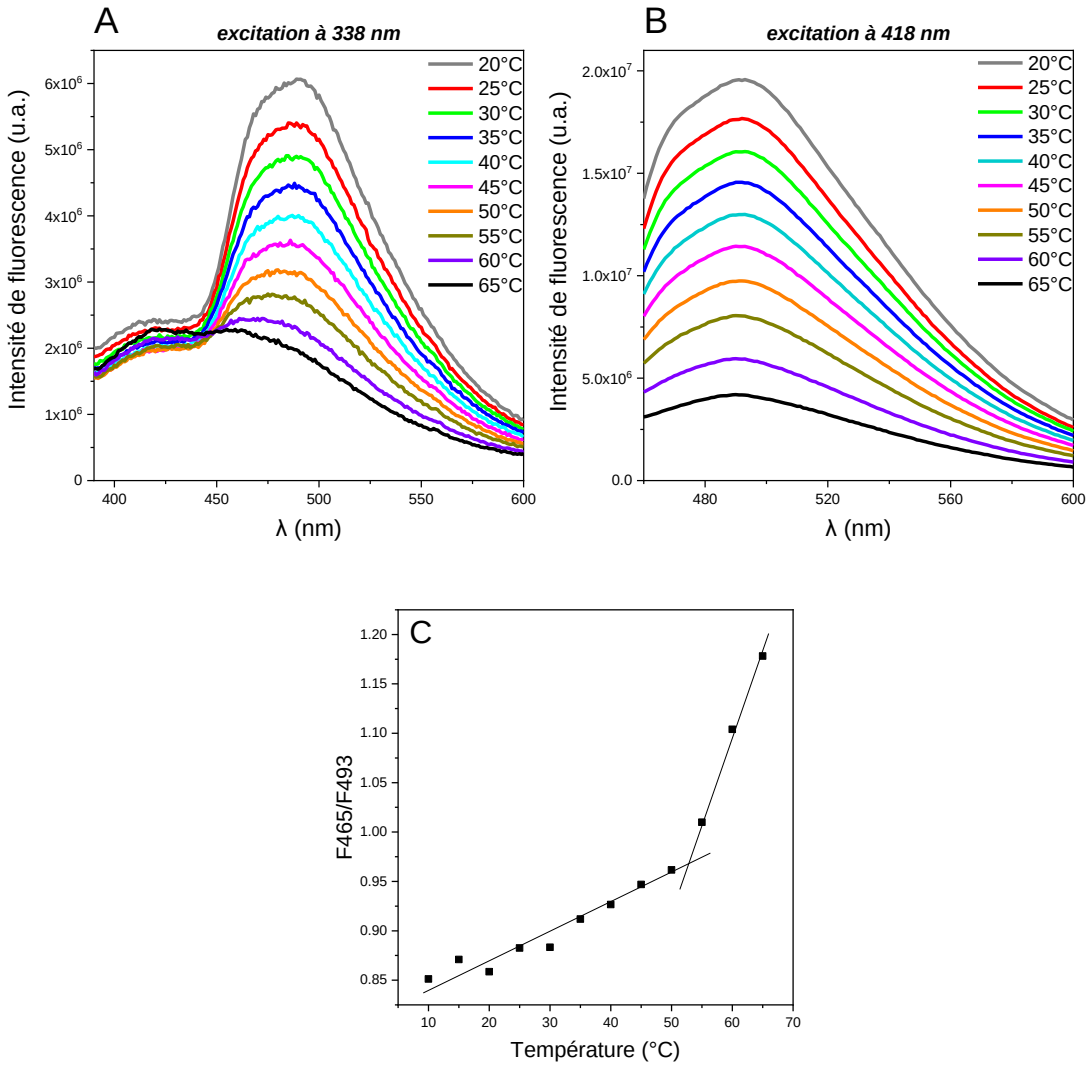


Figure 22. Influence de la température sur la fluorescence de la CC chargée dans les liposomes lors d'une excitation à 338 nm (A) et 418 nm (B). (C) Ratio F_{465}/F_{493} en fonction de la température pour les vésicules chargées avec 8 µM de CC. Les spectres ont été enregistrés dans l'eau.

2.5.8. Étude des interactions curcumine - lécithine en monocouche

L'équilibre céto-énolique en fonction de la concentration en CC a également été étudié sur une monocouche, en utilisant la technique des films de Langmuir. Ici le comportement à la compression d'un film de lécithine de soja (LS) est comparé à celui d'un mélange LS/CC. Afin d'approximer la quantité de curcumine encapsulée dans les liposomes, les monocouches du mélange binaire LS/CC sont préparées à la même fraction molaire que les liposomes chargés en CC à 0,1 µM et 8 µM, soit 0,15 mol ‰ et 11,86 mol ‰ de curcumine par rapport à la lécithine, respectivement.

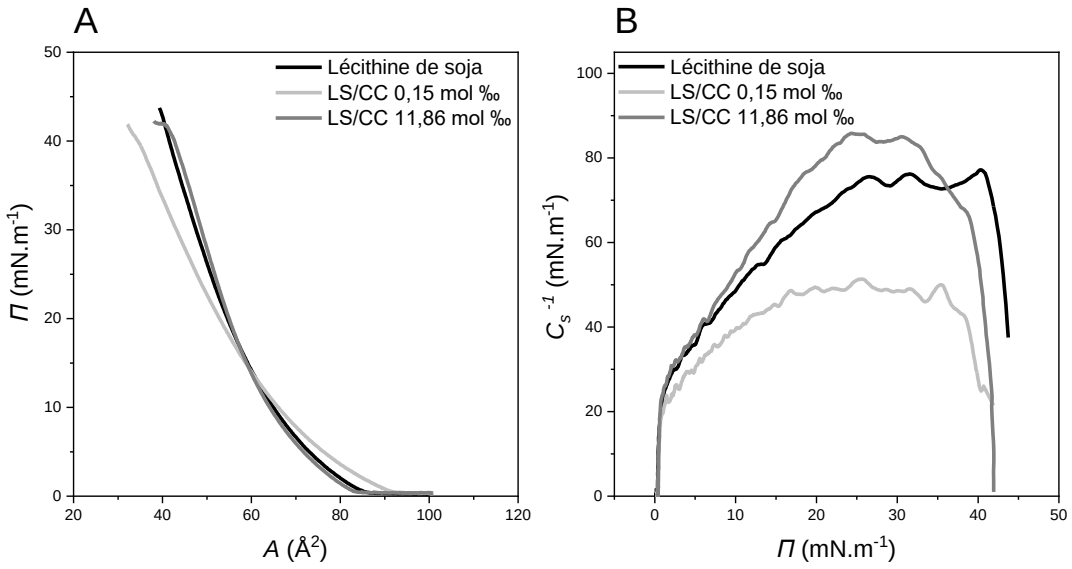


Figure 23. Isothermes de compression *Π-A* (A) et C_s^{-1}-*Π* déterminées à partir des isothermes expérimentaux (B) pour le film de LS pure et les films du mélange binaire LS/CC à 0,15 mol ‰ et 11,86 mol ‰ de CC, épandu sur l'eau à 25 °C. Isothermes obtenues au pH de l'eau.

Les isothermes de pression de surface-aire (*Π-A*) obtenues pour la lécithine de soja (LS) et les mélanges LS/CC sont présentées dans la Figure 23. Les paramètres caractéristiques du film, aire par molécule au collapse (A_{coll}), pression de surface au collapse (Π_{coll}) et module de compressibilité maximale (C_s^{-1}) sont donnés dans le Tableau III. La lécithine de soja, ainsi que les mélanges LS/CC à 0,15 mol ‰ et 11,86 ‰ en CC forment des monocouches avec une A_{coll} comprise entre 36 et 44 Å^2 et une pression au collapse d'environ 40 mN.m^{-1}. Tous les films sont dans un état liquide-expansé (LE), avec des valeurs de C_s^{-1} comprises entre 50 et 90 mN.m^{-1}. Cependant, alors que les films de lécithine seule et de LS/CC à 11,86 ‰, sont très similaires, l'isotherme *Π-A* du mélange LS/CC 0,15 mol ‰ présente une aire par molécule au point de collapse plus faible (36 *vs* 42 Å^2) et un caractère du film plus fluide. En effet, la

valeur du module de compressibilité diminue de 77 à 53 $mN.m^{-1}$ en ajoutant un très faible pourcentage de CC. Au contraire, en augmentant la concentration en CC à 11,86 ‰, la pente de l'isotherme devient plus raide par rapport à celle correspondant à la lécithine pure, avec une valeur de C_s^{-1} de 86 $mN.m^{-1}$, ce qui indique que le mélange forme un film plus rigide. Ces résultats laissent imaginer que, selon sa concentration, la CC n'interagit pas de la même façon avec le film de LS et donc que, selon sa concentration, la CC subirait une tautomérisation dont l'équilibre dépendrait de la partition entre les queues hydrophobes et les têtes polaires. A faible concentration en CC, l'augmentation de la fluidité de la bicouche proviendrait des interactions entre la CC sous sa forme céto et les têtes polaires du film, alors qu'à plus grande concentration, la forme énol, localisée entre les chaînes hydrocarbonées rigidifierait la monocouche.

Tableau III. Paramètres des isothermes de compression au collapse des monocouches de LS, LS/CC 0,15 mol ‰ et LS/CC 11,86 ‰ à 25 °C.

Monocouches	A_{coll} **(A^2)**	Π_{coll} **($mN.m^{-1}$)**	C_s^{-1} **($mN.m^{-1}$)**
Lécithine de soja (LS)	42	42	77
LS/CC (0,15 mol‰)	36	38	53
LS/CC (11,86 mol‰)	44	38	86

Afin de vérifier ces hypothèses, une étude de dynamique moléculaire a été réalisée en collaboration avec François Dehez et Christophe Chipot du laboratoire LPCT de l'Université de Lorraine. Par mesure de simplicité, l'étude a été effectuée avec des films de DOPC, constituant principal de la lécithine de soja.

2.5.9. Simulation de dynamique moléculaire : interaction curcumine - DOPC

La simulation par dynamique moléculaire (DM) des interactions entre la membrane lipidique modèle de DOPC et les deux formes tautomères de la curcumine a pour but d'éclaircir l'arrangement des molécules de CC dans la bicouche lipidique. Les résultats de simulation dynamique moléculaire, montrent d'après les Figures 24 A et B, que les deux isomères sont capables d'interagir avec la membrane par différents modes d'attachement. En effet, la forme énol peut s'aligner avec l'interface membrane-eau mais aussi s'insérer plus profondément dans la membrane, en s'orientant perpendiculairement à la surface de celle-ci. En revanche, la forme céto qui est plus souple et coudée reste orientée parallèlement à la surface de la membrane tout au long de la trajectoire de dynamique moléculaire. Ainsi, dans le cas de la forme céto, l'interaction est globalement limitée à la région des groupements des têtes polaires, tandis que la forme énol s'insère davantage dans la bicouche.

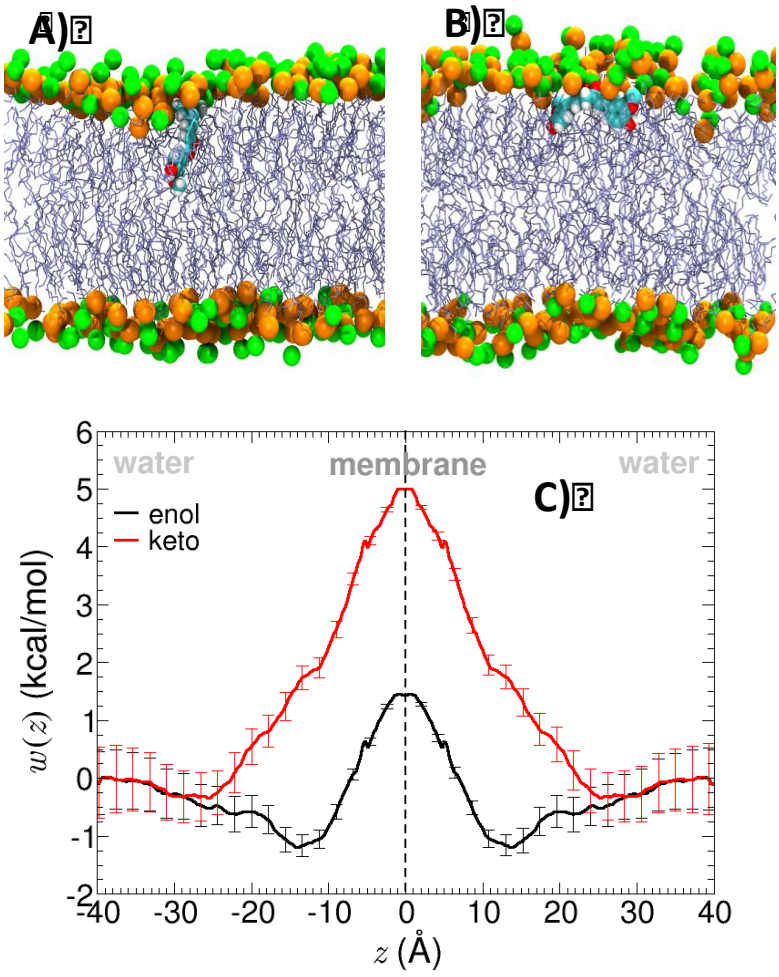


Figure 24. Instantanés représentatifs, extraits d'une simulation d'équilibre DM montrant les interactions de la curcumine avec le modèle de bicouche lipidique dans sa conformation énol (A) et céto (B). (C) Profil d'énergie libre de la pénétration des isomères de la curcumine le long de l'axe (z) de la bicouche lipidique.

Cette photo générale de l'arrangement de la CC dans la membrane lipidique est également vérifiée par l'analyse des profils d'énergie libre sous-jacent de la perméation de la curcumine dans ces formes céto et énol dans la bicouche lipidique (Figure 24 C). Effectivement, la forme énol montre un profil presque sans barrière, permettant au perméant, donc à la CC, de pénétrer profondément dans la bicouche lipidique avec un minimum énergétique global d'environ 1 kcal.mol^{-1}. Cependant, le passage du premier au deuxième feuillet nécessitera de surmonter une barrière d'environ 3 kcal.mol^{-1}. Cet aspect est également compatible avec le fait que la traversée de la bicouche entière par la forme énol n'est pas observée dans la simulation d'équilibre DM. Au contraire, la forme céto présente un minimum beaucoup moins prononcé dans le profil d'énergie libre, et, en effet, seule une légère stabilisation à l'interface hydratée de la membrane peut être envisagée.

Les différents modèles d'interactions formés avec la bicouche lipidique peuvent fournir une explication au déplacement de l'équilibre tautomérique observé expérimentalement. Effectivement, la bicouche constituant un environnement relativement confiné, une augmentation de la concentration va promouvoir des arrangements aboutissant à une occupation maximale de l'espace. Le tautomère énol, plus planaire et plus rigide permettrait de minimiser l'aire occupée, contrairement à l'isomère céto qui a une configuration non-planaire.

Le déplacement de l'équilibre vers la forme céto peut donc principalement être attribué à l'interaction plus favorable de cette dernière avec les groupements des têtes phospholipidiques hydratées. Cela est identifié dans la Figure 25 montrant un zoom d'un instantané représentatif, issu du calcul des liaisons hydrogène établies entre les deux tautomères de curcumine et les phospholipides. L'interaction de l'énol avec les têtes polaire hydratées du phospholipide pourrait également conduire à la rupture de la liaison hydrogène intramoléculaire, rompant ainsi la conjugaison et la planarité de la molécule et donc provoquant sa conversion en céto.

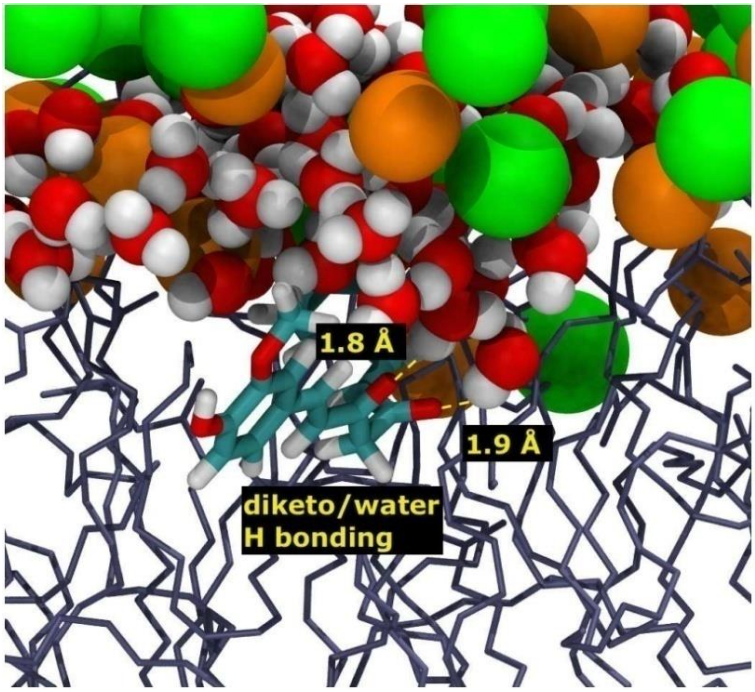


Figure 25. Instantané représentatif extrait de la simulation de DM montrant les liaisons hydrogènes de la forme céto de la curcumine à l'interface phospholipide/eau

2.6. Résultats : Interactions de la curcumine (CC) avec une monocouche lipidique. Rôle du palmitate de cétyle (CP)

2.6.1. Isothermes de compression et microscopie à angle de Brewster des composés purs et de leur mélange

Le comportement interfacial de la curcumine (CC), du palmitate de cétyle (CP), de la 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC) et de leurs mélanges binaire et ternaire a été étudié en utilisant la technique des films de Langmuir.

Les isothermes de pression de surface-aire (*Π-A*) du DOPC pure, des mélanges binaires CP/CC 1 :1, DOPC/CP 1 :1 et DOPC/CC 1 :1 et du mélange ternaire DOPC/CP/CC 2 :1 :1 sont montrées dans la Figure 26 et les paramètres caractéristiques des films au point de collapse sont donnés dans le Tableau IV.

Les résultats montrent que la CC et le CP purs ne forment pas de films stables à l'interface air/eau car la pression de surface est restée quasi nulle tout au long de la compression. Effectivement, une fraction de la curcumine pure est soluble dans la phase aqueuse et des agrégats sont facilement observables à la surface de l'eau en BAM (Annexe 1) ce qui est également le cas pour le palmitate de cétyle (Annexe 1). Ceci est contraire à ce qui est

rapporté par Xu *et al.*,[38] Karewicz *et al.*[37] et Thapa *et al.*[57] dans le cas de la curcumine et Karmakar *et al.*[58] pour le CP.

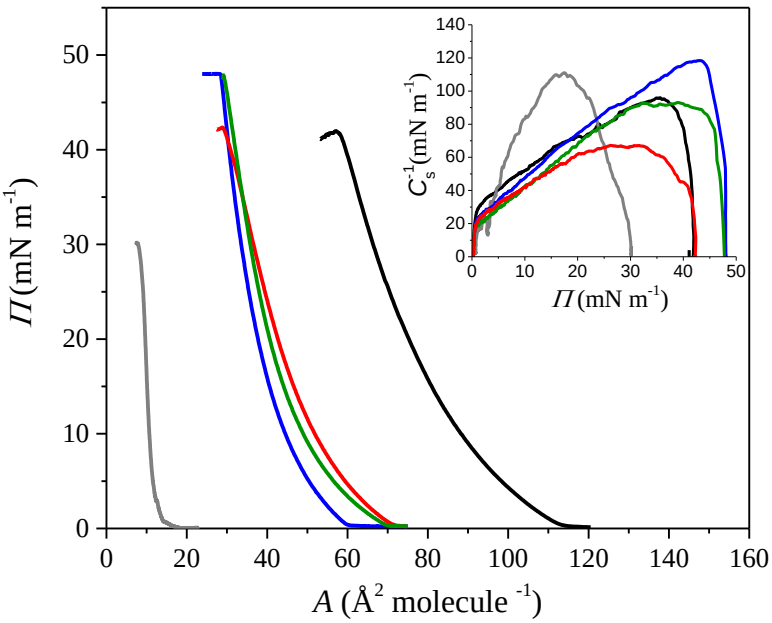


Figure 26. Isothermes de compression *Π-A*. De droite à gauche : films de DOPC pure (noire), DOPC/CC 1 :1 (rouge), DOPC/CP/CC 2 :1 :1 (vert), DOPC/CP (bleu) et CP/CC (gris) épandues sur de l'eau à 25 °C. Encart : C_s^{-1}-*Π* déterminé à partir des isothermes expérimentales.

Le DOPC, quant à lui, montre un comportement typique, en accord avec les données de la littérature.[59,60] La monocouche de DOPC a un caractère de liquide expansé, avec une valeur de C_s^{-1} de 96 mN.m^{-1} (Tableau IV), une aire par molécule au point de collapse (A_{coll}) de 58 Å^2 et une pression de surface au point de collapse (Π_{coll}) de 42 mN.m^{-1}. Le caractère liquide expansé du DOPC est lié à l'insaturation de ses chaînes hydrocarbonées, qui affaiblissent les interactions cohésives de van der Waals entre les chaînes, réduisant ainsi l'empilement moléculaire dans la monocouche et empêchant la formation de domaines condensés. Comme attendu, les images de microscopie à angle de Brewster (BAM) des films de DOPC obtenues à différentes pressions de surface ne montrent aucune anisotropie (Annexe 1).[61,62]

Tableau IV. Paramètres des isothermes de compression au point de collapse des monocouches de DOPC, CP/CC (1 :1), DOPC/CP (1 :1), DOPC/CC (1 :1) et DOPC/CC/CP (2 :1 :1) à 25 °C.

Monocouches	A_{coll} (Å^2.molecule^{-1})	Π_{coll} (mN.m^{-1})	C_s^{-1} (mN.m^{-1})
DOPC	57,7	41,8	96
DOPC/CC	29,4	42,0	67
DOPC/CP	28,4	48,0	118
CP/CC	7,9	22,8	111
DOPC/CP/CC	29,2	47,9	93

Le comportement des mélanges binaires équimolaires avec le DOPC montre l'influence du CP et de la CC sur la monocouche de DOPC. Par exemple, l'isotherme du mélange DOPC/CC 1 :1 est déplacée vers des aires moléculaires plus faibles par rapport à l'isotherme du DOPC pur, avec une valeur de A_{coll} approximativement égale à la moitié du DOPC pure (29 vs 58 Å^2). Tandis que le profil des deux isothermes est similaire, le module de compressibilité indique que la présence de CC dans le film de DOPC induit un caractère légèrement plus fluide (C_s^{-1} de 67 mN.m^{-1}). Ces observations suggèrent qu'une faible quantité de curcumine est présente dans le film de DOPC. Les images de BAM (Figure 27) montrent un film isotrope à faible pression de surface (Figures 27 A et B) tandis que de l'anisotropie apparaît dans la monocouche du mélange DOPC/CC à 37 mN.m^{-1} indiquant la présence de quelques agrégats (Figure 27 C). Après le collapse, la morphologie du film consiste en de nombreux agrégats, clairement observés en BAM (Figure 27 D).

En ce qui concerne le mélange équimolaire DOPC/CP, la pente de l'isotherme est plus importante par rapport à celle correspondant au DOPC pur, avec une valeur de C_s^{-1} de 118 mN.m^{-1} (Tableau IV) indiquant que le mélange forme un film liquide condensé plus rigide que le DOPC pur. La valeur de A_{coll} du film composé du mélange DOPC/CP est faible (28 Å^2) par rapport au film de DOPC pur (58 Å^2). Cela suggère que les chaînes hydrophobes des molécules de CP peuvent s'interdigiter avec les chaînes du DOPC et induire une condensation des molécules formant le film. La formation d'agrégats peut également être impliquée. Cette dernière hypothèse est soutenue par les images obtenues en BAM montrant que le film de DOPC/CP a un caractère anisotrope tout au long de la compression (Figures 27 E- H).

Enfin, alors que le CP et la CC, indépendamment, ne forment pas de film monomoléculaire à l'interface air/eau, leur mélange équimolaire forme un film stable. L'isotherme de compression de ce mélange présente une A_{coll} de 7,9 Å^2 qui est deux fois inférieure à ce qu'on

aurait pu attendre pour un mélange contenant 50% de CP pourvu de deux chaînes hydrocarbonées saturées. En effet, l'aire par molécule minimale d'une longue chaîne hydrocarbonée saturée (*i.e.* C16) est d'environ 18 $Å^2$. Il est alors raisonnable de supposer que le CP et la CC forment des agrégats à l'interface air/eau. Effectivement, les images BAM du film CP/CC montrent, à de faibles valeurs de pression de surface, des domaines brillants, anisotropes, qui coexistent avec une phase gaz (Figures 27 I et J). A des pressions de surface plus importantes, le film devient homogène (Figure 27 K) et enfin redevient hétérogène au-delà du collapse (Figure 27 L). Fait intéressant, l'isotherme du mélange ternaire DOPC/CP/CC 2 :1 :1 est située entre les isothermes correspondant au mélange DOPC/CP 1 : 1 et DOPC/CC 1 :1. Il est à noter que les images BAM montrent de l'anisotropie tout au long de la compression (Figures 27 M-P).

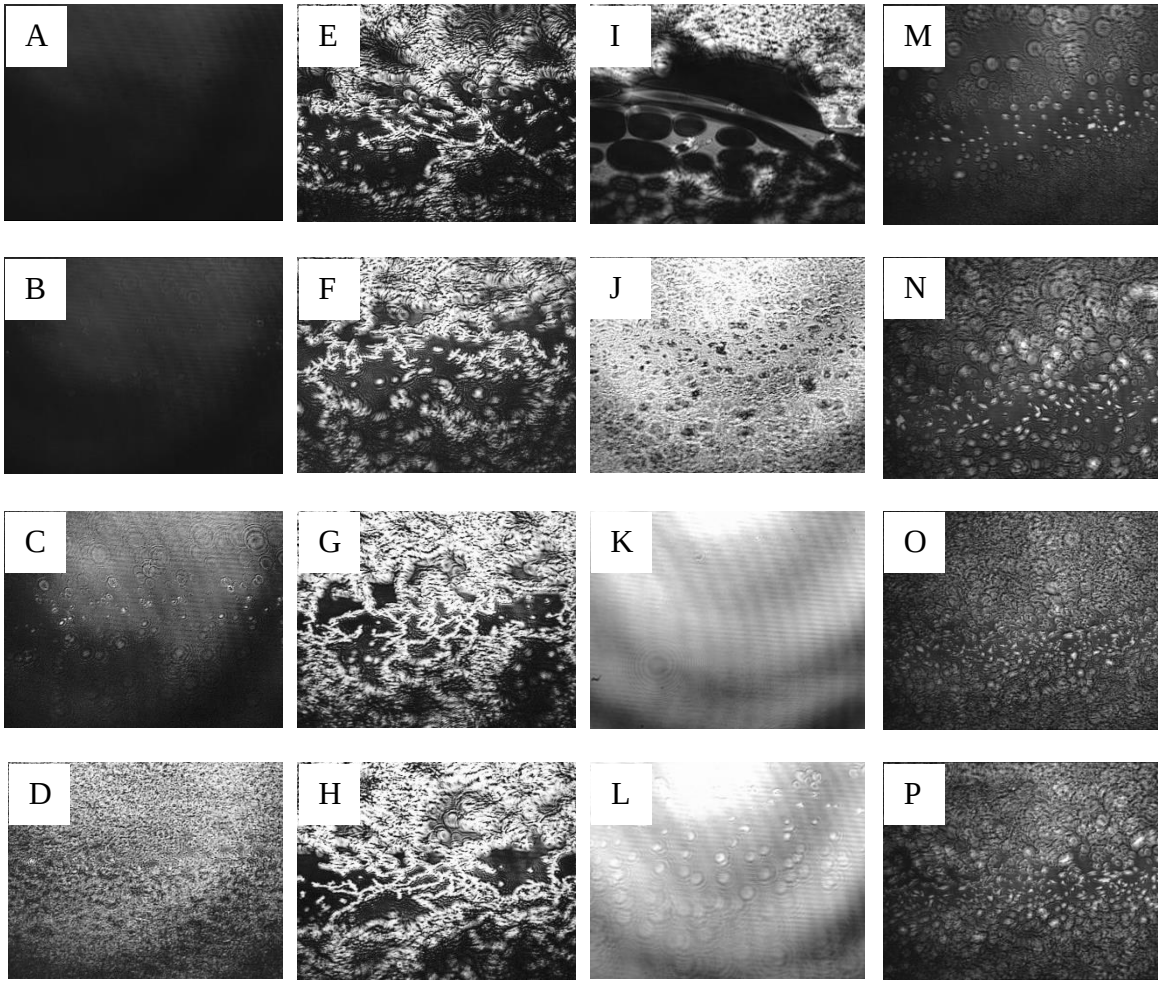


Figure 27. Images BAM des mélanges binaire de DOPC/CC 1 :1 (A-D), DOPC/CP 1 :1 (E-H), CP/CC 1 :1 (I-L) et ternaire DOPC/CP/CC 2 :1 :1 (M-P) à 25 °C. Les images ont été obtenues à : Π ($mN.m^{-1}$) = 0 (A), 5 (B), 37 (C), après le collapse (D) ; 0 (E), 10 (F), 30 (G), 40 (H) ; 0 (I), 10 (J), 22 (K), après le collapse (L) ; 0 (M), 10 (N), 20 (O), 30 (P).

En prenant en compte les résultats obtenus par la mesure de pression de surface et les images BAM, il est probable que les molécules de CP et de CC présentes dans le film contenant le DOPC interagissent et subissent un réarrangement à l'interface air/eau lors de la compression ; la CC stabiliserait le film en interagissant avec le CP au niveau de la région des têtes polaires du DOPC.

Afin de vérifier ces hypothèses, une étude de dynamique moléculaire a été réalisée en collaboration avec Jacek Korchowiec de la faculté de pharmacie, de l'Université Jagiellonian, Pologne. Les systèmes suivants ont été considérés : DOPC, CP, DOPC/CP, DOPC/CC, CP/CC. Les mélanges binaires ont été étudiés à l'équimolarité.

2.6.2. Dynamique moléculaire

Les profils de densité moléculaire des mélanges binaires formés à une interface eau/vide (N,T,p_n,γ = 20 mN.m^{-1}) sont illustrés dans la Figure 28. Les profils de densité étant symétriques, seulement les monocouches supérieures sont présentées. Dans tous les panels, la couleur cyan correspond à l'eau. Dans le cas du DOPC, un profil typique des phospholipides est observé (Figure 28 A). A savoir, les groupements méthyles terminaux (bleu foncé) sont dirigés vers le vide et les têtes polaires sont immergées dans l'eau (PO_4 – ligne rouge et $N(CH_3)_3$ – ligne magenta). De plus, les atomes de carbone hybridés sp^2 des chaînes hydrocarbonées sont représentés en bleu.

Cette image qualitative du DOPC est conservée dans le système binaire DOPC/CP (Figure 28 B). Les groupements CH_3 terminaux (bleu foncé), PO_4 (rouge) et choline (magenta) et les carbones hybridés sp^2 (bleu) sont moins intenses du fait de la plus faible concentration en DOPC dans la monocouche (x_{DOPC} = 0,5). Les groupements CH_3 terminaux du CP (ligne bleu foncé en pointillée) coïncident avec les groupements terminaux CH_3 du DOPC. Les atomes d'oxygène du CP sont localisés à l'interface eau/vide. L'atome d'oxygène du groupement carbonyle (aire grise) est légèrement déplacé vers la phase aqueuse comparé à l'atome d'oxygène du groupement alkoxy (ligne noire). La monocouche formée du mélange DOPC/CP montre un ordre supérieur par rapport à la monocouche formée uniquement de DOPC. Cela se manifeste par l'épaisseur des monocouches qui est estimée à partir de la position du groupement choline et du groupement méthyle terminal. L'épaisseur de la monocouche de DOPC est égale à 21,1 Å, tandis que l'épaisseur de la monocouche du mélange DOPC/CP est égale à 24,3 Å. Cela est en accord avec les valeurs de C_s^{-1} déterminées à partir des isothermes de ces deux monocouches.

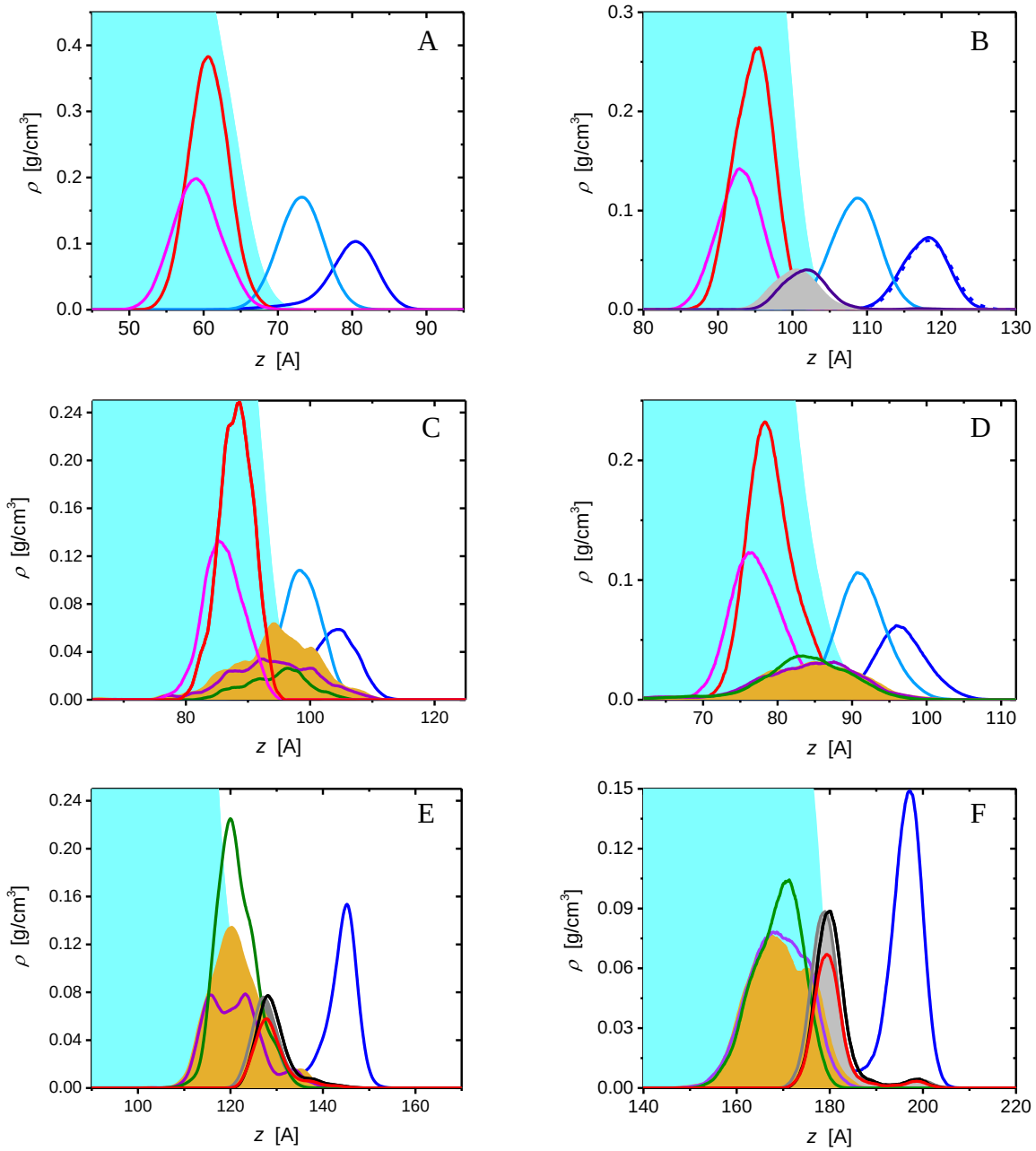


Figure 28. Profil de densité au long de la normale de monocouches constituées de (A) DOPC, (B) DOPC/CP, (C) DOPC/CC forme énol, DOPC/CC formé céto (D), CP/CC forme énol (E), CP/CC forme céto (F). Code couleur : aire cyan-eau ; ligne bleu foncé-groupements méthyles terminaux ; ligne bleue-carbone sp^2 des chaînes acyles ; ligne rouge-groupement PO_4 ; ligne magenta-groupement choline ; aire grise-oxygène du groupement carbonyle du CP ; ligne noire-oxygène du groupement alkoxy du CP ; aire marron-oxygène du groupement hydroxyle de la CC ; ligne violette-oxygène du groupement éther de la CC ; ligne verte-oxygène du groupement carbonyle de la CC. Ligne bleu foncé en pointillé-groupements méthyles terminaux du CP dans la monocouche du mélange DOPC/CP.

Par ailleurs, la présence de curcumine dans la monocouche de DOPC (Figures 28 C et D) n'a pas d'effet sur son épaisseur, qui est égale à 21,0 Å et 20,9 Å pour la forme énol et céto, respectivement. Tous les atomes d'oxygène de la curcumine sont localisés entre le groupement PO_4 et la double liaison des chaînes hydrocarbonées. L'aire indiquée en marron, la ligne noire et la ligne verte correspondent respectivement aux atomes d'oxygène des groupements hydroxyle, éther et carbonyle de la curcumine. La distribution de la curcumine est relativement large. Le comportement de la curcumine est très différent dans les systèmes CP/CC. Ici, les atomes d'oxygène de la curcumine sont décalés vers l'eau par rapport au groupement des têtes polaires du CP (Figures 28 E et F).

L'orientation des chaînes hydrocarbonées du DOPC et du CP est montrée dans la Figure 29. Les graphiques A et B correspondent à la distribution de la probabilité de l'angle d'inclinaison de la chaîne *sn*-1 du DOPC et de la chaîne $–O–R_1$ du CP. La figure pour la chaîne *sn*-2 du DOPC et $–(C=O)–R_2$ du CP montre qualitativement le même comportement et n'est pas rapportée. L'angle d'inclinaison est défini par le premier et le dernier atome de carbone de la chaîne hydrocarbonée. La distribution de la probabilité de l'angle d'inclinaison de la chaîne *sn*-1 dans une monocouche de DOPC (ligne noire) est asymétrique, avec une valeur d'inclinaison la plus probable d'environ 22°. La présence de CP dans la monocouche (ligne rouge) augmente l'ordre de la chaîne du phospholipide. La distribution devient alors plus étroite, le maximum est décalé vers une valeur inférieure et la probabilité est deux fois plus élevée que celle précédemment observée pour une monocouche formée seulement de DOPC. Inversement au CP, la présence de CC induit un léger effet de désordre dans l'orientation de la chaîne du DOPC (lignes vertes). Ceci est en accord avec l'effet fluidifiant de la curcumine sur une monocouche de DOPC déterminé expérimentalement. L'influence des deux formes de la curcumine est similaire (Figure 29 A). Les valeurs les plus probables d'angle d'inclinaison sont déplacées vers des valeurs supérieures, les distributions de probabilité sont plus diffuses et plus symétriques par rapport à la monocouche de DOPC seule.

Un léger effet de désordre des formes céto et énol (lignes bleues) sur les chaînes de CP peut également être observé (Figure 29 B). Les courbes sont maintenant décalées vers des angles plus petits cependant les deux distributions de probabilité sont plus diffuses. En même temps, les chaînes du CP sont plus ordonnées que les systèmes DOPC et DOPC/CC.

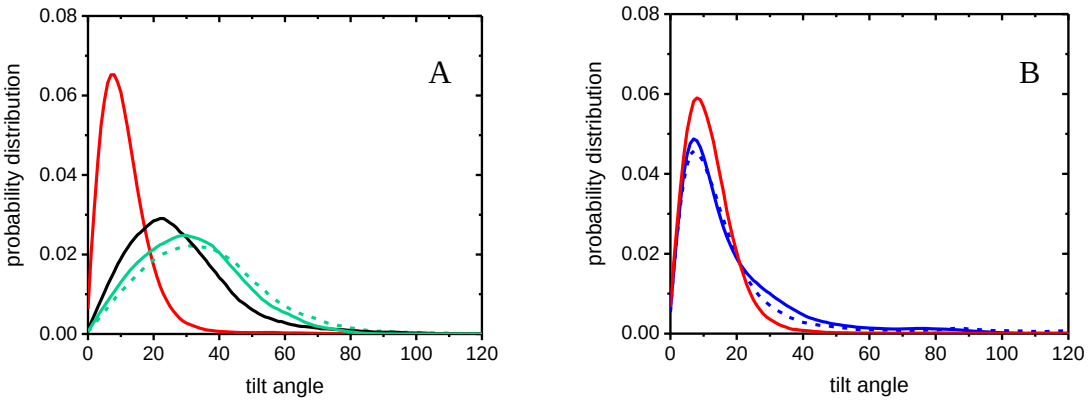


Figure 29. Distribution de la probabilité de l'angle d'inclinaison (tilt angle) de la chaîne *sn*-1 du DOPC (A) et de la chaîne $–O–C_{16}H_{33}$ du CP (B). Code couleur : DOPC-noir ; DOPC/CP-rouge ; DOPC/CC-vert ; CP/CC-bleu. Les lignes solides ou en pointillées correspondent respectivement à la forme énol et céto de la curcumine.

Il ressort de ces résultats de dynamique moléculaire que la curcumine interagit de manière différente avec le DOPC et le CP. Effectivement, les formes céto et énol de la curcumine présentent une distribution relativement large avec le DOPC où elles seraient localisées entre le groupement phosphate des têtes polaires et les doubles liaisons des chaînes hydrocarbonées. Tandis que la curcumine, sous sa forme céto ou énol, serait localisée au niveau des têtes polaire du palmitate de cétyle plutôt qu'au niveau de ses chaînes hydrocarbonées. Dans ce dernier cas, la curcumine serait déplacée vers la phase aqueuse et formerait des complexes avec le CP dont les chaînes grasses seraient dirigées vers le vide. On notera également que le CP rigidifierait le film de DOPC alors que la curcumine le fluidierait, ce qui est en accord avec les observations expérimentales.

2.6.3. Étude de la miscibilité du complexe CP/CC sur une monocouche de 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC)

2.6.3.1. Isotherme de compression des mélanges ternaires

Afin d'obtenir des informations de l'effet d'un mélange équimolaire de CC et CP sur une monocouche de DOPC, des isothermes *Π-A* du mélange ternaire ont été mesurées à trois températures différentes. Les isothermes *Π-A* des mélanges ternaires à différentes fractions molaires de DOPC et du mélange équimolaire CP/CC sont présentés dans la Figure 30.

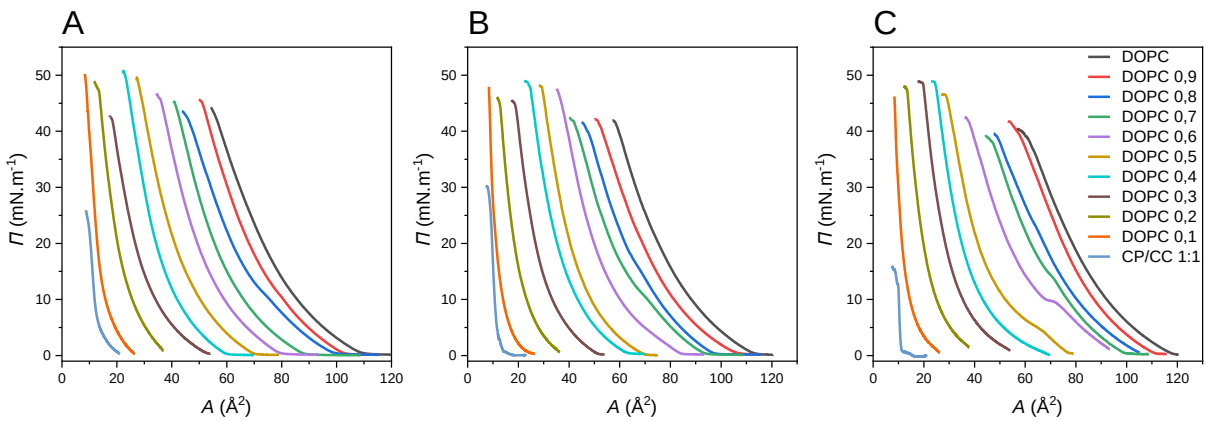


Figure 30. Isothermes *Π-A* des mélanges ternaires de DOPC/CP/CC à 18 °C (A), 25 °C (B) et 32 °C (C) épandus sur l'eau. Code couleur : x_{DOPC} = 1 ; 0,9 ; 0,8 ; 0,7 ; 0,6 ; 0,5 ; 0,4 ; 0,3 ; 0,2 ; 0,1 ; 0.

Tous les systèmes ternaires étudiés présentent des isothermes de compression *Π-A* situées entre les monocouches du DOPC pur et du mélange équimolaire CP/CC. L'augmentation de la fraction molaire de DOPC entraîne un déplacement des isothermes vers des aires moléculaires plus grandes. On observe également que les valeurs de Π_{coll} dépendent de la composition de la monocouche. A 25 °C, la plus grande valeur de Π_{coll} est trouvée pour x_{DOPC} = 0,4 et 0,5 à environ 47 mN.m^{-1}. Il est à noter que ces valeurs sont plus importantes par rapport au DOPC pur (42 mN.m^{-1}) ou au mélange binaire CP/CC (23 mN.m^{-1}). Ces observations indiquent une stabilité plus importante des films composés du mélange ternaire comparé aux monocouches composées du DOPC pur ou du mélange CP/CC 1 :1. La même tendance est observée à 18 °C et 32 °C avec des valeurs maximales obtenues à x_{DOPC} = 0,4 (49 mN.m^{-1}) et 0,2-0,3 (47 mN.m^{-1}), respectivement.

De plus, les isothermes des monocouches du mélange ternaire montrent des points d'inflexion à environ 70-80 Å^2 aux fortes proportions de DOPC pour chaque température étudiée. Ces points d'inflexion correspondent aux minima des modules de compressibilité, comme il peut être observé sur l'isotherme C_S^{-1}-*Π* déterminée à partir des isothermes expérimentales (Figure 31).

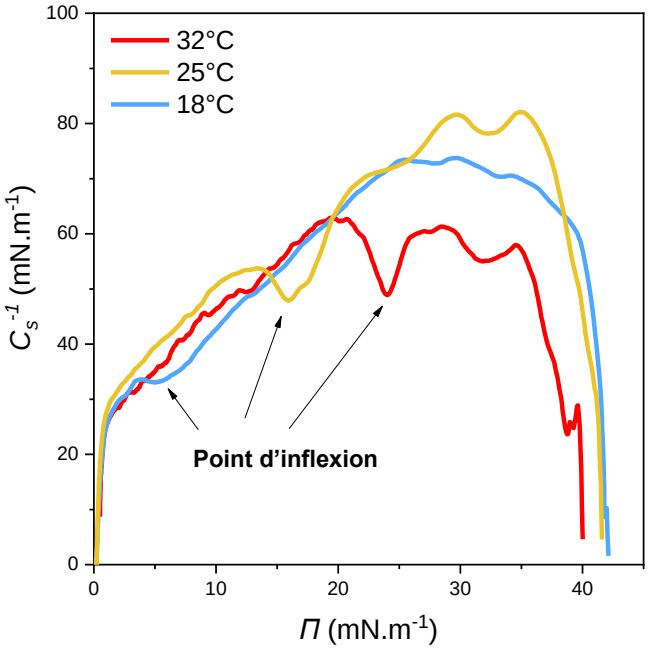


Figure 31. C_s^{-1}-Π déterminé à partir des isothermes expérimentales pour le film DOPC/CP/CC 0,8 :0,1 :0,1 épandu sur l'eau à —18, —25 et —32 °C.

La pression de surface du point d'inflexion varie avec la composition du film, et plus précisément, elle augmente avec l'augmentation de la fraction molaire de DOPC. Effectivement, à 25 °C, les valeurs de pression de surface des points d'inflexion sont d'environ 3, 9, 14 et 22 pour x_{DOPC} = 0,6 ; 0,7 ; 0,8 et 0,9 respectivement. De la même manière, dans les films à 18 et 32 °C, les valeurs des pressions de surface auxquelles on observe un point d'inflexion sont d'environ 4 et 12 mN.m^{-1} pour x_{DOPC} = 0,8 et 0,9 et d'environ 5, 10, 14 et 23 mN.m^{-1} pour x_{DOPC} = 0,5 ; 0,6 ; 0,7 et 0,8 respectivement.

La Figure 31 montre également une dépendance de la pression de surface des points d'inflexion avec la température. Les isothermes C_S^{-1}-Π déterminées à partir des isothermes expérimentales Π-A pour le mélange DOPC/CP/CC 0,8 :0,1 :0,1 à 18, 25 et 32 °C montrent des points d'inflexion à une pression de surface de ~ 4, 14 et 23 mN.m^{-1}, respectivement. Il en résulte donc que, pour une même composition du film, la pression de surface correspondant au point d'inflexion augmente avec la température. Cette observation est vérifiée également pour tous les mélanges ternaires présentant un point d'inflexion. Les points d'inflexion sont généralement interprétés comme une transition de phase, indiquant un changement de la structure du film. Ce changement de la structure du film est donc dépendant de la température et de la fraction molaire de DOPC.

2.6.3.2. Évaluation de la morphologie du point d'inflexion par microscopie à angle de Brewster

La microscopie à angle de Brewster à une interface air/eau permet de visualiser les différences de morphologie des films. La Figure 32 montre exclusivement la monocouche correspondant au mélange DOPC/CP/CC pour x_{DOPC} = 0,6 car le point d'inflexion à environ 10 mN.m^{-1} est plus facilement observable par rapport aux autres isothermes. Il peut être observé qu'à une pression de surface inférieure à celle du point d'inflexion, le film ne montre pas d'anisotropie (Figure 32 A), tandis qu'à environ 10 mN.m^{-1} des domaines brillants apparaissent (Figure 32 B) pouvant correspondre alors à une nouvelle phase. Les domaines deviennent plus brillants et plus nombreux à 20 mN.m^{-1} (Figure 32 C). Ces observations sont valables pour tous les films du mélange ternaire montrant un point d'inflexion et à toutes les températures (Annexe 2, 3 et 4). Il est à noter que le film est isotrope tout au long de la compression pour x_{DOPC} = 0,9 à 32 °C (Annexe 2).

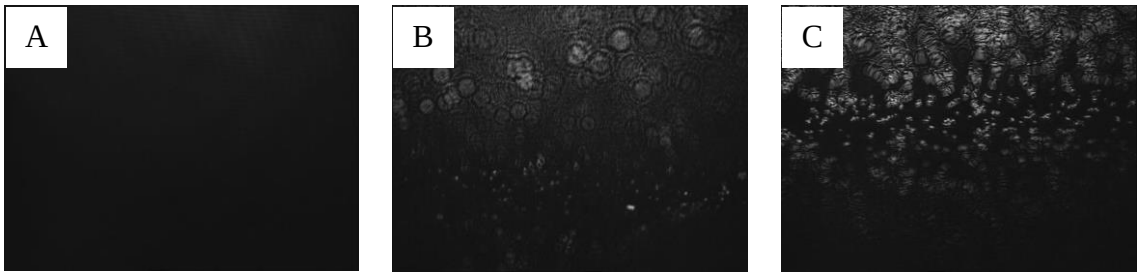


Figure 32. Images BAM du mélange ternaire DOPC/CP/CC pour x_{DOPC} = 0,6 à 32 °C et à différentes pressions de surface. A : 5,0 mN.m^{-1} ; B : 9,6 mN.m^{-1} et C : 20,0 mN.m^{-1}.

2.6.3.3. Etude de l'interaction entre le DOPC, le CP et la CC composant les monocouches

Les interactions entre le mélange CP/CC 1 :1 et le DOPC ont été étudiées en examinant si la variation d'aire moléculaire moyenne en réponse à l'ajout de DOPC répondait à la règle d'additivité, selon l'équation 6 :

$$A_{12} = A_1 x_1 + A_2 x_2 \qquad \text{Equation 6}$$

Où A_{12} est l'aire moléculaire moyenne dans la monocouche du mélange à une pression de surface donnée, A_1 et A_2 sont les aires moléculaires moyenne des composants 1 (DOPC) et 2 (CP/CC 1 :1) à la même pression de surface, et x_1 et x_2 sont les fractions molaires des deux

composés dans le mélange épandu. Le mélange CP/CC est donc considéré comme un seul composé. Les mélanges respectant l'équation 6 montrent un mélange idéal ou une séparation de phase complète. Les mélanges ne suivant pas cette équation montrent une miscibilité partielle résultante des forces d'interaction entre les différents constituants. Une déviation positive à l'aire théorique reflète une interaction répulsive entre les composés, et inversement, une déviation négative à l'aire théorique montre une interaction attractive entre les composés du mélange[63]. La Figure 33 montre une comparaison de l'aire moléculaire moyenne expérimentale et de l'aire moléculaire théorique pour un mélange idéal en fonction de x_{DOPC} à 10 $mN.m^{-1}$ à 18, 25 et 32 °C. Cette dernière valeur a été choisie car elle permet d'observer les points d'inflexion présents, à cette pression de surface, dans les mélanges à forte teneur en DOPC.

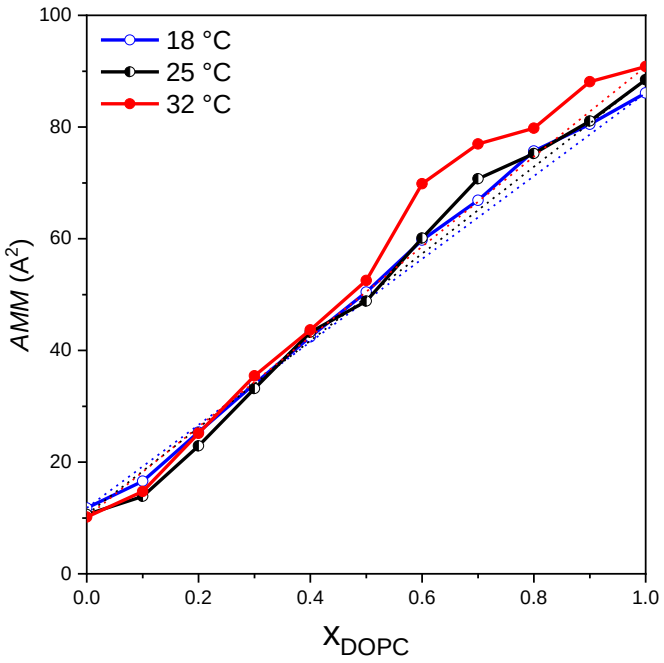


Figure 33. Aire moléculaire moyenne (AMM) des films du mélange ternaire DOPC/CP/CC à 18 °C (○), 25 °C (◐) et 32 °C (●) en fonction de $x_{DOPC.}$ Π = 10 $mN.m^{-1}$. Les lignes en tirets représentent l'aire moléculaire moyenne théorique.

Aux trois températures, les valeurs des aires expérimentales sont approximativement linéaires dans l'intervalle x_{DOPC} = 0,0-0,5, montrant alors une déviation nulle par rapport à l'aire théorique. Cet effet indiquerait l'absence d'interaction entre les molécules et suggérerait que des phases non miscibles puissent coexister ou au contraire, cela suggérerait un mélange idéal. Étant donné que les isothermes de compression montrent une augmentation de la pression de surface au collapse pour ces valeurs de x_{DOPC}, la dernière hypothèse serait

davantage vérifiée. Dans l'intervalle x_{DOPC} = 0,5-1,0 ; on observe une déviation de la linéarité pouvant indiquer une miscibilité partielle des composés du film. Cependant, l'analyse d'un système multi-phasique et multi-composant ne peut être effectuée avec précision. Toutefois, on observe une déviation de la linéarité plus importante avec l'augmentation de la température.

2.6.3.4. Analyse Thermodynamique de la miscibilité du DOPC, du CP et de la CC en couche de Langmuir

La miscibilité des composés constituant le film du mélange ternaire DOPC/CP/CC a été évaluée à partir des isothermes *Π-A* permettant le calcul de l'énergie de Gibbs du mélange, ΔG^{mix}, à 10 mN.m^{-1} et à 18, 25 et 32 °C, en utilisant la formule suivante :

$$\Delta G^{mix} = \int_0^{\Pi}[A_{12} - (x_1A_1 + x_2A_2)]d\Pi \qquad \text{Equation 4}$$

Si $\Delta G^{mix} = 0$, le film est composé d'un mélange idéal, un $\Delta G^{mix} < 0$ révèle un mélange miscible et à l'inverse, si $\Delta G^{mix} > 0$ révèle que les composés du mélange sont non-miscibles. La Figure 34 montre une comparaison de l'énergie de Gibbs du mélange des films ternaires en fonction de x_{DOPC} à 10 mN.m^{-1}et à 18, 25 et 32 °C.

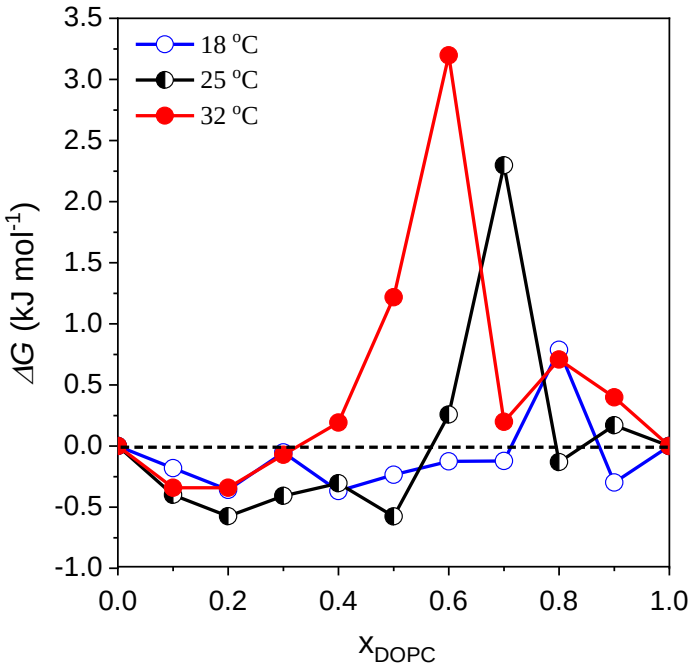


Figure 34. Analyse thermodynamique des films composés du mélange ternaire DOPC/CP/CC à 18 °C (○), 25 °C (◐) et 32 °C (●) en fonction de $x_{DOPC.}$ Π = 10 mN.m^{-1}.

L'analyse des fonctions thermodynamiques d'un système multi-phasique et multi-composant ne peut pas être effectuée avec précision. Néanmoins, les résultats obtenus pour l'énergie libre de Gibbs du mélange (ΔG^{mix}) suggèrent l'existence d'intervalles de miscibilité dans le système (Figure 34).

Sur la base des résultats précédemment discutés, il peut être proposé que pour x_{DOPC} = 0,0-0,4 (Figure 34, ligne rouge, 32 °C), un mélange entre les complexes de CP/CC formant des agrégats et le DOPC logé entre eux forment une phase, comme indiqué par ΔG = 0. Cela signifierait alors un mélange idéal entre les agrégats constitués de CP/CC et les molécules de DOPC formant une couche. Entre x_{DOPC} = 0,4 et 0,7 ; le phospholipide n'est plus contenu dans la structure existante, comme indiqué par l'augmentation de ΔG, ce qui pourrait alors révéler qu'une séparation de phase se produise. Enfin, entre x_{DOPC} = 0,7 et 1,0 ; les complexes CP/CC et les molécules de DOPC forment une seule phase (ΔG = 0) où les agrégats disparaissent. A la température de 18 °C, la transition de phase CP/CC agrégats-molécules de DOPC vers la phase CP/CC-DOPC formant un film monomoléculaire se produit de manière continue. Lors de ce processus, la curcumine devrait diminuer l'agrégation du CP en formant des complexes avec le CP et en augmentant la polarité de sa tête polaire.

2.7. Conclusion

En combinant des méthodes spectroscopiques et physico-chimiques, ainsi que la modélisation par DFT et par dynamique moléculaire, ce chapitre met tout d'abord en évidence le changement de conformation de la curcumine lors de son encapsulation dans une bicouche lipidique de lécithine de soja. Les résultats de spectrophotométrie ont montré qu'une augmentation de la concentration en curcumine modifiait les spectres d'absorbance avec une proéminence de la bande d'absorption décalée vers le rouge, qui a pu être associée à la forme énol. Cette tendance est également confirmée par des mesures de fluorescence, où l'augmentation de la concentration en curcumine entraînait un déplacement bathochrome du maximum d'émission. Ces résultats concordent avec les spectres d'absorption modélisés par DFT. Les changements de conformation sont induits par les effets concomitants de l'environnement membranaire lipidique et de la concentration en CC. L'arrangement des deux tautomères par rapport à la membrane de lécithine peut être modélisé par différents modes d'interactions avec la bicouche lipidique. Alors que la forme énol a tendance à pénétrer à l'intérieur du cœur lipidique, la forme céto, non-planaire, réside préférentiellement à l'interface, en interaction avec les têtes polaires. Plus particulièrement, les résultats mis en

évidence par des simulations de dynamique moléculaire d'équilibre sont également confirmés par le profil d'énergie libre sous-jacent à la pénétration de la curcumine. Dans une solution aqueuse, la forme céto est prédominante, et cet équilibre est maintenu pour de faibles concentrations en CC dans la bicouche lipidique. Effectivement, dans ce cas, la curcumine peut facilement se positionner à l'interface membrane-eau. Cependant, lors d'une augmentation de la concentration, le changement de conformation est favorisé par la nécessité d'adopter un agencement beaucoup plus efficace et moins encombrant, comme celui de l'énol. L'équilibre originel est inversé et la curcumine est capable de pénétrer dans la bicouche lipidique.

Cette étude pourrait expliquer la faible disponibilité de la curcumine généralement observée *in vitro* et *in vivo*. Pour être internalisée et ensuite passer la membrane cellulaire, une concentration suffisante de curcumine est nécessaire dans le cas de son administration sous sa forme libre.

Dans un second temps, les films de Langmuir, la microscopie à angle de Brewster ainsi que la dynamique moléculaire et la thermodynamique montrent que la curcumine et le palmitate de cétyle forment des complexes à une interface air/eau dont la balance hydrophile-hydrophobe permet un mélange avec une monocouche de phospholipide. Les résultats en film de Langmuir montrent que ni la curcumine, ni le palmitate de cétyle ne forment de films stables à une interface air/eau. Cependant, des films stables sont obtenus lors du mélange équimolaire de ces deux composés. Cela pourrait être expliqué par la formation de complexe entre la curcumine et le palmitate de cétyle *via* des interactions entre la tête polaire du lipide et la curcumine. Cette hypothèse serait vérifiée par l'étude de dynamique moléculaire montrant que la curcumine, sous sa forme céto ou énol, serait localisée au niveau des têtes polaire du palmitate de cétyle plutôt qu'au niveau de ses chaînes hydrocarbonées. Les isothermes de compression obtenues en film de Langmuir montrent différentes structures des films composés du mélange ternaire en fonction de la concentration en DOPC. Cela est vérifié en microscopie à angle de Brewster où à faible concentration en DOPC, les images montrent une anisotropie tout au long de la compression pouvant être attribuée à la formation d'agrégats composés de palmitate de cétyle et de curcumine. Alors qu'à forte concentration en DOPC, les images BAM révèlent une monocouche isotrope formant un film monomoléculaire. Cette phase devient anisotrope lors de l'augmentation de la pression de surface, correspondant donc à une nouvelle phase. L'analyse thermodynamique des films composés du mélange ternaire révèlent la présence d'intervalles de miscibilité entre les

constituants. Effectivement, à faible concentration en DOPC, les molécules de DOPC et les agrégats formés de curcumine et de palmitate de cétyle formeraient une phase. L'augmentation de la teneur en DOPC induirait une séparation de phase entre les agrégats et le DOPC. Puis, à plus forte concentration en DOPC, une phase constituée de molécules de DOPC et des complexes entre le palmitate de cétyle et la curcumine formeraient un film monomoléculaire.

Ce second chapitre montre donc, dans un premier temps, l'effet combiné de la concentration et du microenvironnement par confinement sur la tautomérisation de la curcumine. Les résultats mettent en évidence le rôle crucial du confinement dans la détermination des propriétés physico-chimiques de la curcumine. Dans un second temps, ce chapitre met en évidence la propriété de la curcumine à réaliser des complexes avec un lipide (≈ phytolipide) ce qui favoriserait alors l'absorption de la curcumine par la muqueuse intestinale, puisque le complexe CC/CP, favoriserait le mélange avec une monocouche de phospholipide modèle.

2.8. Références

1. A. Akbarzadeh, R. Rezaei-Sadabady, S. Davaran, S. W. Joo, N. Zarghami, Y. Hanifehpour, M. Samiei, M. Kouhi, and K. Nejati-Koshki, *Nanoscale Res. Lett.*, **2013**, *8*, 102.
2. A. Sharma and U. S. Sharma, *Int. J. Pharm.*, **1997**, *154*, 123.
3. O. Wesołowska, K. Michalak, J. Maniewska, and A. B. Hendrich, *Acta Biochim. Pol.*, **2009**, *56*, 33.
4. A. Lorin, C. Flore, A. Thomas, and R. Brasseur, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **2004**, *8*, 163.
5. H. Daraee, A. Etemadi, M. Kouhi, S. Alimirzalu, and A. Akbarzadeh, *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.*, **2016**, *44*, 381.
6. L. Coderch, J. Fonollosa, M. D. Pera, J. Estelrich, and J. L. Parra, *J. Controlled Release*, **2000**, *68*, 85.
7. T.-J. Robin, Thèse, Compiègne, **2014**.
8. P. Dynarowicz-Ł and K. Kita, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **1999**, *79*, 1.
9. P. Dynarowicz-Łątka and K. Hąc-Wydro, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **2004**, *37*, 21.
10. V. M. Kaganer, H. Möhwald, and P. Dutta, *Rev. Mod. Phys.*, **1999**, *71*, 779.
11. A. Ambike, V. Rosilio, B. Stella, S. Lepêtre-Mouelhi, and P. Couvreur, *Langmuir*, **2011**, *27*, 4891.

12. R. Kumar and V. Manjuladevi, "*Molecular Interaction at Interfaces*", ed. Aurelia Meghea, 1st ed., **2012**, InTech.

13. P. Toimil, G. Prieto, J. Miñones Jr, and F. Sarmiento, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2010**, *12*, 13323.

14. J. F. Baret, H. Hasmonay, J. L. Firpo, J. J. Dupin, and M. Dupeyrat, *Chem. Phys. Lipids*, **1982**, *30*, 177.

15. M. Khadem Sadigh, M. S. Zakerhamidi, A. N. Shamkhali, and E. Babaei, *J. Photochem. Photobiol. Chem.*, **2017**, *348*, 188.

16. N. K. Bhatia, S. Kishor, N. Katyal, P. Gogoi, P. Narang, and S. Deep, *RSC Adv.*, **2016**, *6*, 103275.

17. Z. Moussa, M. Chebl, and D. Patra, *J. Photochem. Photobiol. B*, **2017**, *173*, 307.

18. A. Dutta, B. Boruah, A. K. Manna, B. Gohain, P. M. Saikia, and R. K. Dutta, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, **2013**, *104*, 150.

19. A. Dutta, B. Boruah, P. M. Saikia, and R. K. Dutta, *J. Mol. Liq.*, **2013**, *187*, 350.

20. E. López-Tobar, G. P. Blanch, M. L. Ruiz del Castillo, and S. Sanchez-Cortes, *Vib. Spectrosc.*, **2012**, *62*, 292.

21. C. F. Chignell, P. Bilskj, K. J. Reszka, A. G. Motten, R. H. Sik, and T. A. Dahl, *Photochem. Photobiol.*, **1994**, *59*, 295.

22. S. M. Khopde, K. Indira Priyadarsini, D. K. Palit, and T. Mukherjee, *Photochem. Photobiol.*, **2007**, *72*, 625.

23. M. H. M. Leung and T. W. Kee, *Langmuir*, **2009**, *25*, 5773.

24. Y. Niu, X. Wang, S. Chai, Z. Chen, X. An, and W. Shen, *J. Agric. Food Chem.*, **2012**, *60*, 1865.

25. S. Mondal, S. Ghosh, and S. P. Moulik, *J. Photochem. Photobiol. B*, **2016**, *158*, 212.

26. D. Patra and C. Barakat, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, **2011**, *79*, 1034.

27. M. Mouslmani and D. Patra, *RSC Adv.*, **2014**, *4*, 8317.

28. M. Grazia Calvagno, C. Celia, D. Paolino, D. Cosco, M. Iannone, F. Castelli, P. Doldo, and M. Fresta, *Curr. Drug Deliv.*, **2007**, *4*, 89.

29. M. Hasan, N. Belhaj, H. Benachour, M. Barberi-Heyob, C. J. F. Kahn, E. Jabbari, M. Linder, and E. Arab-Tehrany, *Int. J. Pharm.*, **2014**, *461*, 519.

30. J. Barry, M. Fritz, J. R. Brender, P. E. S. Smith, D.-K. Lee, and A. Ramamoorthy, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 4490.

31. D. Patra, E. El Khoury, D. Ahmadieh, S. Darwish, and R. M. Tafech, *Photochem. Photobiol.*, **2012**, *88*, 317.

32. W.-C. Hung, F.-Y. Chen, C.-C. Lee, Y. Sun, M.-T. Lee, and H. W. Huang, *Biophys. J.*, **2008**, *94*, 4331.

33. Y. Sun, C.-C. Lee, W.-C. Hung, F.-Y. Chen, M.-T. Lee, and H. W. Huang, *Biophys. J.*, **2008**, *95*, 2318.

34. H. Mirzaei, A. Shakeri, B. Rashidi, A. Jalili, Z. Banikazemi, and A. Sahebkar, *Biomed. Pharmacother.*, **2017**, *85*, 102.

35. T. H. Marczylo, R. D. Verschoyle, D. N. Cooke, P. Morazzoni, W. P. Steward, and A. J. Gescher, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **2007**, *60*, 171.

36. J. Cuomo, G. Appendino, A. S. Dern, E. Schneider, T. P. McKinnon, M. J. Brown, S. Togni, and B. M. Dixon, *J. Nat. Prod.*, **2011**, *74*, 664.

37. A. Karewicz, D. Bielska, B. Gzyl-Malcher, M. Kepczynski, R. Lach, and M. Nowakowska, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **2011**, *88*, 231.

38. G. Xu, C. Hao, L. Zhang, and R. Sun, *Scanning*, **2017**, *2017*, 1.

39. C. R. Scholfield, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1981**, *58*, 889.

40. B. Korchowiec, J. Korchowiec, M. Hato, and E. Rogalska, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, **2011**, *1808*, 2466.

41. B. Korchowiec, M. Gorczyca, A. B. Salem, J.-B. R. de Vains, and E. Rogalska, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **2013**, *103*, 217.

42. M. Gorczyca, B. Korchowiec, J. Korchowiec, S. Trojan, J. Rubio-Magnieto, S. V. Luis, and E. Rogalska, *J. Phys. Chem. B*, **2015**, *119*, 6668.

43. J. Tomasi, B. Mennucci, and R. Cammi, *Chem. Rev.*, **2005**, *105*, 2999.

44. M. Marazzi, V. Besancenot, H. Gattuso, H.-P. Lassalle, S. Grandemange, and A. Monari, *J. Phys. Chem. B*, **2017**, *121*, 7586.

45. S. Mai, H. Gattuso, A. Monari, and L. González, *Front. Chem.*, **2018**, *6*, 495.

46. H. Gattuso, A. Monari, and M. Marazzi, *RSC Adv.*, **2017**, *7*, 10992.

47. R. L. Martin, *J. Chem. Phys.*, **2003**, *118*, 4775.

48. T. Etienne, X. Assfeld, and A. Monari, *J. Chem. Theory Comput.*, **2014**, *10*, 3906.

49. T. Etienne, X. Assfeld, and A. Monari, *J. Chem. Theory Comput.*, **2014**, *10*, 3896.

50. K. Vanommeslaeghe, E. Hatcher, C. Acharya, S. Kundu, S. Zhong, J. Shim, E. Darian, O. Guvench, P. Lopes, I. Vorobyov, and A. D. Mackerell, *J. Comput. Chem.*, **2010**, *31*, 671.

51. A. D. MacKerell, D. Bashford, M. Bellott, R. L. Dunbrack, J. D. Evanseck, M. J. Field, S. Fischer, J. Gao, H. Guo, S. Ha, D. Joseph-McCarthy, L. Kuchnir, K. Kuczera, F. T. K. Lau, C. Mattos, S. Michnick, T. Ngo, D. T. Nguyen, B. Prodhom, W. E. Reiher, B. Roux, M. Schlenkrich, J. C. Smith, R. Stote, J. Straub, M. Watanabe, J. Wiórkiewicz-Kuczera, D. Yin, and M. Karplus, *J. Phys. Chem. B*, **1998**, *102*, 3586.

52. J. C. Phillips, R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R. D. Skeel, L. Kalé, and K. Schulten, *J. Comput. Chem.*, **2005**, *26*, 1781.

53. W. Humphrey, A. Dalke, and K. Schulten, *J. Mol. Graph.*, **1996**, *14*, 33.

54. H. Fu, H. Zhang, H. Chen, X. Shao, C. Chipot, and W. Cai, *J. Phys. Chem. Lett.*, **2018**, *9*, 4738.

55. A. Puglisi, T. Giovannini, L. Antonov, and C. Cappelli, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2019**, *21*, 15504.

56. Y. Manolova, V. Deneva, L. Antonov, E. Drakalska, D. Momekova, and N. Lambov, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, **2014**, *132*, 815.

57. A. Thapa, B. C. Vernon, K. De la Peña, G. Soliz, H. A. Moreno, G. P. López, and E. Y. Chi, *Langmuir*, **2013**, *29*, 11713.

58. G. Karmakar, P. Nahak, P. Chettri, B. Roy, P. Guha, K. Tsuchiya, K. Torigoe, A. Kumar, R. K. Nath, S. Bhowmik, U. C. De, K. Nag, and A. K. Panda, *J. Surfactants Deterg.*, **2018**, *21*, 421.

59. O. Freudenthal, F. Quilès, G. Francius, K. Wojszko, M. Gorczyca, B. Korchowiec, and E. Rogalska, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, **2016**, *1858*, 2592.

60. B. Maherani, E. Arab-Tehrany, E. Rogalska, B. Korchowiec, A. Kheirolomoom, and M. Linder, *J. Nanoparticle Res.*, **2013**, *15*, 1792.

61. E. Guzmán, L. Liggieri, E. Santini, M. Ferrari, and F. Ravera, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.*, **2012**, *413*, 174.

62. A. Lucero, M. R. Rodríguez Niño, A. P. Gunning, V. J. Morris, P. J. Wilde, and J. M. Rodríguez Patino, *J. Phys. Chem. B*, **2008**, *112*, 7651.

63. H.-J. Lehmler and P. M. Bummer, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **2005**, *44*, 74.

Système de délivrance visant une libération contrôlée de phosphatidylcholines et de curcumine jusqu'au côlon

3. Système de délivrance visant une libération contrôlée de phosphatidylcholine et de curcumine jusqu'au côlon

3.1. Introduction

La RCH est une maladie inflammatoire caractérisée par des épisodes symptomatiques qui apparaissent par intermittence avec des phases de rémission. La curcumine, a démontré une forte propriété anti-inflammatoire. Elle apparaît donc être une molécule prometteuse pour le traitement de la RCH. De plus, la curcumine préviendrait également la perte de fonction de la barrière intestinale en inhibant l'altération des jonctions serrées. Effectivement, le rôle clé de la perturbation des jonctions serrées a été mis en évidence dans la pathogénèse de la RCH.[1] La déstabilisation de ses jonctions entraîne une diminution de 70 % des PC dans la couche de mucus rectal altérant sévèrement la fonction de la barrière hydrophobe de la couche de mucus.[2–4] L'apport de PC exogènes est alors envisagé pour rétablir la composition lipidique du mucus intestinal.

Une prise par voie orale de molécules bioactives offre une facilité d'administration. Cependant, les phosphatidylcholines sont sensibles aux enzymes intestinales et peuvent être digérées et absorbées précocement au niveau de la partie haute du tractus gastro-intestinal. De plus, la curcumine présente une faible solubilité et une faible absorption au niveau de la muqueuse intestinale. Il est donc nécessaire de modifier leur biodisponibilité et de les protéger en les encapsulant au cœur d'un vecteur, afin de les transporter jusqu'au côlon pour atténuer ou traiter les symptômes liés à la RCH.

Parmi les systèmes de délivrance, les nanoparticules lipidiques solides (SLN) semblent prometteuses. Effectivement, en tant que particules lipidiques, elles allient les avantages d'une matrice biocompatible et biodégradable en raison de leur nature[5] tout en augmentant la biodisponibilité et la stabilité des principes actifs. De nombreuses études rapportent les avantages de l'encapsulation de la curcumine au sein de particules lipidiques pour une application orale[6–10] et pour le traitement de RCH *in vivo* chez l'animal.[11,12] Par ailleurs, de multiples exemples de suspensions de SLN formulées avec des modèles de PC, utilisées pour leur propriété émulsifiante, sont également rapportés dans la littérature.[10,12–14] De ce fait, les PC véhiculées lors d'une administration orale seraient directement digérées par les enzymes durant le transit gastro-intestinal.

Par ailleurs, les SLN étant constituées d'une matrice lipidique, celles-ci sont également sensibles à la digestion par les lipases intestinales.[15] Ainsi, la protection de molécules bioactives destinées à une libération gastro-intestinale et du système de délivrance lui-même reste donc un défi à relever par la formulation de systèmes colloïdaux.

Dans ce chapitre nous allons exposer dans un premier temps quelques généralités sur les nanoparticules lipidiques solides ainsi que sur les émulsions de Pickering. Ensuite, nous présenterons l'influence de la stratégie de formulation de particules lipidiques sur la localisation intraparticulaire de phospholipides. Enfin, nous présenterons la stabilisation d'une interface solide/liquide par des nanoparticules solides, utilisées afin de protéger le système de délivrance par effet de Pickering.

3.2. Généralités sur les nanoparticules lipidiques solides (SLN)

Les nanoparticules lipidiques solides (SLN *solid lipid nanoparticles*) ont été développées dans les années 1990. Ce sont des suspensions colloïdales lipidiques dont la taille est submicronique. Les SLN sont composées de lipides solides (ou graisse) à température ambiante (ou du corps humain), biodégradables et biocompatibles généralement stabilisées par l'ajout de tensioactifs et parfois de co-tensioactifs. L'utilisation de lipides solides permet de contrôler davantage la libération du principe actif *via* une mobilité réduite de celui-ci par rapport à une incorporation dans une huile (lipide liquide à température ambiante). Les lipides utilisés pour produire des SLN sont des mono-, di-, triglycérides, des cires, des acides gras etc… caractérisés par leur température de fusion (T_m) (Tableau I).

3.2.1. Préparation des SLN

Les SLN sont généralement préparées à partir d'une émulsion directe huile dans eau (H/E) ; où la phase dispersée (gras fondu) et la phase dispersante (eau + tensioactifs) sont chauffées à une température supérieure au point de fusion du lipide ; suivie par une étape de refroidissement qui permettra la cristallisation du lipide. Les SLN peuvent être préparées par différentes méthodes reposant sur la préparation d'une émulsion avec ou sans apport d'énergie dans le système, telle que : l'homogénéisation à haute pression (à chaud ou à froid), l'ultrasonication ou homogénéisation à grande vitesse, émulsification/évaporation de solvant, émulsification/diffusion de solvant, la formation de microémulsion ou encore par la formation

d'une double émulsion (eau/huile/eau) permettant l'encapsulation de principes actifs hydrophiles. De nombreuses revues de la littérature rapportent plus précisément les différentes méthodes de préparation des SLN.[16,17]

Tableau I. Exemple de lipides utilisés pour la production de SLN pour une administration orale

Groupes	Température de fusion (°C)	Références
Triglycérides		
Trimyristine	56-57	18
Tripalmitine	66-68	19
Tristéarine	72-75	12,20
Monoglycérides		
Glyceryl monostearate	78-81	21
Mélanges de mono-, di- et triglycérides		
Glyceryl behenate	83	22–24
Glyceryl palmitostearate	52-55	23
Acide gras		
Acide stéarique	70	12
Acide palmitique	63	25
Cires		
Palmitate de cétyle	54	26–28
Cire d'abeilles	62-64	29
Cire de carnauba	82	30

3.2.2. Incorporation du principe actif dans les SLN

L'incorporation d'un principe actif dans la matrice lipidique des SLN est influencée par différents paramètres : *i)* la solubilité du principe actif dans le lipide fondu, *ii)* la structure chimique et physique de la matrice lipidique solide et *iii)* l'état polymorphique du lipide utilisé.

i) La solubilité du principe actif dans le lipide fondu doit être suffisamment élevée car elle diminue lors de la cristallisation du lipide.[31]

ii) La nature chimique du lipide est également fondamentale. La solidification des lipides peut conduire à une expulsion du principe actif. Des mélanges de lipides

plus complexes tels que des mono-, di-, triglycérides et contenant des acides gras avec des longueurs de chaînes hydrocarbonées variables conduisent à une limitation du risque d'expulsion dû à la formation de réseaux moins cristallisés offrant des espaces pour accueillir le principe actif.[31]

iii) Le polymorphisme du lipide est déterminant pour l'incorporation d'un principe actif. Un réseau cristallin avec des défauts permet une incorporation plus importante de principe actif. Cependant, un réseau avec moins de défauts est thermodynamiquement plus stable. Les formes cristallines métastables auront donc tendance à se transformer en réseaux plus ordonnés provoquant l'expulsion du principe actif à partir des SLN durant le stockage.[31]

Müller *et al.,*[31] ont décrit trois modèles d'incorporation de principe actif dans les SLN (Figure 1).

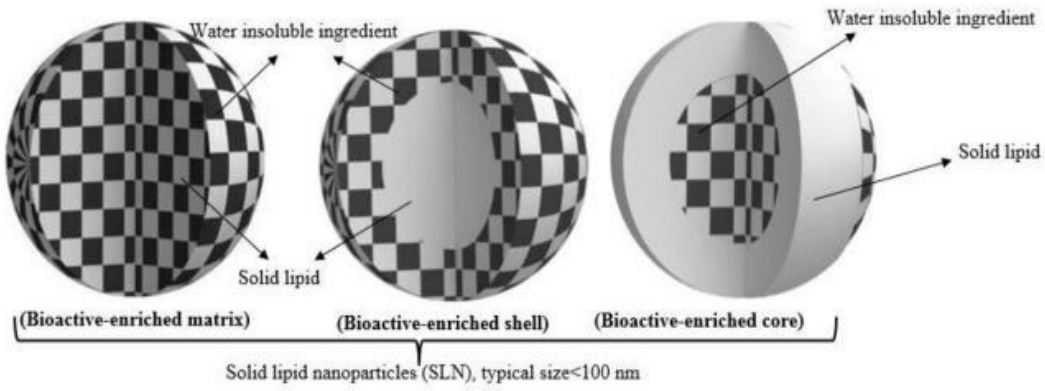


Figure 1. Modèles d'incorporation de principe actif dans les SLN, tiré de Müller *et al.*,[31] 2000. De gauche à droite : modèle de dispersion homogène, modèle couronne enrichie, modèle cœur enrichi.

i) Le modèle de dispersion homogène : lorsque le principe actif est distribué de manière homogène dans la matrice lipidique. En général, aucun tensioactif n'est utilisé durant la préparation de la dispersion colloïdale pour obtenir ce modèle.[32]

ii) Le modèle couronne enrichie : durant la production de SLN, la quantité de principe actif de la phase aqueuse augmente avec l'augmentation de la température due à une solubilité accrue pour cette phase. Il est à noter qu'une augmentation de la concentration en tensioactif contribue aussi à cet effet. Durant le refroidissement, la solubilité du principe actif dans la phase aqueuse diminuerait, entraînant alors une nouvelle répartition du principe actif entre la phase dispersante et dispersée. Lorsque l'émulsion atteint la température de recristallisation du lipide, un cœur lipidique solide

commence à se former qui ne sera plus accessible au principe actif. Cela conduira donc à un enrichissement de la couronne en principe actif. Ce modèle peut conduire à un phénomène de burst (= libération rapide du PA) du principe actif lors de sa libération.

iii) Le modèle cœur enrichi : se produit lorsque le principe actif précipite avant la recristallisation du lipide. Il peut être obtenu lorsque le principe actif est solubilisé dans un lipide fondu à une concentration proche de sa saturation. Le refroidissement de la nanoémulsion conduira à sa supersaturation et donc à la précipitation du principe actif qui sera suivi par la recristallisation du lipide encerclant le principe actif.

3.2.3. Digestion enzymatique *in vitro* de la matrice lipidique des SLN

Avant de pouvoir atteindre la région enflammée du côlon, le système de délivrance lipidique doit résister à un pH acide pouvant atteindre 2,3 en cas de RCH.[33] Il devra également pouvoir éviter d'être capté par la couche de mucus saine et surmonter l'activité de dégradation des enzymes. Effectivement, 80% de la lipolyse des lipides à lieu au niveau de l'intestin en présence des micelles de sels biliaires. Müller, qui est l'un des pionniers dans l'étude de la dégradation des SLN sous l'action de lipase, rapporte l'influence de la nature et du degré de cristallinité de la matrice lipidique ainsi que l'effet du tensioactif utilisé pour stabiliser les suspensions sur la rapidité de dégradation des suspensions de SLN par les lipases.[34,35] Il apparait que l'encombrement stérique de l'émulsifiant soit un facteur important pour limiter la lipolyse.[36] Par exemple, en 2018, Ban *et al*.[37] ont étudié *in vitro* la dégradation enzymatique de SLN stabilisés par un émulsifiant de type Polyéthylène glycol (PEG) en fonction de la longueur de chaîne du polymère. Ils ont démontré qu'il existe une compétition dans le phénomène d'adsorption entre les sels biliaires et l'émulsifiant à la surface des SLN. La présence des sels biliaires à la surface du SLN permet alors la dégradation de la matrice lipidique par les lipases intestinales. D'après leurs résultats, plus la longueur de la chaîne de l'émulsifiant est importante plus l'hydrolyse des triglycérides est réduite. En 2017, Higa *et al*.[38] ont formulé des SLN afin de cibler les régions inflammatoires lors de RCH en utilisant un mélange de lipides extraits de archaebacteria *Halorubrum tebenquichense* (TPA) comme émulsifiant, qui offrirait une protection chimique contre les lipases puisque le lipide utilisé par Higa *et al*. présente des liaisons éthers entre les chaînes hydrocarbonées et le glycérol en position *sn*-2 et *sn*-3. Ils ont alors étudié la dégradation *in vitro*, en présence de lipases pancréatiques, des suspensions lipidiques composées de Compritol® ATO 888 stabilisé soit *i*) par du Tween 80, de la lécithine et du TPA ; soit *ii*) en l'absence de TPA. Ils rapportent une

lipolyse complète de la formulation stabilisée avec la lécithine et le Tween 80 après 30 min dans un milieu intestinal simulé, tandis que la suspension en présence de TPA expose une lipolyse de 45 % après 1 h d'incubation dans le même milieu.

3.3. Généralités sur les émulsions de Pickering

Les émulsions de Pickering sont des systèmes dispersés de deux liquides non-miscibles stabilisés par des particules solides colloïdales (ou émulsifiant solide). Les émulsions de Pickering peuvent être de type direct ou inverse, soit émulsion huile/eau (H/E) ou émulsion eau/huile (H/E), respectivement (Figure 2).

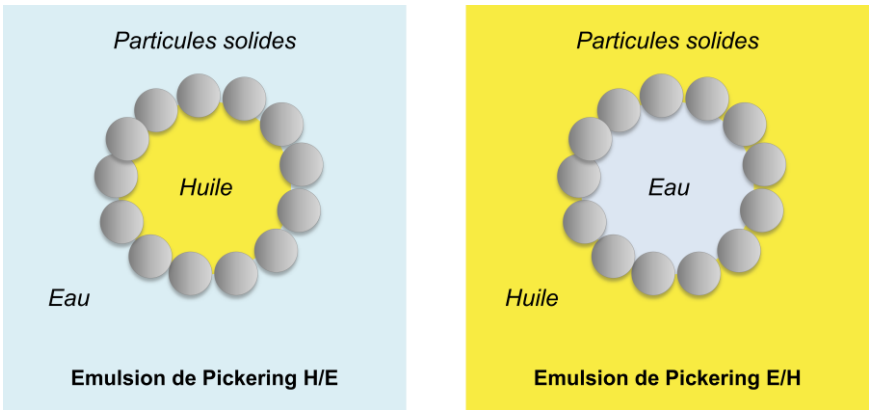


Figure 2. Émulsions de Pickering : directe (Huile/Eau) et inverse (Eau/Huile)

3.3.1. Angle de contact

La morphologie des émulsions de Pickering ne dépend pas de la balance hydrophile-lipophile (*hydrophilic-lipophilic balance* HLB) comme pour les tensioactifs, mais de la mouillabilité de la particule matérialisée par l'angle de contact (θ) que la particule réalise à l'interface huile/eau. Une particule exposant une surface très hydrophile est totalement mouillée par l'eau et ne sera pas adsorbée à l'interface d'une émulsion car elle restera dans la phase aqueuse, et inversement pour les particules trop hydrophobes.

Lors d'un mouillage partiel des particules par les deux phases, la valeur de l'angle contact peut-être calculée à partir de la loi de Young (Equation 1) en fonction des énergies interfaciales du solide et des deux liquides :

$$\cos\theta = \frac{\gamma_{s/h} - \gamma_{s/e}}{\gamma_{h/e}} \qquad \text{Equation 1}$$

Où θ est l'angle de contact entre huile-eau-solide défini dans la phase aqueuse, $\gamma_{s/h}$ est l'énergie de surface entre la particule solide et l'huile, $\gamma_{s/e}$ est l'énergie de surface entre la particule solide et l'eau et $\gamma_{h/e}$ est l'énergie de surface entre l'eau et l'huile. Donc, en considérant des particules solides sphériques, la valeur de θ mesurée dans la phase aqueuse permet de définir le type d'émulsion pouvant être obtenue. Si θ < 90°, la particule est considérée comme hydrophile (Figure 3 A), elle est davantage mouillée par la phase eau, permettant d'obtenir une émulsion directe. Si θ > 90°, la particule est considérée comme hydrophobe (Figure 3 C), elle est davantage mouillée par la phase huile et une émulsion inverse est obtenue. A un angle de 90° (Figure 3 B), les particules sont mouillées par les deux phases et n'ont pas de préférence pour un type d'émulsion.

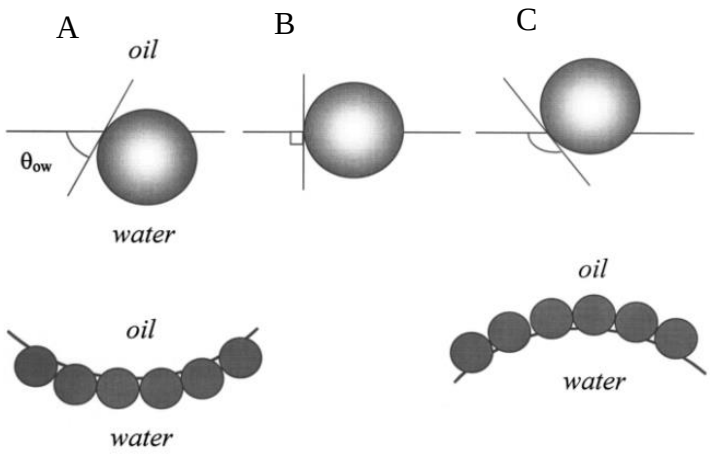


Figure 3. Représentation de l'effet du mouillage et donc de l'ange de contact θ sur le type d'émulsion formée. Repris de Aveyard *et al.*,[39] 2003.

3.3.2. Détermination de l'angle de contact

Il existe différentes méthodes, directes ou indirectes, pour déterminer l'angle de contact des particules adsorbées aux interfaces. Parmi les méthodes indirectes, l'ellipsométrie, la réflectrométrie ou encore l'enregistrement d'isotherme de pression de surface/aire en cuve de Langmuir peuvent être utilisées. Pour les méthodes directes, on peut citer la microscopie à

force atomique, l'interférométrie et la cryofracture à une interface. Destribats récapitule les techniques de mesures dans une article publié en 2014.[40]

3.3.3. Énergie d'adsorption

La stabilisation des émulsions de Pickering provient de la forte adsorption des particules à une interface liquide/liquide. La force avec laquelle une particule est maintenue à une interface huile/eau (donc l'apport d'énergie requis pour la désorption d'une particule) ne dépend pas seulement de θ mais également de la tension superficielle entre l'huile et l'eau et du rayon de la particule.

Ainsi l'énergie requise pour la désorption d'une particule ($-\Delta_{ads}G$) d'un rayon R d'une interface huile/eau de tension interfaciale $\gamma_{h/e}$ est donnée dans l'équation suivante :

$$-\Delta_{ads}G = \pi . R^2 . \gamma_{h/e} . (1 \pm \cos\theta_{h/e})^2 \qquad \text{Equation 2}$$

Par convention θ est défini par rapport à la phase aqueuse, le signe à l'intérieur de la parenthèse est positif si $\theta > 90°$ et négatif si $\theta < 90°$. La gravité est négligeable lorsque les particules mesurent moins de 1 µm.

Donc plus $-\Delta_{ads}G$ est faible, plus les particules seront 'expulsables' de l'interface. L'énergie d'attachement est donc la plus forte quand l'angle de contact est de 90°, ce qui correspond à un maximum de stabilité d'une émulsion dans la plupart des cas. Cependant, lorsque les valeurs d'angle de contact sont proches de 0 – 20° ou 160 – 180°, $-\Delta_{ads}G$ diminue rapidement et devient comparable aux valeurs d'énergie d'adsorption retrouvées pour un tensioactif (≈ 10 kT). La particule peut alors facilement se décrocher de l'interface et l'effet de stabilisation est réduit.[41]

La stabilité des émulsions de Pickering peut aussi être attribuée à la barrière stérique que forment les particules adsorbées à l'interface eau/huile (et vice versa). La difficulté pour la mise en œuvre d'émulsion de Pickering réside dans le choix des particules à utiliser et éventuellement aux modifications de surface à réaliser pour qu'elles soient mouillées par les deux phases.

3.3.4. Digestion enzymatique *in vitro* des émulsions de Pickering

Les émulsions de Pickering ont démontré un fort potentiel quant à la réduction de la digestion enzymatique de la phase lipidique dispersée. Par exemple, Bai *et al.*[42] ont étudié la digestion enzymatique d'une émulsion de Pickering stabilisée par des nanocristaux de cellulose (CNC) d'une largeur de 5-20 nm et d'une longueur de 150-200 nm à différentes concentrations. Ils rapportent que pour ces systèmes, la digestion des lipides est inhibée à forte concentration en CNC. Ces résultats concordent avec ceux de Tzoumaki *et al.*[43] qui constatent le même effet pour une émulsion stabilisée par des nanocristaux de chitine (ChN). D'après ces deux études, l'adsorption irréversible des particules à l'interface H/E contribuerait de manière non négligeable à l'efficacité de protection contre la dégradation enzymatique. La même tendance a été démontrée avec les particules inorganiques de silices qui sont largement utilisées pour stabiliser une émulsion de Pickering. Il a notamment été rapporté qu'avec des particules de silice, une telle émulsion peut être stable à des valeurs de pH physiologique, allant de 3 à 7, et donc intéressant pour l'administration par voie orale.[44,45]

3.4. Partie expérimentale

3.4.1. Produits

Dans le cadre de ce travail, la curcumine (CC ≥ 65 %) ainsi que les phospholipides (PL) extraits du jaune d'œuf, proviennent de chez *Sigma-Aldrich*. Cette source de phospholipides contient ≈ 60 % de phosphatidylcholines.

Le palmitate de cétyle (CP, 95%) de chez *Accros Organics*, est utilisé comme matrice lipidique pour préparer les SLN. Le CP qui est solide à température ambiante est un céride approuvé pour les applications pharmaceutiques. Ce lipide jouera le rôle d'excipient dans la formulation développée pour encapsuler les molécules bio-actives, *i.e.*, les PL et la curcumine.

Le Pluronic® P123 de chez *Sigma-Aldrich* est un copolymère tribloc linéaire de masse molaire de 5800 $g.mol^{-1}$ communément annoté PEO-PPO-PEO. C'est un tensioactif non-ionique qui possède un caractère amphiphile ; puisqu'il est composé d'un bloc central de poly(oxyde de propylène) (PPO, 70 unités) plutôt hydrophobe, et de deux blocs latéraux de poly(oxyde d'éthylène) (PEO, 20 unités par bloc) plutôt hydrophiles. Le P123 est utilisé comme stabilisant dans la formulation de la suspension de type E/PL-SLN/E.

Le Witocan® P est un triglycéride issu d'huile de palmiste fourni par *Cremer Oleo GmbH & Co*. Cette graisse possède une température de fusion comprise entre 34-36 °C. Cette matière grasse a été choisie pour formuler une suspension de SLN thermosensibles de type W-SLN par effet de Pickering.

La poudre de silice pyrogénée d'origine commerciale (*Wacker Chemie AG, HDK® T40*) est utilisée ici comme émulsifiant solide pour la stabilisation par effet de Pickering des SLN préparées à partir de Witocan® P. Les nanoparticules de silice présentent une aire de surface de 360-440 m^2/g et une densité de silanol de surface de 2 $SiOH/nm^2$.

L'acide stéarique (AS, 97%) de chez *Accros Organics*, est un acide gras qui possède une température de fusion de 69 °C. Il a été utilisé pour modifier l'énergie de surface et donc la mouillabilité des nanoparticules de silice pour rendre plus compatibles avec les SLN de Witocan® P.

D'autre part, pour faciliter les analyses par microscopie confocale, deux fluorophores ont été utilisés le 1-Oleoyl-2-[12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodecanoyl]-*sn*-glycero-3-phosphocholine (**NBD-PC**) de chez *Avanti Polar Lipids* et le 1,2-dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt (**TR-DHPE**) de chez *Molecular Probes*. Leurs longueurs d'onde d'excitation (λ_{ex}) et d'émission (λ_{em}) dans le chloroforme et le méthanol, respectivement sont indiquées dans le Tableau II présenté ci-dessous.

Tableau II. Caractéristiques optiques des fluorophores utilisés pour l'analyse en microscopie confocale

Fluorophores	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)
NBD-PC (dans le chloroforme)	474	533
TR-DHPE (dans le méthanol)	595	615

La pancréatine extraite du pancréas de porc (3x USP *United States Pharmacopeial Convention*, *Sigma Aldrich*) est une enzyme de type lipase/phospholipase modèle, utilisée dans le test de digestion *in vitro*.

3.4.2. Conditions et Protocoles de formulation des suspensions de SLN

3.4.2.1. Par simple émulsion directe Huile dans Eau (H/E) pour la suspension de type PL-SLN-CC

Ce mode de préparation a été établi pour obtenir une dispersion de nanoparticules lipidiques solides (SLN) de palmitate de cétyle (CP) formée en présence de phospholipides (PL), extraits du jaune d'œuf, par diffusion/évaporation de solvant suivi d'une étape de sonication à l'aide d'une sonde à ultrasons. Ainsi, une phase organique composée de 100 mg de CP et de 50 mg de PL dissous dans 10 mL de tétrahydrofurane (THF) est initialement préparée. Puis, cette solution est ajoutée, goutte à goutte, à 10 mL d'eau chauffée à 70 °C pour former une pré-émulsion. Celle-ci a ensuite été laissée sous agitation à 70 °C jusqu'à la complète évaporation du THF, puis mise sous ultrasons durant 5 min, à l'aide d'une sonde à ultrasons (Bandelin sonopuls, HD 2200, 47% puissance), pour obtenir une émulsion directe d'huile dans eau (H/E). Le refroidissement des gouttelettes d'huile conduit à la formation d'une suspension de SLN dans l'eau, nommée **PL-SLN**.

Dans le cas des dispersions PL-SLN chargées en curcumine (CC), le mode de préparation est identique à celui venant d'être décrit avec simplement l'ajout de 1 mg de CC dans la phase organique de THF contenant déjà le CP et la PL. Cet échantillon est nommé **PL-SLN-CC**.

3.4.2.2. Par double émulsion Eau dans Huile dans Eau (E/H/E) pour la suspension de type E/PL-SLN-CC/E

Le mode de préparation de ce type de suspension de SLN de CP a été inspiré de la méthodologie établie par Pasc *et al.*[47] qui utilisent une double émulsion eau/huile/eau (E/H/E). Cette stratégie permettrait d'incorporer davantage de PL au cœur du SLN.

Tout d'abord, une émulsion inverse (E/H) a été réalisée en mélangeant sous vortex 500 mg d'eau à un mélange homogène de cyclohexane/CP (1 mL/100 mg). Puis, 50 mg de PL sont dissous dans 260 µL d'un mélange isopropanol/THF (95/5 V/V, proportions volumiques) ont été ajoutés. L'émulsion E/H ainsi obtenue a été dispersée dans 10 mL d'une solution aqueuse contenant 3,45 % en masse de P123 pour obtenir une double émulsion E/H/E. Enfin, cette dernière a été chauffée, à 60 °C, sous vide afin d'évaporer les solvants puis refroidie pour former la suspension finale de SLN, nommée **E/PL-SLN/E**. L'évaporation des solvants organiques a entraîné une perte d'eau, il a donc fallu en ajouter pour réajuster la concentration de P123 à la valeur initiale, soit 3,45 % en masse.

Dans le cas des dispersions E/PL-SLN/E chargées en CC, le mode de préparation venant d'être décrit a été utilisé en ajoutant simplement 1 mg de CC au mélange isopropanol/THF/PL. L'échantillon a été nommé **E/PL-SLN/E-CC**.

3.4.3. Stabilisation de l'interface solide/liquide par des nanoparticules de silice

3.4.3.1. Hydrophobisation de la surface des nanoparticules de silice

Les nanoparticules de silice (SiNPs) pyrogénées ont été modifiées par l'adsorption d'acide stéarique (AS) à la surface des SiNPs, pour obtenir des particules de silice hydrophobes, nommées **SiNPs-AS_*x***. Le *x* correspond à la valeur du rapport massique AS/SiNPs qui est comprise entre 0,1 et 2. Cette méthode 'd'hydrophobisation' a été décrite par Ikem *et al.*[48] et pour ce travail 5 g de SiNPs ont été dispersées dans du chloroforme contenant la quantité appropriée d'AS selon le rapport massique AS/SiNPs visé (donc entre 0,1 et 2). Le mélange a été placé sous agitation à 250 rpm durant 3h à 50 °C. A la fin de la réaction, du méthanol a été additionné au mélange pour précipiter les SiNPs-AS_*x*. Enfin, la solution a été centrifugée pendant 5 minutes à 4000 rpm pour récupérer les SiNPs-AS_*x*. Puis, celles-ci ont été séchées pendant une semaine à 40 °C dans une étuve.

3.4.3.2. Préparation des suspensions W-SLN, W-SLN-SiNPs et W-SLN-SiNPs-AS

Les nanoparticules lipidiques solides (SLN) de cette série ont été préparées à partir d'une graisse alimentaire, le Witocan® P. La suspension **W-SLN** a été obtenue par ultrasonication à chaud d'une émulsion huile/eau où l'huile est le Witocan® P fondu. Pour cela, le gras et l'eau ultra pure ont été chauffés séparément à 60 °C au bain-marie. Ensuite, la quantité appropriée de gras fondu a été ajoutée au milieu aqueux, de 0,5 à 3 % en volume (% V/V), par rapport à la phase aqueuse. Puis, le mélange a été soumis 2 min aux ultrasons à l'aide d'une sonde à ultrasons (Bandelin sonopuls, HD2200, 47% puissance). Finalement, l'émulsion chaude huile/eau a été refroidie à température ambiante sous agitation lente afin de permettre la solidification du Witocan® P.

Concernant la formulation des suspensions **W-SLN-SiNPs** et **W-SLN-SiNPs-AS**, le protocole de formulation suivi est globalement le même que celui venant d'être décrit, excepté que les particules de silice brutes ou hydrophobes sont dispersées, au préalable, par ultrasonication (2 min, 47 % puissance) dans la phase aqueuse chauffée avant l'ajout de Witocan® P fondu à 60 °C.

3.4.4. Techniques de caractérisation

3.4.4.1. Détermination de la taille des suspensions formulées

La distribution en taille et les diamètres hydrodynamiques (D_H) des suspensions de type **PL-SLN** et **E/PL-SLN/E** ont été mesurés par diffusion dynamique de la lumière (*Diffusion Light Scattering* DLS) en utilisant un Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical) avec une détection multi-angles à 13°, 90° et 173° (*Multi-Angle Dynamic Light Scattering* MADLS®). Les D_H ont été mesurés aux trois angles et les résultats sont présentés comme la moyenne d'au moins trois mesures.

Concernant les suspensions **W-SLN, W-SLN-SiNPs** et **W-SLW-SiNPs_AS** préparées à partir de Witocan® P, leur distribution en taille et les D_H ont été mesurés en utilisant un appareil Malvern 3000 HSA Zetasizer à un angle de détection de 90°. Ces suspensions ont été diluées 100 fois avec de l'eau distillée afin de prévenir l'effet de diffusion multiple. Les mesures ont été effectuées à 20 °C puis à 50 °C après 20 min d'incubation sous agitation lors de l'étude de la stabilité à la température. Pour les analyses réalisées à 50 °C, la valeur de la viscosité de l'eau a été paramétrée à 0,547 $mPa.s^{-1}$ dans le logiciel de l'appareil. Car selon la loi de Stokes-Einstein, la valeur du D_H dépend de la viscosité du milieu continu, donc l'eau dans ce cas.

3.4.4.2. Détermination du potentiel Zeta

La charge de surface (ou potentiel Zeta), des suspensions de SLN de type **PL-SLN-CC** et **E/PL-SLN-CC/E**, a été mesurée en utilisant aussi le Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical). Les échantillons ont été préparés dans une solution de NaCl à 10 mM afin d'assurer une conductivité d'au moins 1 mS/cm et le pH a été ajusté à la valeur de 3 ou de 7, selon les besoins de l'étude, avec une solution de HCl ou de NaOH à 0,1 M.

3.4.4.3. Analyse thermogravimétrique (ATG)

La quantité d'acide stéarique (AS) adsorbée sur les particules de silice (SiNPs), a été déterminée par ATG en utilisant une thermobalance Netzsch STA 449F1. Cette technique d'analyse consiste à suivre les pertes en masse de matière en fonction de la température sous atmosphère contrôlée. Ainsi, environ 10 mg de chaque échantillon ont été chauffés à 5 $°C.min^{-1}$ sous flux d'air jusqu'à 800 °C afin d'atteindre la complète décomposition de l'AS.

La quantité d'AS adsorbée sur les particules de silice est calculée classiquement par une différence entre la masse initiale et la masse finale restante

3.4.4.4. Cryo-microscopie électronique en transmission (cryo-TEM)

Une gouttelette de la suspension **W-SLN** ou **W-SLN-SiNPs-AS** a été déposée sur une grille en cuivre recouverte d'une membrane de carbone hydrophobe. La grille a été ensuite plongée dans de l'éthane liquéfié grâce à l'azote liquide puis rapidement transférée sur le support cryogénique et insérée dans la colonne à vide du microscope électronique. Les échantillons ont été analysés sur un microscope de chez JEOL 2100F (S) fonctionnant à 200 kV et équipé d'un spectromètre EELS (GatanTridiem) et d'un détecteur EDX (Si-Li).

3.4.4.5. Microscopie confocale à balayage laser (MCBL)

Afin d'observer les suspensions **W-SLN** et **W-SLN-SiNPs-AS** par MCBL, les particules de SiNP-AS ont été 'marquées' par le TR-DHPE et la suspension W-SLN a été teintée par le NBD-PC. Les caractéristiques de ces deux sondes fluorescentes sont données dans la partie 3.4.1. de ce chapitre. Le protocole de marquage utilisé a été le suivant : les deux sondes fluorescentes ont été diluées individuellement dans du chloroforme à une concentration de 0,04 $mg.mL^{-1}$. Puis, de manière générale, 12,5 µL de la solution de TR-DHPE a été ajoutée à 2,5 mL d'une solution de SiNPs-AS à une concentration de 0,5% massique, chauffée à 60 °C puis dispersée à l'aide d'une sonde à ultrasons (2 min, 47% de puissance). Séparément, 100 µL de la solution de NBD-PC ont été ajoutés à 2,5 mL d'une dispersion de Witocan® P à une concentration de 1% (V/V) et également fondu à 60 °C, puis dispersés à l'aide d'une sonde à ultrasons (2 min, 47% de puissance). Finalement, toujours à chaud, les 2,5 mL de la suspension marquée de SiNPs-AS ont été ajoutés aux 2,5 mL de la pré-émulsion de Witocan® P marquée sous ultrasons (2 min, 47 % puissance).

L'observation des échantillons au microscope confocale est directement faite après le dépôt d'une gouttelette de la suspension marquée à analyser (W-SLN ou W-SLN-SiNPs-AS) sur une lame en verre après avoir dilué 10 fois l'échantillon à observer. Les images de MCBL prises sur ces échantillons ont été obtenues avec le modèle de microscope Leica TCS SP5-X AOBS. La taille des images en pixel carré est de 512 x 512 avec un grossissement x40 (ouverture numérique = 0,8). Cela correspond à une image de 112 x 112 µm. Les émissions de fluorescence ont été enregistrées avec l'adjonction d'un diaphragme de détection (Airy 1). Chaque canal a été acquis séquentiellement. Les images ont été traitées avec Image J.

3.4.5. Détermination de l'efficacité d'encapsulation de la curcumine (CC)

L'efficacité d'encapsulation (EE) de la curcumine dans les suspensions de SLN de type **PL-SLN-CC** et **E/PL-SLN-CC/E** a été quantifiée après formulation en utilisant un module d'ultrafiltration d'un volume de 100 mL. Le mode opératoire consistait à laver par ultrafiltration, sous un flux d'azote à une pression de 4 bar, 0,2 mL de suspension de SLN avec 75 mL d'eau ultra pure. Le filtre utilisé était une membrane de cellulose régénérée de 10 kDa MWCO (*MolecularWeight Cut Off*). Puis, le rétentat (= fraction retenue par la membrane) a été dissous dans du dichlorométhane avant d'être analysé par spectrophotométrie (Perkin-Elmer Lambda 1050 UV-Vis-proche IR). La quantité de curcumine encapsulée a été calculée grâce à une courbe d'étalonnage établie par spectrophotométrie à une longueur d'onde d'absorption de 418 nm pour la CC pure dissoute dans du dichlorométhane (Figure 4).

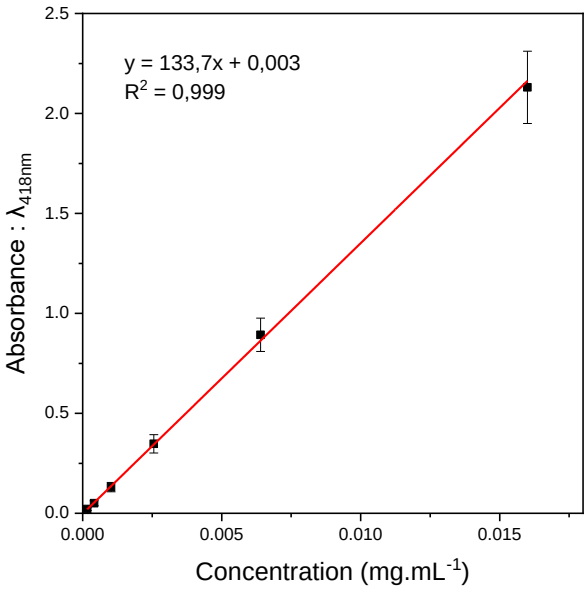


Figure 4. Courbe d'étalonnage établie à la longueur d'onde d'absorption de 418 nm pour une solution de curcumine dissoute dans le dichlorométhane.

L'efficacité d'encapsulation de la CC (EE %) a été calculée à partir de l'équation 3. Ce pourcentage correspond au rapport de la *quantité de curcumine encapsulée*, valeur obtenue après ultrafiltration et analyse spectrophotométrique, sur la *quantité totale de CC* initialement mise dans la formulation.

$$EE\ \% = \frac{Quantité\ de\ curcumine\ encapsulée\ (mg)}{Quantité\ totale\ de\ curcumine\ (mg)} \times 100 \qquad \text{Equation 3}$$

3.4.6. Libération de la CC en conditions gastro-intestinales simulées

L'étude de la libération de la curcumine a été réalisée dans des milieux gastro-intestinaux simulés, selon les conditions modèles proposées par Minekus *et al.*[49] La composition des solutions mères d'électrolytes utilisées pour préparer le fluide gastrique simulé (**FGS**) et le fluide intestinal simulé (**FIS**) est indiquée dans le Tableau III.

Tableau III. Conditions de préparation des solutions mères d'électrolytes des fluides gastrique (FGS) et intestinal (FIS) simulés. *valeurs indiquées pour 400 mL de solutions. Voir ref.[43] pour plus de détails.

Produits	**Sol. Mère**	**FGS sol. Electrolytes (pH 3)**		**FIS sol. Electrolytes (pH 7)**	
	mol.L^{-1}	Vol. prélevé* mL	**[Conc.] mmol.L^{-1}**	Vol. prélevé* mL	**[Conc.] mmol.L^{-1}**
KCl	0,5	6,9	8,6	6,8	8,5
KH_2PO_4	0,5	0,9	1,1	0,8	1,0
$NaHCO_3$	1	12,5	31,3	42,5	106,3
NaCl	2	11,8	59,0	9,6	48,0
$MgCl_2(H_2O)_6$	0,15	0,4	0,2	1,1	0,4
$(NH_4)_2CO_3$	0,5	0,5	0,6	-	-
Ajuster pH					
HCl	6	1,3	19,5	0,7	10,5

De manière générale, la libération de la curcumine à partir des suspensions **PL-SLN-CC** et **E/PL-SLN-CC/E**, a été effectuée en deux étapes successives. L'une des suspensions de SLN a été dispersée en premier lieu dans le milieu **FGS** et laissée sous agitation durant 2 h à 37 °C. Ensuite, l'ensemble du milieu FGS (ou chyme gastrique) est versé dans le milieu **FIS** et laissé 2 h supplémentaires sous agitation à 37 °C. Ainsi, le test de libération a duré 4 h au total. Le détail du protocole est le suivant : la formulation de SLN à tester est mélangée, comme indiqué dans le Tableau IV, avec la solution mère d'électrolytes **FGS** et une solution de $CaCl_2$. Puis quelques µL de HCl sont ajoutés afin d'ajuster le pH à 3 et enfin le volume total est complété à 20 mL par de l'eau pure. Le pH de la solution est suivi par pH-métrie et maintenu à 3 pendant les 2 h de la première phase de libération en milieu FGS. Puis, le chyme est directement mélangé avec la solution mère d'électrolytes **FIS** contenant la pancréatine, le sel de $CaCl_2$ et la quantité d'eau nécessaire pour ajuster le volume total à 40 mL. Pendant cette

deuxième partie du test, le milieu FIS est ajusté et maintenu à pH 7 par l'ajout d'une solution de NaOH. Dans chaque milieu de libération, les SLN sont incubées sous agitation constante à 250 rpm et 37 °C.

Tableau IV. Conditions imposées pour les tests de libération de la CC hors des SLN en milieu FGS et FIS. (*****) préparée avec la solution mère de FIS. (**#**) aussi appelé Chyme Gastrique.

PRODUITS	**Volume (mL)**	**Volume (mL)**
Formulation SLN	8,00	-
Solution mère d'électrolytes FGS	9,10	-
FGS après 2h de libération (#)	-	20,00
Solution mère d'électrolytes FIS	-	11,00
$CaCl_2$ (0,3 M)	0,005	0,040
HCl (1M) (pour ajuster pH à 3)	0,20	-
NaOH (1M) (pour ajuster pH à 7)	-	0,150
Solution de Pancréatine (*) (enzyme avec une activité de 105 $U.mL^{-1}$)	-	5,00
H_2O	Pour compléter à V_{total} = 20,00 mL	Pour compléter à V_{total} = 40,00 mL

Afin de quantifier la CC libérée de chacune des émulsions, 1/20 du milieu de libération (soit 1 mL pour FGS et 2 mL pour FIS) a été prélevé et remplacé par un volume équivalent de fluide simulé frais, du FGS dans la 1ère étape et du FIS dans la 2ème. Chaque prélèvement a ensuite été passé dans le système d'ultrafiltration en appliquant le protocole précédemment détaillé, pour déterminer par spectrophotométrie, la quantité de curcumine restant dans les SLN.

3.5. Résultats : Influence du procédé de formulation sur la localisation des phospholipides (PL)

3.5.1. Caractérisation physico-chimique des formulations de type PL-SLN et E/PL-SLN/E

Les suspensions de nanoparticules solides lipidiques de palmitate de cétyle, **PL-SLN** et **PL-SLN-CC**, ont été préparées par diffusion/évaporation de solvant suivi par une étape d'ultrasonication. D'après les mesures effectuées par DLS (Tableau V), les deux suspensions, préparées à titre comparatif sans et avec CC, présentent une distribution en taille mono-disperse, PDI < 0,2 (***P**oly**D**ispersity**I**ndex*). Les valeurs des diamètres hydrodynamiques (D_H) sont respectivement centrées sur 177 ± 5 nm pour la suspension PL-SLN sans CC et 188 ± 3 nm pour la suspension PL-SLN avec CC. On peut noter que la présence de la curcumine influence très peu le processus de formation des SLN par cette voie puisque la différence de taille est faible. Le même constat est fait pour les suspensions **E/PL-SLN/E** et **E/PL-SLN-CC/E** préparées à partir d'une double émulsion E/H/E car les valeurs de D_H sont très proches malgré la présence de CC et respectivement centrée sur 499 ± 41 nm et 490 ± 22 nm (PDI ≤ 0,3). Cependant, d'après ces résultats, on constate qu'à quantité égale en CP et PL dans chacune des formulations, le mode de préparation influence davantage la taille des SLN. En effet, le D_H des SLN obtenus par la double émulsion (E/PL-SLN-CC/E) est environ 2,5 fois supérieur au D_H mesuré pour les SLN préparés par simple émulsion (PL-SLN-CC). Cependant, la présence de différents émulsifiants à l'interface des SLN pourrait également influencer la taille des suspensions. De plus, l'efficacité d'encapsulation (EE %) de la curcumine semble aussi dépendre de la stratégie de formulation (Tableau V) puisque les SLN obtenues par simple émulsion (PL-SLN-CC) retiendraient 46,8 ± 3,1 % de la CC initialement formulée alors que les SLN réalisées par double émulsion (E/PL-SLN-CC/E) en contiendraient 61,9 ± 1,8 %.

D'autre part, afin de déterminer l'influence de la stratégie de formulation sur l'effet de confinement des phospholipides dans les SLN, des mesures de potentiel Zeta (PZ) ont été réalisées. L'hypothèse de départ est que comme la charge de surface des SLN de CP est neutre et que seuls les PL contenus dans la source de lécithine sont chargés, si les suspensions PL-SLN ou E/PL-SLN/E, avec et sans CC, présentent une valeur de potentiel Zeta non nulle, cela signifierait qu'au moins une partie des PL n'est pas encapsulée. Ainsi, le potentiel Zeta des suspensions PL-SLN-CC et E/PL-SLN-CC/E a été mesuré dans les deux conditions de pH

gastro-intestinal, c'est-à-dire à pH 3 et pH 7 (Tableau V). A titre comparatif, des liposomes de PL, extraits du jaune d'œuf, ont également été réalisés par hydratation de film fin et mesurés par cette technique (voir chap. II section 2.4.2). Les liposomes de PL présentaient une valeur de PZ de -11,3 ± 0,4 mV à pH 3 et de -35,3 ± 1,0 mV à pH 7.

Concernant la suspension de PL-SLN-CC, les valeurs de PZ relevées dans les deux conditions de pH sont de -10,6 ± 0,5 mV à pH 3 et de -33,1 ± 0,6 mV à pH 7. Ces résultats sont très similaires à ceux mesurés pour les liposomes de PL. Cela semble indiquer que pour la suspension PL-SLN-CC, les PL sont présents en surface des nanoparticules lipidiques. Cela pourrait être expliqué par le fait que cette formulation a été préparée à chaud à partir d'une simple émulsion où le mélange d'ester gras (CP), de PL et de CC dissous dans le THF, a été injecté dans l'eau ; et donc il semble raisonnable de supposer qu'une partie des PL peut diffuser à l'interface CP fondu/eau pour la stabiliser ou les PL formeraient des liposomes en solution. Effectivement, Garcia-Fuentes *et al.*[50] rapportent que la lécithine formerait des micelles mixtes avec le tensioactif en suspension lors de leur utilisation en tant qu'émulsifiant pour stabiliser une suspension de SLN. Cependant, Schubert *et al.*[51] ne rapportent pas la présence de micelles mixtes mais la présence d'une couronne composée de lécithine et du tensioactif autour des SLN.

La suspension E/PL-SLN-CC/E obtenue par double émulsion, quant à elle, présente à pH 3 et 7, des valeurs de potentiel Zeta proches de zéro et inférieures à celles mesurées pour les liposomes seuls, à savoir -2,6 ± 0,7 mV à pH 3 et -5,5 ± 0,6 mV à pH 7. Ces valeurs indiquent fortement une faible concentration en PL à la surface des SLN formulées par cette voie. Car, malgré la présence du P123 qui est un tensioactif non ionique utilisé pour stabiliser les SLN dans l'eau (voir 3.4.2.2. de ce chapitre), la présence de PL en surface des SLN ou dans des micelles mixtes (P123/PL) en solution aurait néanmoins été détectée. Ainsi, comme supposé au moment du choix de cette stratégie, la formulation par une double émulsion paraît donc plus efficace pour encapsuler les PL au cœur des SLN que la formulation par simple émulsion. Cependant, pour confirmer l'efficacité de la stratégie de formulation par double émulsion, une suspension de SLN de CP stabilisée par du P123, a également été préparée selon le protocole de formulation de la suspension de type PL-SLN (émulsion simple). Le rapport molaire CP/P123 correspond à celui de la formulation E/PL-SLN/E. Cette suspension présente des valeurs de potentiel Zeta semblables à celles de la suspension E/PL-SLN-CC/E à pH 3 (-2,1± 0,3 mV vs -2,6 ± 0,7 mV) et à pH 7 (-5,1 ± 0,9 mVvs et -5,5 ± 0,6 mV). Ces données confirment ainsi l'hypothèse que les valeurs de potentiel Zeta de E/PL-SLN-CC/E

sont bien dues à la présence du tensioactif non-ionique en surface des particules de SLN et non pas à des PL. Par ailleurs, il a été vérifié par la mesure des PZ à pH 3 et 7, que les micelles de P123 ne masquent pas la tête polaire des PL. Pour cela, une solution de P123/PL a été préparée au même rapport molaire que celui utilisé pour la formulation de la suspension E/PL-SLN-CC/E. Les mesures de potentiel Zeta révèlent des valeurs de -15,0 ± 0,2 mV à pH 3 et de -38,1 ± 0,2 mV à pH 7, ce qui correspond aux résultats obtenus pour les liposomes de PL. L'encapsulation d'au moins une partie des molécules de PL au cœur des SLN dans le cas de la formulation par double émulsion est ainsi fortement confirmée par l'ensemble de ces données. Néanmoins, en termes de quantité de PL encapsulée dans le SLN, les résultats obtenus restent qualitatifs.

3.5.2. Test de digestion *in vitro* pour suivre la dégradation enzymatique des PL encapsulés

Pour mettre davantage en évidence l'encapsulation des chaînes de PL au cœur des SLN de **PL-SLN-CC** et **E/PL-SLN-CC/E**, une étude de dégradation enzymatique des phospholipides a été réalisée *in vitro*, dans des milieux gastro-intestinaux simulés selon le protocole de Minekus *et al.*[49] (Figure 5). L'hypothèse émise est qu'en présence de pancréatine, les PL en surface des SLN devraient être digérées et provoquer la déstabilisation de la suspension colloïdale ainsi que la libération de la CC. C'est pourquoi, chaque formulation a été incubée successivement à 37 °C dans un fluide gastrique simulé (FGS à pH 3) durant 2 h, puis 2 h supplémentaires dans un fluide intestinal simulé (FIS à pH 7, sans et avec pancréatine). L'étude de libération a duré 4 h au total et la CC a servi de sonde afin de suivre le processus de dégradation enzymatique. Pour cela, le suivi de la libération de la curcumine a nécessité l'ultrafiltration de 4 prélèvements effectués tout au long du test *in vitro* à 1 h, 2 h 3 h et 4 h, comme indiqué sur la Figure 5. De cette manière, la teneur relative en CC restée à l'intérieur des SLN a été déterminée grâce à l'analyse spectrophotométrique du retentât dissous dans le dichlorométhane (voir 3.4.5 de ce chapitre). La Figure 5 présentée ci-dessous, compare les intensités d'absorption relatives, A/A_0 (en %), correspondant à la CC restée dans les SLN (n = 3) pour les deux formulations, **PL-SLN-CC** et **E/PL-SLN-CC/E**, en présence ou non d'enzymes (enz = pancréatine). L'intensité A_0 est déterminée à partir d'un prélèvement effectué à T0.

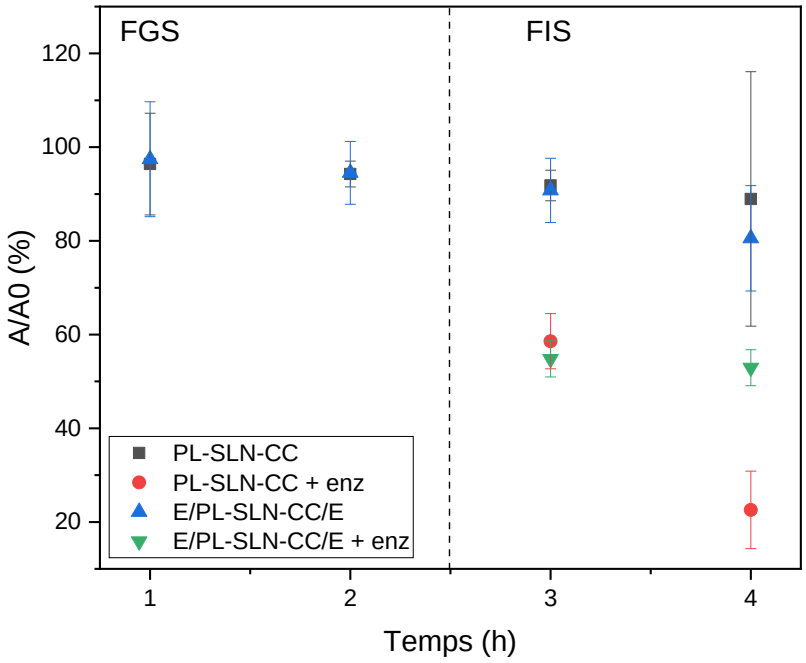


Figure 5. Comparaison des intensités d'absorption relatives, A/A_0 (en %), de la CC retenue dans les formulations. Les valeurs calculées pour chaque prélèvement effectué au cours du test *in vitro* : après 1 h et 2 h dans le fluide gastrique simulé (FGS) puis après 3 h et 4 h dans le fluide intestinal simulé (FIS), pour **PL-SLN-CC** sans (■) et avec pancréatine (enz) (●) et pour **E/PL-SLN-CC/E** sans (▲) et avec pancréatine (enz) (▼).

Ces résultats montrent que la libération de la curcumine à partir des deux types de formulation est faible dans les milieux FGS et FIS sans enzyme. Effectivement, après 2 h dans le FGS, seulement 6 % de la curcumine ont été libérés hors des formulations. Après 2 h dans le FIS, en l'absence d'enzyme, 20 % de la curcumine sont extraits de la suspension PL-SLN-CC et seulement 11 % de la dispersion de E/PL-SLN-CC/E. En revanche, l'ajout de pancréatine dans le milieu FIS, a un impact significatif sur la libération de la curcumine hors de la suspension PL-SLN-CC. Pour cette dernière, après seulement 1 h d'incubation dans le milieu FIS en présence de pancréatine (voir Figure 5 point à 3 h), 41 % de la curcumine sont libérés. La quantité relarguée augmente à 77 % après 2 h (voir Figure 5 points à 4 h). En revanche, la cinétique de libération de la curcumine est différente pour la suspension **E/PL-SLN-CC/E** dans le milieu FIS contenant de la pancréatine. Car, on constate que 45 % de la curcumine encapsulée sont relargués après 3 h de libération, où un plateau serait atteint car 47 % de la curcumine sont libérés après 4 h de libération.

D'après ces résultats (Tableau V), il est clairement visible que la cinétique de libération de la CC hors des deux types de suspensions est différente en présence d'enzymes puisque la

suspension **PL-SLN-CC** relargue davantage de CC. Cela peut être expliqué par le fait que si les phospholipides sont localisés à la surface des SLN, ils sont plus accessibles pour la pancréatine, et donc plus facilement digérés. En comparaison, pour la suspension **E/PL-SLN-CC/E** incubée dans le milieu FIS en présence de pancréatine, le phénomène de libération de la CC est diminué, corroborant l'hypothèse que les PL seraient davantage localisés à l'intérieure des SLN, comme semblait l'indiquer les mesures de potentiel Zeta discutées précédemment. Par ailleurs, on notera également que la suspension **E/PL-SLN-CC/E** libère peu de CC lors de l'incubation en milieu FGS, et aussi qu'elle favoriserait une libération prolongée dans le milieu FIS (avec enzyme). Car après 4 h de test, environ 50 % de CC est toujours retenue dans les SLN.

Le Tableau V présenté ci-dessous, résume les données expérimentales réunies pour les différents types de suspensions réalisées dans le cadre de cette étude.

Tableau V. Résumé des caractéristiques dimensionnelles (D_H), physiques (potentiel Zeta à pH 3 et 7), l'efficacité d'encapsulation de la CC (EE %)[#] mesurée après formulation et % de CC restant dans les SLN* après 4h de test de libération en présence de pancréatine, pour les formulations indiquées.

Formulations :	**D_H (nm)**	**Potential Zeta (mV)**		**EE (%) en CC[#]**	**% CC restant***
		pH 3	pH 7		
PL-SLN	177 ± 5	-10,6 ± 0,5	-33,1 ± 0,6	-	-
PL-SLN-CC	188 ± 3	-10,9 ± 0,2	-35,3 ± 0,8	46,8 ± 3,1	~ 20
CP-P123	-	-2,1± 0,3	-5,1 ± 0,9	-	-
E/PL-SLN/E	499 ± 41	-2,6 ± 0,7	-5,5 ± 0,6	-	-
E/PL-SLN-CC/E	490 ± 22	-4,7 ± 0,3	-5,3 ± 0,2	61,9 ± 1,8	~ 50
PL/P123	-	-15,0 ± 0,2	-38,1 ± 0,2	-	-

A l'issue de cette étude et de l'ensemble des résultats venant d'être discuté, il semblerait donc que la formulation de suspensions colloïdales E/PL-SLN-CC/E réalisée par une double émulsion E/H/E, serait une bonne stratégie pour encapsuler simultanément des lipides amphiphiles (les phosphatidylcholines) et une molécule bioactive (CC) dans une matrice lipidique.

En résumé, garder une efficacité d'encapsulation constante jusqu'à l'intestin atteint de RCH, et donc limiter la libération prématurée des principes actifs par la digestion enzymatique, est un critère incontournable dans la formulation de systèmes de délivrance par voie orale. C'est pourquoi, la discussion des résultats préliminaires qui vont être présentés dans cette deuxième partie, porte sur l'étude de la formulation de SLN de Witocan® P, stabilisés par effet de Pickering grâce à des nanoparticules de silice.

3.6. Résultats : Stabilisation d'une interface solide/liquide par des nanoparticules solides

3.6.1. Modification et caractérisation des nanoparticules de silice (SiNPs)

3.6.1.1. 'Hydrophobisation' des particules SiNPs

Les particules de silice (●) sont constituées de dioxyde de silicium (SiO_2) en leur cœur et d'une densité variable de groupe hydroxyles (**●-OH**) en surface. Cette composition chimique est à l'origine du caractère polaire et donc hydrophile, de ce type de particules inorganiques. C'est pourquoi, à l'état brut, les particules de silice sont peu efficaces pour stabiliser par effet de Pickering, une interface eau/huile dans une émulsion. Les particules auront une plus forte affinité pour la phase aqueuse que lipidique. Il est rapporté dans la littérature, que l'adsorption d'acide oléique,[48,52] de tensioactifs,[53] ou la conversion des fonctions silanols en liaisons siloxane,[46] et le greffage d'hexamethyldisilazane[54] en surface des particules, sont quelques stratégies pour augmenter ou moduler l'hydrophobicité de ces particules. Les particules de silice ainsi modifiées peuvent avoir un vrai rôle d'émulsifiant solide et stabiliser tantôt une émulsion directe H/E ou inverse E/H.[54]

Dans le cadre de cette étude, l'hydrophobicité de particules de silice pyrogénées (SiNPs) a été modulée par l'adsorption d'acide stéarique (AS) en surface, selon des rapports massiques AS/SiNPs variables, s'échelonnant de 0,1 à 2, comme présenté dans le Tableau VI. La quantité d'AS adsorbée (Figure 6 A) sur les particules inorganiques a été calculée à partir des masses résiduelles relevées sur les thermogrammes obtenus par analyse thermogravimétrique (ATG). La Figure 6 B représente les courbes pour les particules nues et les particules modifiées aux rapports massiques AS/SiNPs de 0,1 à 2. Après interprétation des données (Figure 6 A), on constate que la quantité totale d'AS adsorbée sur les particules de silice augmente de façon non-linéaire de 3,5 % à 40,5 % massique où une valeur seuil semble

atteinte. Ce comportement d'adsorption est bien en accord avec l'augmentation des valeurs du rapport AS/SiNPs. Par contre, la valeur seuil pourrait indiquer que la couverture maximale de la surface des particules de silice soit atteinte (Figure 6 A).

D'autre part, l'augmentation progressive du caractère hydrophobe des SiNPs avec l'adsorption d'AS, semble être visible sur les thermogrammes (Figure 6 B). En effet, pour les particules de silice brutes, seulement un phénomène de désorption de l'eau est observé à 100 °C. Cela est typique des matériaux hydrophiles inorganiques. Pour les particules de silice modifiées, l'étape de désorption de l'eau (à 100 °C) disparait progressivement avec l'augmentation d'AS adsorbé. Les particules devenant plus hydrophobes, le phénomène spontané de sorption de l'eau est moins important. Cela se manifeste par la disparition du point d'inflexion de la courbe autour de 100 °C.

Tableau VI. Échantillons de particules de silice (SiNPs) fonctionnalisées par l'acide stéarique (AS) à différents rapports massiques AS/SiNPs

Echantillons	**AS/SiNPs** ***(g/g)***
SiNPs	-
SiNPs-AS_0,1	0,1:1
SiNPs-AS_0,2	0,2:1
SiNPs-AS_0,4	0,4:1
SiNPs-AS_0,6	0,6:1
SiNPs-AS_0,8	0,8:1
SiNPs-AS_2	2:1

De plus, deux étapes de dégradation sont visibles pour les échantillons préparés aux rapports massiques de 0,6 et 2. Une première perte de masse est visible entre 200 °C et 300 °C, suivie d'une seconde entre 300 °C à 500 °C. Vílchez *et al*.[55] ont également observé ce comportement thermique avec de l'acide oléique adsorbé à la surface de nanoparticules de silice. Ils ont interprété le phénomène comme provenant de la formation de multicouches d'acide gras autour des particules. Dans notre cas, ce comportement de dégradation thermique pourrait alors indiquer qu'à partir d'une quantité d'AS de 26 % massique (AS/SiNPs = 0,6), les chaînes d'AS adsorbées s'organiseraient également en multicouches.

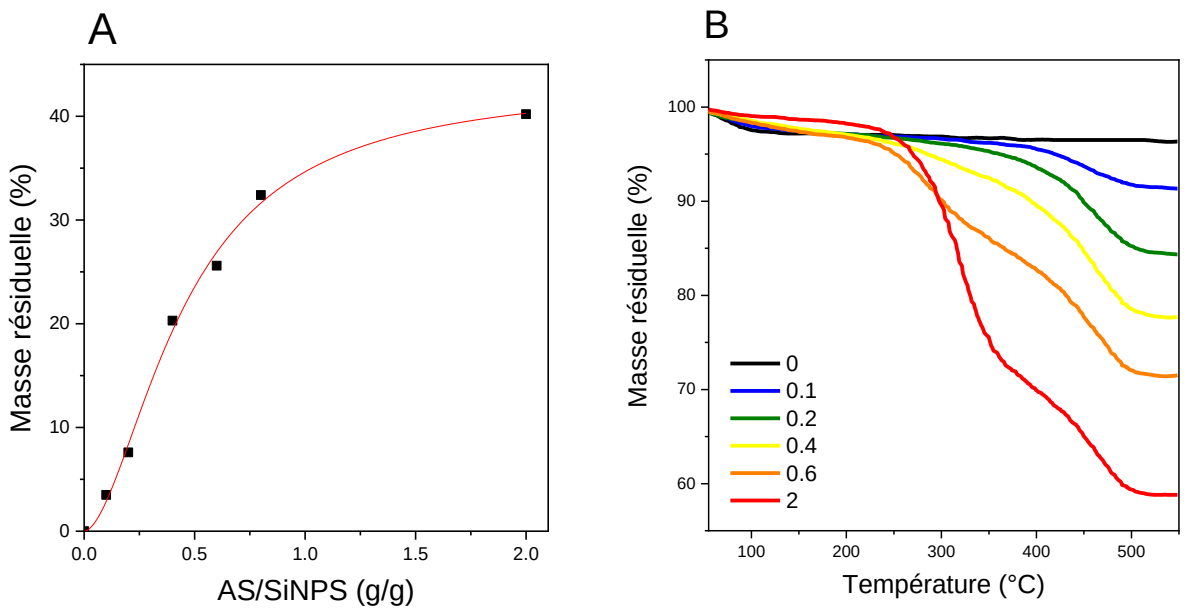


Figure 6. (A) Représentation graphique du % massique d'AS adsorbé sur chaque échantillon de particules modifiées, (B) Courbes thermogravimétriques obtenues pour des particules de silice nues (0 ou SiNPs) et modifiées par de l'acide stéarique (AS) à des rapports massiques AS/SiNPs variables : *0,1* ; *0,2* ; *0,4* ; *0,6* ; *2*.

3.6.1.2. Caractérisation des particules SiNPs hydrophobes

La Figure 7 compare les distributions en taille mesurées par DLS pour les suspensions de particules de silice nues (SiNPs) et les particules modifiées au ratio massique de 0,1 (SiNPs-AS_0,1). D'après ces données, on constate que l'allure de la distribution en taille est très similaire et que le D_H, mesuré à la largeur à mi-hauteur du maximum (LMH) de chaque pic, est de 250 nm pour les deux suspensions. La modification des particules nues par 3,5 % d'AS adsorbé, ne semble pas avoir changé significativement la taille des SiNPs brutes, indiquant que la couche d'AS est probablement très fine.

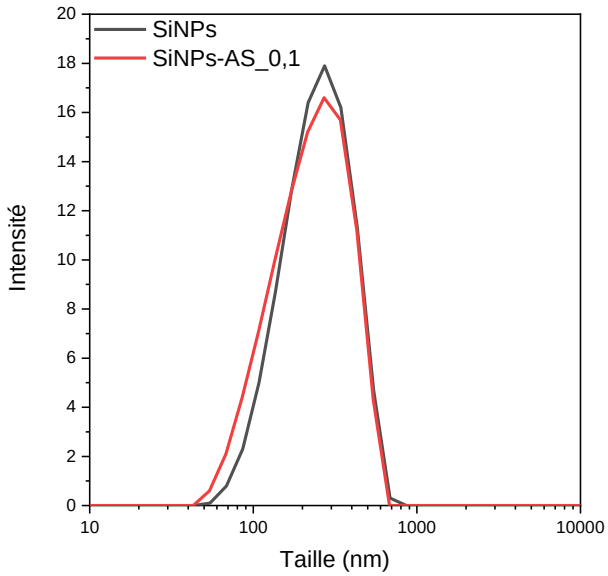


Figure 7. Comparaison entre la distribution en taille des particules de silice nues, SiNPs (—) et modifiées par de l'acide stéarique au rapport massique AS/SiNPs de 0,1, AS-SiNPs_0,1 (—).

Enfin, après modification de particules SiNPs par l'AS, il a été constaté visuellement qu'au-dessus du ratio massique AS/SiNPs de 0,2, les suspensions SiNPs-AS étaient fortement agrégées dans l'eau. En revanche, les suspensions préparées à un pourcentage massique de 0,5 % avec les particules modifiées à 0,1 et 0,2, étaient stables pendant 12 jours. Par conséquence, les particules hydrophobes SiNPs-AS_0,1 et SiNPs-AS_0,2, ont été sélectionnées pour stabiliser des SLN formées à partir de Witocan® P par l'effet de Pickering.

3.6.2. Formulation des nanoparticules lipidiques solides à base de Witocan® P

Le Witocan® P (W) est un mélange de triglycérides de qualité alimentaire à base d'huile de palmiste avec une température de fusion autour de 34-36 °C. Comme expliqué par la Figure 8, après l'étape 'd'hydrophobisation' des particules SiNPs, le procédé d'émulsion à chaud (60 °C, sous ultrason) a permis de disperser le W fondu dans la suspension aqueuse de SiNPs-AS_*x* (avec *x* = 0,1 ou 0,2). La suspension finale, nommée W-SiNPs-AS, a été obtenue après le refroidissement et le durcissement des gouttelettes de W.

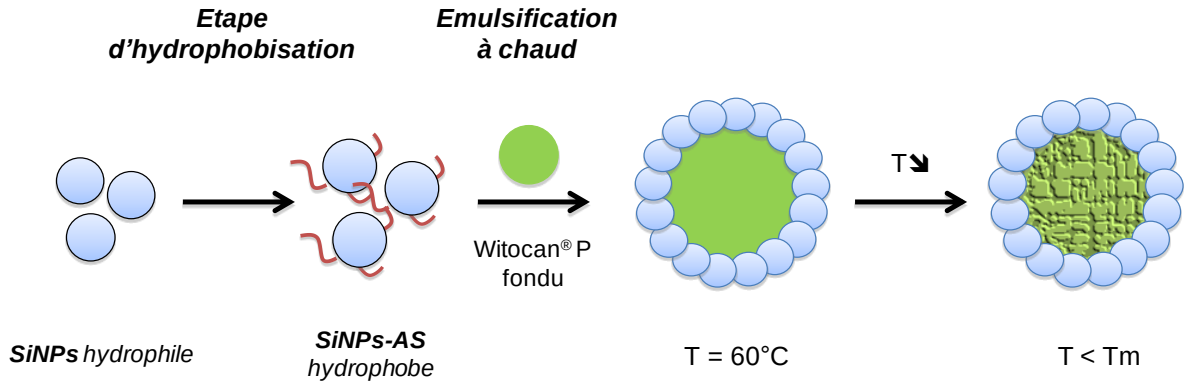


Figure 8. Représentation schématique de la formation des particules solides lipidiques (SLN) stabilisées par des particules de silice hydrophobes.

3.6.3. Étude de stabilité des suspensions W-SiNPs-AS_*x*

Plusieurs suspensions de W-SiNPs-AS_*x* ont été préparées afin de déterminer la meilleure composition pour obtenir une suspension stable. Le Tableau VII résume les différentes compositions étudiées en faisant varier de manière systématique la quantité d'émulsifiant solide, *i.e.*, les particules de silice, et de Witocan® P dont les pourcentages volumiques choisis s'échelonnent entre 0,5 et 3 %. Ainsi, trois séries de suspensions W-SiNPs-AS se distinguent dans le Tableau VII en fonction de l'émulsifiant solide utilisé : *SiNPs*, *SiNPs-AS_0,1* et *SiNPs-AS_0,2*. Le pourcentage massique en particules hydrophobes dans l'émulsion a été varié entre 0,5 et 5 % pour SiNPs-AS_0,1 ou entre 0,5 et 2,5 % pour SiNPs-AS_0,2 ; seulement 0,5 % pour les particules nues (SiNPs).

La stabilité des formulations préparées pour cette étude a été estimée visuellement par comparaison avec une suspension de W formulée avec des particules de silice nues (W-SiNPs_0,5). Les formulations stables après 24 h de repos statique à température ambiante sont marquées en vert (✓) et les suspensions jugées instables en rouge (✗), dans le Tableau VII.

Tableau VII. Résumé de la stabilité des formulations **W-SiNPs-AS_x**, matérialisées par (✗ et ✓) après 24h de repos à température ambiante. Appréciation visuelle en fonction de la proportion massique (% m) en particules de silice nues (SiNPs) ou hydrophobes (SiNPs-AS_x), et du % volumique en Witocan® P (*dans l'émulsion à chaud).

Type de particules SiNPs	**SiNPs (% massique dans l'émulsion)**	**Witocan® P (% V/V dans l'émulsion)***					
		0,5	**0,75**	**1**	**1,5**	**2**	**3**
SiNPs	**0,5**	✗	✗	✗	✗	✗	✗
SiNPs-AS_0,1	**0,5**	✓	✓	✓	✓	✓	✗
	1	✓	✓	✓	✓	✓	✗
	2,5	✓	✓	✓	✓	✗	✗
	5	✓	✓	✓	✗	✗	✗
SiNPs-AS_0,2	**0,5**	✓	✓	✓	✓	✗	✗
	1	✓	✓	✓	✗	✗	✗
	2,5	✓	✓	✗	✗	✗	✗

Après 24 h de repos statique, il a été observé que 0,5 % en masse de particules de silice nues (SiNPs) ne permettent pas de stabiliser les SLN de W, quelque soit la quantité de Witocan® P mise initialement dans l'émulsion à chaud. Une destabilisation par agrégation et crémage a été observée. En revanche, l'émulsifiant solide SiNPs-AS_0,1 utilisé jusqu'à 1 % en masse permet de stabiliser des suspensions colloïdales de SLN contenant jusqu'à 2 % (en volume) de W. Néanmoins, l'augmentation de la quantité en particules hydrophobes de 2,5 à 5 %, oblige à diminuer jusqu'à 1 % V/V la proportion de W pour obtenir des suspensions stables. D'autre part, l'augmentation à 0,2 ; du rapport massique x = AS/SiNPs sur les particules de silice, ne permet pas de stabiliser autant de W qu'à x = 0,1. Les particules de type SiNPs-AS_0,2, stabilisent au mieux jusqu'à 1,5 % de W alors que les particules SiNPs-AS_0,1 permettent d'incorporer jusqu'à 2 % de W à faible concentration en particules. Parmi toutes les suspensions étudiées, la plus stable est constituée de 0,5 % en V/V de Witocan® P et de 0,5 % en masse de SiNPs-AS_0,1. Un suivi de la stabilité au temps long a indiqué que cette formulation, notée ($W_{0.5}$-SiNPS-AS_0,1), est stable jusqu'à 3 semaines.

De manière générale, cette étude de stabilité des suspensions de SLN de W, semble démontrer que la polarité de la surface des particules de silice doit bien être diminuée pour

stabiliser une suspension lipidique de W. Pour autant, l'augmentation de la teneur en AS sur les particules, de $x = 0,1$ à $x = 0,2$ ne favorise pas l'incorporation de W. La même tendance est observée lorsque la concentration en émulsifiant solide hydrophobe est augmentée ; puisque le phénomène d'agrégation est amplifié. Aussi, pour le reste de l'étude seule la suspension colloïdale $W_{0.5}$-SiNPS-AS_0,1 sera considérée.

3.6.4. Effet des SiNPs modifiées sur la taille des suspensions de SLN

La distribution en taille de la suspension colloïdale **$W_{0.5}$-SiNPs-AS_0,1** contenant donc 0,5 % en volume de lipides et 0,5 % en masse de SiNPs-AS_0,1 a été obtenue par DLS (Tableau VIII). Ces données ont été comparées avec les valeurs de D_H mesurées pour les suspensions de particules de silice brutes (**SiNPs**), de **SiNPs-AS_0,1** et de 0,5 % V/V de Witocan® P stabilisé par SiNPs non modifiée (**$W_{0.5}$-SiNPs**). Les analyses de DLS ont été effectuées le jour de la préparation des suspensions. Comme mentionné précédemment, les particules SiNPs et SiNPs-AS_0,1 ont un D_H équivalent, d'environ 250 nm. Peu stable, la suspension colloïdale $W_{0.5}$-SiNPs, présente une distribution de taille multimodale centrée sur deux tailles ; l'une autour de 200 nm et l'autre de 1 μm, environ. Il est difficile d'être catégorique sur la nature des particules en suspension, puisque 200 nm peut aussi bien correspondre à des particules de silice hydrophobes (ou des SiNPs nues résiduelles) qu'à des nanoparticules solides lipidiques de W. Ces 'objets' en suspension coexistent soit avec des particules lipidiques d'un diamètre proche du micromètre (916 nm) soit avec des agrégats de SLN de W d'une taille inférieure. Néanmoins, en gardant la même teneur en W et en émulsifiant hydrophobe dans la suspension $W_{0.5}$-SiNPs-AS_0,1, que dans $W_{0.5}$-SiNPs, on peut observer la conservation de la taille de la première population à 179 nm et une diminution de la taille de la seconde population à 635 nm. Étant donné que la composition est la même et que seul le type de particules SiNPs a changé, ce résultat laisse penser que les particules hydrophobes permettent de diminuer la taille de la seconde population de SLN (ou d'agrégats). Par diffusion de lumière, il est impossible de différencier les nanoparticules des agrégats. Cependant, il est reconnu pour une émulsion de Pickering, que l'augmentation de la quantité de particules solides diminue la taille des gouttelettes d'huile jusqu'à une augmentation limite du rapport particule/huile[56,57]. Dans notre cas, la présence de particules de silice hydrophobes favoriserait la formation de plus petites gouttelettes d'huile, lors de la formulation à chaud et/ou limiterait la coalescence de ces gouttelettes avant la cristallisation du lipide[39] permettant ainsi d'obtenir une suspension de SLN d'une taille inférieure. Ces résultats sembleraient alors indiquer la formation d'une émulsion de Pickering lors de la formulation à chaud.

Tableau VIII. Distributions en taille des particules de silice brutes (SiNPs) ou modifiées (SiNPs-AS-0,1) comparées aux SLN de lipide (W) stabilisées par les particules de silice non-modifiées (W0.5-SiNPs) ou modifiées (W0.5-SiNPs-AS-0,1).

Ech.	**SiNPs**	**SiNPs-AS 0.1**	**$W_{0.5}$-SiNPs**	**$W_{0.5}$-SiNPs-AS_0,1**
D_H	250± 17 nm	253 ± 9 nm	204 ± 20 nm 916 ± 115 nm	179 ± 11 nm 635 ± 104 nm

3.6.5. Effet de la température sur la stabilité des émulsions de Pickering

L'effet de l'augmentation de la température sur la taille des suspensions colloïdales a été étudié comparativement par DLS sur deux suspensions de SLN : **$W_{0.5}$-SiNPs** et **$W_{0.5}$-SiNPs-AS_0,1**. Il s'agit de mettre en évidence la capacité de stabilisation des nanoparticules de silice hydrophobes par effet de Pickering lorsque la température de la suspension passe de 20 °C à 50 °C, soit 15 °C au-dessus de la température de fusion du Witocan® P. Avant chaque mesure, les suspensions ont été homogénéisées aux deux températures, pendant 20 min sous agitation.

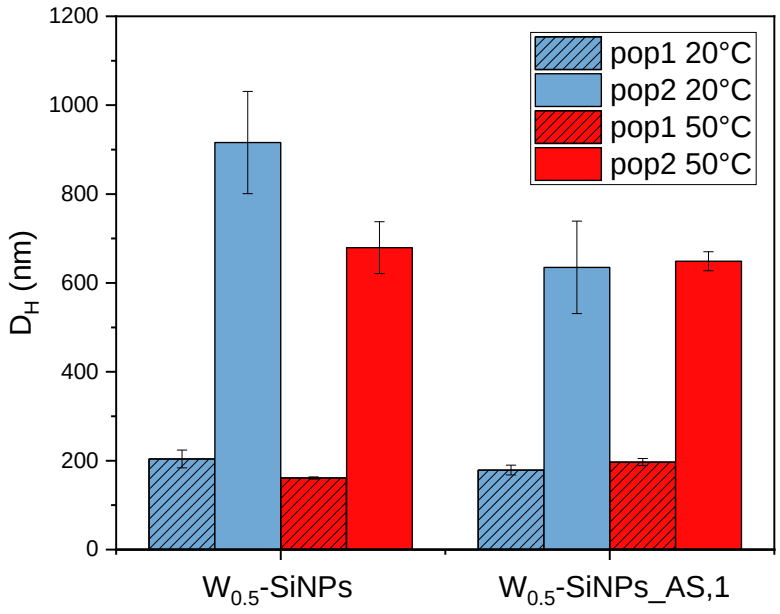


Figure 9. Représentation des D_H mesurés par DLS pour : les SLN stabilisées par les particules de silice brutes (**$W_{0.5}$-SiNPs**), et pour les SiNPs hydrophobes (**$W_{0.5}$-SiNPs-AS_0,1**). Analyses comparatives faites à **20 °C** (bleu) et **50 °C** (rouge) pour chaque suspension. La distribution en taille est prédominée par deux tailles moyennes qui ont été reportées dans ce graphique (**pop1** & **pop2**).

Les valeurs de D_H relevées pour chaque suspension sont représentées par la Figure 9. D'après les résultats, on constate qu'à 20 °C la suspension de $W_{0.5}$-SiNPs présente deux tailles de particules à environ 200 et 900 nm de diamètre. Le D_H diminue à 680 nm environ, après la mise en température de la suspension à 50 °C. La diminution du D_H observée à 50 °C pourrait être attribuée à une désagrégation des SLN en suspension à l'état liquide ou au crémage des plus grosses gouttelettes d'huile. Pour autant, la stabilisation à chaud des SLN de W par les particules de SiNPs nues, semble préserver la suspension de tous phénomènes d'agrégation ou coalescence du W fondu ; puisqu'une diminution plutôt qu'une augmentation en taille a été observée. L'hypothèse que l'effet de Pickering connu pour stabiliser une interface liquide/liquide, puisse jouer ici un rôle dans la stabilisation paraît se confirmer. D'autant plus, que l'effet de Pickering semble plus marqué lorsque les particules de silice sont hydrophobes. Car dans le cas de la suspension $W_{0.5}$-SiNPs-AS_0,1, aucune des deux populations présentes dans cette suspension ne subit une variation en taille avec l'augmentation de la température. En effet, les valeurs de D_H mesurées se maintiennent à environ 200 et 600 nm, quelle que soit la température de la suspension.

3.6.6. Caractérisation morphologique des suspensions colloïdales par MCBL et cryo-MET

Dans le but de visualiser la répartition des particules de silice modifiées par l'acide stéarique (AS) sur les SLN de Witocan® P (W-SLN), la suspension colloïdale **$W_{0.5}$-SiNPs-AS_0,1** a été observée par Microscopie Confocal à Balayage Laser (MCBL). Cette technique d'observation a nécessité le marquage de l'échantillon par deux sondes fluorescentes ayant une longueur d'onde d'émission différente : le TR-DHPE (λ_{em} = 615 nm) pour l'AS et le NBD-PC (λ_{em} = 533 nm) pour le W-SLN. Les photons de fluorescence des colorants respectifs sont filtrés et collectés séparément par deux canaux. De ce fait, sur les images de MCBL présentées dans la Figure 10, le Witocan® P apparaît en vert (canal 1) et les particules de silice modifiées SiNPs-AS_0,1 apparaissent en rouge (canal 2). La superposition de la fluorescence enregistrée pour les deux canaux donne une couleur orange (canaux 1 + 2) révélant ainsi la co-localisation des particules de silice hydrophobisées SiNPs-AS_0,1 et de W-SLN.

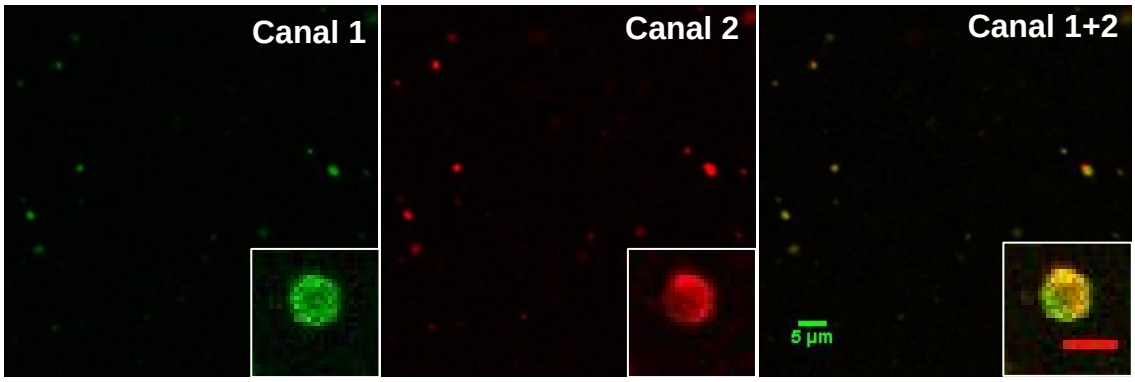


Figure 10. Images de MCBL obtenues pour la suspension W0,5-SiNPs-AS_0,1. Le canal 1 représente le Witocan® P marqué en vert ; le canal 2 représente les particules de silice hydrophobes marquées en rouge ; le dernier canal est la superposition des canaux 1 et 2. Encart, Zoom sur une particule : barre d'échelle en rouge = 3 µm.

La limite de résolution du MCBL ne permet pas d'obtenir une information fine de l'arrangement des particules sur les particules de SLN. C'est pourquoi, une visualisation par cryo-microscopie électronique en transmission (cryo-MET) a été faite sur deux types de suspension. La Figure 11 correspond aux images prises pour les suspensions de 0,5 % V/V de Witocan® P nue (**$W_{0.5}$-SLN,** Figure 11 A), et SLN stabilisées par les particules hydrophobes, $W_{0.5}$-SiNPs-AS_0,1 (Figure 11, B et C).

Les SLN de Witocan® P sans émulsifiant présentent une forme plutôt sphérique mais avec un aspect feuilleté semblable à la morphologie d'un chou ou d'une rose. Cela proviendrait de la cristallisation en lamelles des triglycérides composant le Witocan® P. En effet, au refroidissement, la cristallisation peut provoquer des contraintes dans les particules de graisse qui se fracturent en donnant ce type de morphologie. En présence de particules de silice hydrophobes (Figure 11 B), on confirme que la distribution en taille des SLN formées est polydisperse, comme déjà révélé par les mesures de DLS. On remarque également que les SLN présentent une forme arrondie aux bords plus réguliers avec des aspérités à la surface, certainement liées à l'adsorption des particules de silice. On peut aussi remarquer par le contraste électronique généré par la différence de densité électronique entre Witocan® P et les particules inorganiques, que les SiNPs hydrophobes sont dispersées par agrégats à la surface des SLN.

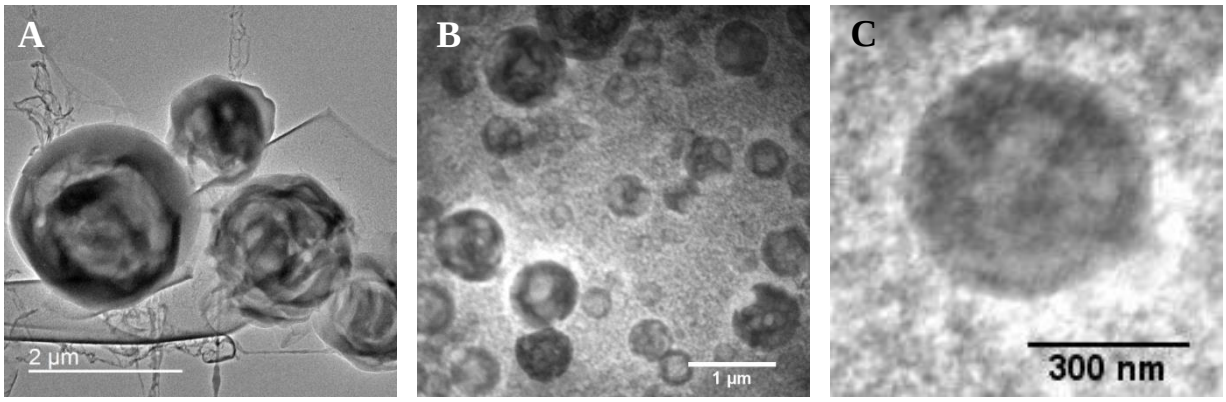


Figure 11. Images de cryo-microscopie électronique en transmission de (A) suspension de Witocan® P nue, (B) et (C) de la suspension $W_{0,5}$-SiNPs-AS-0,1.

L'association des analyses par microscopie confocale et électronique met bien en évidence que les particules de silice hydrophobes s'adsorbent à l'interface liquide/liquide au moment de la formulation à chaud et que celles-ci y restent une fois les SLN formés.

3.7. Conclusion

La première partie de ce chapitre a été consacrée à l'étude de l'influence de deux stratégies de formulation sur l'efficacité d'encapsulation de la curcumine et de confinement de phospholipides dans les SLN de palmitate de cétyle.

Ainsi, deux types de suspension de SLN ont été formulées, l'une par simple émulsion H/E et l'autre par double émulsion E/H/E. La caractérisation des suspensions par diffusion de lumière a révélé une différence significative de la distribution en taille des SLN qui sont 2,5 fois plus grandes lorsqu'elles sont obtenues par double émulsion (~500 nm contre ~200 nm). Une différence dans l'efficacité d'encapsulation a été corrélée avec la stratégie de formulation. Puisque par double émulsion, 62% de la curcumine initialement mise ont pu être encapsulés dans les SLN contre 47% par la voie de la simple émulsion.

D'autre part, la combinaison de la mesure du potentiel Zeta et l'étude de digestion enzymatique dans des milieux gastro-intestinaux a permis de mettre en évidence la localisation des PL dans les SLN. En effet, les résultats issus des analyses de PZ ont montré que les SLN formulées par double émulsion possèderaient très peu de PL en surface puisque la charge de surface mesurée était quasiment nulle. Cela est en adéquation avec les résultats du test *in vitro,* qui ont montré qu'en milieu intestinal simulé en présence de pancréatine, ce type de SLN peut retenir 50 % de la quantité de CC initialement encapsulée. Cela a été

attribué au fait que la lipolyse des chaînes de PL par la pancréatine est minimisée grâce au confinement des phospholipides au cœur des SLN.

Globalement, les résultats confirment l'hypothèse selon laquelle la formulation de SLN par une double émulsion où l'émulsion inverse eau/huile est stabilisée par les PL, favoriserait l'inclusion d'une partie des phospholipides au cœur de la particule lipidique solide. De plus, l'étude *in vitro* révèle aussi que cette suspension, qui est proche du système de libération théoriquement envisagé, permettrait une protection de la curcumine dans le milieu gastrique et une libération prolongée dans le milieu intestinal. Ces résultats montrent la capacité du système de délivrance cible à promouvoir le transport des molécules bioactives d'intérêts (curcumine et phosphatidylcholines) jusqu'au côlon afin qu'elles puissent exercer leur effet bénéfique en cas de RCH.

Néanmoins, dans les conditions physiologiques réelles, les particules lipidiques restent vulnérables. C'est pourquoi, dans la deuxième partie de ce chapitre, il s'agissait de formuler à chaud une suspension de SLN de Witocan® P stabilisées par un émulsifiant solide, à savoir des particules de silice. Habituellement, ce mode de stabilisation est basé sur l'effet de Pickering par lequel de nombreuses émulsions sont depuis élaborées pour les raisons déjà mentionnées. Cette étude a aussi été faite, pour mettre en évidence la réversibilité de l'effet de Pickering dans le cas d'une suspension de SLN thermosensible. C'est pourquoi, afin d'optimiser l'adsorption des particules de silice à l'interface lipide-eau, il a fallu en premier lieu les rendre plus hydrophobes par l'adsorption d'acide stéarique en surface. Puis, une étude de stabilité a permis de trouver la meilleure composition pour obtenir une suspension stable. Des différentes formulations réalisées, il en ressort que l'augmentation de la quantité d'émulsifiant solide ainsi que la quantité d'AS adsorbée sur celui-ci, semblent diminuer la quantitié de lipide pouvant être stabilisé. La formulation la plus stable (>3 semaines) est composée de 0,5% V/V de W et de 0,5% en masse de particules de silice modifiées par 3,5 % en masse d'acide stéarique. Cette dernière formulation a donc été analysée par microscopie confocale à balayage laser et en cryo-microscopie électronique en transmission. Les images MCBL révèlent une co-localisation des particules de silice hydrophobes sur les SLN de Witocan® P. En combinaison avec les images de cryo-MET, il a été observé que les particules de silice s'adsorbent sous forme d'agrégats à la surface des SLN de Witocan® P. Une étude de stabilité en température a également démontré que les particules de silice hydrophobes permettent de stabiliser l'interface liquide/liquide une fois la suspension de SLN fondue à

50 °C. La stabilisation par effet de Pickering semble donc réversible dans le cas d'une suspension thermosensible.

Le développement d'un tel système de délivrance semble prometteur pour augmenter la résistance du vecteur face aux lipases ou aux sels biliaires présents dans le système digestif.

3.8. Références

1. W. Stremmel, S. Staffer, M. J. Schneider, H. Gan-Schreier, A. Wannhoff, N. Stuhrmann, A. Gauss, H. Wolburg, A. Mahringer, A. Swidsinski, and T. Efferth, *J. Crohns Colitis*, **2017**, *11*, 1247.
2. A. Braun, I. Treede, D. Gotthardt, A. Tietje, A. Zahn, R. Ruhwald, U. Schoenfeld, T. Welsch, P. Kienle, G. Erben, W.-D. Lehmann, J. Fuellekrug, W. Stremmel, and R. Ehehalt, *Inflamm. Bowel Dis.*, **2009**, *15*, 1705.
3. R. Ehehalt, J. Wagenblast, G. Erben, W. -D. Lehmann, U. Hinz, U. Merle, and W. Stremmel, *Scand. J. Gastroenterol.*, **2004**, *39*, 737.
4. W. Stremmel, R. Ehehalt, S. Staffer, S. Stoffels, A. Mohr, M. Karner, and A. Braun, *Dig. Dis.*, **2012**, *30*, 85.
5. M. D. Joshi and R. H. Müller, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2009**, *71*, 161.
6. C. Ban, M. Jo, Y. H. Park, J. H. Kim, J. Y. Han, K. W. Lee, D.-H. Kweon, and Y. J. Choi, *Food Chem.*, **2020**, *302*, 125328.
7. C. Righeschi, M. C. Bergonzi, B. Isacchi, C. Bazzicalupi, P. Gratteri, and A. R. Bilia, *LWT - Food Sci. Technol.*, **2016**, *66*, 475.
8. J.-S. Baek and C.-W. Cho, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2017**, *117*, 132.
9. H. Hajj Ali, F. Michaux, I. S. Bouelet Ntsama, P. Durand, J. Jasniewski, and M. Linder, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **2016**, *118*, 1168.
10. H. Ji, J. Tang, M. Li, J. Ren, N. Zheng, and L. Wu, *Drug Deliv.*, **2016**, *23*, 459.
11. A. Beloqui, P. B. Memvanga, R. Coco, S. Reimondez-Troitiño, M. Alhouayek, G. G. Muccioli, M. J. Alonso, N. Csaba, M. de la Fuente, and V. Préat, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **2016**, *143*, 327.
12. M. Sharma, S. Sharma, and J. Wadhwa, *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.*, **2019**, *47*, 45.
13. D. Pandita, R. K. Khar, A. Ahuja, et al., *Pharmazie*, **2011**, 171.
14. M. J. Blanco-Prieto, M. Guada, V. Sebastian, S. Irusta, E. Feijoo, and M. del C. Dios-Vieitez, *Int. J. Nanomedicine*, **2015**, *10*, 6541.
15. M. Muchow, P. Maincent, and R. H. Müller, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **2008**, *34*, 1394.
16. M. Geszke-Moritz and M. Moritz, *Mater. Sci. Eng. C*, **2016**, *68*, 982.

17. W. Mehnert and K. Mäder, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2012**, *64*, 83.

18. S. Martins, A. C. Silva, D. C. Ferreira, and E. B. Souto, *J. Biomed. Nanotechnol.*, **2009**, *5*, 76.

19. M. García-Fuentes, D. Torres, and M. J. Alonso, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **2003**, *27*, 159.

20. D.-D. Kim, H.-J. Cho, J. W. Park, and I.-S. Yoon, *Int. J. Nanomedicine*, **2014**, *9*, 495.

21. P. K. Gaur, S. Mishra, M. Bajpai, and A. Mishra, *BioMed Res. Int.*, **2014**, *2014*, 1.

22. M. R. Aji Alex, A. J. Chacko, S. Jose, and E. B. Souto, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2011**, *42*, 11.

23. S. G. Padhye and M. S. Nagarsenker, *Indian J. Pharm. Sci.*, **2013**, *75*, 591.

24. M. Guada, A. Beloqui, M. Alhouayek, G. G. Muccioli, M. del C. Dios-Viéitez, V. Préat, and M. J. Blanco-Prieto, *Int. J. Pharm.*, **2016**, *503*, 196.

25. P. Ramalingam and Y. T. Ko, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **2016**, *139*, 52.

26. B. Sarmento, S. Martins, D. Ferreira, and E. B. Souto, *Int. J. Nanomedicine*, **2007**, *2*, 743.

27. S. Kim, R. Diab, O. Joubert, N. Canilho, and A. Pasc, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **2016**, *140*, 161.

28. S. Kim, M.-J. Stébé, J.-L. Blin, and A. Pasc, *J Mater Chem B*, **2014**, *2*, 7910.

29. H. Amekyeh, N. Billa, K.-H. Yuen, and S. L. S. Chin, *AAPS PharmSciTech*, **2015**, *16*, 871.

30. A. R. Madureira, D. A. Campos, P. Fonte, S. Nunes, F. Reis, A. M. Gomes, B. Sarmento, and M. M. Pintado, *RSC Adv.*, **2015**, *5*, 22665.

31. R. H. Müller, K. Mäder, and S. Gohla, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2000**, *50*, 161.

32. I. Katouzian, A. Faridi Esfanjani, S. M. Jafari, and S. Akhavan, *Trends Food Sci. Technol.*, **2017**, *68*, 14.

33. S. G. Nugent, D. Kumar, and D. F. Evans, *Gut*, **2001**, *48*, 571.

34. R. H. Müller, D. Rühl, and S. A. Runge, *Int. J. Pharm.*, **1996**, *144*, 115.

35. C. Olbrich, O. Kayser, and R. H. Müller, *Int. J. Pharm.*, **2002**, *237*, 119.

36. M. Wulff-Pérez, J. de Vicente, A. Martín-Rodríguez, and M. J. Gálvez-Ruiz, *Int. J. Pharm.*, **2012**, *423*, 161.

37. C. Ban, M. Jo, S. Lim, and Y. J. Choi, *Food Chem.*, **2018**, *239*, 442.

38. L. H. Higa, H. E. Jerez, M. A. de Farias, R. V. Portugal, E. L. Romero, and M. J. Morilla, *Nanomed.*, **2017**, *12*, 1165.

39. R. Aveyard, B. P. Binks, and J. H. Clint, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **2003**, *100*, 503.

40. M. Destribats, S. Gineste, E. Laurichesse, H. Tanner, F. Leal-Calderon, V. Héroguez, and V. Schmitt, *Langmuir*, **2014**, *30*, 9313.

41. B. P. Binks and S. O. Lumsdon, *Langmuir*, **2000**, *16*, 8622.

42. L. Bai, S. Lv, W. Xiang, S. Huan, D. J. McClements, and O. J. Rojas, *Food Hydrocoll.*, **2019**, *96*, 709.

43. M. V. Tzoumaki, T. Moschakis, E. Scholten, and C. G. Biliaderis, *Food Funct*, **2013**, *4*, 121.

44. A. Sarkar, S. Zhang, M. Holmes, and R. Ettelaie, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **2019**, *263*, 195.

45. P. E. Ruiz-Rodriguez, D. Meshulam, and U. Lesmes, *Food Biophys.*, **2014**, *9*, 406.

46. B. P. Binks and J. H. Clint, *Langmuir*, **2002**, *18*, 1270.

47. J.-L. Blin, J. Jacoby, S. Kim, M.-J. Stébé, N. Canilho, and A. Pasc, *Chem Commun*, **2014**, *50*, 11871.

48. V. O. Ikem, A. Menner, and A. Bismarck, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 8277.

49. M. Minekus, M. Alminger, P. Alvito, S. Ballance, T. Bohn, C. Bourlieu, F. Carrière, R. Boutrou, M. Corredig, D. Dupont, C. Dufour, L. Egger, M. Golding, S. Karakaya, B. Kirkhus, S. Le Feunteun, U. Lesmes, A. Macierzanka, A. Mackie, S. Marze, D. J. McClements, O. Ménard, I. Recio, C. N. Santos, R. P. Singh, G. E. Vegarud, M. S. J. Wickham, W. Weitschies, and A. Brodkorb, *Food Funct*, **2014**, *5*, 1113.

50. M. Garcia-Fuentes, D. Torres, M. Martín-Pastor, and M. J. Alonso, *Langmuir*, **2004**, *20*, 8839.

51. M. A. Schubert, M. Harms, and C. C. Müller-Goymann, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2006**, *27*, 226.

52. A. Sadeghpour, F. Pirolt, and O. Glatter, *Langmuir*, **2013**, *29*, 6004.

53. D. Lugo, J. Oberdisse, M. Karg, R. Schweins, and G. H. Findenegg, *Soft Matter*, **2009**, *5*, 2928.

54. Y. Chevalier and M.-A. Bolzinger, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.*, **2013**, *439*, 23.

55. A. Vílchez, C. Rodríguez-Abreu, J. Esquena, A. Menner, and A. Bismarck, *Langmuir*, **2011**, *27*, 13342.

56. J. Frelichowska, M.-A. Bolzinger, and Y. Chevalier, *J. Colloid Interface Sci.*, **2010**, *351*, 348.

57. S. Arditty, V. Schmitt, J. Giermanska-Kahn, and F. Leal-Calderon, *J. Colloid Interface Sci.*, **2004**, *275*, 659.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

La rectocolite hémorragique (RCH) fait partie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, dont les épisodes symptomatiques ont la particularité d'apparaître par intermittence avec des phases de rémission. Actuellement en France, le Vidal recommande différents traitements selon l'activité et les complications liées à la maladie. Cependant, la RCH est une maladie incurable ; actuellement le traitement a pour objectif d'atteindre et de maintenir la rémission. Cependant, l'efficacité des médicaments actuels reste modeste. De plus, ces traitements entraînent de nombreux effets secondaires, parfois graves. Dans ce contexte, un apport simultané en phosphatidylcholines (PC) exogènes et en curcumine (CC) semble être une combinaison prometteuse en vue de soulager les symptômes de la RCH. En effet, cette combinaison préviendrait à la fois du déficit en PC dans la couche de mucus du côlon et calmerait l'inflammation. Cependant, malgré leur fort potentiel thérapeutique, ces deux molécules souffrent d'une faible biodisponibilité après une administration par voie orale.

Dans ce contexte, deux objectifs sont développés dans ce mémoire. **Le premier** s'intéresse à l'étude des interactions entre la curcumine et des membranes modèles de phosphatydilcholine en bicouche et en monocouche. **Le second objectif** est de développer un système de délivrance, combinant l'encapsulation de curcumine et de phosphatydilcholine, au cœur de nanoparticules lipidiques solides (SLN) dont l'interface solide/liquide est stabilisée par des nanoparticules solides.

Ainsi, dans un premier temps, l'étude de l'interaction de la curcumine avec une bicouche de lécithine de soja, utilisée comme modèle de PC, a été menée par l'association de techniques expérimentales : de spectrophotométrie et de physico-chimie (film de Langmuir et Diffusion Dynamique de Lumière). Les données obtenues ont été corroborées par des calculs théoriques de modélisation moléculaire. Les résultats mettent en évidence le changement de conformation de la CC encapsulée dans la bicouche lipidique de PC, sous l'effet combiné du confinement et de la concentration en curcumine. En effet, d'après l'interprétation des spectres d'absorption et d'émission, en variant la concentration en CC, deux formes sont distinguées (céto et énol) dont l'équilibre tautomérique est déplacé vers la forme énol à plus forte concentration en curcumine. D'après les simulations théoriques, la forme céto de géométrie non-planaire, est davantage localisée au niveau des têtes polaires hydratées. Tandis que la forme énol, favorisée par sa géométrie planaire, s'insère plus facilement dans la membrane lipidique, à concentration élevée en curcumine.

Dans un second temps, les interactions dans un système ternaire de CC, PC et palmitate de cétyle (CP) ont été étudiées en monocouche, dit aussi film de Langmuir. Cette technique de caractérisation consiste à étudier le comportement du film sous compression en fonction de la composition du mélange ternaire. Les isothermes de compression permettent de calculer en tout rapport un paramètre thermodynamique qui est l'énergie de Gibbs du mélange. Les résultats de cette étude ainsi que les données de modélisation de dynamique moléculaire, montrent que la CC et le CP formeraient des complexes à l'interface air/eau. D'autre part, l'étude de la miscibilité entre la CC, le CP et le 1,2-dioléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (DOPC) révèle la présence de domaines de miscibilité favorisée par la balance hydrophile-hydrophobe du complexe.

Pour répondre au second objectif de ce mémoire, l'influence de la stratégie de formulation sur l'efficacité d'encapsulation de la CC et de phospholipides au cœur des SLN de palmitate de cétyle, a été étudiée. Pour cela, deux suspensions de SLN ont été formulées, la première par diffusion/évaporation (dif/évap) de solvant suivi par une étape de sonication et la seconde par double émulsion. Les mesures de diffusion dynamique de la lumière révèlent une taille 2,5 fois plus grande lorsque la suspension est obtenue par double émulsion (~ 500 nm contre ~ 200 nm par dif/évap). De plus, cette dernière stratégie de formulation permet une meilleure efficacité d'encapsulation de la CC (62 % contre 47 % par dif/évap). La combinaison de la mesure du potentiel Zeta et l'étude *in vitro* de digestion enzymatique dans des milieux gastro-intestinaux simulés (ou test de relargage), montrent que la formulation obtenue par double émulsion favoriserait davantage l'inclusion des phospholipides au cœur des SLN. L'étude *in vitro* indique également que cette dernière suspension permet de protéger la CC du milieu gastrique et offre une libération prolongée de la CC dans le milieu intestinal simulé.

Enfin, l'étude de la capacité des nanoparticules solides à stabiliser une interface solide/liquide a conduit à l'élaboration d'une suspension de particules lipidiques stable pendant au moins 3 semaines. Cette suspension a été obtenue à partir d'une émulsion directe à chaud stabilisée par effet de Pickering, grâce aux nanoparticules de silice hydrophobisées. L'étude de stabilité menée sur différentes formulations a permis de déterminer que la quantité de lipide pouvant être stabilisée en suspension, dépend à la fois de la quantité d'acide stéarique adsorbée sur les nanoparticules de silice et de la teneur en particules solides. Ainsi la formulation donnant une suspension stable est composée de 0,5 % V/V de Witocan®P et de 0,5 % en masse de nanoparticules de silice. La combinaison des images de microscopie confocale et des images de cryo-microscopie électronique en transmission a révélé que les

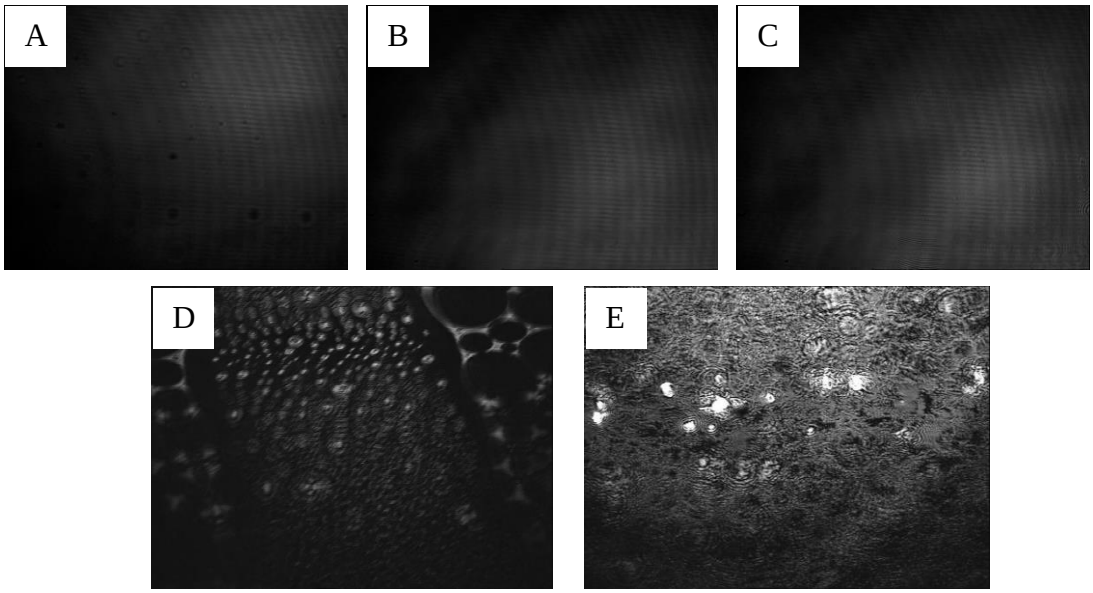
particules de silice s'adsorbent sous forme d'agrégats à la surface des SLN de Witocan®P. Une étude de la stabilité en température met également en évidence la réversibilité de l'effet de Pickering quant à la stabilisation de la suspension de SLN.

En conclusion, ce travail démontre que pour augmenter le taux de curcumine internalisée par des membranes cellulaires, il semblerait nécessaire d'atteindre une concentration en curcumine à partir de laquelle la molécule adopte la forme la plus perméable, à savoir la forme énol. Les résultats indiquent également que l'interaction de la curcumine avec la membrane est favorisée lorsque la CC forme un complexe de type phytolipide avec le palmitate de cétyle. Sur la base de ces résultats, un système de délivrance combinant l'encapsulation de curcumine et de phospholipides au cœur de particules solides lipidiques a été formulé. Ainsi, un tel système destiné à la délivrance des molécules d'intérêts par voie orale, permettrait alors d'augmenter la biodisponibilité de la curcumine et des phosphatidylcholines à la région enflammée du côlon. La capacité des nanoparticules solides à stabiliser un tel vecteur a également été démontrée.

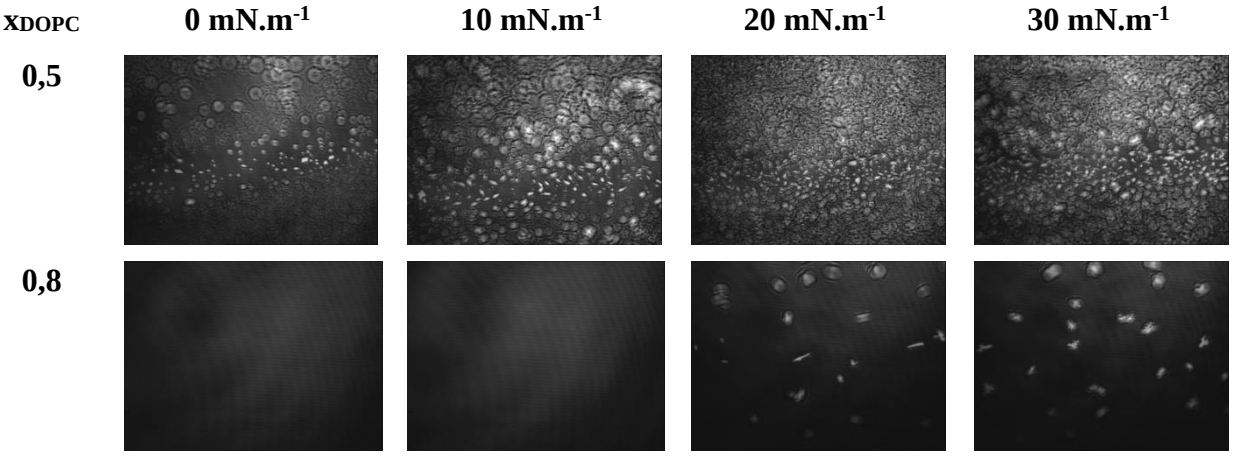
Néanmoins, quelques perspectives d'optimisation seraient à envisager afin de stabiliser le système de délivrance, obtenu par double émulsion, par des nanoparticules solides. Par exemple, il serait nécessaire d'augmenter la stabilité de la formulation dans le temps et la teneur en gras dans la suspension. Pour cela, l'exploration de nouvelles nanoparticules solides (*i.e.* nanocristaux de chitine), de nature, de taille ou de forme différentes, 'hydrophobisées' avec des polymères ou des acides gras possédant des longueurs de chaînes hydrophobes et des degrés d'insaturations variables, pourraient être une piste pour améliorer un tel système. Cela permettrait d'effectuer une étude plus comparative sur les performances d'encapsulation et de libération en milieu gastro-intestinal simulé, entre les formulations précédemment développées et les futures formulations stabilisées par des particules solides. Enfin, il serait intéressant d'étudier l'interaction et l'adhésion de ce nouveau vecteur sur des muqueuses modèles de RCH pour déterminer les paramètres bio-physiques prédominants et ainsi mieux prédire son comportement *in vivo* en situation de RCH.

Annexes

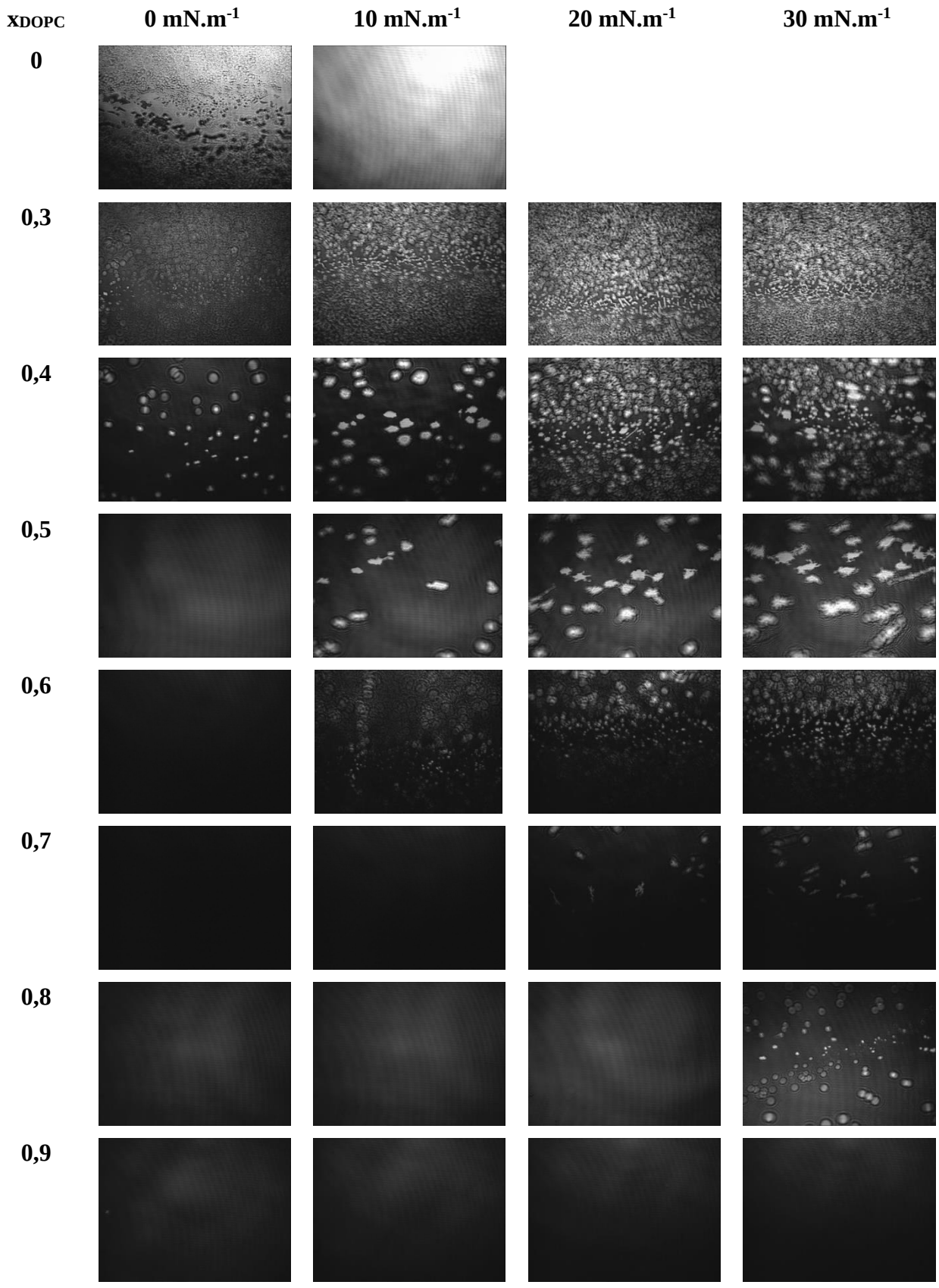
Annexes



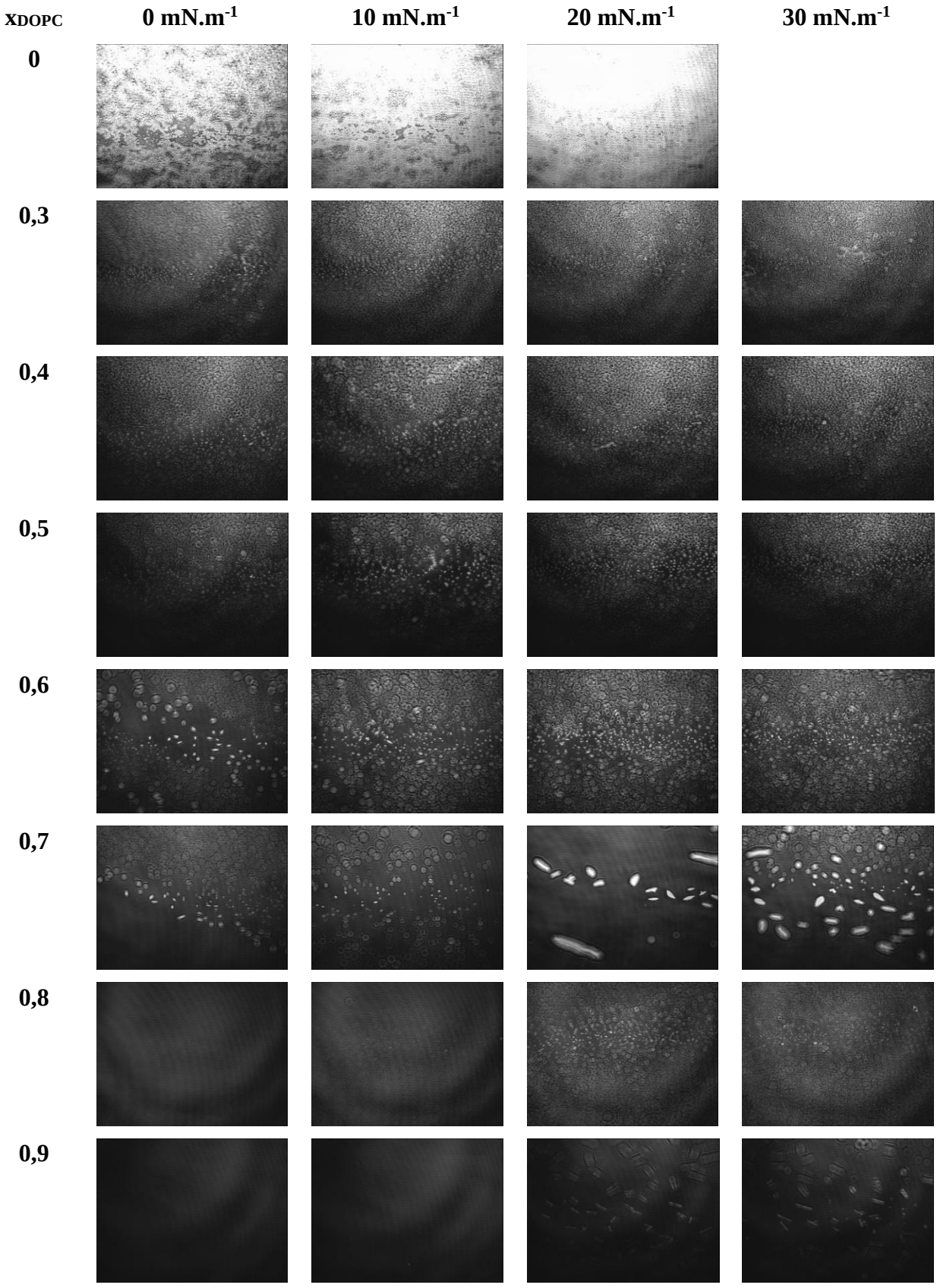
Annexe 1. Images de microscopie à angles de Brewster des composés purs DOPC, CC et CP. Température : 25 °C. DOPC (A-C) ; CC (D) et CP (E). Les images ont été obtenues à : Π (mN.m^{-1}) = 0 (A), 20 (B), 40 (C) ; 0 (D) ; 0 (E).



Annexe 2. Images de microscopie à angles de Brewster du mélange ternaire DOPC/CP/CC à différentes pressions de surface. Température : 25 °C. La fraction molaire de DOPC (x_{DOPC}) et la pression de surface (en mN.m^{-1}) sont annotées sur la figure.



Annexe 3. Images de microscopie à angles de Brewster du mélange ternaire DOPC/CP/CC à différentes pressions de surface. Température : 32 °C. La fraction molaire de DOPC (x_{DOPC}) et la pression de surface (en $mN.m^{-1}$) sont annotées sur la figure.



Annexe 4. Images de microscopie à angles de Brewster du mélange ternaire DOPC/CP/CC à différentes pressions de surface. Température : 18 °C. La fraction molaire de DOPC (x_{DOPC}) et la pression de surface (en $mN.m^{-1}$) sont annotées sur la figure.

Résumé

La rectocolite hémorragique (RCH) fait partie des Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI) et reste à ce jour incurable. Au-delà de l'administration d'anti-inflammatoires, dont la curcumine (CC) en présente les effets, une des voies à explorer est la réparation de la muqueuse intestinale par un apport exogène de phosphatidylcholine (PC) et de lysophophatidylcholine, déficitaires à plus de 70% chez les patients atteints de RCH. Pour répondre à cette problématique, nous nous sommes intéressés à la conception de systèmes lipidiques pour la voie orale permettant le transport simultané de CC et de PC. Nous avons exploré dans un premier temps la nature des interactions mises en jeu entre les deux principes actifs au sein de deux systèmes membranaires modèles, les bicouches liposomales et les monocouches (ou films de Langmuir). Il en ressort que l'équilibre céto/énolique de la curcumine et donc l'interaction avec la PC soit influencée par la concentration et le confinement. D'autre part, l'ajout d'un céride, le palmitate de cétyle, complexant la curcumine favoriserait, pour certaines compositions, la miscibilité avec la PC tout en rigidifiant le mélange ainsi obtenu.

Sur la base de ces résultats, nous avons réalisé des suspensions de particules solides lipidiques, tout en variant la méthodologie de formulation, diffusion-évaporation de solvant *vs* double émulsion et la nature du stabilisant, émulsifiants *vs* nanoparticules. La suspension obtenue par double émulsion s'avère être la plus efficace en termes d'encapsulation, de protection en milieu gastrique simulé et de libération prolongée des principes actifs dans un milieu intestinal simulé. Enfin, la capacité des nanoparticules solides à stabiliser l'interface solide/liquide des SLN, semblable à l'effet de Pickering, a aussi été démontrée.

L'ensemble de cette étude est une preuve de concept quant au potentiel des suspensions de nanoparticules lipidiques solides pour l'administration orale de curcumine et de phosphatidylcholine exogène.

Mots-clés : curcumine, phosphatidylcholine, film de Langmuir, vésicule, nanoparticules lipidiques solides, effet de Pickering

Abstract

Ulcerative colitis (UC) is an Inflammatory Bowel Disease (IBD) and it is still nowadays incurable. Beyond the administration of anti-inflammatory drugs, including curcumin (CC), one of the pathways to be explored is the repair of the intestinal mucosa by an exogenous supply of phosphatidylcholine (PC) and lysophophatidylcholine, which are over 70% deficient in patients with RH. To address this issue, we were interested in the design of lipid systems for the oral delivery and allowing the simultaneous carry of CC and PC. We first explored the nature of the interactions involved between the two active ingredients within two model membrane systems, liposomal bilayers and monolayers (or Langmuir films). It turns out that the keto/enol equilibrium of curcumin and therefore the interaction with PC is influenced by both concentration and confinement. On the other hand, the addition of a ceride, cetyl palmitate, complexing curcumin allows, for some compositions, the miscibility with PC while stiffening the as obtained mixture.

Based on these results, we formulated various dispersions of solid lipid particles, by varying the methodology of colloidal engineering, diffusion-solvent evaporation *vs* double emulsion and the nature of the stabilizer, emulsifiers *vs* nanoparticles. The suspension obtained by the double emulsion method appears as the most efficient in terms of encapsulation, protection in simulated gastric medium and sustained release of the active ingredients in a simulated intestinal medium. Finally, the ability of solid nanoparticles to stabilize the solid / liquid interface of SLNs, similar to the Pickering effect, has also been demonstrated.

The entire study is a proof of concept regarding the potential of solid lipid nanoparticle suspensions for the oral administration of curcumin and exogenous phosphatidylcholine.

Keywords: curcumin, phosphatidylcholine, Langmuir film, vesicles, solid lipid nanoparticles, Pickering Effect