Thèse présentée pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Strasbourg

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

Discipline : Chimie Physique

Soutenue publiquement le 30 Septembre 2010

Par Adeline CALLET

Administration orale d'insuline par double encapsulation : développement du système nanoparticulaire par coacervation complexe insuline / chitosane

---

Membres du jury

Directeur de thèse	**M. Yves FRERE** Chargé de Recherches Institut Charles SADRON - CNRS UPR 22, Strasbourg
Co-directeur de thèse	**Mme Séverine SIGRIST** Responsable de laboratoire (HDR) Centre Européen d'Etude du Diabète, Strasbourg
Rapporteurs externes	**Mme Christine VAUTHIER** Directeur de Recherches CNRS UMR 8612, Université Paris Sud, Châtenay-Malabry
	M. Jean-Pierre BENOIT Professeur INSERM U 646, Université d'Angers
Examinateur interne	**Mme Françoise PONS** Professeur CNRS UMR 7199, Université de Strasbourg
Examinateur externe	**M. Julien MEISSONNIER** Directeur R&D Catalent Pharma Solutions, Beinheim

«Dans les sciences, le chemin est plus important que le but. Les sciences n'ont pas de fin.»

Erwin Chargaff

Biochimiste autrichien (1905-2002)

Je remercie Monsieur Yves Frère de m'avoir accueillie dans son équipe et d'avoir dirigé cette thèse. Ces trois années passées à vos côtés m'ont permis d'apprendre énormément et de m'épanouir scientifiquement.

Je remercie chaleureusement Madame Séverine Sigrist d'avoir été ma co-directrice et pour son investissement dans ce travail. Plus qu'une co-directrice, tu as beaucoup compté au cours de ces trois années et sans ton aide, ce travail ne serait pas ce qu'il est devenu, je tenais à te le dire, merci encore.

Je remercie également la Région Alsace pour avoir financé ce travail et plus particulièrement Messieurs Robin et Guyot.

Je remercie les membres du jury de m'avoir fait l'honneur d'avoir accepté de juger ce travail : **Madame Christine Vauthier**, Directeur de Recherches à l'Université Paris Sud (CNRS UMR 8612), **Monsieur Jean-Pierre Benoît**, Professeur à l'Université d'Angers (INSERM U 646), **Madame Françoise Pons**, Professeur à l'Université de Strasbourg (CNRS UMR 7199) et **Monsieur Julien Meissonnier**, Directeur R&D chez Catalent Pharma Solutions (Beinheim, France).

Je remercie Monsieur Jean-François Legrand, directeur de l'Institut Charles Sadron, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

Un grand merci à Christian, pour ton travail mais également pour ton amitié. Sans ton aide, tout aurait été différent. Accepte ici toute ma reconnaissance et mon amitié.

Merci à tous les membres de l'Institut sans qui, je n'aurais pas passé d'aussi bonnes années, et plus particulièrement : Jean-Marc (dit Jean-Luc), toute l'équipe administrative (Philippe, Paule sans qui je n'aurais jamais pu partir en missions, Magali, Katia, Monique …).

Un grand merci à ceux qui ont su me lancer la bouée de sauvetage : François Schosseler, Alain Rameau, Nicole … et à ceux qui m'ont aiguillé quand mon grand ami le chitosane me faisait des misères : Alain Rameau, Joseph Selb, Odile Gavat, Michel Rawiso et Philippe Lorchat.

Je tiens également à remercier tous les membres de mon équipe pour leur aide précieuse et les bons moments passés ensemble : Gwen, Gauthier, Mathias, Fouzia, Natalia …

Audrey, je ne t'oublie pas. Nous avons, toutes les deux, passé des caps difficiles, mais cela nous a rendu plus fortes. Merci pour ton soutien et ton amitié.

Manu et Caro, je pense à vous aussi. Vous comptez toutes les deux beaucoup à mes yeux, merci pour votre aide, votre réconfort et les moments de détente (ah, les mots croisés du midi !!). Merci encore.

Je n'oublie pas non plus le Centre Européen du Diabète, vous m'avez accueillie les bras ouverts et même si je n'étais pas là aussi souvent que je l'aurais voulu, j'ai toujours passé d'agréables moments. Merci Nathalie(s), Allan, Will, Elodie, Pauline, Claudio, Akkiz, Stéphanie sans oublier Nico et Marjorie …

Ce travail ne serait pas ce qu'il est sans l'aide des stagiaires qui ont rythmé la vie du laboratoire : Rita, Yann, Charlotte, Anaïs …

J'ai eu la joie de pouvoir contribuer à la mise en place du Bureau des Jeunes Chercheurs de l'Institut. Merci de m'avoir confié cette responsabilité, merci à ces membres : Guillaume, Mathieu, Georges, Constantin, Johanna, Diana, Fred …

Je remercie chaleureusement mes parents, ma famille, mes amis pour leur soutien et pour m'avoir donné le courage d'en arriver jusque là.

Enfin, je ne pourrais terminer sans remercier une personne qui me tient à cœur, tu as été là dans les bons moments comme dans les moments difficiles. Tu as su rester à mes côtés pour me supporter. Merci pour tous ces moments de bonheur passés à tes côtés. Je te dédie cette thèse.

Merci.

Liste des abréviations

ATR : Atténuation Totale de la Réflectance

CL : Chitosane chlorhydrate

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

DCCT : Diabetes Control and Complications Trial

DDA : Degré de désacétylation

DID : Diabète insulino-dépendent

DNID : Diabète non-insulino-dépendant

DS : Degré de Substitution

G : Chitosane Glutamate

HA : Acide hyaluronique

ID : Intra-duodénal(e)

IRTF : InfraRouge à Transformée de Fourier

NOCC : N-,O-carboxyméthyl chitosane

NPH : Neutral Protamine Hagedorn

PEC : Complexes de polyélectrolytes

PLA : Acide polylactique

PLGA : Acide polylactique-co-glycolique

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

SC : Sous-cutané(e)

TGI : Tractus gastro-intestinal

Sommaire

Introduction générale **1**

Introduction bibliographique **5**

1. L'insuline 6
   1.1 Structure de l'insuline 8
2. Le diabète 9
   2.1 Insulinothérapie 13
   2.2 Différents types d'insulines développés par l'industrie pharmaceutique 16
      2.2.1 Origine de l'insuline 16
      2.2.2 Analogues de l'insuline 17
         2.2.2.1 Analogues ultrarapides de l'insuline 18
         2.2.2.2 Analogues lents de l'insuline 18
      2.2.3 Insuline humaine ordinaire ou rapide 19
      2.2.4 L'insuline NPH 19
      2.2.5 Mélanges d'insuline 20
      2.2.6 Développement d'une insuline concentrée 20
3. Autres voies d'administration de l'insuline 20
   3.1 La voie buccale / sublinguale 21
   3.2 La voie nasale 22
   3.3 La voie pulmonaire 23
   3.4 La voie oculaire 26
   3.5 La voie rectale 26
   3.6 La voie transdermique 27
   3.7 La voie orale 28
   3.8 Comparaison des différentes voies d'administrations 29
4. L'administration par voie orale 30
   4.1 Les contraintes chimiques 31
   4.2 Les contraintes physiques 32
   4.3 Les méthodes permettant de surmonter les contraintes physico-chimiques 34
      4.3.1 Les promoteurs d'absorption 34

4.3.2 Les inhibiteurs enzymatiques 35
4.3.3 Les systèmes mucoadhésifs à base de polymères 36
4.3.4 Les systèmes particulaires à délivrance ciblée 38
5. Les différentes techniques d'encapsulation 40
5.1 La gélation ionotropique 41
5.2 Le spray-dring 42
5.3 L'émulsion 43
5.3.1 L'émulsion simple (h/h ou h/e) 44
5.3.2 L'émulsion double (e/h/e) 44
5.4 La polymérisation interfaciale (polycondensation) 45
5.5 La séparation de phase ou coacervation 47
6. La coacervation complexe 52
6.1 Définition 52
6.2 Encapsulation de l'insuline par coacervation complexe 54
6.2.1 Physico-chimie de l'insuline 55
6.3 Choix du couple insuline / polyélectrolyte 57
6.3.1 Comparaison du chitosane et de l'acide hyaluronique 58
7. Le chitosane 59
7.1 Présentation du chitosane 59
7.2 Les modifications du chitosane 62
7.2.1 Approche chimique : modifications par liaisons covalentes 65
7.2.2 Approche ionique : salification du chitosane 67
8. Le vecteur pharmaceutique complexe 68
9. Les nanoparticules au sein du vecteur pharmaceutique complexe 70

Matériel et méthodes 71

1. Le chitosane 72
1.1 Caractérisation du chitosane 72
1.1.1 Détermination du degré d'acétylation par RMN du proton 72
1.1.2 Détermination du degré de désacétylation et du pKa par pHmétrie 72
1.2 Modifications du chitosane 73
1.2.1 Approche chimique 73
1.2.2 Approche ionique 75

1.3 Caractérisations des dérivés hydrosolubles du chitosane 76
1.3.1 Analyse par InfraRouge à Transformé de Fourier (IRTF) 76
1.3.2 Analyse par RMN du proton 76
1.3.3 Analyse par dosage pHmétrique et conductimétrique : détermination du degré de substitution 76
2. L'insuline 77
3. Formation de nanoparticules par la technique de coacervation complexe 78
3.1 Protocole de formation des nanoparticules chitosane / insuline 78
3.2 Lyophilisation des nanoparticules 80
3.3 Caractérisation des coacervats complexes 80
3.3.1 Taille (Diffusion Dynamique de la Lumière) 81
3.3.2 Potentiel zêta 81
3.3.3 Morphologie des nanoparticules 81
3.3.4 Efficacité d'encapsulation de l'insuline 81
3.4 Vieillissement des nanoparticules 83
4. Comportement des nanoparticules : études *in vitro* 83
4.1 Comportement des nanoparticules en milieux simulés 83
4.2 Etude de relargage 84
5. Effet hypoglycémiant des nanoparticules : études *in vivo* 84
5.1 Modèle de rat diabétique et induction du diabète 84
5.2 Vérification de la biofonctionnalité des nanoparticules 85
5.2.1 Administrations des nanoparticules par voie sous-cutanée 86
5.2.2 Administrations des nanoparticules par voie intra-duodénale 87
5.3 Détermination de la bioefficacité des nanoparticules 87

Chapitre I – Synthèse et caractérisation d'un dérivé hydrosoluble du chitosane 89

I. Modifications chimiques : carboxyméthylation du chitosane 95
I.1. Article 95
II. « Modifications ioniques » : salification du chitosane 116
II.1. Caractérisation des sels de chitosane 118
II.1.1. RMN du proton 118
II.1.2. Dosage pHmétrique 119
Conclusions du chapitre I 123

Chapitre II – Formation de nanoparticules par complexation de l'insuline 125

II.1. Conditions de formation des complexes 126
II.2. Formation de nanoparticules NOCC / insuline 130
II.2.1. Article 130
II.2.2. Résultats complémentaires : étude de l'influence du DDA et de la masse molaire du NOCC sur la formation des nanoparticules 148
II.3. Formation de nanoparticules sels de chitosane/insuline 158
II.3.1. Détermination de la zone de complexation par dosage turbidimétrique 158
II.3.2. Caractérisation des particules sels de chitosane / insuline 161
II.3.3. Caractérisation des particules CL 113 / insuline 162
II.3.3.1. Observations microscopiques 162
II.3.3.2. Taille et potentiel zêta des nanoparticules CL 113 / insuline 164
II.3.3.3. Efficacité d'encapsulation de l'insuline dans les nanoparticules CL 113 168
II.3.3.4. Stabilité des nanoparticules CL 113 / insuline 169
Conclusions du chapitre II 172

Chapitre III – Etude comparative *in vitro* et *in vivo* des nanoparticules 173

III.1. Etude *in vitro* des nanoparticules NOCC et CL 113 175
III.1.1. Comportement en milieux simulés 175
III.1.2. Etude de libération de l'insuline en milieux simulés 179
III.1.3. Lyophilisation des nanoparticules 181
III.2. Etude *in vivo* de l'effet hypoglycémiant des nanoparticules NOCC et CL 113 182
III.2.1. Injections sous-cutanées de nanoparticules non lyophilisées 182
III.2.2. Injections sous-cutanées de nanoparticules lyophilisées 184
III.2.3. Administrations intra-duodénales de nanoparticules 186
III.2.3. Détermination de la bioefficacité des nanoparticules 190
Conclusions du chapitre III 192

Conclusion générale et perspectives 195

Références bibliographiques 201

Annexes 217

Introduction générale

Qualifié par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) de « fléau du XXIe siècle », le diabète est une maladie chronique qui touche aujourd'hui plus de 280 millions de personnes dans le monde et près de 3 millions en France. Le terme « diabète » vient du grec *diabaínein*, dérivé du préfixe *dia-*, « à travers » et du verbe *baínein*, « traverser, passer ». Cette maladie tire son nom de ses symptômes typiques : la polydipsie (forte soif) et la polyurie (excrétion d'urine plus importante que la normale) et désigne un groupe de maladies métaboliques caractérisées par une hyperglycémie, résultant de défauts de la sécrétion et/ou de l'action de l'insuline [1]. Cette hyperglycémie est associée, à des degrés divers et par des mécanismes encore mal connus, à des complications à long terme, touchant en particulier les yeux, les reins, les nerfs, le cœur et les artères.

Il existe différents types de diabète, parmi lesquels les plus connus sont le diabète de type 1 dit « insulino-dépendant », qui nécessite un traitement par injections pluriquotidiennes d'insuline et le diabète de type 2 dit « non-insulino-dépendant », qui se traite en premier lieu par des mesures hygiéno-diététiques, puis si besoin, par la mise en place d'un traitement médicamenteux. Par la suite, des injections quotidiennes d'insuline peuvent s'avérer nécessaires au bon contrôle de la glycémie. Parmi les 280 millions de diabétiques dans le monde, 90 % des malades présentent un diabète de type 2 et 10 % un diabète de type 1.

Données épidémiologiques (Janvier 2009)

Depuis les années 1980, de nombreuses enquêtes épidémiologiques ont été conduites de par le monde, afin de déterminer la prévalence[1] du diabète. A l'aide de ces données, le nombre de diabétiques adultes dans le monde était estimé à environ 30 millions en 1985; ce nombre est passé à 135 millions en 1995, 173 millions en 2002 et les projections prévoient 366 millions pour 2030 (figures 1 et 2). Bien que cette augmentation de prévalence du diabète survienne principalement dans les populations adultes et chez les sujets âgés, l'émergence du diabète de type 2 chez les enfants et les adolescents devient une réalité incontournable. En effet, le diabète de type 2 qui touchait principalement les adultes âgés de plus de 40 ans, a commencé à affecter les enfants et jeunes adultes de moins de 20 ans.

[1] En épidémiologie, la prévalence est une mesure de l'état de santé d'une population à un instant donné. Elle est calculée en rapportant à la population totale, le nombre de cas de maladies présents à un moment donné dans une population. Elle s'exprime généralement en pourcentage.

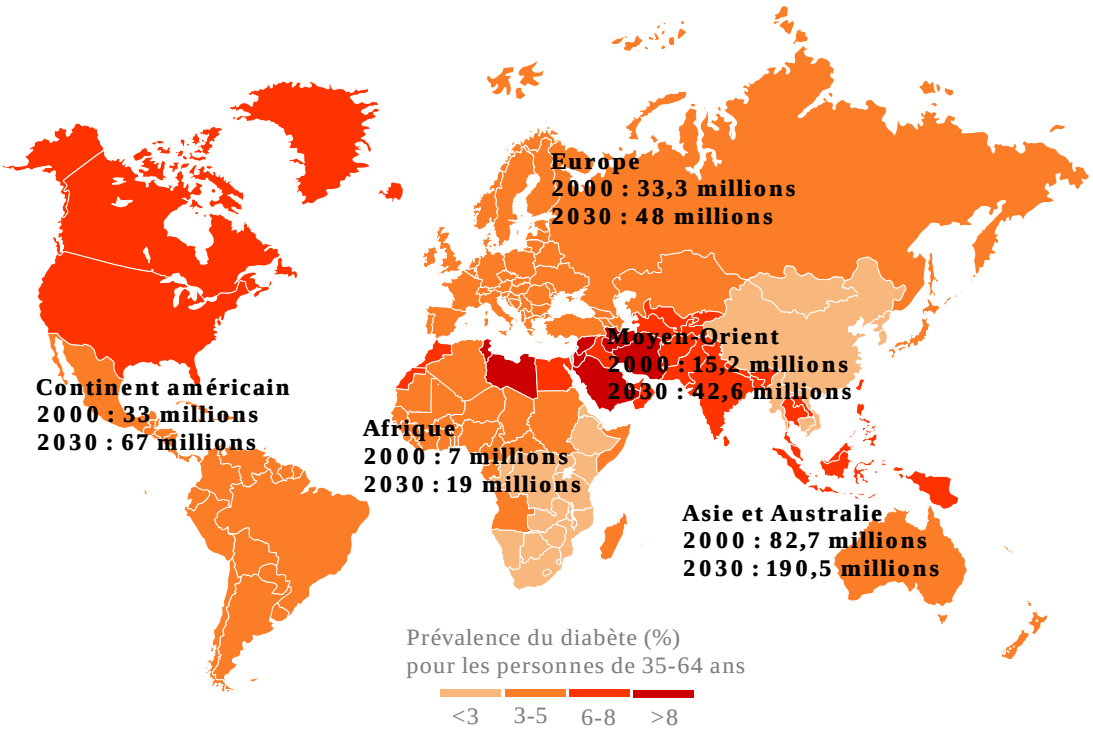


Figure 1 : Prévalence du diabète dans le monde en 2000 et projections pour 2030 d'après [2, 3]

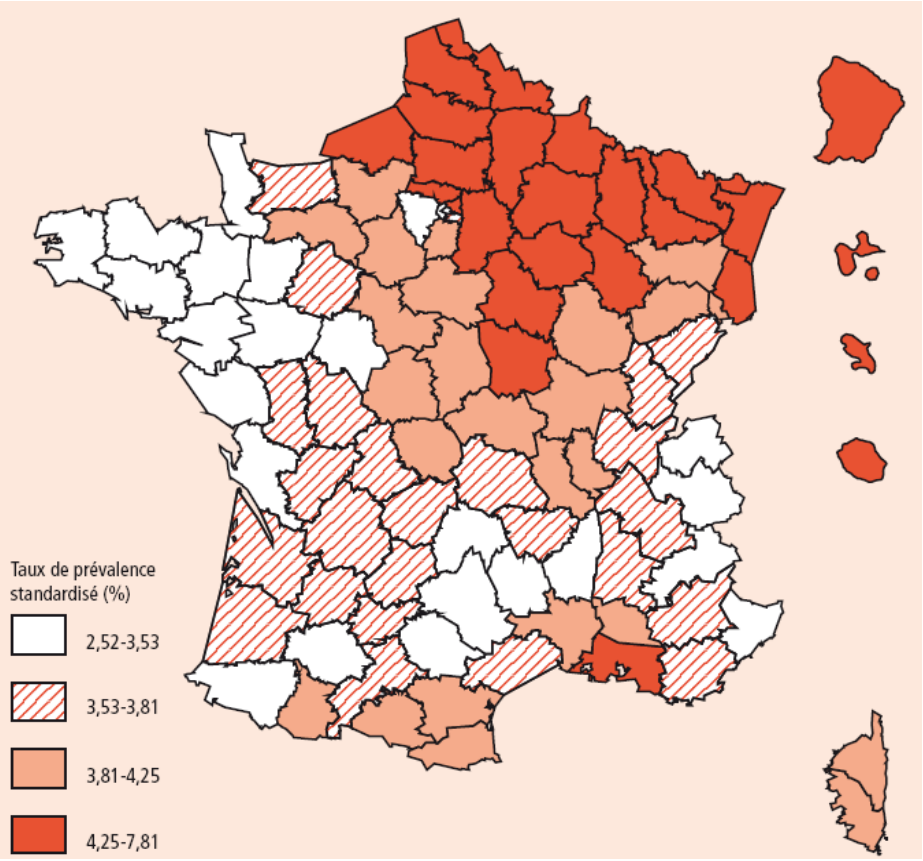


Figure 2 : Prévalence du diabète traité en France, par département [3]

Impacts du diabète sur la santé publique

Le diabète, qu'il soit de type 1 ou 2, représente une charge importante en santé publique essentiellement à cause des complications à long terme qu'il favorise. Les plus connues et les plus redoutées sont les complications microvasculaires, dont le facteur de risque est l'hyperglycémie. La prévention de ces complications est possible, notamment par la mise en place d'un équilibre glycémique le plus proche possible de celui d'un sujet non diabétique. Pour parvenir à cet équilibre glycémique optimal, dans le cadre d'un diabète de type 1 et d'un diabète insulino-requérant, un apport quotidien et contrôlé d'insuline est nécessaire. De la qualité de cette régulation, dépend la qualité de vie du patient, d'où la nécessité de l'optimiser.

Aujourd'hui, cet apport d'insuline se fait essentiellement par le biais d'injections, inconfortables et contraignantes pour le patient. De nombreuses recherches sont actuellement menées sur le développement d'autres voies d'administration de l'insuline. Axés sur le développement d'une administration par voie orale d'insuline, mes travaux de thèse s'inscrivent dans un contexte économique à fort potentiel technologique et novateur.

Ce manuscrit présente les travaux de thèse réalisés dans le cadre du développement de nanoparticules d'insuline destinées à être administrées par voie orale après double encapsulation.

Introduction bibliographique

Ce chapitre présente, en premier lieu, des données bibliographiques détaillant la fonctionnalité puis la structure de l'insuline. Une brève présentation de la physiopathologie du diabète, résultant d'un mauvais fonctionnement de cette insuline, sera réalisée. Seront ensuite présentées, les différentes méthodes d'insulinothérapie actuellement utilisées pour le traitement du diabète.

La partie suivante résumera les différentes alternatives aux injections d'insuline existantes et actuellement en cours de développement. Ce travail s'étant focalisé sur l'administration d'insuline par voie orale, une partie importante décrira les différentes stratégies utilisées par de nombreux travaux relatés dans la littérature pour permettre une telle administration.

Parmi ces stratégies visant à promouvoir l'administration d'insuline par voie orale, l'utilisation de systèmes particulaires est celle présentant la plus grande versatilité, permettant ainsi de s'adapter au mieux aux contraintes liées à la voie orale. Ainsi, les différentes techniques d'encapsulation seront présentées.

Le choix de la technique et des matériaux étant directement lié aux propriétés de ces systèmes particulaires, la mise en place d'un cahier des charges décrivant les propriétés requises sera réalisée. Ainsi, l'élaboration de ces systèmes particulaires pourra être développée.

Pour terminer, le système de double encapsulation d'insuline spécifiquement développé pour l'administration orale de principes actifs sera brièvement décrit.

1. L'insuline

L'insuline, nécessaire à la régulation de la glycémie, est la seule hormone hypoglycémiante. Elle est sécrétée par les îlots de Langerhans du pancréas. Celui-ci présente une double fonction. En effet, glande vitale pour l'organisme, le pancréas participe d'une part à la digestion des aliments en fabriquant des enzymes déversées dans le tube digestif, et d'autre part à la fabrication d'insuline et de glucagon (hormone hyperglycémiante) qui sont déversés dans le sang pour normaliser la glycémie (figure 3). Ces deux hormones antagonistes

ont pour rôle de maintenir la glycémie à des valeurs normales comprise entre 0,8 et 1,2 g/L à jeun.

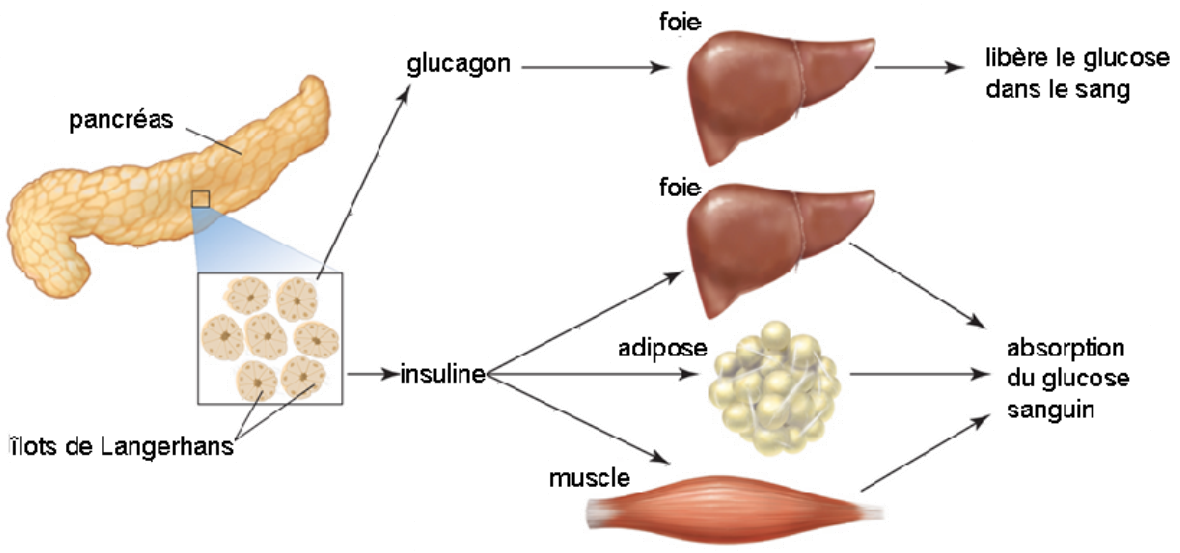


Figure 3 : Double rôle du pancréas au sein de l'organisme

En effet, en cas d'hyperglycémie, lorsque le taux de glucose est supérieur à 1 g/L, les cellules endocrines du pancréas (situées au niveau des îlots de Langerhans) libèrent des molécules d'insuline dans le sang. Lorsque ces molécules arrivent au foie, elles sont reconnues par des récepteurs spécifiques et vont déclencher la transformation du glucose en glycogène (forme stockée du glucose) et l'accroissement des entrées de glucose dans les adipocytes du foie où il sera mis en réserve. L'insuline a aussi une action au niveau de la dégradation du glucose. C'est une hormone hypoglycémiante.

En revanche, en cas d'hypoglycémie, lorsque la concentration de glucose est inférieure à 1 g/L, c'est le glucagon, sécrété par le pancréas, qui agit de manière analogue pour augmenter la glycémie. La libération de glucagon, par les cellules endocrines du pancréas provoquera dans les cellules hépatiques, la transformation inverse du glycogène en glucose acheminé vers le sang. Elle bloquera également l'entrée du glucose au niveau de la membrane des adipocytes du foie (figure 4).

Le rôle de l'insuline est indispensable dans le métabolisme. Sa fonction est de maintenir l'équilibre du taux de glucose sanguin, en le faisant consommer par les tissus de l'organisme (muscles, tissus graisseux, etc. …) et en diminuant sa production par le foie. L'insuline agit

sur la grande majorité des cellules de l'organisme, à l'exception de certaines cellules comme les cellules nerveuses. La fixation de l'insuline aboutit à la consommation du glucose par les cellules cibles. Au niveau des organes de stockage du glucose (le foie et les muscles), cette hormone stimule la synthèse de glycogène. Elle stimule aussi la synthèse de lipides dans les tissus adipeux.

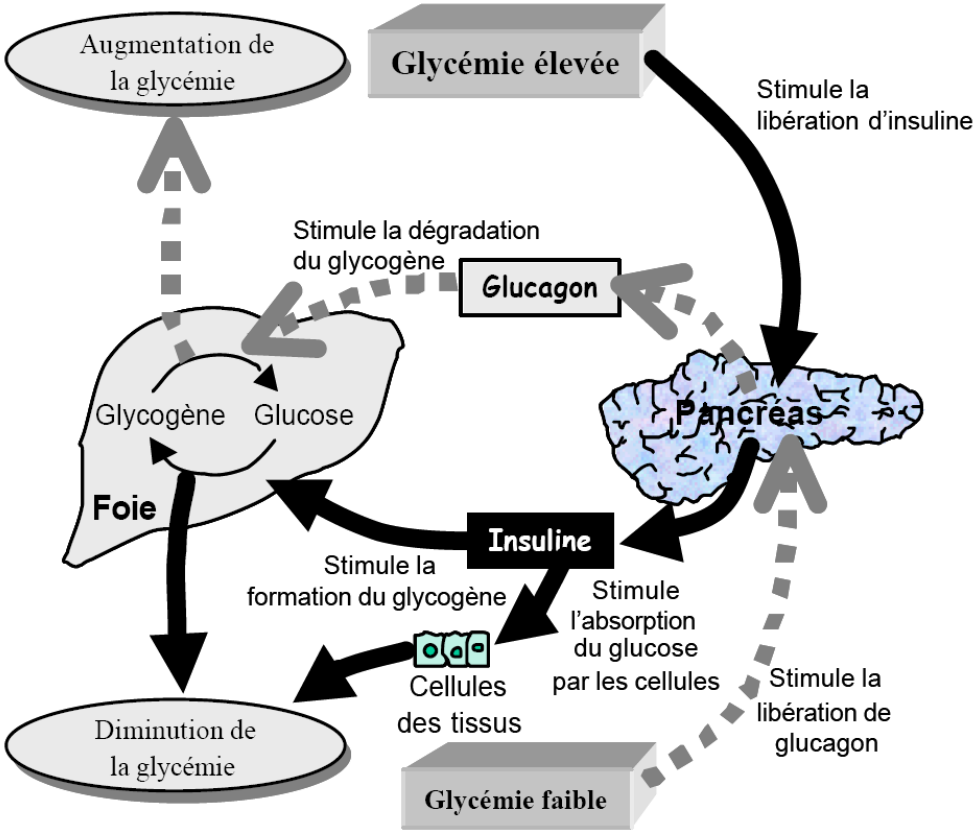


Figure 4 : Régulation de la glycémie par l'insuline et le glucagon

1.1 Structure de l'insuline

L'insuline a été découverte en 1921 suite aux travaux de Banting et Best [4], néanmoins la connaissance de sa structure primaire n'a été établie qu'en 1955 d'après le travail de Sanger *et al*. [5]. De par sa taille et sa structure, la molécule d'insuline est communément appelée polypeptide ou encore protéine. Une protéine est une macromolécule biologique composée par une ou plusieurs chaînes d'acides aminés liées entre elles par des liaisons peptidiques. Un polypeptide est une chaîne linéaire composée de plus de 10 acides aminés. En général, on parle de protéine lorsque la chaîne contient plus de 50 acides aminés ; elle peut comprendre

un ou plusieurs polypeptides. L'ordre dans lequel les acides aminés s'enchaînent est codé par le génome et constitue la structure primaire de la protéine. La protéine se replie sur elle-même pour former des structures secondaires, dont les plus importantes quantitativement sont l'hélice alpha et le feuillet bêta. Enfin, les différentes structures secondaires sont agencées les unes par rapport aux autres pour former la structure tertiaire, souvent renforcée par des ponts disulfures.

Dans le cas de l'insuline, sa structure primaire est formée de deux chaînes polypeptidiques : la chaîne A (21 acides aminés) et la chaîne B (30 acides aminés), réunies par deux ponts disulfures qui relient les cystéines A7 et A20 de la chaîne A à leurs homologues B7 et B19 de la chaîne B (figure 4). Le poids moléculaire de l'insuline humaine est 5734 Daltons. La figure 5 montre la structure moléculaire de l'insuline, divisée en unités A et B [6].

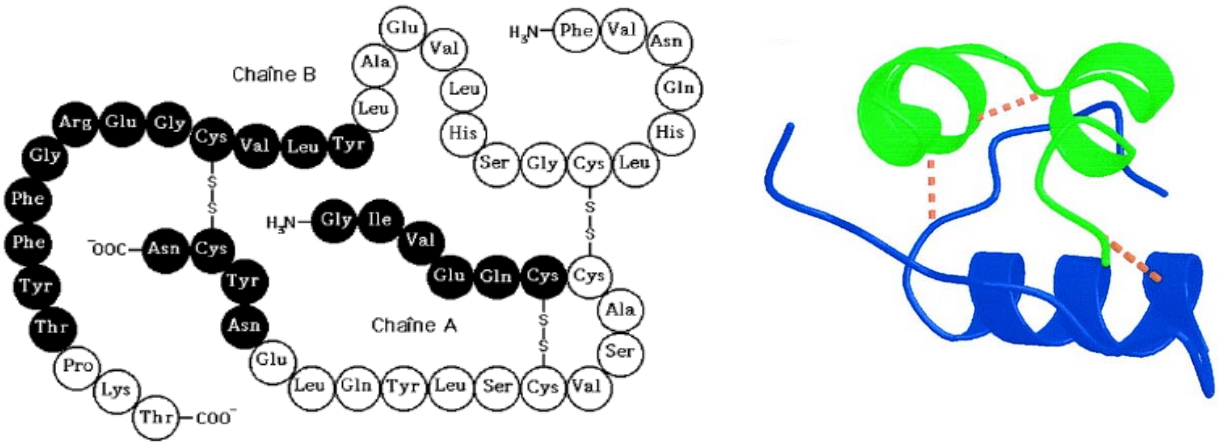


Figure 5 : Structure primaire (a) et secondaire (b) de la molécule d'insuline [7], [8]
(chaîne A : vert, chaîne B : bleu, ponts disulfures : orange)

2. Le diabète

Lorsque le pancréas ne produit pas suffisamment d'insuline ou que l'organisme ne l'utilise pas correctement, le patient présente un taux anormalement élevé de sucre dans le sang conduisant à une hyperglycémie. Des hyperglycémies chroniques peuvent conduire, avec le temps, à des complications graves qui touchent notamment les nerfs et les vaisseaux sanguins. L'insuline est l'hormone qui permet la régulation de cette concentration de glucose

sanguin (figure 6). Il existe différents types de diabètes dont les principaux sont présentés ci-dessous :

- Le diabète de type 1 (connu sous le nom de diabète insulino-dépendant (DID) ou juvénile) est caractérisé par une production insuffisante d'insuline due à une destruction, à plus de 90 %, des cellules ß fabriquant l'insuline. Cette forme de diabète peut affecter l'individu dès son plus jeune âge et nécessite obligatoirement des injections pluri-quotidiennes d'insuline.

    - Les symptômes sont les suivants: excrétion excessive d'urine (polyurie), sensation de soif (polydipsie), faim constante, perte de poids, altération de la vision et fatigue. Ces symptômes peuvent apparaître brutalement.
    - Le traitement réside en l'administration d'insuline pouvant s'effectuer à l'aide de stylos injecteurs, de pompes à insuline portables ou implantables.

- Le diabète de type 2 (également appelé diabète non insulino-dépendant (DNID) ou diabète de la maturité) résulte d'une mauvaise utilisation de l'insuline par l'organisme. Le diabète de type 2 représente 90 % des diabètes rencontrés dans le monde. Il est en grande partie le résultat d'une surcharge pondérale et de la sédentarité.

    - Ses symptômes peuvent être les mêmes que ceux du diabète de type 1 mais sont souvent moins marqués. De ce fait, la maladie peut être diagnostiquée plusieurs années après son apparition, une fois les complications déjà présentes. Cette forme de diabète apparaît généralement à l'âge adulte (après 40 ans), mais progresse actuellement chez les jeunes en raison d'un mauvais équilibre alimentaire et du manque d'activité physique dès l'enfance.
    - Le traitement est basé sur une alimentation équilibrée, l'exercice physique et la prise orale de comprimés antidiabétiques. Lorsque ces mesures hygiéno-diététiques ne permettent plus de réguler la glycémie de façon optimale, le patient doit alors recourir, à long terme, à des apports d'insuline par injection et devient alors devient insulino-réquerant. Seulement 10 % des diabétiques de type 2 ont recours à une insulinothérapie.

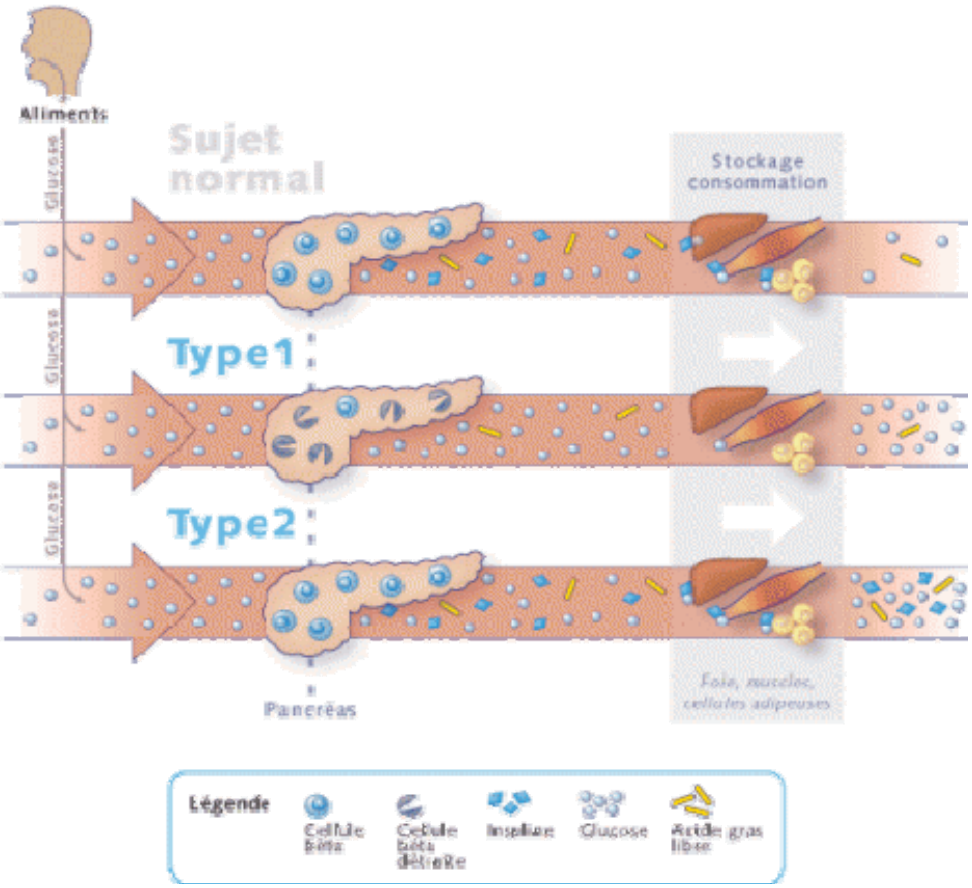


Figure 6 : Comportement de l'organisme d'un diabétique de type 1 et de type 2

<u>Quelles sont les conséquences habituelles du diabète?</u>

Au quotidien, lorsque la glycémie n'est pas suffisamment bien régulée, le diabète s'accompagne de deux complications majeures : les hypoglycémies et les hyperglycémies. L'hypoglycémie (glycémie inférieure à 0,7 g/L) conduit à l'apparition de symptômes tels que des tremblements, vertiges et maux de tête associés à une transpiration excessive, une forte pâleur et sensation de faim. L'hyperglycémie (glycémie supérieure à 1,40 g/L après les repas et à 1,20 g/L le reste du temps) se traduit sous forme d'une extrême soif, de besoins fréquents d'uriner, de maux de ventre et de somnolence.

Dans ces deux cas, si la normoglycémie n'est pas rapidement rétablie, des complications sévères peuvent conduire à des malaises pouvant aller jusqu'aux comas, entraînant parfois des atteintes neurologiques irréversibles. Avec le temps, le mauvais contrôle répété des hyperglycémies conduit à une glucotoxicité. Celle-ci induit d'autres complications chroniques

majeures qui peuvent endommager le cœur, les vaisseaux sanguins, les yeux, les reins et les nerfs (figure 7) :

- Le diabète augmente le risque de cardiopathie et d'accident vasculaire cérébral. Près de 50 % des diabétiques meurent d'une maladie cardio-vasculaire (principalement cardiopathie et accident vasculaire cérébral).
- Associée à une diminution du débit sanguin, la neuropathie qui touche principalement les pieds, augmente la probabilité d'apparition d'ulcères des pieds et d'amputation des membres.

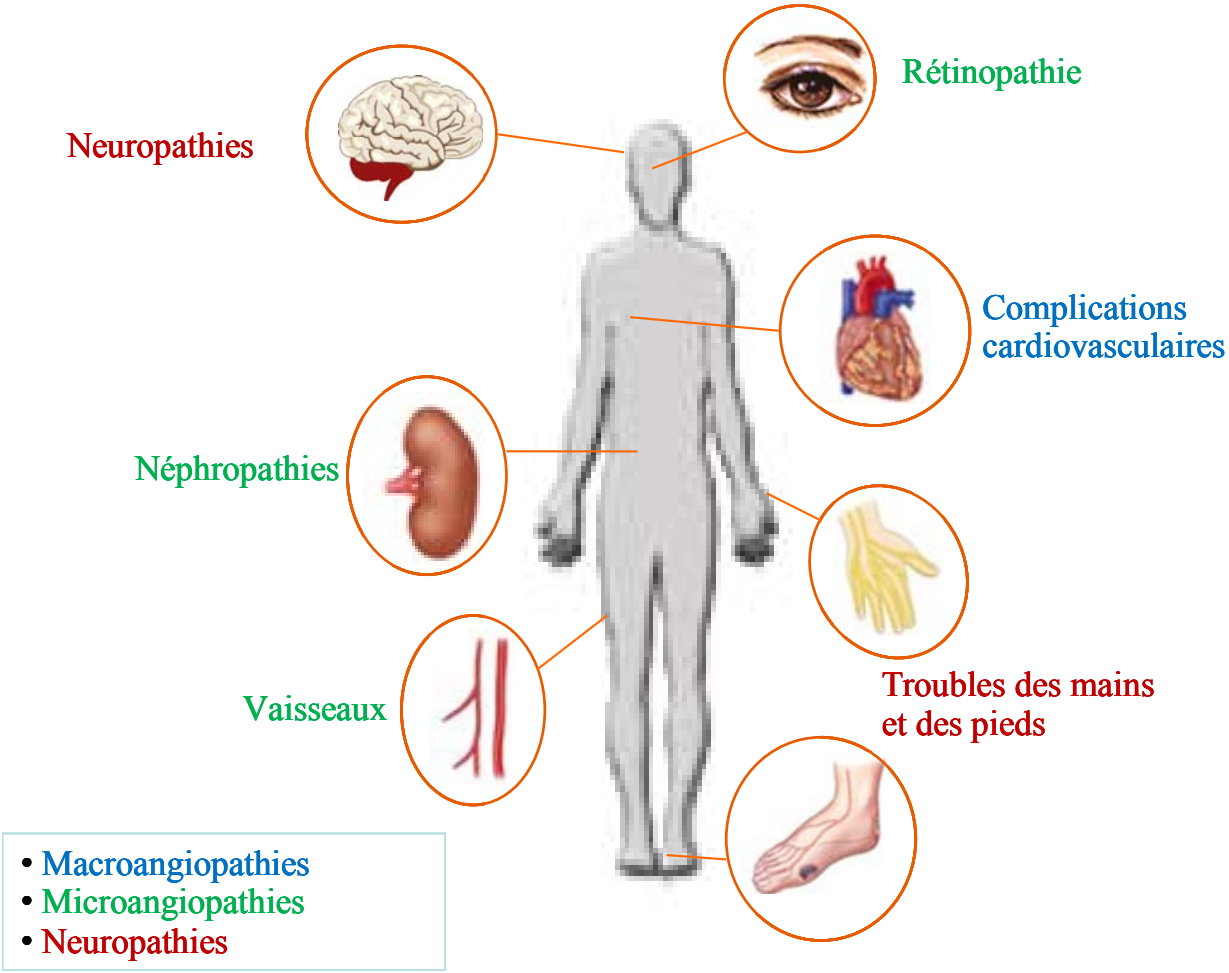


Figure 7 : Complications micro- et macrovasculaires liées au diabète

- La rétinopathie diabétique est une cause importante de cécité et survient par suite des lésions des petits vaisseaux sanguins de la rétine qui s'accumulent avec le temps. Au bout de 15 ans de diabète, près de 2 % des sujets deviennent aveugles et environ 10 % présentent des atteintes visuelles graves.
- Le diabète figure parmi les principales causes d'insuffisance rénale. Environ 10 à 20 % des diabétiques meurent d'une insuffisance rénale.

- La neuropathie diabétique fait suite aux lésions nerveuses dues au diabète et touche jusqu'à 50 % des diabétiques. Bien que de nombreux problèmes différents puissent résulter d'une neuropathie diabétique, les symptômes courants sont des fourmillements, des douleurs et engourdissement ou des faiblesses au niveau des pieds et des mains.
- Le risque général de décès chez les diabétiques est, au minimum, deux fois plus important que chez les personnes non diabétiques.

Le traitement du diabète impose l'abaissement de la glycémie. Dans la plupart des cas, le traitement du diabète s'effectue majoritairement par un apport d'insuline nécessaire au fonctionnement de l'organisme. Il est essentiel de trouver un compromis entre hyperglycémie et hyper-insulinémie, les deux pouvant conduire à des lésions irréversibles. Le diabétique est alors soumis à un contrôle drastique de sa glycémie afin de réguler sa glycémie au plus près des valeurs physiologiques.

2.1 Insulinothérapie

Chez les personnes non diabétiques, l'insuline est sécrétée à des taux très variables au cours de la journée en fonction de l'alimentation, de l'exercice, etc... Le schéma d'insulinothérapie idéal est celui qui reproduit l'insulino-sécrétion physiologique à savoir un apport basal qui permet de maintenir une glycémie aussi proche que possible de la normale entre les repas (0,7 à 1,1 g/l) associé à un apport supplémentaire d'insuline au moment des repas, afin d'assimiler les glucides apportés par l'alimentation, en évitant les pics d'hyperglycémies postprandiaux (1 à 1,4 g/l) (figure 8) [9].

Il existe toujours une opposition entre la nécessité d'éviter l'hyperglycémie, en multipliant le nombre d'injections d'insuline, et l'obligation d'éviter les épisodes d'hypoglycémie pour le confort et la sécurité du patient.

Insulinothérapie optimisée

L'étude DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) [10], étude clinique majeure conduite entre 1983 et 1993, a montré que l'obtention d'un équilibre glycémique aussi proche que possible de celui du sujet normal permettrait de réduire à terme l'incidence des

complications microvasculaires chez le diabétique (figure 9). Elle fait appel à un schéma d'insulinothérapie qui sépare l'apport basal en insuline (pour normaliser la glycémie interprandiale) et les apports supplémentaires (bolus) au moment des repas.

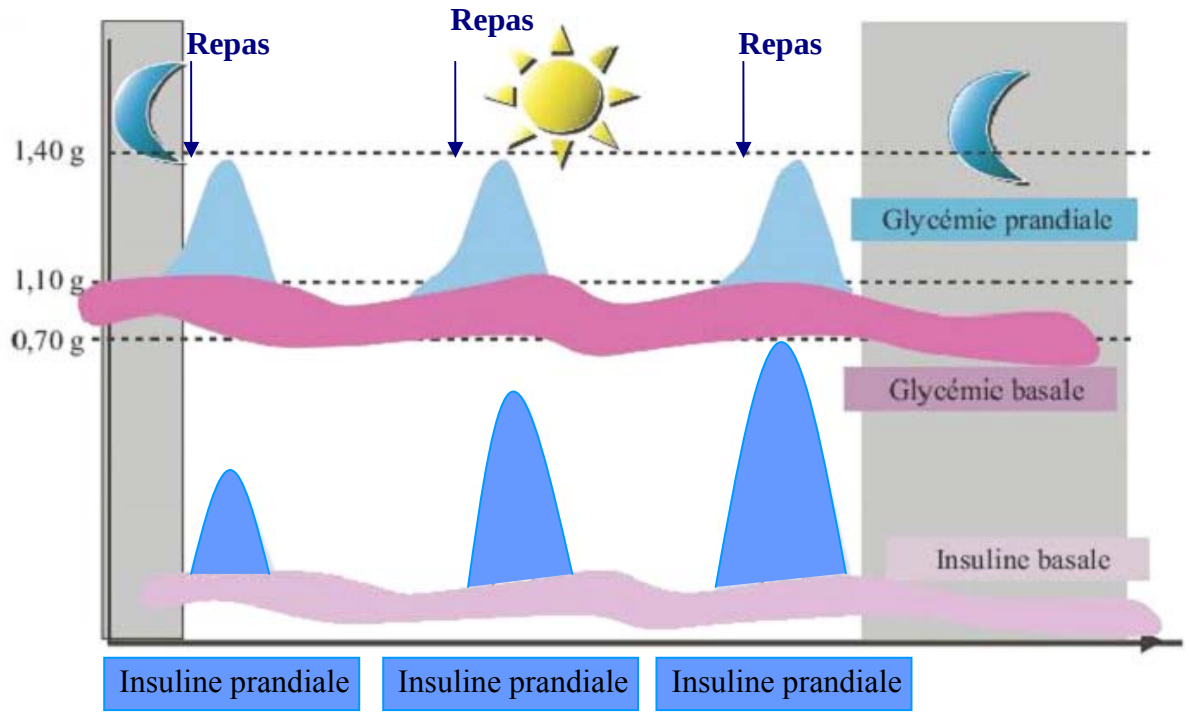


Figure 8 : Sécrétion d'insuline et régulation de la glycémie en fonction des repas pris au cours de la journée

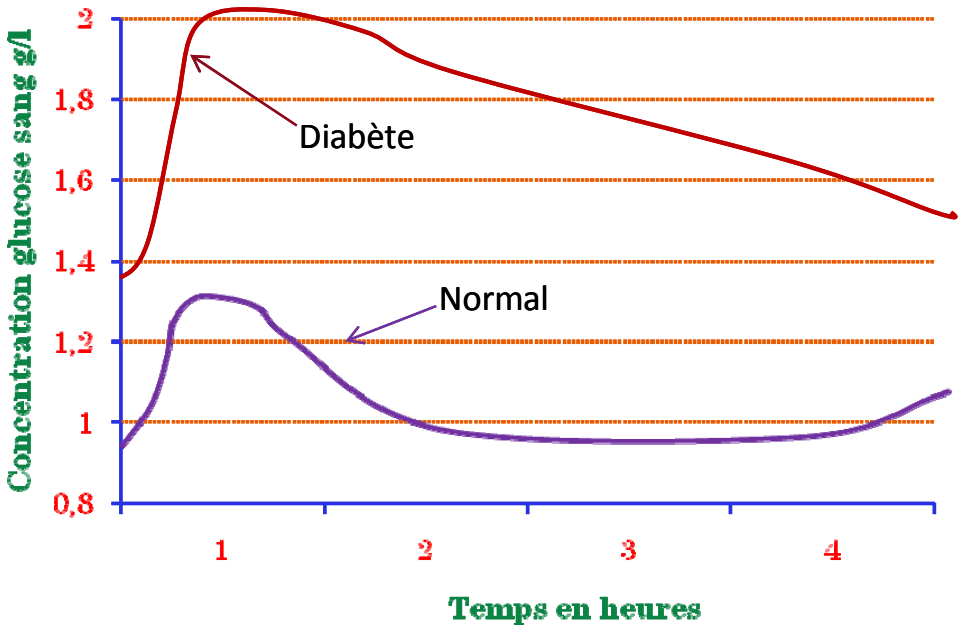


Figure 9 : Glycémies d'un patient diabétique et non-diabétique

Ce schéma basal-bolus est à la base de l'insulinothérapie fonctionnelle qui responsabilise le patient en le rendant autonome mais nécessite son éducation (y compris diététique) et la réalisation d'autocontrôles pluriquotidiens de la glycémie capillaire. Le but est de faire varier les doses d'insuline en fonction des besoins en tenant compte des apports alimentaires, de l'activité physique et d'autres facteurs (maladie, stress…). Pour parvenir à cet objectif glycémique, plusieurs moyens permettent une insulinothérapie optimisée : les pompes à insulines et les injections pluri-quotidiennes.

Les pompes à insuline

Les pompes à insuline permettent de délivrer en continu 24h/24 de l'insuline rapide ou un analogue ultrarapide, à des débits éventuellement variables pendant le jour et la nuit et des bolus préprandiaux juste avant les repas.

La technique à 4 ou 5 injections par jour

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

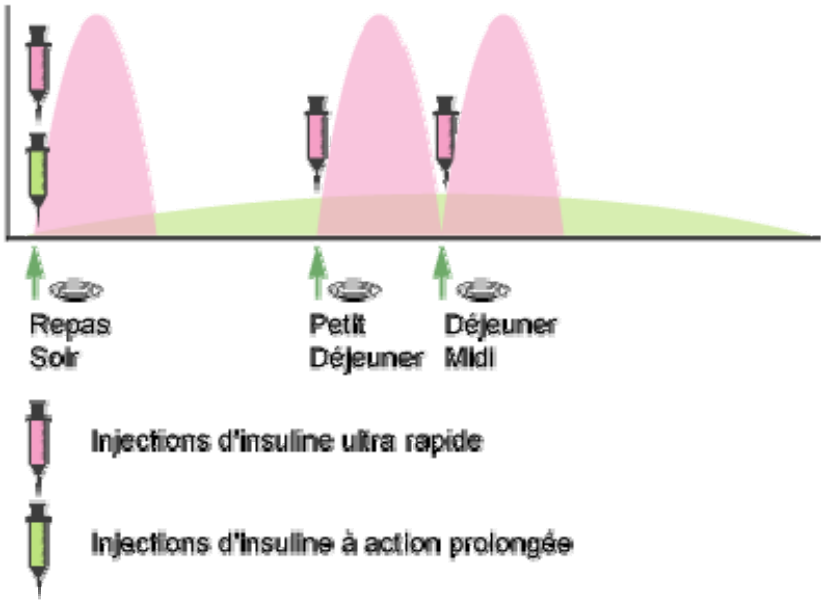


Figure 10 : Schéma d'injections pluri-quotidiennes dans le cadre d'une insulinothérapie

Les analogues lents de l'insuline injectés par voie sous-cutanée sont libérés régulièrement sans pic ; ils sont utilisés comme insuline basale dans l'insulinothérapie fonctionnelle en association avec un bolus d'analogue ultrarapide avant chaque repas (diabète de type 1 ou diabète insulino-requérant) ou en association avec des hypoglycémiants oraux dans le diabète de type 2 (figure 10).

2.2 Différents types d'insulines développés par l'industrie pharmaceutique

Il existe plusieurs types d'insuline qui dépendent essentiellement de leur rapidité de passage dans la circulation sanguine ainsi que de leur durée d'action. De la protamine et/ou du zinc sont ajoutés aux insulines pour ralentir leurs actions. De nouvelles formes, issues de modifications de la séquence de l'insuline (figure 11), permettent également aujourd'hui de ralentir l'action de l'insuline afin d'améliorer le contrôle de la glycémie : quantité d'insuline constante sur une durée plus longue (figure 12).

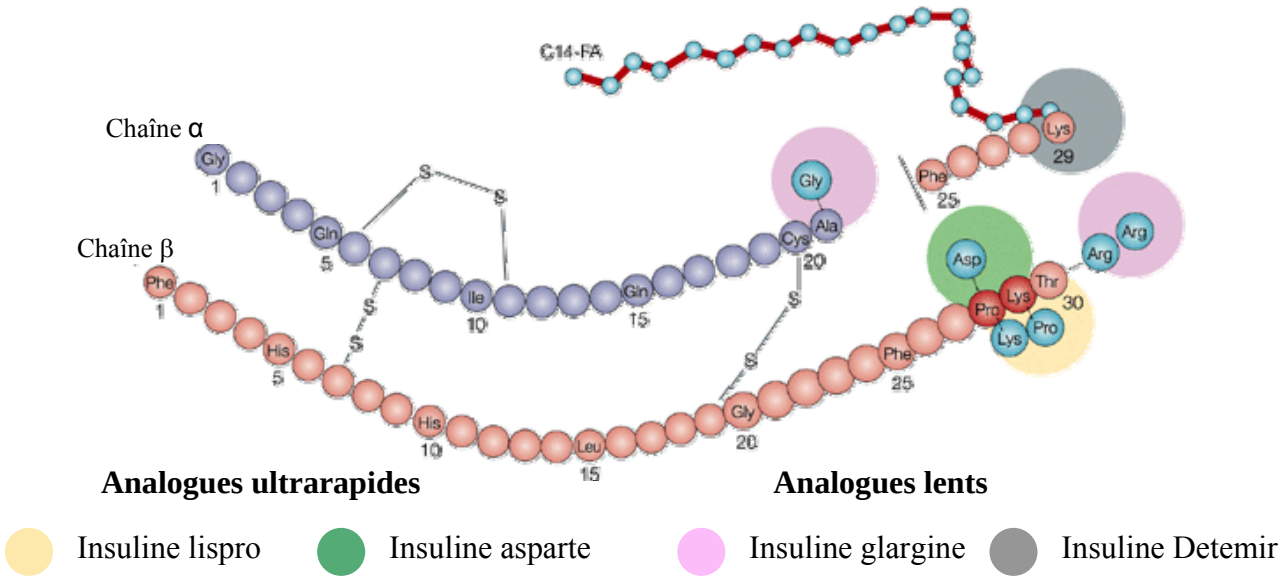


Figure 11 : Modifications de la séquence de l'insuline [11]

2.2.1 Origine de l'insuline

Il y a quelques années, l'insuline était fabriquée à partir de pancréas d'animaux : bœuf et surtout porc. L'arrivée des techniques de génie génétique a permis d'inclure dans des cellules vivantes, les séquences d'ADN humain qui codent pour la synthèse de l'insuline, alors

qualifiée d'insuline biogénétique humaine. Des modifications chimiques sont également envisageables afin que la molécule d'insuline acquière des caractéristiques particulières. Il s'agit d'analogues de l'insuline humaine, généralement produits par génie génétique.

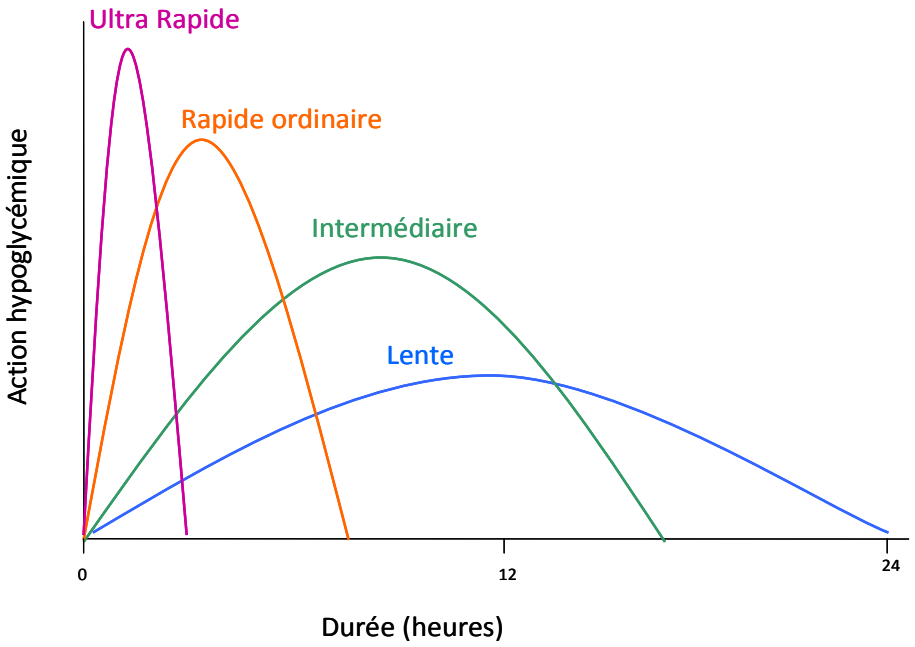


Figure 12 : Action hypoglycémiante et durée d'action des différents types d'insulines

2.2.2 Analogues de l'insuline

Un analogue de l'insuline est une forme modifiée de l'insuline, différent de celle présente dans la nature, mais toujours à la disposition du corps humain pour effectuer la même action que l'insuline humaine en termes de contrôle glycémique [12]. Par génie génétique, la séquence d'acides aminés de l'insuline peut être changée pour modifier ses caractéristiques d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'excrétion (figure 11). Ces modifications ont été utilisées pour créer deux types d'analogues de l'insuline :

- ceux qui sont plus facilement absorbés à partir du site d'injection et donc agissent plus rapidement que l'insuline naturelle sous-cutanée. Ils sont destinés à alimenter le niveau de bolus d'insuline nécessaire après un repas,
- ceux qui sont libérés lentement sur une période comprise entre 8 et 24 heures. Ils permettent d'alimenter le niveau basal d'insuline pour la journée. Les premiers analogues de l'insuline ont été fabriqués par Eli Lilly.

2.2.2.1 Analogues ultrarapides de l'insuline

Les insulines analogues sont des molécules dont la structure chimique est proche de celle de l'insuline humaine, mais elles s'en différencient par la suppression, le remplacement ou l'addition de certains acides aminés. Ces changements ont pour effet principal de modifier leur cinétique de résorption et d'action. Il existe trois analogues ultrarapides :

- l'insuline lispro ou Humalog (Lilly) résulte de l'inversion des deux avant-derniers acides aminés, la lysine prenant la position B28 et la proline la position B29,
- l'insuline asparte ou Novorapid (NovoNordisk) est obtenue en remplaçant la proline B28 en acide aspartique,
- l'insuline glulisine ou Apidra (Sanofi-Aventis) provient du remplacement de l'acide aspartique en B3 de l'insuline humaine par la lysine et de la lysine en B29 par l'acide glutamique.

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

2.2.2.2 Analogues lents de l'insuline

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

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

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

Les analogues lents de l'insuline doivent être administrés uniquement par voie sous-cutanée et ne doivent en aucun cas être mélangés à d'autres insulines.

2.2.3 Insuline humaine ordinaire ou rapide

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

2.2.4 L'insuline NPH

L'insuline NPH (Neutral Protamine Hagedorn), du nom de son inventeur est l'insuline humaine biogénétique additionnée de sulfate de protamine, destinée à retarder et augmenter sa durée d'action. Elle se présente sous forme d'une suspension laiteuse. La durée d'action de l'insuline NPH se prolonge pendant 14 à 18 heures. Cette durée est dite intermédiaire car elle

se situe entre celle de l'insuline rapide et celle des insulines lentes au zinc. Autrefois utilisées, elles agissaient pendant au moins 24 heures.

2.2.5 Mélanges d'insuline

Le mélange de l'insuline NPH à l'insuline humaine rapide ou à un analogue ultrarapide a pour but de disposer à l'aide d'une seule injection d'un profil d'action à début rapide ou ultrarapide et de durée prolongée.

2.2.6 Développement d'une insuline concentrée

Ce type d'insuline a été spécifiquement développé pour être utilisé dans les pompes à insuline internes munies d'un cathéter intrapéritonéal. L'Insuplant (Sanofi-Aventis) est une insuline humaine d'action rapide et courte, obtenue par modification enzymatique de l'insuline porcine. Cette insuline présente une concentration quatre fois supérieure aux autres insulines et a été formulée de façon à minimiser la perte d'efficacité dans les conditions de stress mécanique et thermique rencontrées dans les pompes.

3. Autres voies d'administration de l'insuline

Contraignante pour le mode de vie, l'insulinothérapie par injection n'est pas le traitement le plus confortable pour les patients. Elle nécessite un contrôle strict de leur glycémie, de leur alimentation et de leur exercice physique. De plus, chaque diabète étant différent, le patient doit lui-même adapter son traitement à son propre cas. C'est pourquoi, depuis de nombreuses années, d'autres voies d'administration sont proposées [12] (figure 13).

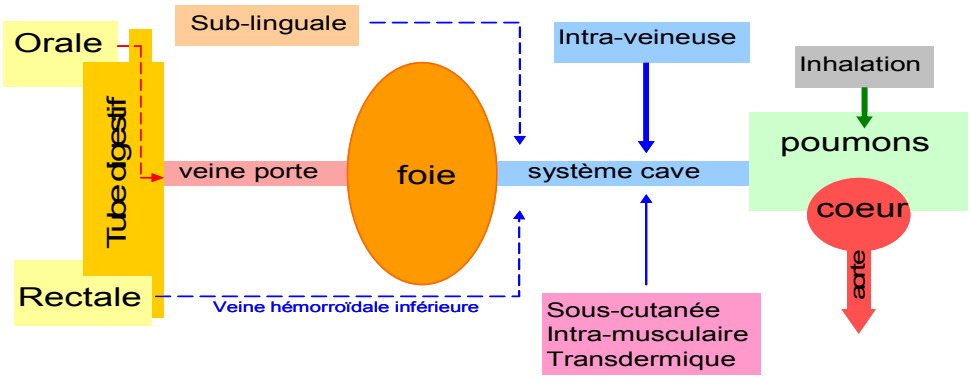


Figure 13 : Différentes voies d'administration

3.1 La voie buccale / sublinguale

Cette voie facilement accessible offre un certain nombre de possibilités rendant possible l'administration de principes actifs peptidiques. La cavité buccale, facile d'accès, possède une grande surface d'absorption (100- 200 cm^2) avec peu d'activité protéolytique et, est fortement vascularisée. Cependant, en pratique, la structure en multicouches de l'épithélium buccal et de la muqueuse sublinguale (approximativement 60 % de superficie de la muqueuse orale) combinée avec un flux continu variable de salive constitue une barrière efficace à l'absorption. L'utilisation de promoteurs d'absorption (tensioactifs, sels biliaires, agents chélateurs, alcools et acides gras), seuls ou combinés avec des systèmes bioadhésifs (gels, films, patchs), pour augmenter la perméabilité a été largement évalué dans des études *in vivo*. Des diminutions de glycémie jusqu'à 30 % par rapport à une administration intramusculaire ont été observées mais les études ont manqué de reproductibilité [13, 14].

De nombreuses autres options pour améliorer l'absorption ont été tentées incluant le complément d'inhibiteurs d'enzyme et/ou des modifications chimiques pour augmenter l'hydrophobie de l'insuline (conjugaison avec polymères divers, acylation, méthylation) et l'utilisation de pro-drogues [15-17]. De nouveaux efforts ont été fait pour développer des systèmes de délivrance mucoadhésifs incorporant l'insuline, avec ou sans promoteurs, dans des formulations liposomales incluant des vésicules lipidiques fortement déformables (transfersomes) [18, 19].

Peu d'études ont évalué la voie buccale et sublinguale. Des diminutions de la glycémie ont été rapportées chez un faible nombre de patients diabétiques de type 1 traités à l'aide d'un vaporisateur d'insuline en solution aqueuse, mais seulement après administrations répétées [20]. Une autre formulation d'aérosol d'insuline liquide combinée à des micelles de promoteurs d'absorption a également été développée [21]. Un nombre de données limitées concernant des diabétiques de type 1 et 2 suggère une réponse plus rapide et de plus courte durée comparée à une injection sous-cutanée d'insuline. La tolérance locale apparaît acceptable, mais la biodisponibilité reste faible, nécessitant des administrations répétées [21, 22]. La multitude de techniques déjà évaluées illustre les difficultés inhérentes à la voie buccale d'administration de l'insuline. Seules des stratégies combinées semblent permettrent un possible succès futur.

Récemment, une formulation d'aérosol d'insuline liquide, connue sous le nom d'Oral-Lyn™ (ou Oralin™), a été développée par la société Generex Biotechnology™. Ce système

permet la libération d'une dose précise d'insuline via un inhalateur. La simplicité d'utilisation de cet inhalateur repose sur la formation d'un brouillard de gouttelettes atomisées, sous haute pression, directement dans la bouche du patient.

Figure 14 : Pulvérisateur buccal d'insuline Oral-Lyn™ (Generex Biotechnology™)

Ce système permet l'atomisation à haute vitesse de particules, directement dans le souffle du patient permettant un dépôt direct sur les muqueuses buccales (sans aucun dépôt pulmonaire) et d'augmenter ainsi significativement la quantité absorbée. Cette formulation sous forme d'aérosol (figure 14) est rapidement absorbée par la muqueuse buccale fournissant des taux d'insuline, dans la circulation générale, suffisants pour atteindre une normoglycémie [21, 23]. Une récente étude de concept a démontré qu'Oral-Lyn™ pourrait être utilisé pour remplacer les injections d'insuline après-repas, pour les diabétiques de type 2 afin de réguler la glycémie post-prandiale [24].

3.2 La voie nasale

La cavité nasale offre une surface épithéliale d'approximativement 150 cm^2 mais les barrières principales à l'absorption incluent la présence d'enzymes protéolytiques, associées à des mécanismes défensifs innés des voies aériennes, comme la clairance muco-ciliaire (ensemble coordonné de transport épithélial d'eau, d'ions, de sécrétion, de fonctionnement ciliaire et de toux). Une vaste gamme de promoteurs a été utilisée pour augmenter l'absorption d'insuline à travers la muqueuse nasale. Ceux-ci incluent des sels biliaires et leurs dérivés, des tensioactifs, des acides gras et des cyclodextrines [25, 26]. Néanmoins, des études

histologiques sur des animaux ont révélé des dégâts cellulaires, suite à l'exposition à certains de ces promoteurs, notamment des dérivés de sels biliaires [27].

D'autres méthodes ont permis d'améliorer l'absorption d'insuline en inhibant l'activité protéolytique et/ou en retardant l'élimination de l'insuline, à l'aide de composés mucoadhésifs. La biodisponibilité de l'insuline intranasale varie à la fois selon le type, le volume et la concentration du promoteur et de l'insuline. Elle dépend également de la taille, la densité, la forme et l'hygroscopicité des particules, des caractéristiques de flux d'air nasal et de la présence éventuelle d'une pathologie nasale [26, 28]. Chez l'Homme, l'absorption nasale d'insuline est plus rapide mais la biodisponibilité est inférieure de 20 % à celle d'une injection sous-cutanée [29-31] et la variabilité est plus grande [32].

Des études cliniques sur des diabétiques de type 1 et 2, ont révélé une augmentation rapide mais, de durée limitée, du taux d'insuline plasmatique après administration nasale, nécessitant plusieurs doses pour contrôler la glycémie postprandiale [33, 34]. Cependant, le contrôle métabolique était fréquemment inférieur à celui d'une injection sous-cutanée, et de nombreux patients ont vu apparaître une irritation nasale locale [33, 35, 36]. Plus récemment, une préparation d'insuline nasale lyophilisée, contenant du glycocholate de sodium et administrée avant repas, a montré un contrôle similaire à celui de deux injections journalières d'insuline lente chez des diabétiques de type 2 pendant 4 mois [37].

Une formulation sous forme de gel a ensuite été développée avec une efficacité équivalente à l'insuline sous-cutanée permettant une tolérance chez le diabétique de type 1 pendant 6 mois de traitement [38]. Jusqu'à présent, l'expérience clinique, relativement limitée avec l'insuline intranasale, démontre un besoin de doses importantes répétées pour permettre un contrôle efficace de la glycémie. L'apparition d'irritations nasales et de dommages cellulaires sur la muqueuse chez plus de 25 % des patients est une limite à l'utilisation de cette voie, notamment pour des traitements à long terme. Pour que l'insuline intranasale puisse devenir une alternative clinique et commerciale viable face à l'injection sous-cutanée, de nombreux obstacles restent toujours à surmonter.

3.3 La voie pulmonaire

L'appareil respiratoire offre le plus grand potentiel pour la délivrance de polypeptide comme l'insuline, avec une superficie évaluée à 140 m^2, dont plus de 95 % sont des zones d'absorption. La surface alvéolaire est recouverte d'une monocouche très mince, fortement

vascularisée, de cellules épithéliales (0,1-0,2 µm d'épaisseur) permettant un transport très court pour rejoindre la circulation sanguine. Le transport à travers le mur alvéolaire se fait par transcytose pour des molécules de plus de 40 kDa et principalement par bi- ou tri-jonction paracellulaire pour des molécules plus petites comme l'insuline (5,7 kDa) [39]. La biodégradation cytosolique locale semble être le facteur le plus déterminant pour la biodisponibilité. La tolérance du poumon vis-à-vis des agressions immunitaires est aussi un avantage potentiel pour la délivrance de principes actifs [40].

Des tentatives à court terme de libération d'insuline via un aérosol inhalé ont débuté dans les années 1920. Ensuite, renouvelées dans les années 1970 [29, 30], ce n'est qu'à partir des années 1990 que l'importance de la dynamique d'aérosol a été reconnue. De nombreux facteurs sont connus pour influencer le site de dépôt des particules inhalées, y compris la taille et la densité massique, la morphologie, la charge, la solubilité et l'hygroscopicité [41]. La taille des particules conditionne leur absorption et donc l'efficacité du système.

Des études ont montré que des particules de taille supérieure à 10 µm étaient majoritairement absorbées par la bouche, alors que celles de taille comprise entre 5 et 10 µm étaient absorbées par la région trachéo-bronchique, et celles de taille inférieure à 1 µm sont essentiellement exhalées (absorbées par les alvéoles pulmonaires). Les particules inhalées arrivent dans les poumons par sédimentation, diffusion et impaction inertielle ; phénomène se produisant quand une particule est si grande qu'elle n'est pas en mesure de s'adapter rapidement aux brusques changements de direction. En raison de son inertie, elle poursuivra sa trajectoire initiale et s'écrasera sur l'obstacle [42]. L'inspiration profonde optimise le dépôt alvéolaire et conditionne donc la délivrance d'une dose précise, ne permettant pas d'obtenir une réponse reproductible. La respiration du patient est donc un paramètre influençant fortement l'absorption intrapulmonaire [31, 43]. La présence d'objets obstruant le flux d'air, de maladies pulmonaires [42, 44], d'un patient fumeur [45], sportif [46] et la capacité à utiliser l'inhalateur [47] sont des facteurs clefs qui peuvent influencer l'efficacité de l'insuline inhalée.

La majeure partie des essais cliniques récents, réalisés sur l'insuline inhalée, a été obtenue grâce à deux techniques : en utilisant une formulation sous forme de poudre sèche (nébulisation) administrée via le dispositif Nektar/Exubera® ou à l'aide d'une forme liquide (atomisation) : aérosol AERx® Insulin Diabetes Management System (NovoNordisk) et

inhalateur Aerodose® (Aerogen Inc.). D'autres technologies utilisent la pulvérisation de particules solides d'insuline, modifiées pour le dispositif AIR™ (Eli Lilly) ou sous forme de Technosphere™ (Mannkind Biopharmaceuticals) [48] (figure 15). Un an après sa commercialisation en septembre 2006, le système Exubera® de Pfizer a été retiré du marché.

Bien que permettant de remplacer les injections quotidiennes, le système ne permettait pas de se passer d'injections d'insuline à durée d'action prolongée, la durée d'action d'Exubera® étant trop brève. De plus, le dispositif s'est avéré encombrant et lourd et de nombreux professionnels de santé (laboratoires et cliniciens) s'inquiétaient quant aux effets toxiques à long terme de l'insuline sur les poumons.

A. Exubera® (Pfizer)

B. AeroDose® (AeroGen Inc).

C. AIR™ (Eli Lilly/Alkermes)

D. AERx® de NovoNordisk

Figure 15 : Différentes types d'inhalateurs pour insuline inhalée (A : Exubera® (Pfizer), B : AeroDose® (AeroGen Inc), C : AIR™ (Eli Lilly/Alkermes), D : AERx® de NovoNordisk)

Après l'échec de l'insuline à inhaler Exubera®, le potentiel commercial étant trop limité, une autre insuline à inhaler voit son dévelopement stoppé, AERx® de Novo Nordisk, une des causes principales étant le coût de commercialisation de loin supérieur à celui de l'insuline injectable. Dans le système AERx®, l'insuline se présente sous forme liquide, atomisée en

particules de 1 à 3 microns de diamètre. L'inhalateur intègre un microprocesseur permettant d'analyser la qualité de l'inhalation et de la respiration, ce qui autorise le patient à inhaler l'insuline uniquement lorsque l'appareil le lui signale. Eli Lilly abandonne à son tour le développement de l'insuline inhalée et quitte son partenaire Alkermes Inc., avec qui il a développé le système AIR™. Ce système utilise des particules poreuses d'insuline, censées garantir une meilleure absorption et dont le diamètre se situe entre 5 et 30 microns. Des études aux États-Unis avaient démontré des résultats identiques à l'Exubera®.

3.4 La voie oculaire

Très peu d'études ont porté sur l'évaluation du potentiel de l'administration d'insuline par voie oculaire. Les taux d'absorption étant variables et très faibles, même en présence de promoteurs d'absorption, la présence de réactions locales sévères défavorables ont conduit à la conclusion que cet itinéraire offrait peu ou pas de possibilité dans le traitement de patients diabétiques insulino-nécessitants [49].

3.5 La voie rectale

Cette voie d'administration possède l'avantage indéniable de permettre d'éviter la dégradation enzymatique locale de l'insuline, lors de son passage dans la circulation générale (sanguine et/ou systémique) notamment au niveau du système lymphatique, contournant ainsi le processus d'extraction hépatique d'insuline, inconvénient majeur de la plupart des autres voies d'administration. Néanmoins, l'acceptation à long terme de cette voie de délivrance de l'insuline est peu probable. En effet, l'absorption d'insuline au niveau du rectum est limitée, sa biodisponibilité étant relativement faible (4-10 %) comparée à une administration sous-cutanée. De plus, son absorption est plus rapide et de plus courte durée.

L'absorption d'insuline par voie rectale nécessite l'utilisation de promoteurs incorporés dans des suppositoires ou des gels. Ainsi, l'efficacité et la toxicité de l'acide eicosapentanoïque ont été explorées à l'aide d'une émulsion multiple eau/huile/eau. Cette étude a démontré une forte augmentation de la perméabilité vis-à-vis de l'insuline, associée à une faible toxicité, présentant l'acide eicosapentanoïque comme un candidat viable en tant que promoteur d'absorption pour la délivrance rectale d'insuline [50].

3.6 La voie transdermique

Bien que facilement accessible et possédant une large surface d'échange (1 à 2 m^2), la peau est relativement peu perméable aux molécules hydrophiles de fortes masses molaires comme l'insuline. L'imperméabilité de la peau est principalement due à la couche de lipides intercellulaires à la surface externe de la peau (*stratum corneum*) [51, 52]. Des tentatives d'optimisation de libération du principe actif ont impliqué la destruction ou le retrait de la couche lipidique par de multiples méthodes chimiques, électriques ou physiques.

La iontophorèse (ou ionophorèse) est un procédé utilisant un faible courant électrique afin de faire passer certaines molécules à visée thérapeutique à travers la peau [53, 54], des ultrasons basse fréquence (sonophorèse ou phonophorèse) [55] et/ou l'utilisation d'agents transporteurs de principes actifs [56] sont les méthodologies principalement explorées. L'utilisation de la iontophorèse cathodique, pour transférer l'insuline, sous forme hexamérique, soluble à travers la peau non traitée, s'est révélée être inefficace. Elle peut néanmoins être améliorée en optimisant le contact avec la peau en rasant les cheveux, en retirant la *stratum corneum*, ou en administrant de l'insuline fortement chargée ou sous forme monomérique après pré-traitement de la peau avec des agents délipidants [54]. De plus, en fonction de la charge globale de l'insuline (modifiée ou analogue), le transfert peut être plus ou moins optimal : la charge négative ayant montré un transfert plus efficace. Cependant, la quantité d'insuline absorbée reste à peine suffisante pour satisfaire aux quantités minimales d'insuline nécessaire. D'autres études d'optimisation de l'absorption ont été réalisées avec des systèmes employant du courant pulsé. Cependant, le transfert transdermique d'insuline reste inadéquat [57]. De plus, la question de la sécurité au niveau du pré-traitement physico-chimique utilisé se pose quant à de possibles impacts à long terme [58].

Plusieurs autres études ont montré des diminutions de la glycémie suite à l'utilisation d'ultrasons basse fréquence (20-150 kHz) afin d'augmenter le transfert transdermique d'insuline appliquée sous forme d'une solution aqueuse ou d'hydrogel. L'efficacité de cette technique repose sur la densité d'énergie et sur la longueur de l'impulsion des ultrasons [56]. Ainsi, l'utilisation combinée d'iontophorèse et d'ultrasons conduisant à une certaine synergie a été suggérée [59]. L'incorporation d'insuline dans des vésicules liposomales fortement déformables, connues comme transfersomes, ont montré des taux de transferts transdermiques

intercellulaires de l'ordre de 50 %. Cependant, des études plus récentes ont été incapables de reproduire des résultats similaires. Malgré les nombreuses stratégies employées pour augmenter la délivrance transdermique d'insuline, le succès a été très limité. Pour fournir une quantité d'insuline nécessaire à la normoglycémie par cet itinéraire, de nouvelles approches, impliquant probablement une combinaison de méthodes physiques et chimiques, devront être déployées [25].

3.7 La voie orale

La voie orale présente l'avantage d'avoir un itinéraire d'absorption portal-hépatique. En effet, le foie se situe entre le tube digestif et le reste de l'organisme, jouant ainsi un rôle de filtre pour contrôler lors de leur « premier passage » toutes les molécules absorbées. Ce premier passage hépatique permet de ne laisser passer qu'une certaine quantité du principe actif administré, ce qui conduit à une « sélection » par l'organisme de la quantité distribuée au reste de l'organisme. Pour assurer cette fonction, la totalité du sang issu du tube digestif est drainée par la veine porte qui assure 75 % du débit sanguin hépatique. Les molécules faisant l'objet d'un premier passage hépatique sont généralement des molécules étrangères à l'organisme (molécules xénobiotiques) mais également des substances physiologiques comme par exemple, les sels biliaires ou l'insuline.

L'étude DCCT [10] a montré qu'une insulinothérapie proche de la sécrétion physiologique d'insuline, chez un sujet non-diabétique, permettait de potentiellement réduire les complications microvasculaires dues à la glucotoxicité. Ainsi, cette notion de premier passage hépatique pourrait contribuer à une régulation de la quantité d'insuline « utilisée » par rapport à la quantité administrée.

La voie orale est à la seule à permettre ce passage hépatique et semble donc être la plus intéressante pour l'administration d'insuline. Cependant, les principes actifs polypeptidiques, comme l'insuline, sont naturellement dégradés dans le tractus gastro-intestinal : environnement acide de l'estomac combiné à l'action d'enzymes digestives, notamment au niveau de l'intestin grêle. La surface épithéliale du tractus gastro-intestinal est elle-même une barrière efficace à l'absorption d'insuline. De plus, peptide habituellement absorbé comme nutriments pour l'organisme, il se trouve que l'insuline n'est absorbée à aucun moment, vraisemblablement en raison de son poids moléculaire.

A l'heure où l'administration orale d'insuline est potentiellement attirante, cette voie d'administration se développe sans pour autant avoir rencontré le succès jusqu'à présent [60]. De nombreuses stratégies individuelles et combinées ont été développées afin d'augmenter l'absorption d'insuline. Ceux-ci incluent la co-administration d'insuline avec des inhibiteurs d'enzymes et/ou l'utilisation de promoteurs de pénétration, la modification de la stabilité chimique de l'insuline et l'utilisation de composés mucobioadhésifs, de liposomes, d'émulsions et systèmes polymériques [61]. Malgré les nombreuses stratégies différentes testées, généralement moins d'1 % d'insuline oralement administrée est absorbée [62].

3.8 Comparaison des différentes voies d'administrations

Si l'on compare les différentes voies d'administration de l'insuline, on observe qu'elles présentent toutes à la fois des avantages et des inconvénients résumés dans le tableau 1.

	Avantages	**Limites**
Voie buccale/sublinguale	Aucune dégradation (pH neutre, absence d'enzyme)	Faible perméabilité, faible surface d'absorption
Voie nasale	Bonne perméabilité des membranes	Faible temps de contact, irritation rapide des muqueuses
Voie pulmonaire	Large surface de contact avec les alvéoles vascularisées = réponse rapide	Dose absorbée aléatoire, inhalateur coûteux et technique à maîtriser
Voie oculaire	Facile d'accès	Faible perméabilité, faible temps de contact → faible biodisponibilité
Voie rectale	Site d'absorption intéressant → absence d'enzyme	Faible perméabilité, inconfortable si quotidienne
Voie transdermique	Large surface d'échange, facile d'accès	Faible perméabilité aux molécules hydrophiles
Voie orale	**Libération directe dans le sang (contrôle hépatique)**	**Nombreuses contraintes physico-chimiques**

Tableau 1 : Différentes voies d'administration possibles de l'insuline

Néanmoins, l'utilisation et le choix d'une nouvelle voie d'administration repose sur des critères prédéfinis visant à simplifier le traitement et à améliorer la qualité de vie des patients diabétiques via un meilleur contrôle de la glycémie et un auto-contrôle moins contraignant. Si l'on compare les diverses voies d'administration possibles de l'insuline selon les critères précédents (tableau 1), on observe que la voie orale est celle qui remplie ces conditions. En

effet, elle est notamment une des seules à remplir la condition de premier passage hépatique (tableau 2).

	Utilisation simple, rapide et discrète	Pas de piqûre	Premier passage hépatique	Limitations des hypoglycémies sévères	Pas de matériel
Voie buccale/sublinguale	✓	✓			
Voie nasale	✓	✓			
Voie pulmonaire	✓	✓			
Voie oculaire	✓	✓			
Voie rectale		✓	✓		✓
Voie transdermique	✓	✓			
Voie orale	✓	✓	✓	✓	✓

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

L'insuline orale permettrait donc de reproduire la sécrétion physiologique d'insuline par le pancréas via son passage par la veine porte, menant directement au foie et représentant un avantage physiologique thérapeutique indéniable dans la gestion du traitement du diabète. Le paragraphe suivant porte sur l'étude détaillée de l'administration par voie orale.

4. L'administration par voie orale

Le tractus gastro-intestinal (TGI) est une voie d'administration de choix pour l'administration de la plupart des principes actifs médicamenteux, indépendamment de leur structure ou poids moléculaire. La fabrication d'une forme galénique orale ne nécessite de répondre qu'à très peu d'exigences en termes de stérilité, de pyrogénicité et de contamination particulaire [48].

L'insuline possède une place importante dans les thérapies de traitement du diabète insulinodépendant (type 1) et pour certains diabétiques de type 2. Cependant, elle est encore administrée par l'intermédiaire d'injections. Il serait fortement avantageux que l'insuline soit administrée oralement, permettant ainsi de mimer la délivrance physiologique et de fournir un meilleur contrôle de la glycémie. Cette voie d'administration permettrait également de

diminuer l'incidence des hyper-insulinémies périphériques conduisant aux complications connues (neuropathie, rétino-endopathie, etc…). De nombreuses études évaluent le devenir de l'insuline dans le TGI. Les principaux défis rapportés impliquent de surmonter la dégradation enzymatique de l'insuline ainsi que sa très faible adsorption via le TGI [63]. En effet, les contraintes liées à l'administration orale de l'insuline sont principalement de nature chimique, biochimique et physique.

4.1 Les contraintes chimiques

Le TGI ayant pour rôle de dégrader les aliments en nutriments assimilables par l'organisme (acides aminés), l'action de diverses enzymes permet l'hydrolyse des protéines, chaque enzyme ayant un rôle bien spécifique en relation avec son substrat. De par, sa nature protéique, l'insuline, substrat de ces enzymes protéolytiques est donc dégradée. De plus, la présence de fortes variations de pH le long du TGI (figure 16) conduit à la perte de sa structure protéique et donc à son inactivité.

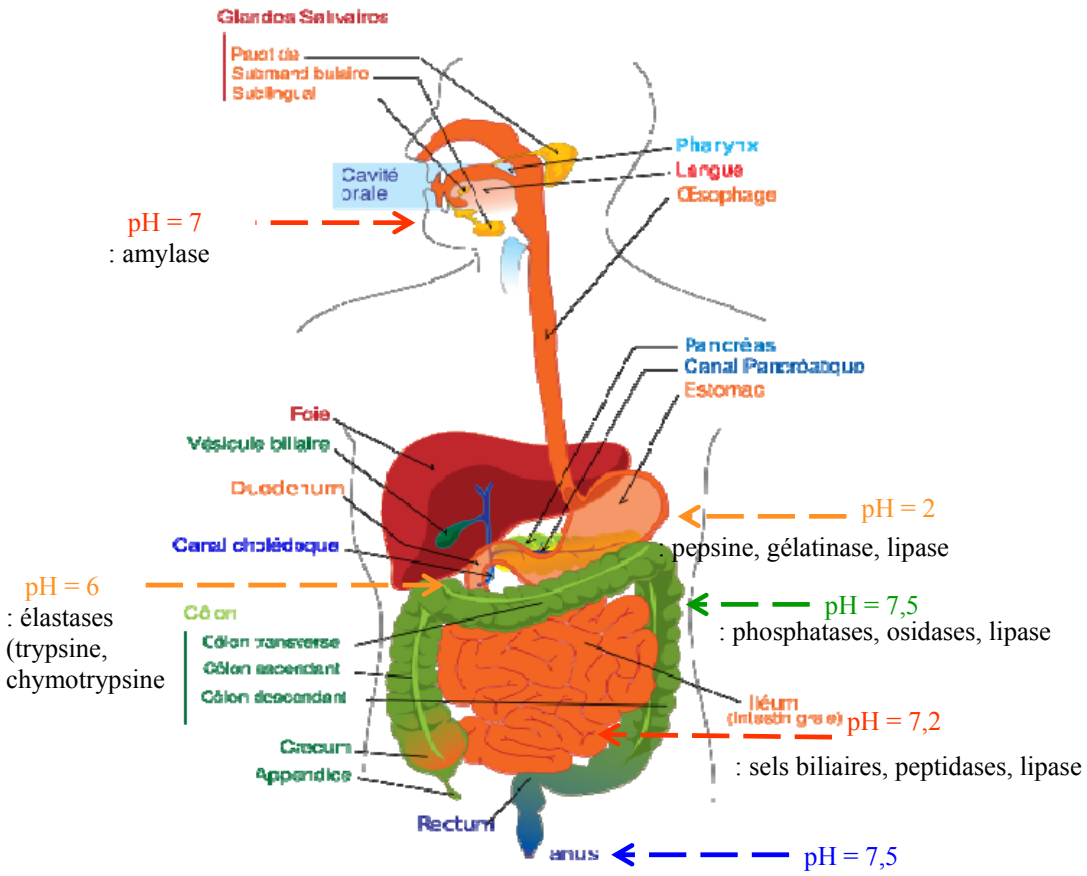


Figure 16 : Variations de pH et nature des enzymes présentes le long du tractus gastro-intestinal

4.2 Les contraintes physiques

La deuxième barrière à l'administration orale de l'insuline est une barrière purement physique. L'épithélium intestinal possède la plus grande surface d'échange entre le milieu extérieur et le milieu intérieur (plus de 200 m^2), résultant de son repliement en villosités et microvillosités à la surface des entérocytes, cellules épithéliales majoritaires (figure 17).

Malgré l'importance de sa surface d'absorption, l'épithélium intestinal constitue une barrière majeure à la libre diffusion des molécules. La nature hydrophile de l'insuline défavorise son passage vers la circulation sanguine, par diffusion à travers les membranes lipidiques.

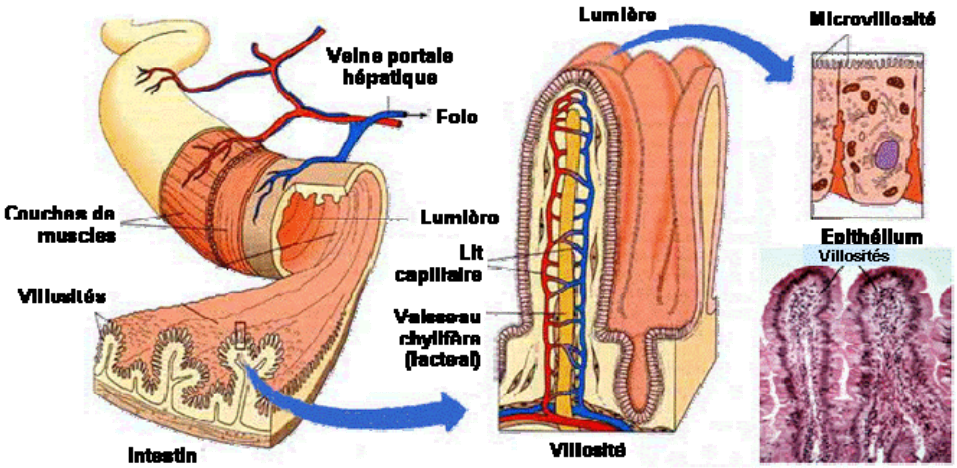


Figure 17 : Contraintes physiques rencontrées le long du tractus gastro-intestinal

En effet, cet épithélium est constitué d'une monocouche continue d'entérocytes (80 %), de cellules de Goblet (cellules à mucus, 15 %) et de cellules M liées entre elles par des jonctions serrées qui uniformisent la surface épithéliale. L'épithélium joue donc un rôle important de protection de la muqueuse digestive constamment exposée à des éléments étrangers (xénobiotiques, antigènes et micro-organismes). Entre ces trois types de cellules, différents types de jonctions intercellulaires existent, parmi lesquelles :

- les jonctions étanches, « jonctions serrées » ou « *zonula occludens* » capables de limiter la perméabilité de l'épithélium ;
- les jonctions d'ancrage, « *zonula adherens* » et « desmosomes », qui permettent l'attachement mécanique des cellules entre elles ;
- les jonctions communicantes, « jonctions de type gap », qui permettent le passage de signaux chimiques ou électriques entre les cellules.

Afin de traverser l'épithélium et de rejoindre la circulation sanguine, les molécules présentes dans la lumière intestinale peuvent emprunter trois voies différentes : la voie transcellulaire (à travers les cellules) par transport actif ou par transport passif et la voie paracellulaire (entre cellules adjacentes). Le passage transcellulaire peut être envisagé par les entérocytes ou les cellules M. Quant au passage paracellulaire, il nécessite la traversée des jonctions serrées (figure 18).

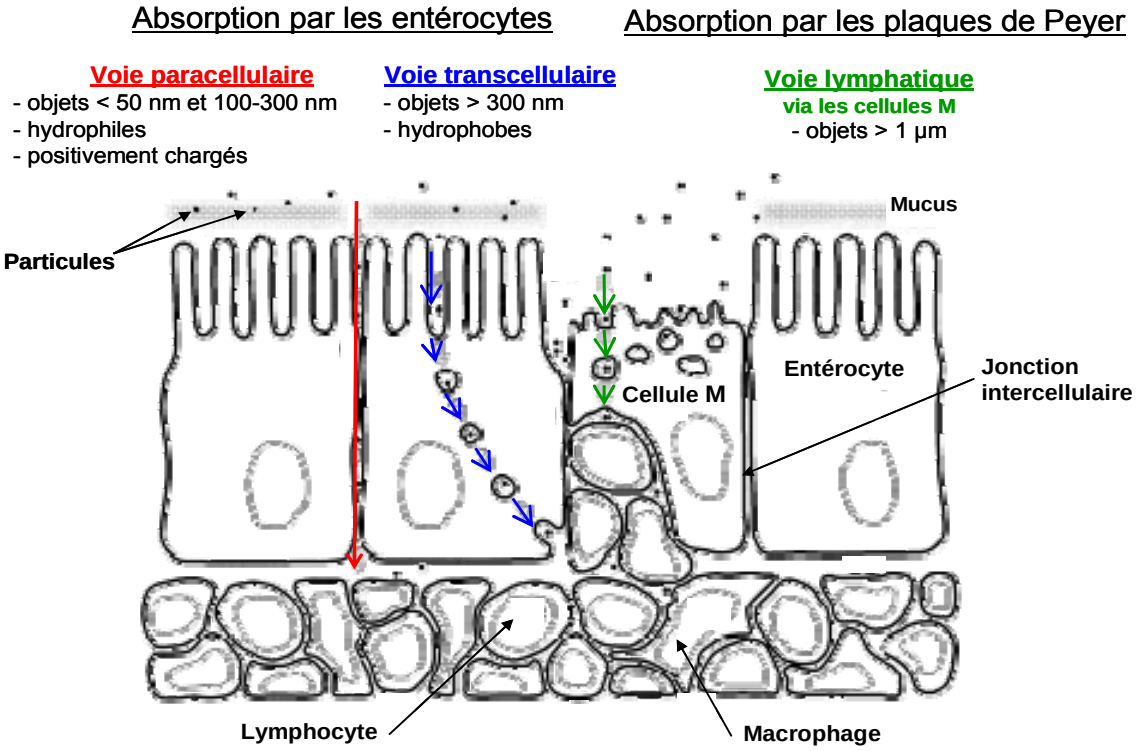


Figure 18 : Représentation schématique des trois voies de passage trans-épithélial à partir de [64]

La voie de passage utilisée dépend majoritairement de l'hydrophilie, de la taille, de la forme et de la charge des composés. Les composés hydrophobes utilisent majoritairement la voie transcellulaire tandis que les composés hydrophiles préfèrent le passage paracellulaire par diffusion passive via les pores hydrophiles [65, 66]. Les pores hydrophiles, constituant la voie paracellulaire, appelés jonctions serrées, scellent l'espace entre les cellules épithéliales en formant une barrière protectrice permettant la diffusion des petits solutés. Les propriétés négatives de l'espace intercellulaire privilégient le passage des composés cationiques par la voie paracellulaire. Les travaux de Linnankoski [67] ont permis de déterminer la porosité paracellulaire. Deux classes de pores ont été identifiées : des pores de petite taille 50-60 nm et de taille supérieure à 100-300 nm.

L'organisation de l'épithélium intestinal est dépendant des fonctions qu'il occupe (absorption des nutriments et protection vis-à-vis des composés exogènes). Cette structure complexe rend l'absorption de principe actif d'autant plus difficile, qu'il faut réussir à lui faire rejoindre la circulation sanguine en traversant l'épithélium sans qu'il perde son activité biologique. Le succès dans la délivrance orale de l'insuline thérapeutique améliorerait la qualité de la vie de beaucoup de patients diabétiques qui doivent quotidiennement recevoir des injections d'où l'intérêt de poursuivre dans cette optique malgré les contraintes présentes.

Dans les dernières décennies, diverses tentatives ont été réalisées afin de surmonter les limites et les inconvénients de la thérapie orale conventionnelle d'insuline. Cette voie implique de surmonter la barrière de la dégradation enzymatique, d'améliorer la perméabilité épithéliale, et de conserver l'activité biologique du principe actif au cours de la formulation.

4.3 Les méthodes permettant de surmonter les contraintes physico-chimiques

Diverses stratégies pharmaceutiques ont déjà été étudiées afin de maximiser la biodisponibilité biologique de l'insuline orale, de surmonter les barrières physico-chimiques et de développer des thérapies sûres et efficaces. Parmi les différentes techniques existantes, les plus fréquemment utilisées pour s'affranchir de ces contraintes sont les suivantes :

4.3.1 Les promoteurs d'absorption

Les promoteurs d'absorption présentent la capacité d'améliorer l'absorption des principes actifs en augmentant leur capacité de transport para- et trans-cellulaire. Ils impliquent plusieurs mécanismes d'action différents, notamment des modifications de la fluidité membranaire, de la viscosité du mucus, du passage des protéines par les membranes et de l'ouverture des jonctions serrées [68]. Parmi les promoteurs non-spécifiques les plus communs, on citera les sels biliaires, les acides gras, tensioactifs, salicylates, agents chélateurs et un composé biologique, la toxine *zonula occludens* qui augmente la perméabilité intestinale par atteinte des jonctions serrées.

L'ajout de sels biliaires dans des systèmes micellaires augmentent la pénétration d'insuline via un passage paracellulaire [69]. Une étude du N-lauryl-β-D-maltopyranoside a aussi suggéré que ce promoteur puisse ouvrir les jonctions serrées de l'épithélium, augmentant ainsi

la pénétration de l'insuline via un passage paracellulaire [70]. Dans une autre étude, des émulsions multiples eau/huile/eau incorporant 2 % d'acide eicosapentaenoique ont montré des effets dose-dépendants sur l'insuline [71].

Les travaux de Morishita *et al.* ont évalué l'effet d'une administration d'insuline en solution dans diverses boucles rectales et intestinales, avec ou sans caprate de sodium (Na_2EDTA) et de glycocholate de sodium en tant que promoteur d'absorption, et avec ou sans inhibiteurs de protéases comme par exemple, l'aprotinine [72]. Leurs résultats ont suggéré que l'utilisation de promoteurs augmentait l'efficacité de l'insuline, et ce de manière préférentielle au niveau de la boucle d'injection. Une stratégie innovante impliquant la modulation des jonctions serrées pour améliorer le transport paracellulaire de principes actifs et des protéines normalement non absorbés par l'intestin semble être une solution très attirante [73]. Chez des rats diabétiques, la biodisponibilité de l'insuline orale co-administrée avec la toxine *zonula occludens* s'est montré suffisante pour permettre une diminution de la glycémie à des niveaux semblables à ceux réalisés après une injection parentérale d'insuline [74].

Cependant, l'utilisation de promoteurs d'absorption est limitée par le fait qu'une fois les membranes des cellules perméabilisées ou les jonctions serrées ouvertes, le transport est augmenté non seulement pour le peptide et les principes actifs protéiques, mais également pour la totalité des molécules indésirable dans le TGI [75].

4.3.2 Les inhibiteurs enzymatiques

De récentes études ont permis l'évaluation d'inhibiteurs d'enzymes afin de ralentir le taux de dégradation de l'insuline. La co-administration d'inhibiteurs d'enzymes permet de contourner efficacement la barrière enzymatique conduisant à une délivrance viable de principes actifs protéiques.

L'insuline est fortement dégradée par la trypsine, l'α-chymotrypsine et l'élastase. Dans une étude intéressante, Yamamoto *et al*. ont évalué les effets de cinq inhibiteurs d'enzymes différents (glycocholate de sodium, mésilate de camostat, bacitracine, inhibiteur de la trypsine de soja et aprotinine) sur le métabolisme intestinal de l'insuline chez des rats [76]. Parmi ces inhibiteurs d'enzyme, le glycocholate de sodium, le mésilate de camostat et la bacitracine se sont montrés efficaces dans l'amélioration de la disponibilité physiologique de l'insuline dans le gros intestin. Cependant, aucun de ces inhibiteurs d'enzyme ne s'est montré efficace dans l'intestin grêle, probablement à cause des nombreuses enzymes sécrétées.

Récemment, l'ovomucoïde (enzyme inhibitrice de protéases présente dans le blanc d'œuf des oiseaux) a été identifiée comme une nouvelle classe d'inhibiteurs d'enzymes [77, 78]. Les ovomucoïdes ont été évalués afin de démontrer leur efficacité dans la prévention de la dégradation de l'insuline en présence de trypsine et d'α-chymotrypsine. Une formulation contenant de l'insuline associée à de l'ovomucoïde de poulet ou de canard a montré sa stabilité en présence de trypsine et d'α-chymotrypsine [79]. Les résultats ont suggéré que l'effet inhibiteur de l'ovomucoïde était dû à l'inactivation de l'α-chymotrypsine, principalement responsable de l'inactivation de l'insuline.

Des conjugués polymère-inhibiteur ont également montré une capacité de protection *in vitro* contre la trypsine, l'α-chymotrypsine et l'élastase [80]. Une matrice de transport a ainsi été développée pour protéger l'insuline de la dégradation *in vitro* par ces enzymes. Les inhibiteurs covalemment reliés à un polymère mucoadhésif, la carboxymethylcellulose sodique (Na-CMC), ont montré une forte activité inhibitrice envers la trypsine, l'α-chymotrypsine et l'élastase.

De récentes preuves ont été apportées concernant le rôle du mucus et des couches de glycocalyx (couche protectrice de la membrane cellulaire, composée de glycoprotéines et de glycolipides) dans les phénomènes de reconnaissance et d'adhésion cellulaire et de protection contre les agressions mécaniques, chimiques et enzymatiques. En effet, ces domaines extracellulaires directement attachés à l'épithélium intestinal, posséderaient une fonction significative dans l'absorption et/ou la protection face à la dégradation protéolytique de l'insuline [81, 82].

L'inconvénient principal de ces inhibiteurs est leur forte toxicité. De plus, l'utilisation d'inhibiteurs d'enzymes peut également affecter l'absorption d'autres peptides normalement dégradés et l'application non spécifique de tels composés au niveau intestinal peut entraîner une modification métabolique dans le TGI, de part une réduction de la digestion des protéines issues de l'alimentation.

4.3.3 Les systèmes mucoadhésifs à base de polymères

Le terme « mucoadhésion » se réfère à l'adhésion entre des polymères et la muqueuse ainsi qu'à la propriété de certains polymères, qui deviennent adhésifs s'ils sont à l'état hydraté [83, 84]. Ainsi, les systèmes de délivrance de principes actifs mucoadhésifs ont pour but de prolonger le temps de contact avec le site d'absorption du principe actif, d'intensifier le contact avec la muqueuse pour augmenter le gradient de concentration, d'assurer l'absorption

immédiate sans dilution ou dégradation et de le diriger vers un site prédéfini [85, 86]. Ainsi, les systèmes de délivrance à base de polymères mucoadhésifs, fournissent un contact intime avec la muqueuse, réduisant la dégradation entre les lieux de libération et d'absorption. De nouveaux polymères montrant une excellente activité inhibitrice à l'encontre des enzymes protéolytiques associée à une mucoadhésion satisfaisante, pourraient être intéressants pour contourner la barrière enzymatique liée à la prise orale de protéines.

Le greffage de polymères hydrophiles, comme les polyacrylates, les dérivés de cellulose et les dérivés de chitosane sur des surfaces biologiques, est basé sur des liaisons hydrogènes et des interactions ioniques. Ces dernières années, un grand nombre de systèmes mucoadhésifs ont été développés, notamment à base d'hydrogels composites superporeux [87], de nano-transporteurs lipidiques [88], de polymères soufrés [89] et de dérivés du chitosane [83, 90]. Il a également été démontré que certains polymères mucoadhésifs pouvaient agir comme promoteurs d'absorption ou inhibiteurs d'enzymes [91].

Plusieurs groupes de recherches ont essayé d'intégrer la sensibilité au pH dans des transporteurs polymères mucoadhésifs [92], [93, 94]. Leur but étant de protéger le principe actif sensible à la dégradation protéolytique de l'estomac et de la partie supérieure de l'intestin grêle. La faisabilité de la délivrance d'insuline par voie orale à l'aide de copolymères greffés a été étudiée. Morishita *et al*. ont constaté que le système poly(acide méthacrylique-*g*-éthylène glycol) était un candidat très prometteur à la délivrance d'insuline par voie orale [95].

Des polymères micro-particulaires de petite taille chargés d'insuline ont montré une libération rapide de l'insuline ainsi qu'une absorption plus importante comparée à des particules de plus grande taille, conduisant à un effet hypoglycémiant accru sans dommage sur les muqueuses [96]. Dans une étude semblable, des nanoparticules de chitosane (polysaccharide mucoadhésif) ont montré une capacité à augmenter l'absorption intestinale de nombreux peptides et protéines [97].

Ces dernières années, des polymères soufrés appelés « thiomères » sont apparus comme une alternative prometteuse [98]. Jusqu'à présent, des thiomères cationiques (chitosane-cysteine [99], chitosane-thiobutylamidine [100] et chitosane-acide thioglycolique [101]) et anioniques (poly(acide acrylique)-cysteine [102], poly(acide acrylique)-cystéamine [103], carboxymethylcellulose-cysteine [104] et alginate-cysteine [89]) ont été produits. Grâce aux ponts disulfures inter- et intramoleculaires, de nombreuses formes (comprimés et microparticules) montrent des propriétés cohésives fortes, aboutissant à une plus grande stabilité, à des temps de désintégration prolongés et une libération mieux contrôlée du peptide incorporé [105].

De nombreux systèmes de délivrance à base de polymères mucoadhésifs ont été pensés pour être efficaces dans l'amélioration de l'absorption intestinale de molécules biologiques vulnérables aux enzymes protéolytiques [106]. Cependant, leur toxicité au cours d'une période prolongée reste inconnue et des essais cliniques sont nécessaires pour aboutir à une utilisation potentielle chez l'Homme.

4.3.4 Les systèmes particulaires à délivrance ciblée

Le souhait de délivrer des principes actifs protéiques aisément et efficacement a conduit à l'utilisation de systèmes de délivrance ciblée. La plupart des stratégies de délivrance orale d'insuline basées sur des transporteurs particulaires ont été développées afin de contourner les barrières physico-chimiques qui rendent impossible l'administration orale de peptides. Ainsi, ils protègent efficacement la protéine de la dégradation enzymatique dans l'environnement agressif du TGI, permettent un passage accru à travers l'épithélium intestinal, et contrôlent la libération [107].

Les progrès réalisés vers la délivrance non invasive de protéines ont été réalisés par l'intermédiaire d'itinéraires spécifiques d'administration, permettant ainsi de réduire la dose délivrée et de concentrer la dose thérapeutique aux sites spécifiques d'actions pharmacologiques [108]. Néanmoins, l'absorption n'étant pas uniforme dans tout le TGI, l'absorption spécifique dépend des différences de composition et d'épaisseur de la couche de mucus, du pH, de la superficie et de l'activité enzymatique, rendant le ciblage délicat à mettre en œuvre [109]. La libération d'un peptide dans une région spécifique du TGI où l'assimilation dans le système lymphatique est maximale et l'activité enzymatique faible, a été utilisée pour augmenter l'absorption de principes actifs après administration orale [110]. Ainsi, l'administration d'insuline avec le glycocholate de sodium, via un système de délivrance ciblée au colon, a montré des effets hypoglycémiants accrus après administration orale. La combinaison du glycocholate de sodium et du poly(oxyde d'éthylène) a tendance à prolonger l'absorption d'insuline après administration orale en utilisant le système de délivrance colonique ciblée [111].

Les liposomes sont également des transporteurs alternatifs potentiels pour la délivrance orale de protéines, comme par exemple l'aprotinine [112]. Dans une approche semblable, Degim *et al.* ont examiné les propriétés de pénétration de formulations liposomales diverses contenant de l'insuline, à travers une monocouche de cellules Caco-2. Ils ont constaté que l'administration orale d'insuline associée à des liposomes de taurocholate de sodium

permettait une diminution de la glycémie. En outre, une forte corrélation *in vivo / in vitro* a été observée à l'aide du modèle de cellules Caco-2 [113].

Récemment, la technique de multicouches auto-assemblées a été appliquée à la microencapsulation de chitosane et d'alginate de sodium [114], méthode simple pour contrôler l'encapsulation et la libération de protéines. De plus, l'utilisation des propriétés mucoadhésives du chitosane augmente la pénétration des protéines à travers les surfaces biologiques [115].

Les protéines comme les lectines et les transferrines ont été suggérées comme molécules de transport pour l'absorption gastro-intestinale de polypeptides. Le greffage covalent de lectine à des particules de polystyrène a significativement augmenté leur assimilation par les plaques de Peyer (follicules de tissu lymphoïde recouvert d'un épithélium contenant les cellules M) et les tissus intestinaux [116]. Les plaques de Peyer ne présentant pas d'activité de dégradation lysosomale, ces caractéristiques favorables ont stimulé la recherche dans la visée de ces plaques dans le cadre de la délivrance de peptides [117]. Des microparticules de taille inférieure à 10 µm sont ainsi capables de traverser les plaques de Peyer. Des études histologiques ont montré que des particules de 100 nm se répandaient via les couches sub-mucosales, tandis que de plus grandes particules (10 µm) étaient principalement localisées dans la paroi de l'épithélium [118].

Des corrélations taille-dépendantes ont également été confirmées sur des cellules Caco-2 [119]. Les systèmes de transporteurs colloïdaux déjà étudiés pour améliorer la délivrance de peptides incluent les microémulsions [120], les liposomes [121], les nano- et micro-particules [122] et les micelles polymériques [123]. La charge de surface et la taille des particules sont les facteurs principaux qui contrôlent l'assimilation de ces particules par les plaques de Peyer. En effet, il a été montré que l'assimilation par les plaques de Peyer était plus importante pour des particules de taille inférieure ou égale à 1 µm, portant une charge de surface négative [124].

Bien que les résultats soient prometteurs, les quantités de particules absorbées par l'épithélium intestinal restent insuffisantes et les possibilités d'assimilation non spécifiques par les entérocytes ou les cellules M restent controversées. De plus, des problèmes de toxicité pourraient apparaître suite à une absorption continue de particules par les cellules M et engendrer une réaction immunitaire. Néanmoins, si les particules administrées présentent une taille inférieure à 1 µm permettant de contourner cette absorption par les plaques de Peyer, aucune réaction indésirable ne sera déclenchée. Les travaux de Gaumet *et al.* ont montré que des particules de taille inférieure à 100 nm étaient majoritairement absorbées par voie

intracellulaire, jusqu'à rejoindre le noyau des cellules pour certaines, alors que des particules de taille supérieure à 300 nm étaient situées dans la membrane cellulaire [125].

L'utilisation de particules de taille nanométrique est donc une alternative permettant à la fois de surmonter la barrière de la dégradation enzymatique, d'améliorer la perméabilité épithéliale, et de conserver l'activité biologique du principe actif au cours de la formulation.

5. Les différentes techniques d'encapsulation

L'encapsulation est considérée comme la technique la plus adaptée à l'administration de principes actifs protéiques par voie orale, elle permet de pallier à la fois les contraintes physico-chimiques du TGI et de conserver l'activité biologique du principe actif lors du procédé d'encapsulation.

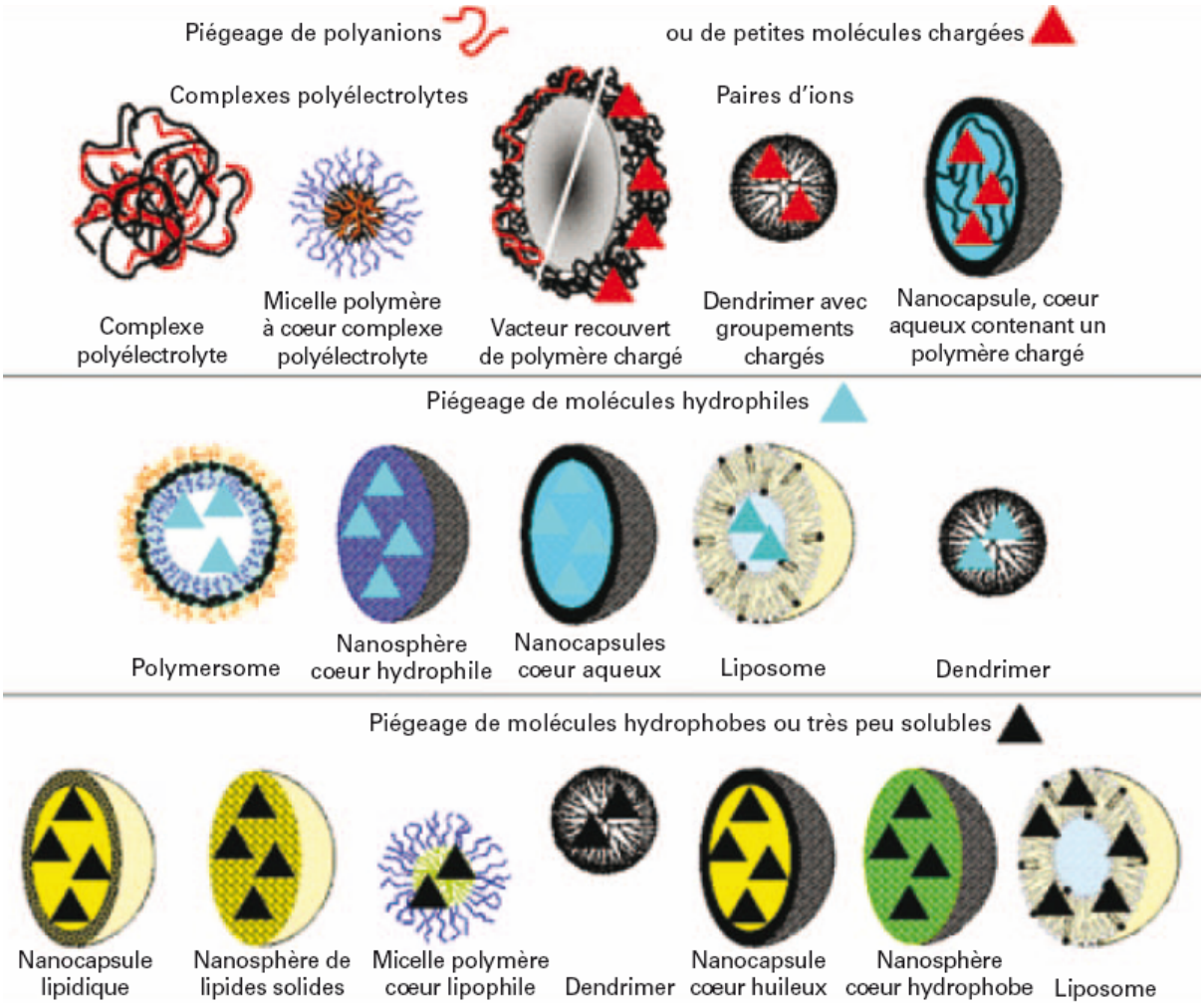


Figure 19 : Différents types de particules permettant l'encapsulation d'un principe actif [126]

De nombreuses techniques permettent l'encapsulation de principes actifs et conduisent à différents types de particules dont les propriétés dépendent du procédé de fabrication (figure 19). Parmi ces techniques, les plus fréquemment utilisés sont les suivantes [127] :

5.1 La gélation ionotropique

La gélation ionotropique est basée sur la capacité de réticulation des polyélectrolytes en présence de certains ions pour former des hydrogels. Le cas le plus connu est celui de la gélation de l'alginate en présence de calcium. L'alginate est le polyanion le plus utilisé dans le domaine de l'encapsulation. Les cations divalents et trivalents induisent une gélation par liaison des unités guluroniques de l'alginate. Les micro- et macro-sphères sont produites via un goutte à goutte d'une solution d'alginate et de principe actif dans une solution de chlorure de calcium. Les ions calcium se répandent alors dans les gouttes d'alginate formant un réseau tridimensionnel de l'alginate ioniquement réticulé. Etant donné que la formation des gouttelettes se fait via une aiguille, la taille des particules est relativement importante. Néanmoins, des gouttelettes de plus petite taille peuvent être formées en utilisant des vibrations ou un système de pulvérisation [128].

Avantages

Cette technique présente l'avantage principal de permettre une formulation douce et de conserver ainsi l'activité biologique des protéines. Tous les polyélectrolytes étant hydrosolubles, cela permet d'encapsuler les protéines sans utiliser de solvants organiques et de températures élevées. Cette technique est également simple, rapide, rentable et industrialisable.

Limites

La gélation ionotropique pour la délivrance contrôlée de protéines, bien que permettant la complexation dans des conditions douces, présente un inconvénient majeur. En effet, la matrice et la membrane formées ne sont pas capables de contrôler la libération sur une longue période. Cependant, pour permettre l'utilisation de cette technique pour la délivrance contrôlée de protéines, il est nécessaire de contrôler la cinétique de libération, notamment par le biais de membranes de plus grande densité obtenues en incorporant des polyélectrolytes chargés pouvant se complexer avec l'alginate. Des études ont montré que certains polyélectrolytes pouvaient présenter des problèmes de biocompatibilité [129-131]. En effet,

une réaction immunitaire a été observée suite à l'implantation de particules d'alginate : les unités manuroniques de l'alginate ont été montrées comme responsables de la stimulation de la production de molécules inflammatoires (interleukine IL-1 et TNF-α).

5.2 Le spray-dring

La technique de spray-drying est largement utilisée dans le secteur pharmaceutique depuis la fin des années 1970, pour former des systèmes microparticulaires pour la libération contrôlée de principes actifs. Un polymère hydrophile ou hydrophobe est préalablement dissout dans un solvant approprié. Le principe actif peut être soit dissout, soit mis en suspension dans ce même solvant. Le mélange est ensuite pulvérisé à l'aide d'une buse, conduisant à l'obtention de microsphères solides précipitées [132]. Il est parfois nécessaire d'inclure des plastifiants pour permettre la formation de microcapsules de forme sphérique régulière et de surface lisse, en réduisant la rigidité de chaîne de polymère [133].

Avantages

Un des principaux avantages de cette technique est sa large gamme d'applications. Des polymères aussi bien hydrophiles qu'hydrophobes peuvent être utilisés en choisissant le solvant approprié. Bien que des courants d'air chaud soient nécessaires pour permettre le séchage, la température des gouttelettes peut être maintenue à des valeurs faibles en raison de l'évaporation rapide du solvant, permettant ainsi d'encapsuler des principes sensibles à la chaleur comme les protéines [134].

Cette technique est rapide et conduit à des résultats similaires aux techniques conventionnelles en termes de distribution de taille, de morphologie des particules et de cinétique de libération du principe actif avec l'avantage indéniable de permettre une encapsulation rapide et importante du principe actif.

Limites

Néanmoins, cette technique demande une quantité de matière considérable car une quantité non négligeable peut rester à l'intérieur de la chambre de séchage due à l'adhésion sous forme humide, ce qui pose de sévères contraintes dans le cas de composés onéreux ou faiblement disponibles.

De plus, le processus de séchage peut conduire à un changement de morphologie des particules séchées [135, 136]. Pour exemple, des cristaux de progestérone sous forme alpha initiale se sont transformés en forme bêta lors de l'étape de séchage après association avec le PLA. Un autre problème pouvant survenir est la formation de fibres dans le cas où les forces nécessaires à la formation des gouttelettes par rupture du filament de liquide (jet) seraient insuffisantes. Dans ce cas, il est important de considérer la nature du polymère à utiliser ainsi que sa viscosité.

5.3 L'émulsion

Des méthodes d'évaporation/extraction de solvants ont largement été utilisées pour préparer des microsphères chargées de divers principes actifs, notamment hydrophobes. Dans le cadre de l'encapsulation de protéines, des émulsions huile/eau (h/e), huile/huile (h/h) ou eau/huile/eau (e/h/e) ont été utilisées. Selon le nombre d'émulsions produites pendant la préparation des microsphères, l'évaporation/extraction de solvant peut être divisée en deux méthodes : émulsion simple et double (figure 20).

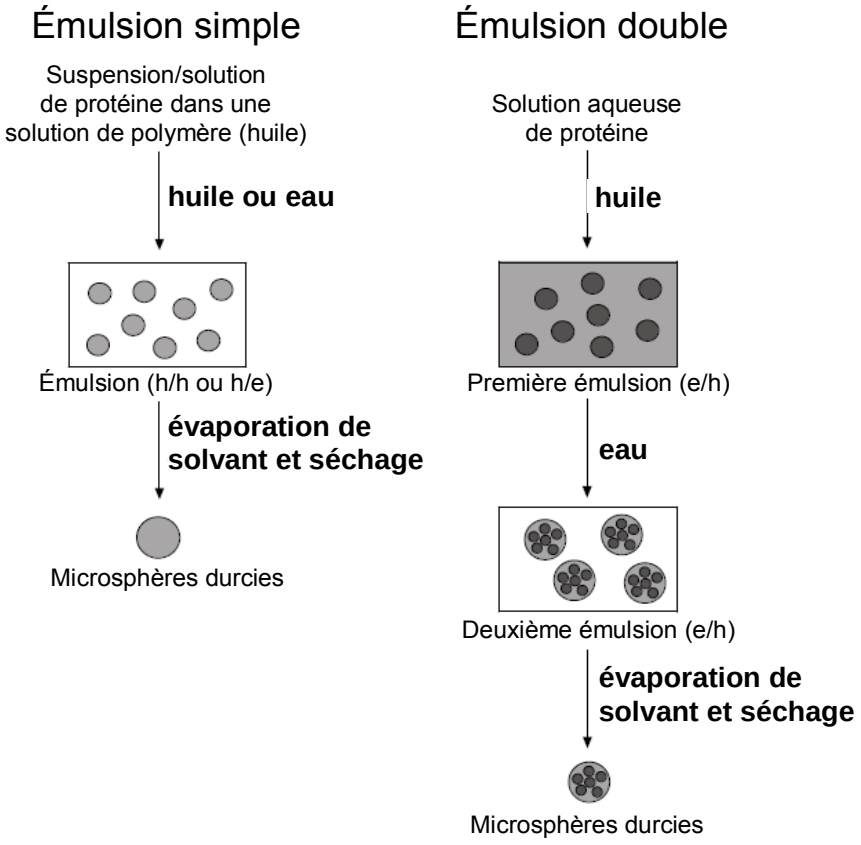


Figure 20 : Microsphères obtenues par évaporation de solvant : émulsion simple (gauche) et double (droite)

5.3.1 L'émulsion simple (h/h ou h/e)

Dans la méthode d'émulsion simple, les protéines sont placées dans une phase dispersée, qui est une solution de polymère dans un solvant organique dont les traces résiduelles sont tolérées par l'organisme comme le dichlorométhane ou l'acétate d'éthyle. L'acide polylactique (PLA) et poly(lactique-co-glycolique) (PLGA) sont les polymères synthétiques biodégradables les plus largement utilisés dans la préparation de composés relarguants. La cinétique de relargage peut être contrôlée en changeant les masses molaires et/ou la proportion des copolymères. Les principes actifs peuvent être dispersés sous forme de particules solides ou solubilisés dans la solution de polymère. La solution ou suspension de principe actif est ajoutée dans une phase continue, pouvant être une huile minérale (h/h) ou une solution aqueuse (h/e) contenant des tensioactifs. L'étape d'émulsification est effectuée par agitation, homogénéisation ou sonication. La présence de tensioactifs dans la phase continue stabilise l'émulsion créée.

Le solvant organique, constituant la phase dispersée, est éliminé par évaporation ou extraction. Au cours du processus d'évaporation, le durcissement de l'émulsion se produit lorsque le solvant organique volatile de la phase dispersée passe dans la phase continue et s'évapore de celle-ci à pression atmosphérique. L'utilisation de vide ou une augmentation de température modérée peut accélérer l'évaporation du solvant. Dans le processus d'extraction de solvant, l'émulsion est transférée dans une grande quantité d'eau (ou d'autre milieu) et l'extraction de solvant se produit plus rapidement que dans le cas de l'évaporation. Ainsi, les microsphères produites par extraction sont plus poreuses que celles obtenues par évaporation de solvant. La structure poreuse conduit à une libération plus rapide du principe actif. Les microsphères préparées sont récupérées par centrifugation ou filtration puis lyophilisées.

5.3.2 L'émulsion double (e/h/e)

Dans le cas des émulsions doubles, une solution aqueuse contenant le principe actif est d'abord émulsionnée dans un solvant organique contenant le polymère solubilisé. L'émulsion e/h est ensuite ajoutée dans une phase aqueuse contenant des tensioactifs, formant ainsi l'émulsion e/h/e. Enfin, le solvant organique est éliminé par extraction dans une phase aqueuse externe ou par évaporation.

Avantages

La méthode d'évaporation/extraction de solvant est largement utilisée pour la libération de molécules de petite taille. Des principes actifs de petite taille avec une faible hydrosolubilité peuvent être encapsulés avec succès dans des micro/nanosphères de polymères. De plus, l'utilisation de polymères biodégradables comme les PLA et PLGA permet de contrôler la cinétique de libération via le contrôle de leur cinétique de dégradation ou du procédé de formation de l'émulsion. En effet, les forces importantes subies par les microsphères ont tendance à produire des microparticules plus petites, conduisant à une libération plus rapide de leur contenu en raison de leur surface de contact plus grande et d'un chemin de diffusion plus court.

Limites

Tandis que des méthodes d'évaporation/extraction de solvants ont conduit à la préparation de microparticules pour la délivrance de protéines, les méthodes ne sont toujours pas idéales et beaucoup d'aspects restent à améliorer. Tout d'abord, l'efficacité d'encapsulation du principe actif n'est pas optimale. Ensuite, la technique nécessite l'utilisation de solvants organiques généralement toxiques pour permettre la dissolution des polymères biodégradables. De plus, afin de répondre aux critères, le taux résiduel de solvant organique toxique doit être nul ou réduit au minimum. Enfin, dans la plupart des cas, les protéines sont libérées avec un « burst release » pouvant induire une réponse incorrecte du patient liée à une trop haute dose de principe actif dans le sang, et la totalité du principe actif n'est pas libérée. Ceci est principalement dû à une modification de la stabilité des protéines. Pour rester actives, celles-ci doivent conserver leur conformation tridimensionnelle, cependant elles sont susceptibles d'être dénaturées ou agrégées par divers facteurs, notamment suite à une exposition aux solvants organiques et aux forces subies lors de l'étape d'émulsification ou de sonication.

5.4 La polymérisation interfaciale (polycondensation)

Deux monomères réactifs (typiquement un dichlorure et une diamine) sont respectivement dissous dans des solvants non miscibles puis mélangés pour former une émulsion huile/eau (dichlorure dans la phase huileuse et diamine dans la phase aqueuse). L'un des monomères diffuse à l'interface huile/eau, permettant leur réaction pour former la membrane polymérique

(figure 21). Un exemple typique est la formation de microcapsules de polyamide (nylon) [137].

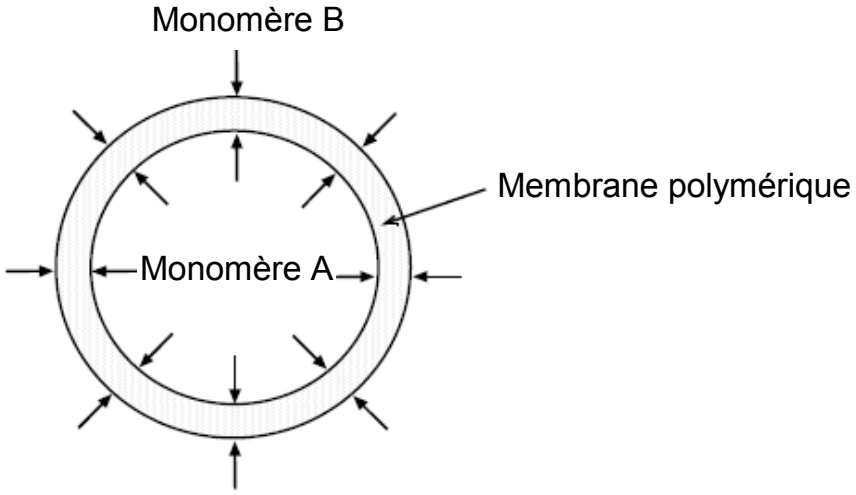


Figure 21 : Microencapsulation par polymérisation interfaciale (d'après [137])

Une phase organique (chloroforme/cyclohexane) contenant un tensioactif (par exemple, le trioléate de sorbitane également appelé Span 85) et un tampon aqueux contenant le principe actif à incorporer (enzymes ou protéines) et la diamine sont préparés séparément. Les deux phases sont mélangées pour former une émulsion eau/huile jusqu'à obtention de la taille des gouttelettes souhaitée. Une autre phase non aqueuse contenant le chlorure d'acide est ajoutée à l'émulsion. La polymérisation est stoppée par ajout d'un excès de la phase non aqueuse.

Les microcapsules sédimentent et sont récupérées puis lavées pour éliminer les résidus de solvants organiques et l'excès de réactif. Des combinaisons diverses de monomères peuvent être utilisées pour obtenir une large gamme de membranes polymériques [137]. Du chlorure de sébacoyle et de la 1,6-hexane diamine peuvent être utilisés pour former du polyamide 6-10. Les microcapsules obtenues par cette technique ont tendance à être fragiles et difficiles à manipuler. Le chlorure de téréphthaloyle et la 1,6-hexane diamine forme une membrane de polyester. Typiquement, les chlorures d'acide et les diamines sont des monomères réactifs ; cependant, les isocyanates peuvent également être utilisés en remplacement total ou partiel des chlorures d'acide [138]. Le polymère composé d'un seul type de monomère peut être formé à l'interface (polymérisation interfaciale par addition) [137]. Les polyalkylcyanoacrylates en font partie. La phase aqueuse contenant le principe actif et la phase organique contenant le monomère acrylique sont mélangées pour former une émulsion

eau/huile. La polymérisation est amorcée par la présence d'eau dans la phase aqueuse avec le cyanoacrylate dissout dans la phase organique.

Récemment, des nanoparticules d'insuline ont été préparées en utilisant la technique de polymérisation interfaciale par addition [120]. Afin d'éviter les nombreuses étapes de lavage, des huiles (acides caprylique/caprique, triglycérides et mono/diglycérides) et des tensioactifs (polysorbate 80 (Tween 80) et monooléate de sorbitane) ont été utilisés pour formuler des émulsions de taille micrométrique. Le poly(éthyl 2-cyanoacrylate) obtenu est reconnu comme biodégradable. Etant donné que l'insuline est confinée dans la phase aqueuse de l'émulsion eau/huile, une efficacité d'encapsulation importante (86 %) peut être atteinte. L'insuline est relarguée avec un « burst release » initial pendant les 30 premières minutes, suivi d'une libération constante pendant près de 3 heures, après lesquelles la quantité libérée diminue.

Limitations

Bien que l'on ait initialement proposé cette méthode pour l'encapsulation d'enzymes, de sérieux problèmes techniques demeurent toujours. Le premier est la large surface de contact (interface) huile/eau créée au cours de la réaction, durant laquelle les enzymes risquent d'être inactivées. Deuxièmement, les grandes quantités d'enzymes peuvent participer à la réaction de polymérisation modifiant ainsi leur activité biologique. Enfin, il est souvent difficile de contrôler la réaction de polymérisation : le rendement et la qualité de la membrane obtenue par polymérisation interfaciale peuvent être contrôlés par un certain nombre de facteurs comme la nature des monomères réactifs, les conditions de réaction, les concentrations en monomères, la température, la qualité du mélange [138]. De plus, de nombreuses étapes de lavage sont nécessaires pour éliminer les monomères n'ayant pas réagi, les sous-produits, les restes de solvants organiques et les tensioactifs. Ces lavages répétés peuvent conduire à une perte de principes actifs solubles dans l'eau. Pour finir, les changements de pH engendrés par la formation d'acide chlorhydrique, sous-produit de la réaction du chlorure d'acide et de l'amine, peuvent endommager le principe actif.

5.5 La séparation de phase ou coacervation

L'encapsulation par séparation de phase est un procédé comprenant 3 étapes : (1) séparation de phase du polymère « de surface » pour former des gouttelettes de coacervats, (2)

adsorption des gouttelettes à la surface du principe actif et (3) solidification des capsules [139] (figure 22).

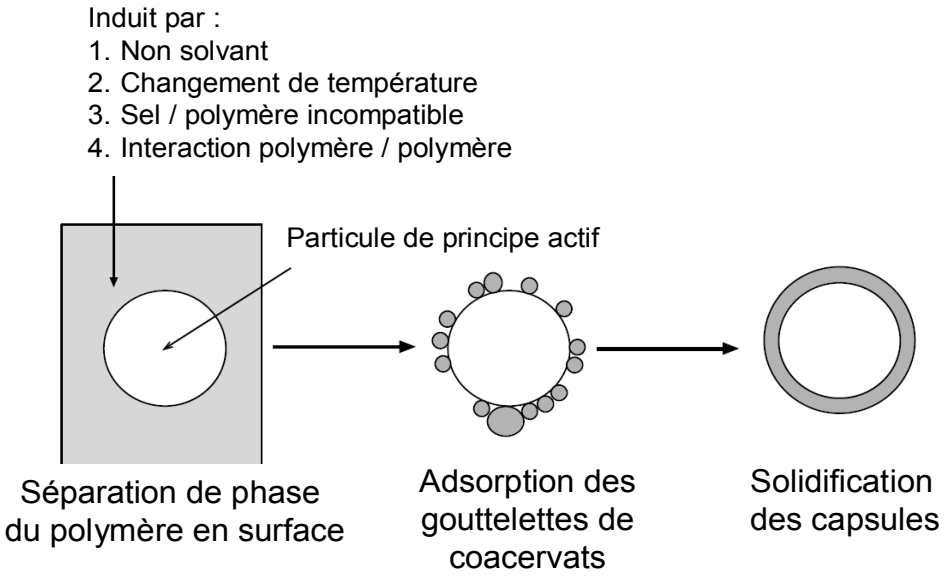


Figure 22 : Schéma de la formation d'un coacervat [128]

Les techniques de séparation de phase peuvent être classifiées selon la méthode induisant la séparation de phase : ajout d'un non-solvant, modification de la température, ajout de sel ou de polymère incompatible [140]. Afin de déterminer les zones de séparation de phase permettant de conduire à l'obtention des coacervats, des diagrammes de phases sont généralement réalisés permettant de connaître ces conditions de séparation de phase (figure 23).

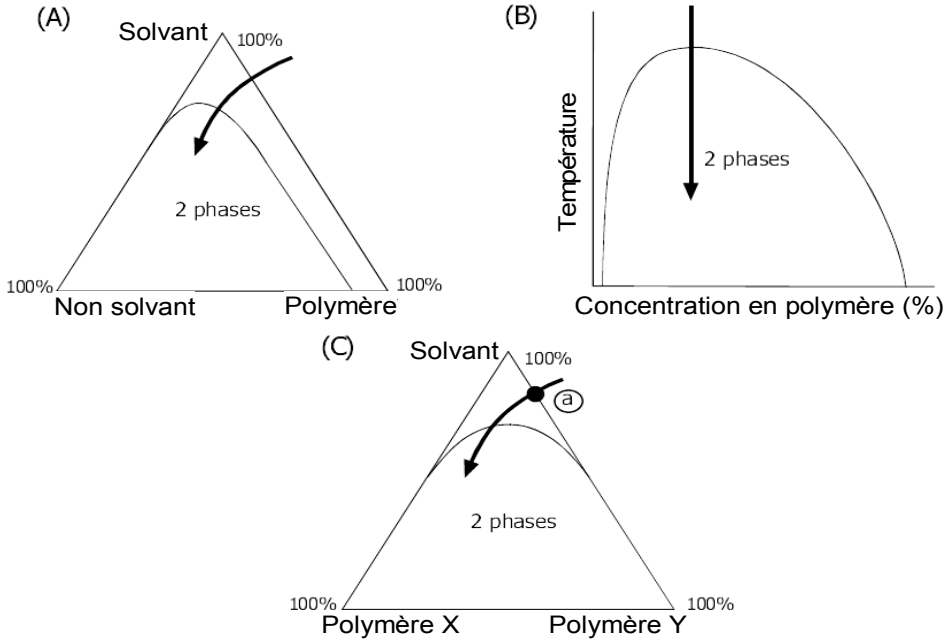


Figure 23 : Diagrammes de séparation de phase basés sur l'ajout de non-solvant (A), la température (B) et l'ajout de polymères incompatibles (C) [141].

Avantages

La technique de séparation de phase par ajout de non-solvant est la plus répandue dans l'encapsulation de principes actifs hydrosolubles, comme les protéines, permettant ainsi d'éviter leur contact avec la phase continue aqueuse. Cela réduit au minimum la perte de principe actif hydrosoluble par migration vers la phase aqueuse, induisant une efficacité d'encapsulation plus importante. Dans le cas de la formation de particules nanométriques, ce procédé est plus couramment appelé nano-précipitation. Cette méthode permet également un contrôle efficace de la taille des particules avec une distribution de taille plus étroite, en variant simplement les paramètres des composés ajoutés comme la concentration en sel [142], la viscosité et la quantité de non-solvant ainsi que la masse molaire du polymère utilisé [143].

Limites

Bien que beaucoup de systèmes de séparation de phase aient démontré leur efficacité, chaque méthode présente plusieurs inconvénients. Les microsphères ont tendance à s'agréger et le passage à l'échelle industrielle peut s'avérer difficile [144]. Dans le cas de l'ajout de non-solvant, il reste souvent des traces de ceux-ci qui sont généralement des composés toxiques difficiles à éliminer. Des études ont néanmoins montré qu'avec des techniques de séchage appropriées, il était possible de limiter les traces de solvant résiduelles [145].

Cas particulier : la coacervation complexe

Il existe un cas particulier de la séparation de phase pour lequel le composé ajouté induisant la séparation de phase est un polymère de charge opposé au premier. La séparation de phase est alors induite par des interactions polymère-polymère conduisant à la formation d'un coacervat de faible solubilité, qui va précipiter et induire la séparation de phase. Dans ce cas précis, la coacervation est dite complexe.

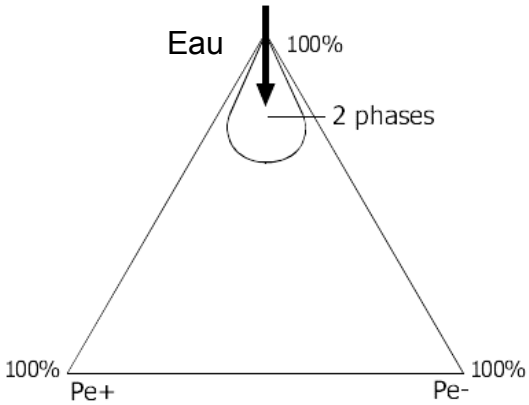


Figure 24 : Diagrammes de séparation de phase dans le cas d'un polyélectrolyte positif (Pe+) et d'un polyélectrolyte négatif (Pe-) [141]

Cette technique diffère de l'ajout d'un polymère incompatible dans le sens où ici, les deux composés se retrouvent présents au sein du coacervat formé. Dans ce cas, le diagramme de phase aura l'allure de la figure 24.

Avantages

Tout comme la séparation de phase, la coacervation complexe permet l'encapsulation de protéines, en ne faisant intervenir qu'une seule phase de nature aqueuse. Ainsi, aucune dégradation, ni perte d'activité biologique n'a lieu. Cette technique apporte un contrôle efficace de la taille des particules avec une distribution de taille étroite associée à une efficacité d'encapsulation importante.

Limites

Dans le cas des interactions polymère-polymère (coacervation complexe), la gamme de pH permettant la complexation est relativement limitée et l'utilisation de réticulants peut poser de sérieux problèmes. Etant donné que la technique est basée sur des interactions électrostatiques entre deux polyélectrolytes, le pH du milieu est un facteur important. Par exemple, dans un système à base de gélatine/gomme arabique, le pH doit se situer au-dessous de la valeur du point isoélectrique de la gélatine (pH 8,9) de façon à ce qu'elle soit positivement chargée et la gomme arabique doit être négativement chargée dans les mêmes conditions. Ainsi, la gamme de pH appropriée pour ce système est restreinte [128]. La gamme de pH peut être étendue par addition d'un polymère hydrosoluble non-ionique, comme le polyéthylène glycol [146, 147].

De plus, afin d'améliorer les propriétés des microcapsules obtenues, des agents réticulants peuvent être utilisés afin de les durcir. Le glutaraldéhyde et le formaldéhyde sont des composés fréquemment utilisés dans ce but. Une réaction de condensation se produit entre les groupements amines (de la gomme d'acacia par exemple) et les fonctions aldéhydes du réticulant. Toutefois, l'agent réticulant peut diffuser jusqu'au cœur de la particule et ainsi se répandre jusqu'au principe actif avec lequel il peut réagir. Cette méthode n'est donc pas appropriée aux principes actifs protéiques. De plus, des problèmes de toxicité potentiels peuvent également survenir [128].

Parmi les techniques d'encapsulation présentées ci-dessus, toutes présentent des avantages et des inconvénients résumés dans le tableau ci-dessous (tableau 3).

Technique	Avantages	Inconvénients
Gélation ionotropique	- formulation douce pour les protéines : pas de solvant organique, milieu aqueux, température faible, - technique simple et rapide	- difficulté de contrôle de la cinétique de libération
Spray-drying	- large gamme d'applications - encapsulation importante et rapide du principe actif	- nécessite une quantité de matière importante → pertes
Double émulsion	- bon contrôle de la cinétique de libération - possibilité d'encapsuler de petites molécules	- efficacité d'encapsulation limitée - utilisation de solvant organique - phénomène de burst-release
Polymérisation interfaciale	- large gamme de membranes possibles - en fonction des monomères, encapsulation de composés hydrophiles ou hydrophobes - encapsulation élevée d'insuline à l'aide de cyanoacrylates	- large surface de contact huile/eau → dégradation des principes actifs fragiles - contrôle limité de la réaction - lavages nécessaires → perte de produit
Séparation de phase	- encapsulation de protéines possible - bon contrôle de la taille des particules	- fabrication industrielle limitée - récupération des particules difficile
Coacervation complexe	- conditions douces : pas de solvant organique, température ambiante	- gamme de pH limitée - si utilisation de réticulant → toxicité

Tableau 3 : Comparaison des différentes techniques d'encapsulation

Parmi ces techniques, la coacervation complexe utilisée sans ajout de réticulant, permet l'encapsulation de principes actifs fragiles comme les protéines. Bien que cette technique présente également des inconvénients, elle est la seule à permettre une libération contrôlée du principe actif et ce, sans ajout de tensioactif ou d'autre stabilisant. De plus, son utilisation en milieu aqueux en fait une technique de choix pour une utilisation à des fins thérapeutiques. Le paragraphe suivant traite de la coacervation complexe de manière plus détaillée.

6. La coacervation complexe

6.1 Définition

Lorsque la désolvatation simultanée de deux polyélectrolytes hydrosolubles portant des charges opposées est provoquée par une modification de pH du milieu aqueux, on parle de coacervation complexe [148]. En effet, la structure du coacervat est « complexe » puisqu'elle comprend deux polymères, par opposition à la coacervation simple qui génère des gouttelettes de coacervats constitués d'un seul polymère. Le procédé d'encapsulation par coacervation complexe se déroule de la façon suivante (figure 25) :

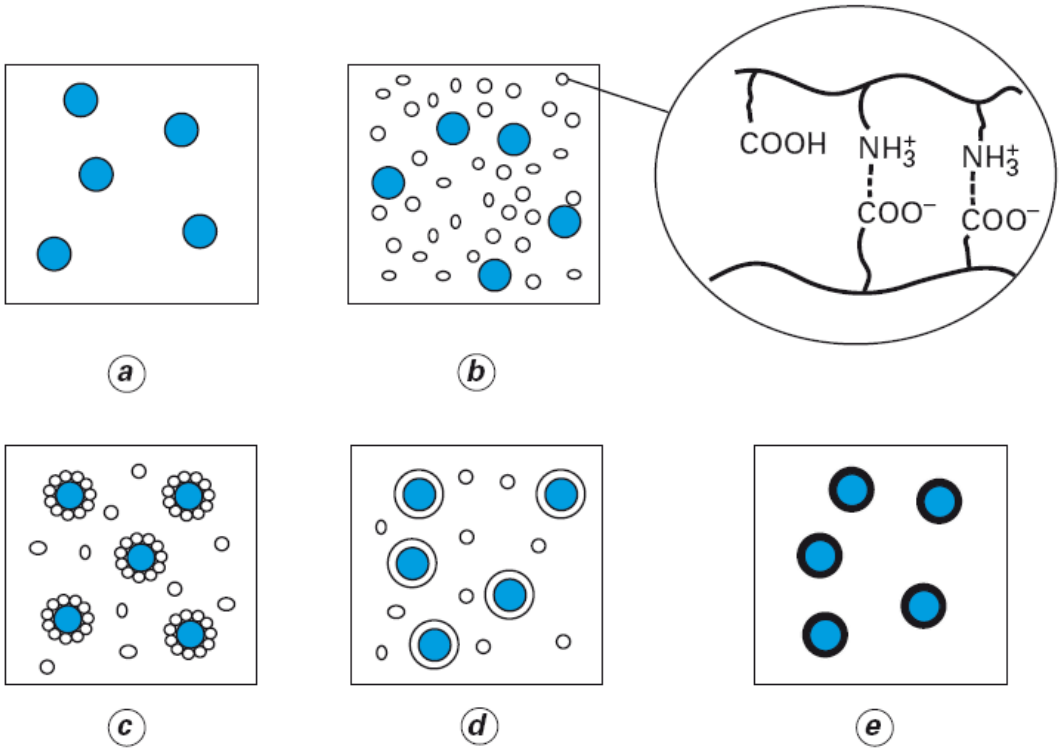


Figure 25 : Schéma du principe d'encapsulation par coacervation complexe [148]

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

d). Finalement, cet enrobage est consolidé par réticulation (phase e) des macromolécules constitutives du coacervat.

Il est également important de travailler avec des solutions très diluées de polymères (concentrations inférieures à 3 %), pour que le phénomène de coacervation puisse se produire. La membrane des coacervats peut ensuite être éventuellement réticulée par du glutaraldéhyde ou de l'acide tannique par exemple. Après ce traitement, les particules peuvent être isolées et séchées.

Comme le suggère la figure 25, les particules obtenues sont des capsules. Leur taille varie de quelques micromètres à quelques dizaines de nanomètres. Elle dépend essentiellement de la taille initiale des cristaux ou des globules de matière active dispersée. Dans ce deuxième cas, la taille des microcapsules pourra être ajustée en jouant sur la vitesse d'agitation de l'émulsion initiale. Seules les matières actives lipophiles peuvent être encapsulées selon ce procédé : huiles végétales ou minérales, huiles essentielles ...

Les taux d'encapsulation peuvent être très élevés, de l'ordre de 80 %. Ce procédé est facilement industrialisable en raison de l'absence d'utilisation de solvant organique. Les rendements de production sont très élevés. Une des limitations du procédé concerne le choix limité de matériaux puisque seul un couple de polyélectrolytes portant des charges opposées peut convenir.

Une variante de cette méthode peut être apportée pour encapsuler des matières actives hydrosolubles. Elle consiste à formuler une émulsion inverse eau/huile (e/h) puis à encapsuler cette émulsion, le coacervat venant se déposer sur les gouttelettes huileuses. La difficulté de cette approche réside dans la formulation d'une émulsion double eau/huile/eau (e/h/e) stable, condition indispensable à une bonne encapsulation. L'encapsulation par coacervation complexe est déjà largement utilisée dans de nombreux secteurs industriels. Dans l'industrie papetière, la production de microcapsules pour la réalisation de papiers autocopiants est particulièrement importante. Dans le milieu pharmaceutique, cette technique est également mise en œuvre pour la microencapsulation de paraffine liquide ou d'huiles essentielles utilisées en aromathérapie ...

6.2 Encapsulation de l'insuline par coacervation complexe

La formation de complexes de polyélectrolytes se fait dans des conditions douces (température ambiante et agitation modérée) et ne nécessite aucune utilisation d'ultrasons, de solvants organiques et de stabilisants comme c'est le cas dans la majorité des techniques et protocoles décrits dans la littérature [149-151]. La technique de coacervation complexe est donc idéale pour complexer des composés peptidiques fragiles comme l'insuline. La formation du complexe est gouvernée par l'attraction électrostatique entre les groupements de charges opposées ainsi que par la libération des contre-ions liés aux chaînes de polyélectrolytes. La mise en présence de deux polyélectrolytes de charges opposées, conduit sans aucun apport d'énergie extérieure, à la formation d'un coacervat complexe stable (figure 26). La stabilité du complexe sera d'autant plus grande que les masses des deux polyélectrolytes mis en présence seront différentes. Ainsi, il sera plus favorable d'ajouter le polyélectrolyte de faible masse dans celui de plus grande masse afin d'optimiser la stabilité des liaisons électrostatiques formées [152]. De plus, les solutions de polyélectrolytes doivent être diluées de façon suffisante afin d'éviter toute agrégation macroscopique des composés présents en solution. Il suffit donc d'ajouter goutte à goutte une solution diluée de polycation dans une solution diluée de polyanion ou inversement [153].

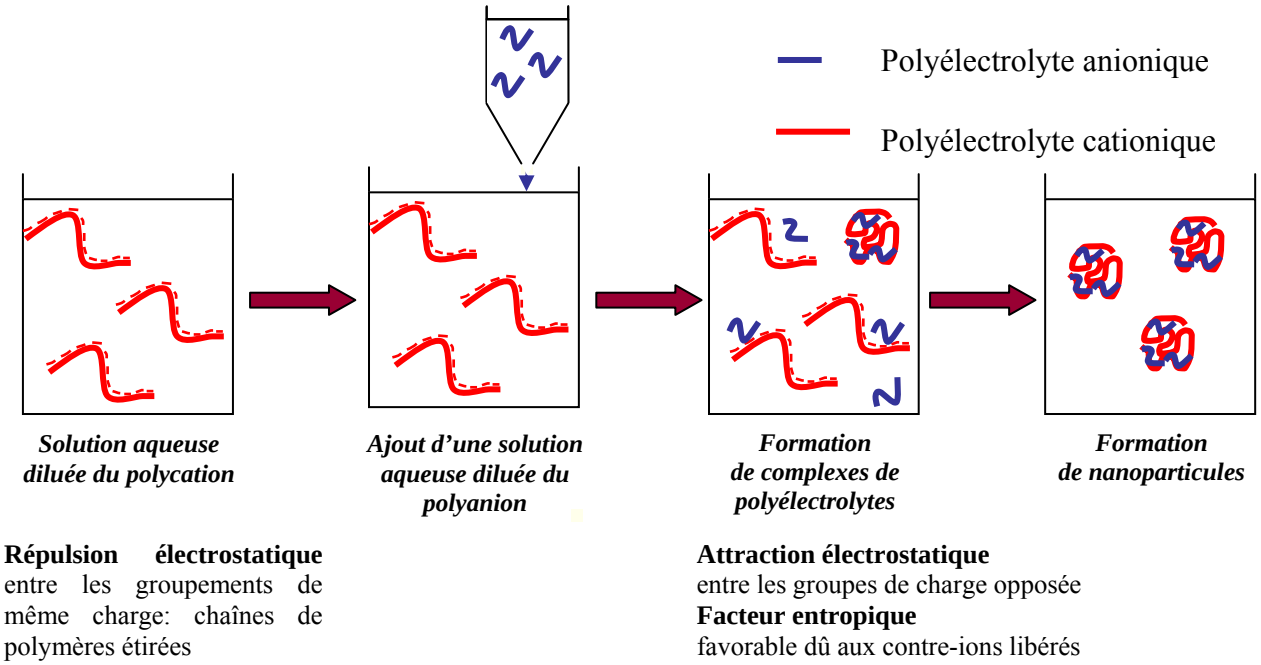


Figure 26 : Technique de coacervation complexe

Le complexe ainsi formé se présente sous forme d'un objet de structure homogène dont le cœur étant généralement globalement neutre et la surface fortement chargée, de la charge du polyélectrolyte de plus forte masse molaire (figure 27). Cette charge de surface permet une répulsion électrostatique des complexes et donc une bonne stabilité de la suspension colloïdale obtenue.

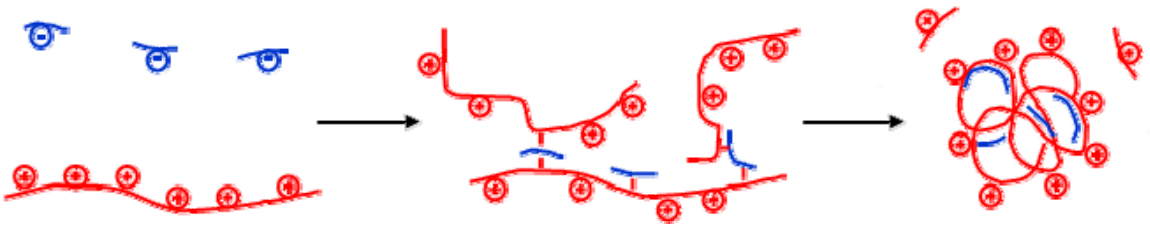


Figure 27 : Schéma de la formation d'un coacervat complexe

La formation des complexes de polyélectrolytes est majoritairement influencée par la nature, la répartition et la densité de charge présentes sur les polyélectrolytes. En effet, si celle-ci est trop faible, les complexes ne se formeront pas et si elle est trop forte, un précipité sera obtenu plutôt qu'un coacervat.

D'autres facteurs sont également déterminants, comme la masse molaire des polyélectrolytes ou les conditions expérimentales comme le pH ou la force ionique. En effet, le pH influence le degré d'ionisation des groupements portés par les polyélectrolytes faibles, comme le chitosane, et donc leur densité de charge. Une forte concentration en sel crée un effet d'écran électrostatique entre les charges des polyélectrolytes et peut inhiber la formation des complexes. Le ratio polyanion/polycation, la concentration des polyélectrolytes ou leur ordre d'addition influenceront également la charge globale et les propriétés du coacervat obtenu. Tous ces paramètres doivent être contrôlés avec précision afin de produire de façon reproductible des particules avec les caractéristiques souhaitées.

6.2.1 Physico-chimie de l'insuline

L'insuline, protéine de séquence définie d'acides aminés, possède de nombreux groupements ionisables apportés par les résidus de certains acides aminés. En effet, 6 d'entre eux peuvent porter une charge positive et 10 autres, une charge négative. L'insuline présente donc une structure chargée, dépendante du pH [154]. Un point isoélectrique est donc défini

pour une valeur de pH pour laquelle une électro-neutralité est observée. Dans le cas de l'insuline, les travaux de Li *et al.* ont déterminé le point isoélectrique de l'insuline par électrophorèse à un pH de 5,3-5,4 [155]. La valeur communément admise est de 5,5 comme le suggère la figure 28, qui présente le dosage théorique de l'insuline réalisé à partir des valeurs des pK intrinsèques déterminés par Tanford et Epstein [156].

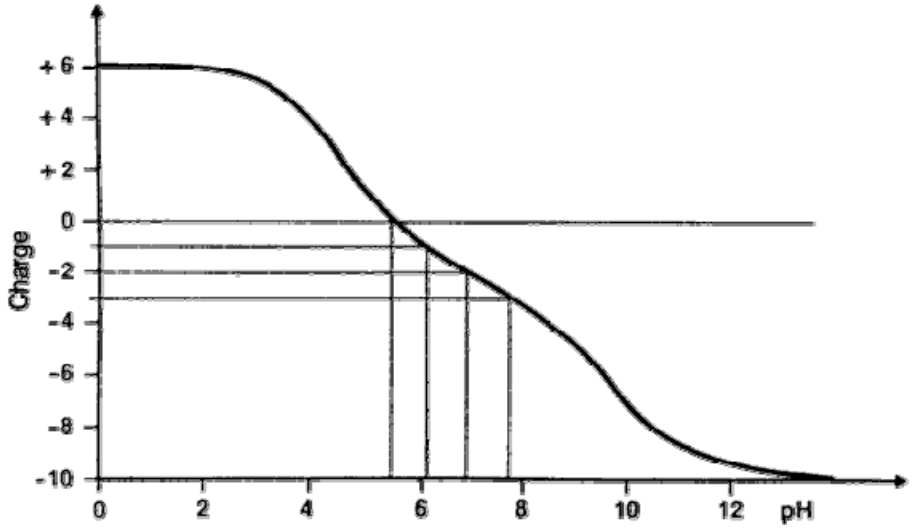


Figure 28 : Charge globale de la molécule d'insuline en fonction du pH [157]

Ces données nous permettent de la considérer soit comme polyélectrolyte positif, soit comme polyélectrolyte négatif (figure 29).

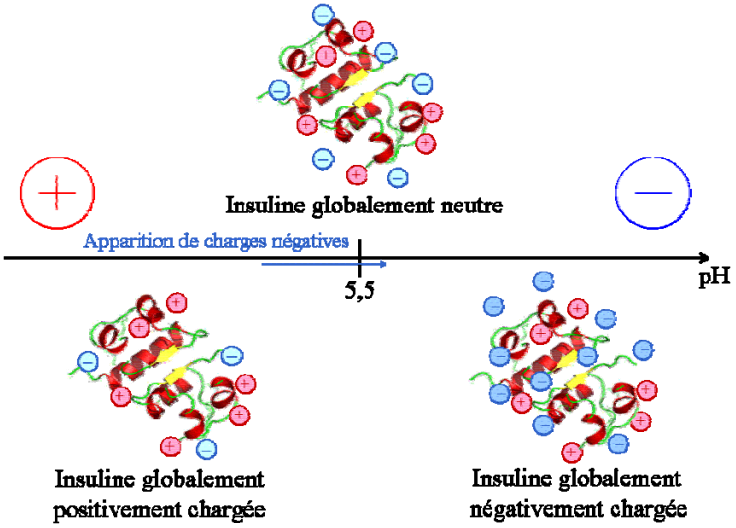


Figure 29 : Nature de la charge portée par l'insuline en fonction du pH

Cette nature ampholyte permet d'envisager l'utilisation de la technique de séparation de phase dans le cas particulier de la coacervation complexe. La seule condition à l'utilisation de

cette technique est de trouver un couple insuline/polyélectrolyte rendant possible la complexation. Le choix d'un polyélectrolyte de charge opposée à l'insuline, permettant l'obtention de nanoparticules par une réaction de coacervation complexe, est essentiellement conditionné par des contraintes chimiques liées au pH. L'étude de ses propriétés biologiques [158, 159] parallèlement à ses propriétés physico-chimiques, nous conduit à l'obtention de deux domaines distincts (figure 30) : un domaine où l'insuline est à la fois active et positivement chargée et un domaine où l'insuline est à la fois active et négativement chargée.

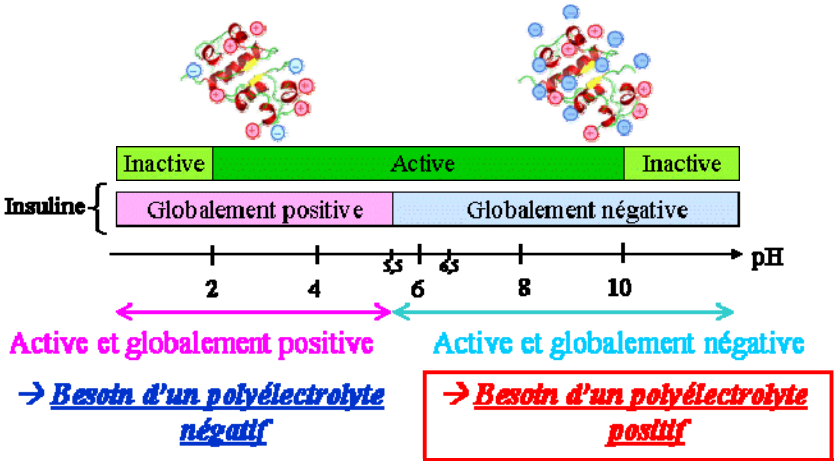


Figure 30 : Domaine d'activité et charges de l'insuline en fonction du pH

Les conditions idéales permettant la formation de nanoparticules correspondent à une valeur de pH où l'insuline est à la fois biologiquement active et non dégradée comme par exemple, la valeur du pH physiologique (pH 6,2). L'insuline peut donc être complexée indifféremment avec un polyélectrolyte négatif ou avec un polyélectrolyte positif.

6.3 Choix du couple insuline / polyélectrolyte

Parmi les nombreux polymères couramment utilisés dans le domaine de l'encapsulation de principes actifs, on trouve à la fois des polymères synthétiques (PLGA, poly(cyanoacrylate)…) et des polymères issus de la biomasse (alginate, acide hyaluronique, chitosane …). Ces derniers issus de la biomasse présentent généralement l'avantage d'être biodégradables et donc favorables à une utilisation thérapeutique.

Dans le cas de la coacervation complexe, deux techniques conduisent à l'encapsulation de l'insuline : la complexation peut se faire entre deux polyélectrolytes de charges opposées puis

l'insuline est ajoutée et piégée dans ce « réseau » (figure 31) ou alors l'insuline est considérée comme un polyélectrolyte à part entière et dans ce cas, intervient directement dans la réaction de complexation (figure 26). Les polyélectrolytes les plus utilisés dans le cas de la coacervation complexe de l'insuline sont l'acide hyaluronique, le chitosane et ses dérivés (complexation) ou encore l'alginate ainsi que le sulfate de dextrane (piégage).

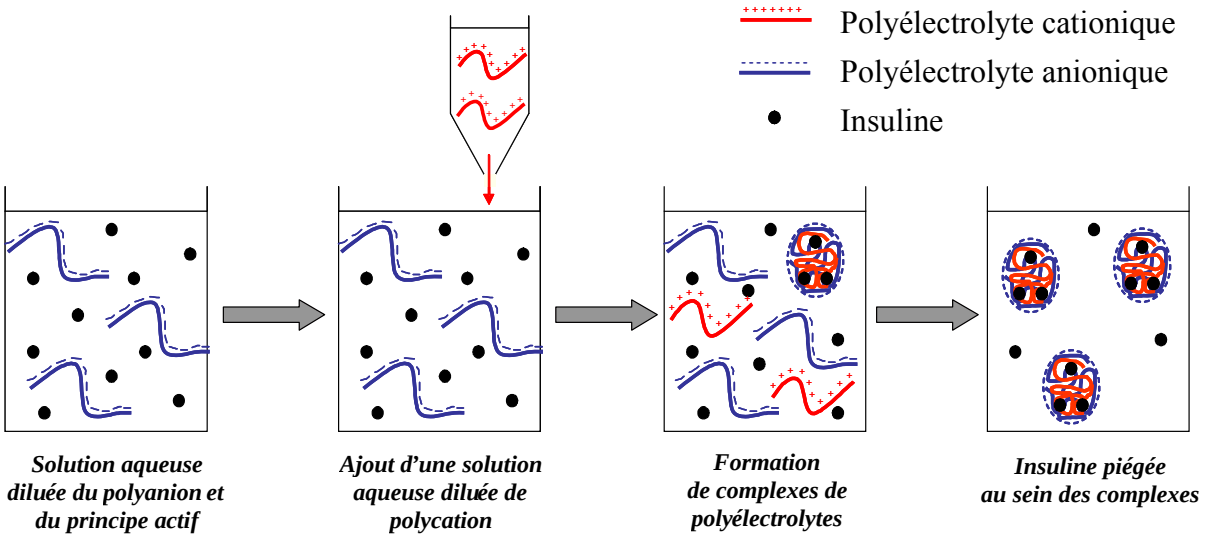


Figure 31 : Piégeage de l'insuline dans un complexe de polyélectrolytes

Dans notre cas, nous avons choisi de privilégier les techniques conduisant à l'utilisation du minimum de composés. Notre choix s'est donc tourné vers la complexation « directe » de l'insuline. L'insuline pouvant être positivement ou négativement chargée selon le pH, elle peut donc être complexée avec un polyélectrolyte négatif comme par exemple l'acide hyaluronique ou avec un polyélectrolyte positif comme le chitosane.

6.3.1 Comparaison du chitosane et de l'acide hyaluronique

Les travaux de Jederstrom [160, 161] sur la complexation de l'insuline avec l'acide hyaluronique ont montré la possibilité de complexer l'insuline et l'acide hyaluronique à l'aide d'un procédé de dialyse et de modifications de pH et de forces ioniques. Ces travaux ont donné lieu à un brevet [162] ainsi qu'à la mise en place d'une start-up travaillant sur la vectorisation de principes actifs thérapeutiques par voie orale à l'aide d'acide hyaluronique. Néanmoins, bien que les résultats soient concluants, le procédé est relativement long (~ 60 heures) et nécessite de lourdes étapes de changements du milieu de dialyse ce qui peut conduire à une industrialisation délicate.

Bien que la coacervation complexe soit indifféremment possible avec l'acide hyaluronique ou avec le chitosane, certains aspects penchent en faveur du chitosane. En effet, de nombreuses études ont montré que dans le cas de particules chargées, la voie de passage préférentiellement utilisée pour rejoindre la circulation sanguine et/ou systémique dépendait majoritairement de l'hydrophilie, de la taille et de la charge des composés. Or, la voie paracellulaire privilégie le passage de composés hydrophiles (diffusion passive), positivement chargés (espace intercellulaire négativement chargé) et de taille comprise entre 100-300 nm.

L'intégralité de ces critères s'applique d'avantage au chitosane qu'à l'acide hyaluronique. En effet, le chitosane est l'un des rares polyélectrolytes cationiques naturels. De plus, il présente des propriétés mucoadhésives que ne possède pas l'acide hyaluronique qui lui permettent d'augmenter le temps de contact avec les muqueuses et de maximiser son adsorption. De plus, l'utilisation d'un composé issu de ressources naturelles, renouvelables et contribuant à la valorisation des déchets de l'industrie de la pêche ne peut qu'appuyer le choix de ce polymère. Voyons plus en détails, le cas du chitosane.

7. Le chitosane

7.1 Présentation du chitosane

Le chitosane est un polymère naturel, dérivé de la chitine, présentant des propriétés particulièrement intéressantes qui en font un matériau fréquemment utilisé dans le domaine des biomatériaux : régénération des tissus [163], reconstruction osseuse [164] ou encore vectorisation de molécules actives [165]. Le chitosane est donc un excellent candidat à l'encapsulation de principes actifs à visée thérapeutique, notamment en termes de biocompatibilité. Néanmoins, le chitosane est une substance très peu répandue dans la nature et n'entre dans la composition que de certains insectes (comme par exemple dans la paroi abdominale des reines des termites) et dans la paroi cellulaire de certains champignons (les zygomycètes). Il n'y a donc pas de source primaire de chitosane exploitable.

La chitine est un composant d'origine naturelle issu de la biomasse. Elle est produite par les insectes, les arachnides, les animaux marins (crabes, crevettes …) et les champignons. Elle est également présente dans certaines bactéries et levures. Dans le règne animal, la chitine est un élément entrant dans la composition de la cuticule et du squelette interne. Au niveau des

autres règnes biologiques, elle est signalée dans les parois cellulaires des champignons et de certaines algues. La chitine est un homo-polysaccharide linéaire dont la structure chimique est un enchaînement d'unités monomères N-acétyl-β-D-glucosamine liées par liaisons glycosidiques (1→4) (figure 32). Elle représente le deuxième polysaccharide naturel le plus abondant après la cellulose [166, 167]. Les déchets de l'industrie de la pêche, essentiellement les carapaces de crustacés riches en chitine, ne sont pas exploitables de par la faible solubilité de la chitine, limitée aux solvants organiques toxiques, ce qui réduit sévèrement leurs applications potentielles. La chitine représente cependant la matière première nécessaire à la production du chitosane [168, 169]. La production est assurée par la transformation des déchets issus de la pêche après traitement chimique. Cette voie représente le principal itinéraire utilisé pour sa préparation dans l'industrie aussi bien que pour la recherche en laboratoires [170].

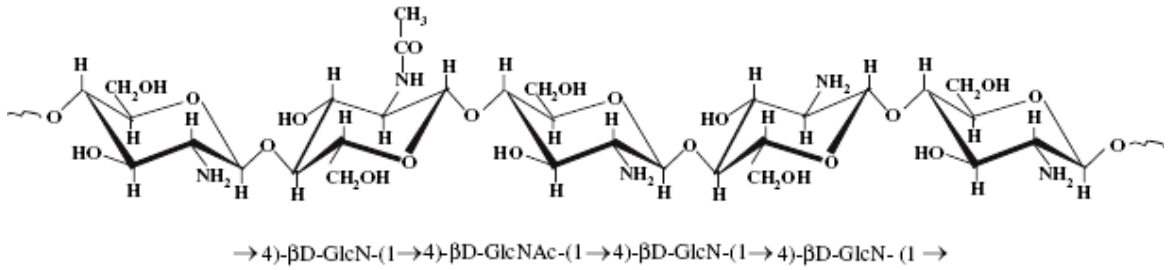


Figure 32 : Structure primaire du chitosane

La désacétylation en milieu basique de la chitine va permettre d'obtenir le chitosane, son principal dérivé. Il existe une multitude de techniques de préparation. Le plus souvent, il est produit par une désacétylation partielle de la chitine dans une solution d'hydroxyde de sodium concentrée à une température de 110-115°C durant plusieurs heures, sous atmosphère inerte et en présence d'un agent réducteur (borohydrure de sodium $NaBH_4$). Le choix des conditions influence la qualité du produit ainsi que ces caractéristiques. En effet, des conditions trop drastiques conduisent à une dégradation physique du polymère avec notamment des conséquences importantes sur sa masse molaire alors que des conditions trop douces ne permettraient pas une désacétylation suffisante.

La réaction de désacétylation étant rarement complète, tous les groupements amines de la chitine ne sont pas hydrolysés ce qui conduit à une distribution aléatoire des motifs. Le terme chitosane s'applique à tout copolymère dont le degré de désacétylation (DDA) est supérieur à

50 %. Ainsi, chaque chitosane est caractérisé par la fraction de groupements N-acétamide résiduels (DA) ou par la quantité relative de groupements acétyls retirés (degré de désacétylation : DDA) à la molécule de chitine lors de sa préparation. Elles sont généralement déterminées par RMN du proton. Les propriétés du chitosane seront donc fortement dépendantes du DDA et de la masse molaire mais également de la solubilité, la flexibilité des chaînes ou encore la viscosité des solutions.

La chitine et le chitosane, de même que leurs dérivés, possèdent des propriétés filmogènes leur permettant d'être utilisés sous forme de membranes, solutions, gels ou nanoparticules. Ainsi, ce polymère biocompatible, biodégradable, bioassimilable (ou métabolisable), antibactérien [171], antifongique, non antigénique et non toxique [172] est un excellent candidat à notre étude. Plusieurs travaux ont démontré que le chitosane et ses dérivés présentaient des propriétés bioadhésives [173] qui permettent d'augmenter le temps de contact avec les muqueuses et favorisent l'absorption des macromolécules à travers les muqueuses, en augmentant la perméabilité de l'épithélium de manière réversible via l'ouverture des jonctions serrées, permettant un passage paracellulaire des composés hydrophiles. Le chitosane, seul ou complexé avec un polymère anionique, est un excellent support pour le transport et le relargage lent de principes actifs médicamenteux [174].

Le chitosane se comporte comme un polycation à forte densité de charge en milieu acide. C'est une base faible dont la valeur du pKa est proche de 6,5 [175, 176]. Il est donc soluble en milieu acide par protonation des fonctions amines. Lorsque le pH devient inférieur au pKa, le chitosane devient positivement chargé et par conséquent soluble. Comme pour tout polyélectrolyte, la valeur du pKa dépend du taux de protonation des groupements amines auquel le pKa est déterminé, il est donc lié au DDA. La présence de ces unités N-acétylées modifie la solubilité du chitosane et lui confère ainsi un caractère plus ou moins hydrophobe et donc des propriétés auto-associatives. En effet, les liaisons inter- et intra-chaînes limitent la disponibilité des groupements amines pour l'eau mais également pour d'autres substrats comme les protéines par exemple.

Le chitosane possède une réactivité chimique élevée de par ses fonctions amines primaires libres qui lui confèrent une forte densité de charges positives. Cette nature cationique lui permet de former des complexes de polyélectrolytes avec d'autres composés anioniques : polyélectrolytes ou protéines. Il présente également la capacité d'interagir avec les ions

métalliques, les teintures, protéines, acides nucléiques, lipides, herbicides, pesticides et acides humiques [177-179]. Cependant, les propriétés du chitosane dépendent fortement du pH. Au-delà d'un pH 6,5, il précipite et ne présente plus de groupements ionisés. Afin de pouvoir complexer l'insuline, il est nécessaire de maximiser sa solubilité. Le seul inconvénient majeur du chitosane à son utilisation dans le cadre d'un relargage intestinal de principes actifs est sa solubilité limitée au pH basique de l'intestin limitant ainsi l'activité enzymatique de la bêta-glucosidase capable de l'hydrolyser, libérant ainsi le principe actif.

C'est pourquoi, des modifications chimiques de la chitine et du chitosane sont élaborées afin de permettre l'accès à des applications plus variées. Elles consistent notamment à modifier ses propriétés physico-chimiques telles que la solubilité, l'activité antimicrobienne et sa capacité d'interactions avec d'autres substances.

7.2 Les modifications du chitosane

Afin d'accroître la solubilité du chitosane, différentes techniques existent (figure 33). Il est notamment possible de faciliter sa solubilisation en réduisant les longueurs des chaînes, via un procédé physique fortement énergétique (cisaillement, ultrasons) [180-183], par hydrolyse acide [184, 185] ou par dégradation enzymatique [186]. Dans le cas précis de la complexation, ce procédé conduirait à la perte des propriétés recherchées pour la complexation avec l'insuline, apportées par la longueur des chaînes. Une réaction conduisant à une désacétylation complète du chitosane permettrait également d'accroître sa solubilité mais engendrerait d'importantes réductions de sa masse molaire [187, 188]. Il est également possible d'effectuer des modifications chimiques sur le chitosane. Parmi les dérivés du chitosane décrits dans la littérature, il est possible de différencier les réactions spécifiques faisant intervenir les groupements amines en position C-2, des réactions non spécifiques se produisant sur les fonctions alcools C-3 et C-6 (essentiellement estérification et étherification). Les réactions les plus fréquemment utilisées mettent en jeu la réactivité de la fonction amine en C-2. Parmi celles permettant d'accroître la solubilité du chitosane en milieu aqueux, les plus utilisées sont les réactions de quaternisation [187, 189], de copolymérisation branchée [190, 191], les réactions de Maillard [192, 193] et l'alkylation [187, 194]. De plus, les dérivés triméthylés et éthylés du chitosane sont connus pour être des promoteurs de perméabilité par ouverture des jonctions serrées [117].

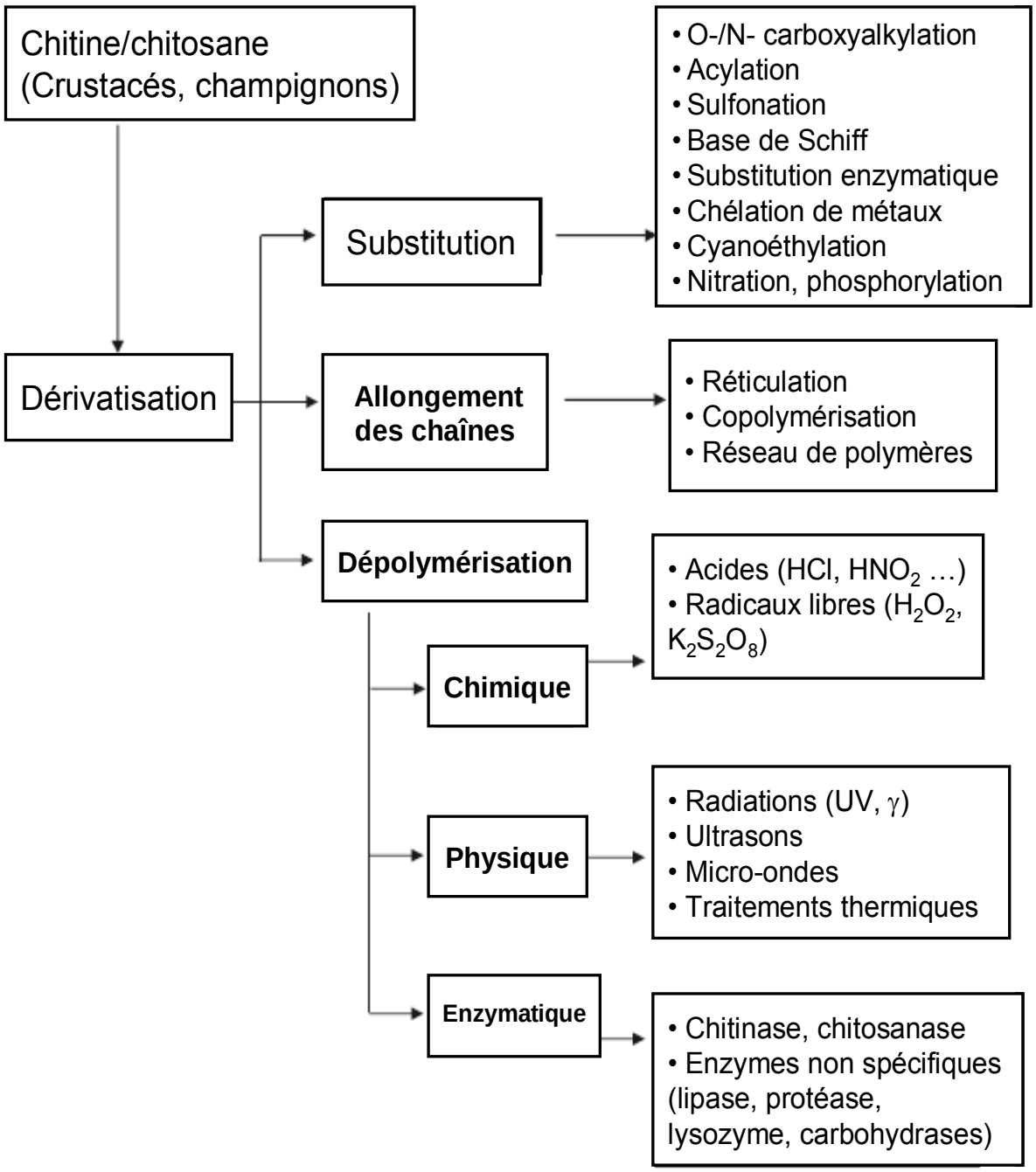


Figure 33 : Dérivés potentiels du chitosane, d'après [195]

Le tableau 4 regroupe ces différentes réactions et présente leurs avantages et inconvénients.

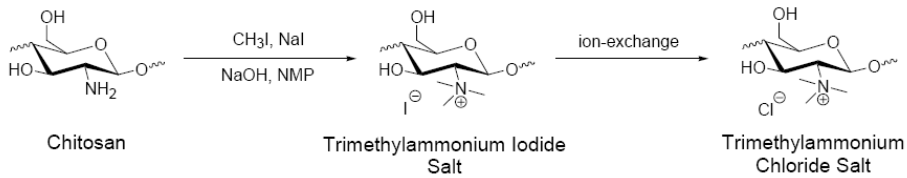
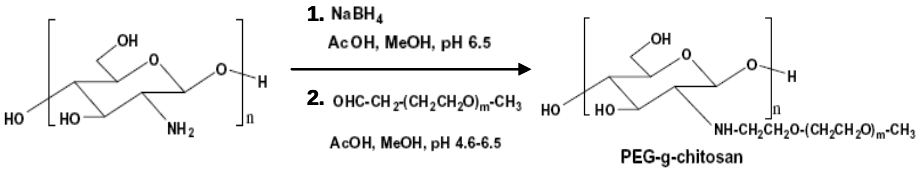
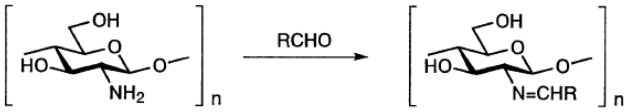
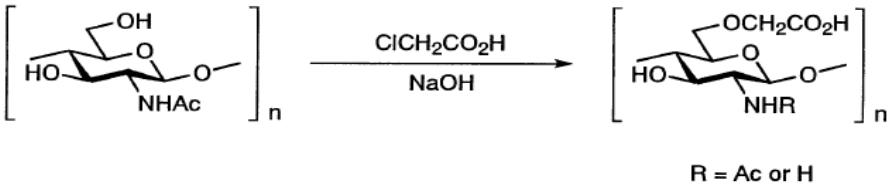
Réactions	Avantages	Inconvénients
Quaternisation [196]		
	Réaction simple Fort taux de substitution Hydrosoluble à pH neutre	Utilisation de solvants organiques Forte diminution de masse molaire Toxicité
Copolymérisation (graft) Cas particulier : PEGylation [197]		
	Large choix d'architectures moléculaires Excellente solubilité Biocompatible, faible toxicité	Faible degré de polymérisation Utilisation fréquente de composés toxiques (phtalates, iode …) Solubilité limitée
Bases de Schiff (réaction d'un aldéhyde sur une amine) [187]		
	Conditions douces (réaction biochimique de l'organisme) Facile et contrôlable	/
Alkylation Cas particulier : carboxyméthylation [187]		
	Introduction de groupements acides → polyampholyte	/

Tableau 4 : Différents types de modifications chimiques réalisées sur le chitosane

Il est néanmoins important de garder à l'esprit que le produit résultant a pour but une utilisation à visée thérapeutique et qu'il doit donc présenter certaines caractéristiques comme l'innocuité, la biocompatibilité ou encore le caractère bioassimilable. Il faut donc privilégier une voie ne nécessitant pas l'utilisation de produits nocifs et ne conduisant à aucune trace résiduelle pouvant être dangereuse pour la santé du patient. Les deux types de réactions à

privilégier dans notre cas sont la réaction de Maillard ainsi que la carboxyméthylation, cas particulier de l'alkylation.

La modification du chitosane par le biais d'une réaction de Maillard avec la glucosamine a été réalisée [198]. Néanmoins, la solubilité obtenue n'étant pas suffisante, d'autres types de modifications ont été réalisés. Parmi elles, la réaction de carboxyméthylation est une excellente alternative puisqu'elle permet l'obtention d'un composé conservant une non-toxicité.

7.2.1 Approche chimique : modifications par liaisons covalentes

La réaction de carboxyméthylation conduit à l'obtention d'un chitosane soluble dans une plus large gamme de pH, permettant ainsi l'utilisation du chitosane dans des domaines auparavant limités, de par sa faible solubilité [171]. Par conséquent, d'autres applications potentielles du chitosane carboxyméthylé, incluant le domaine médical et pharmaceutique, ont vu le jour, principalement pour la libération de principes actifs [199], pour l'élaboration d'appareils orthopédiques, la réduction des adhésions des tissus après intervention chirurgicale [200] et pour le traitement d'effluents industriels [201].

D'après la littérature [202-204], le choix de la réaction et des réactifs conditionne l'obtention d'un N-, O- ou N-, O-carboxyméthyl chitosane. Lorsque la carboxyméthylation est réalisée en présence d'acide mono-chloroacétique en milieu 2-propanol / hydroxyde de sodium, la substitution en position O- est favorisée, si la réaction est réalisée à température ambiante. Dans le cas d'une réaction à température plus élevée, c'est la N-substitution qui prédomine [205]. Intéressons-nous plus particulièrement au cas du N-, O-carboxyméthyl chitosane (NOCC).

Comparaison du chitosane N-,O-carboxymethylé et de l'acide hyaluronique

Le NOCC est fréquemment comparé à l'acide hyaluronique (HA), biopolymère naturellement présent dans l'organisme ayant pour rôle de protéger, amortir et lubrifier le tissu mou. HA est un polymère à longue chaîne fait de deux sucres de répétition, présent dans le fluide qui baigne les cellules des tissus connectifs, dans le fluide synovial et dans les fluides de l'œil. Le NOCC possède certaines propriétés communes à HA. Un de ces sucres est

identique à celui présent sur la chitine. Il ne présente aucune charge électrique et est un composé parent du NOCC. Le deuxième motif de HA présente un groupe carboxylique qui lui confère une charge négative. Etant donné que le NOCC est un produit synthétique, deux changements essentiels se produisent :

- le groupement lié à un atome d'azote est enlevé pour apporter un groupement amine libre permettant d'éventuelles modifications successives,
- des groupements carboxyliques sont ajoutés pour apporter une charge négative au NOCC et augmenter sa solubilité.

Etant donné que le NOCC porte à la fois des amines et des groupes carboxyliques, alors qu'HA porte seulement le groupe carboxylique, le NOCC peut ainsi couvrir une plus large gamme d'applications.

Le NOCC est unique car il porte les deux groupements amines et carboxyliques, présents sur tous les acides aminés et protéines, base de tous les systèmes vivants. En outre, le NOCC est aisément modifié par des méthodes chimiques simples développées pour la modification de protéines. Par exemple, des principes actifs protéiques peuvent être couplés au NOCC ou celui-ci peut être réticulé pour former des hydrogels. Ce couplage permet d'améliorer sensiblement leur stabilité *in vivo* et d'augmenter leur efficacité. De plus, le NOCC possède également des propriétés clairement différentes de celles d'HA. En effet, le NOCC présente près de deux fois plus de groupements carboxyliques que HA. Puisqu'ils portent une charge négative *in vivo*, le NOCC est donc plus fortement chargé que HA. Il est probable que cette charge négative additionnelle soit à l'origine du phénomène d'anti-adhésion de certaines cellules sur les surfaces et tissus enduits de NOCC. Le tableau 5 récapitule les avantages concurrentiels principaux du NOCC par rapport à HA.

Caractéristiques principales	**NOCC**	**HA**
Biocompatible	✓	✓
Biorésorbable	✓	✓
Polysaccharide	✓	✓
Groupe carboxylique	✓	✓
Groupement amine	✓	×
Charge négative importante	✓	×
Inhibition de l'adhésion cellulaire	✓	×
Inhibition de l'adhésion des protéines	✓	×
Modification chimique simple	✓	×

Tableau 5 : Comparaisons des caractéristiques principales du NOCC et de HA

Le NOCC possède des propriétés communes à d'autres polysaccharides présents dans le corps humain. Cependant plusieurs de ses propriétés sont uniques vis-à-vis des autres polysaccharides :

- le NOCC possède des groupements amine et carboxylique naturellement présents sur les acides aminés et les protéines mais absent sur une chaîne polysaccharidique. La présence de ces substituants le rend bioadhésif aux tissus durs (os et dents) et mous (muqueuses),
- le NOCC porte une charge négative, répétée sur les motifs de sucre, suffisante pour éviter l'adhésion de certaines cellules et protéines sur les surfaces enduites de NOCC,
- le NOCC peut être aisément modifié par des moyens chimiques simples, de par la présence d'une amine réactive et de groupes carboxyliques le long de la chaîne du polymère. Une modification du NOCC implique l'obtention de polymères de plus fortes masses molaires ce qui représente une durée de persistance *in vivo* prolongée,
- de nombreux principes actifs thérapeutiques peuvent également être facilement couplés au NOCC par l'intermédiaire de ces mêmes groupements. Le NOCC forme aisément des films, éponges, hydrogels, solutions viscoélastiques et particules.

7.2.2 Approche ionique : salification du chitosane

Les modifications chimiques sont couramment utilisées pour améliorer la solubilité du chitosane. Cependant, elles peuvent parfois conduire à des modifications de ses propriétés. C'est pourquoi, la salification du chitosane est également fréquemment développée. En effet, elle conduit à une modification significative de sa solubilité engendrée par la protonation des fonctions amines. Le chitosane et l'acide sont alors liés non pas par une liaison covalente mais par une liaison électrovalente [206].

De plus, les sels de chitosanes possèdent des caractéristiques physico-chimiques qui dépendent fortement du choix du contre-ion [207]. Les travaux d'Orienti *et al.* ont montré que l'utilisation d'acide aspartique, glutamique, chlorhydrique ou lactique permettait la préparation de systèmes de relargage intestinal du diclofénac de sodium grâce à une gastro-résistance suivie d'un relargage progressif du principe actif, dû à l'hydrolyse enzymatique. Une étude de la capacité de complexation de certains de ces chitosanes avec des protéines a montré la dépendance des propriétés des complexes en fonction du choix du contre-ion [208].

Néanmoins, l'utilisation de l'encapsulation seule reste insuffisante, ne permettant pas d'apporter une protection à la fois gastrique et intestinale. C'est pourquoi, la technique de double encapsulation a été utilisée.

8. Le vecteur pharmaceutique complexe

Etant donné qu'aucune technique d'encapsulation ne permet de résoudre simultanément les contraintes chimiques et physiques rencontrées le long du TGI, l'équipe d'encapsulation de l'Institut Charles Sadron a mis au point une nouvelle formulation, à l'aide d'une technique de double encapsulation, sous forme d'un vecteur pharmaceutique complexe afin de conserver l'intégrité du principe actif lors de son passage dans le tractus gastro-intestinal. Ce vecteur pharmaceutique complexe (figure 34) se compose de trois parties biocompatibles distinctes : un véhicule, des nanoparticules contenant l'insuline et un dispersant lipophile.

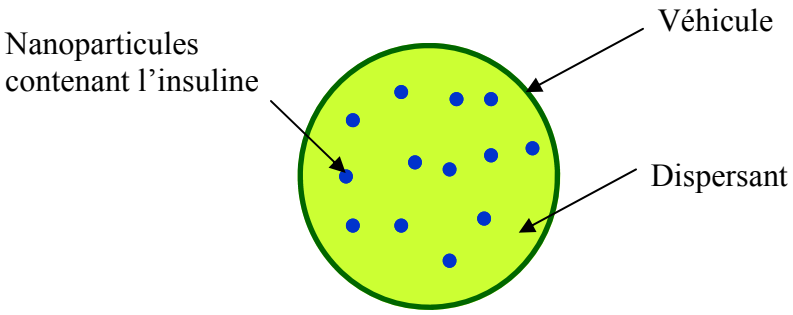


Figure 34 : Schéma du vecteur pharmaceutique complexe breveté [209]

Par sa complexité, ce vecteur pharmaceutique apporte via ses différents constituants, une solution aux divers problèmes rencontrés lors de l'administration par voie orale :

- des nanoparticules à base de polymères naturels biodégradables et bioassimilables, afin d'éviter leur accumulation dans l'organisme après libération du principe actif. Des modifications de surface peuvent être envisagées afin d'augmenter leurs propriétés mucoadhésives, faciliter leur passage à travers l'épithélium intestinal et leur apporter un effet furtif afin d'augmenter la biodisponibilité du principe actif,

- un dispersant lipophile qui doit à la fois empêcher la diffusion de la solution d'insuline en dehors des nanoparticules pendant le stockage et limiter la migration de sucs gastriques pendant leur passage dans l'estomac,

➢ un véhicule synthétisé à partir d'un polymère biocompatible comme par exemple, par gélation ionotropique de l'alginate de sodium (polymère naturel et biocompatible) à l'aide d'ions calcium. Il doit protéger les nanoparticules contenant l'insuline pendant leur passage dans la bouche, l'œsophage et l'estomac puis les libérer dans l'intestin.

L'utilisation de ce vecteur apporte une protection envers le tractus digestif grâce à la technique de double encapsulation (véhicule et nanoparticules). En effet, le véhicule permet une protection gastrique : le vecteur conserve son intégrité lors du passage de la bouche (pH neutre) et de l'estomac (pH acide) et les nanoparticules permettent une protection intestinale.

Cette dernière est nécessaire car les nanoparticules sont amenées à être en contact avec le milieu intestinal après la dégradation du vecteur dans l'intestin (pH proche de 8) permettant ainsi la libération des nanoparticules qui doivent alors traverser la barrière intestinale pour rejoindre la circulation sanguine et/ou systémique afin d'y libérer l'insuline (figure 35).

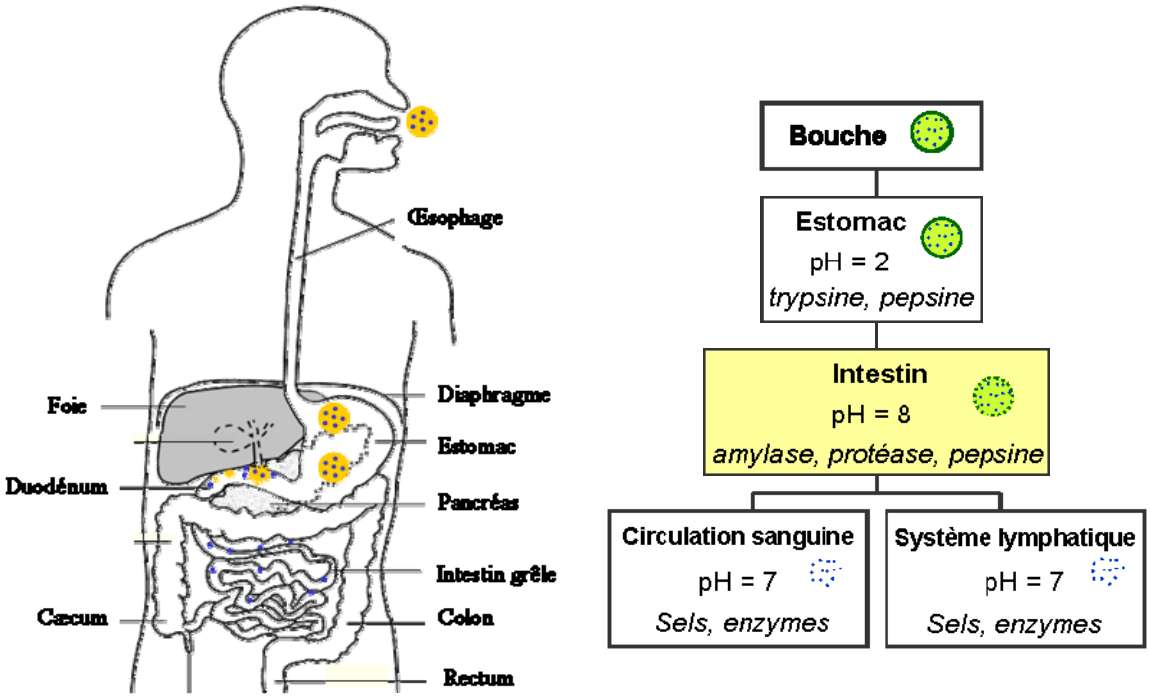


Figure 35: Schéma du devenir du vecteur pharmaceutique complexe après administration par voie orale

Ce vecteur devrait également permettre d'accéder à une augmentation significative de la biodisponibilité du principe actif par le biais de modifications de la surface des nanoparticules.

9. Les nanoparticules au sein du vecteur pharmaceutique complexe

Différents types de particules peuvent être intégrées au vecteur pharmaceutique complexe. Au sein du laboratoire, des nanoparticules de PLGA, obtenues par double émulsion et évaporation de solvant, ont montré d'excellentes capacités hypoglycémiantes. Néanmoins, ces nanoparticules, de par leur technique d'obtention, présentent des inconvénients majeurs à l'utilisation thérapeutique. En effet, la présence de solvants, de tensioactifs et d'un polymère non naturel difficilement dégradable, peut engendrer une certaine toxicité pour l'organisme.

C'est pourquoi, le développent d'un autre type de nanoparticules a été réalisé au sein du laboratoire. Les besoins ayant été identifiés, un cahier des charges a pu être établi. Les nanoparticules devront répondre aux critères suivants :

- Etre obtenues à partir d'un matériau naturel et bioassimilable,
- A l'aide d'un procédé ne nécessitant ni solvant, ni additif,
- Contenir et protéger l'insuline avec un rendement d'encapsulation maximal,
- Etre stable dans des conditions physiologiques, notamment en milieu intestinal (la protection gastrique étant apportée par le vecteur),
- Présenter une taille inférieure à 500 nm leur permettant de traverser la barrière intestinale,
- Etre positivement chargées, de façon à maximiser leur passage à travers la barrière intestinale,
- Et présenter une activité hypoglycémiante.

Les propriétés requises étant clairement définies, les nanoparticules seront synthétisées par la technique de coacervation complexe, technique permettant d'encapsuler, dans des conditions douces et sans additif, des principes actifs protéiques comme l'insuline. L'encapsulation sera réalisée entre le chitosane et une insuline humaine rapide.

Matériel et méthodes

Le chitosane présente une solubilité limitée à pH physiologique. Ainsi, il a été nécessaire d'avoir recours à des modifications chimiques afin d'accroitre sa solubilité dans cette gamme de pH. Afin que celles-ci soient les plus contrôlées possibles, elles ont été réalisées sur des chitosanes préalablement caractérisés par différentes techniques. La modification chimique de ce chitosane connu, a ensuite été effectuée dans le but d'obtenir un chitosane N-,O-carboxyméthylé hydrosoluble.

Pour permettre l'étude de la complexation entre le chitosane et l'insuline, il est indispensable de connaître les caractéristiques des espèces entrant en jeu dans la complexation. Ainsi, les différents types de chitosane (modifié ou non) utilisés dans la complexation avec l'insuline ont été caractérisés précisément selon des techniques décrites ci-dessous.

1. Le chitosane

1.1 Caractérisation du chitosane

1.1.1 Détermination du degré d'acétylation par RMN du proton

L'analyse s'effectue par RMN du proton selon une méthode proposée dans la littérature [210]. L'échantillon à analyser est préparé par dissolution de 10 mg de chitosane dans un mélange DCl/D_2O (0,6 mL de DCl 2% / 1,4 mL de D_2O). Les acquisitions sont réalisées sur un spectromètre Avance 400 MHz (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany) soit à température ambiante (25°C), soit à 70°C afin d'éviter que le pic du solvant D_2O ne vienne interférer avec ceux du chitosane.

1.1.2 Détermination du degré de désacétylation et du pKa par pHmétrie

Afin de quantifier les charges positives présentes sur la structure du chitosane en milieu acide, un dosage pH-métrique a été mis au point à partir d'un protocole décrit dans la littérature [211].

200 mg de chitosane (PROTASAN UP B 80/20, NovaMatrix, FMC BioPolymer AS, Norway) sont préalablement dissous dans 25 mL d'une solution standard d'HCl 0,1 mol/L

(Titrisol, Merck Chemicals). Après dissolution complète, le volume est complété à 40 mL à l'aide d'eau distillée et une certaine quantité de KCl est ajouté afin d'ajuster la force ionique à 0,1. La solution titrante est une solution de NaOH 0,4 mol/L à laquelle 0,1 mol/L de KCl sont ajoutés pour maintenir la force ionique constante au cours du dosage. Le dosage est réalisé sous atmosphère inerte (bullage d'azote) dans une cellule à double paroi thermostatée (2 ± 0,1°C) agitée mécaniquement.

Un titrateur automatisé (DL50 Graphix Titrator, Mettler Toledo, Viroflay, France) est utilisé pour les mesures de pH et les ajouts de solution titrante. Le programme de dosage permet l'utilisation de deux modes : (mode 1) par incréments, dans lequel le volume de solution titrante ajoutée est fixé (0,02 mL) et constant sur toute la durée du dosage et (mode 2) dynamique, dans lequel le volume ajouté est ajusté en quantité inversement proportionnelle à la pente de la courbe de dosage. Ainsi, plus on s'approche du point équivalent, c'est-à-dire lorsque les variations de pH sont importantes, plus les ajouts sont faibles. Dans les deux cas, un temps d'attente a été fixé avant que la mesure du pH ne soit réalisée et avant l'ajout suivant, permettant ainsi l'obtention d'une certaine homogénéisation de l'échantillon à doser et donc de la stabilité de la mesure. Ainsi, la mesure de pH n'est validée que lorsque la différence entre deux valeurs successives est d'au minimum 0,5 mV. Le temps entre deux ajouts a été choisi comme suffisamment long pour permettre la compensation des variations du temps de réponse de l'électrode.

Les dosages sont effectués en mode « dosage de point équivalent ». Les données acquises permettent le tracé du pH et de variations de la première et de la seconde dérivée en fonction du volume de solution titrante ajouté afin de permettre la détermination de ces points équivalents. Le dosage est réalisé en triplicats et les volumes équivalents ont été déterminés avec une précision de 2 %.

1.2 Modifications du chitosane

1.2.1 Approche chimique

La modification chimique du chitosane par une réaction de carboxyméthylation est réalisée à partir d'un protocole décrit dans la littérature [212]. Dans un ballon de 250 mL, 0,2 g de chitosane solide (sous forme de flocons) sont mis en suspension dans 10 mL

d'isopropanol, sous agitation magnétique à température ambiante (figure 36). 2,5 mL d'une solution aqueuse de soude à 10 mol/L, divisée en 5 portions égales, sont ajoutés au milieu réactionnel hétérogène (sous agitation) sur une durée de 25 min. Le milieu alcalin est agité pendant 30 minutes supplémentaires, puis 6 g d'acide monochloroacétique sont ensuite ajoutés, en 5 portions égales, à un intervalle d'une minute.

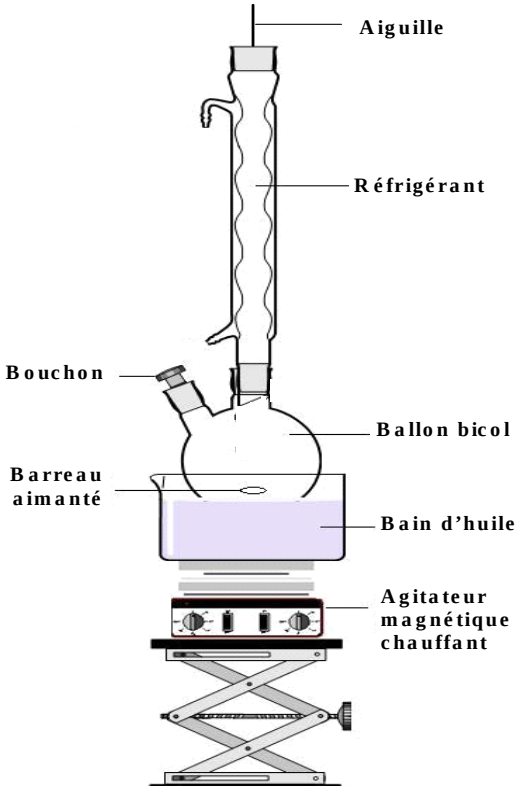


Figure 36 : Montage relatif à la réaction de synthèse du chitosane N,O-carboxyméthylé (NOCC)

Le milieu est alors chauffé à une température de 65°C, sous agitation magnétique, pendant une durée de 3 heures. A l'issue de cette réaction, le milieu est filtré et le produit solide (NOCC, figure 37) ainsi obtenu est rincé au méthanol, puis mis à sécher à température ambiante (24 heures environ à l'abri de la poussière).

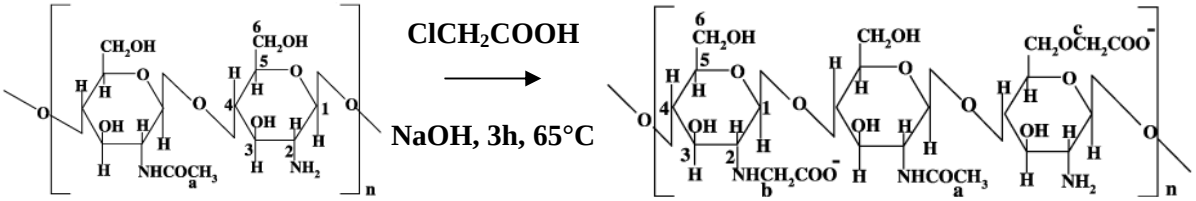


Figure 37 : Réaction de synthèse du chitosane N,O-carboxyméthylé (NOCC)

1.2.2 Approche ionique

La modification de la solubilité du chitosane peut également s'effectuer via une salification de celui-ci. Ce type de modification consiste en la dissolution du chitosane en milieu acide, en contrôlant la quantité d'acide introduite. La difficulté de la salification réside dans le contrôle de la quantité d'acide à ajouter. En effet, la quantité de protons ajoutée doit être strictement égale au nombre d'amines à protoner, les protons en excès servant à modifier le pH de la solution. Afin que le chitosane puisse être positivement chargé, pour permettre la complexation de l'insuline, il faut que le pH de la solution de chitosane soit inférieur à son pK apparent. Pour cela, lors de la réalisation de la réaction de salification, il est nécessaire que la quantité d'acide introduite, pour protoner les amines du chitosane, soit parfaitement contrôlée de façon à ne pas induire d'acidification de la solution.

Le sel de chitosane résultant présente ainsi des amines protonées et des contre-ions associés. Obtenu sous forme solide, il peut être solubilisé directement dans l'eau, étant donné que ses amines sont déjà sous forme protonée. Les propriétés du sel de chitosane obtenu dépendent de la nature du contre-ion utilisé pour la salification. Ainsi, il est possible de moduler les propriétés physico-chimiques du dérivé hydrosoluble du chitosane. Parmi les différents types de sels de chitosane existant, nous nous sommes intéressés au chitosane chlorhydrate et au chitosane glutamate (figure 38).

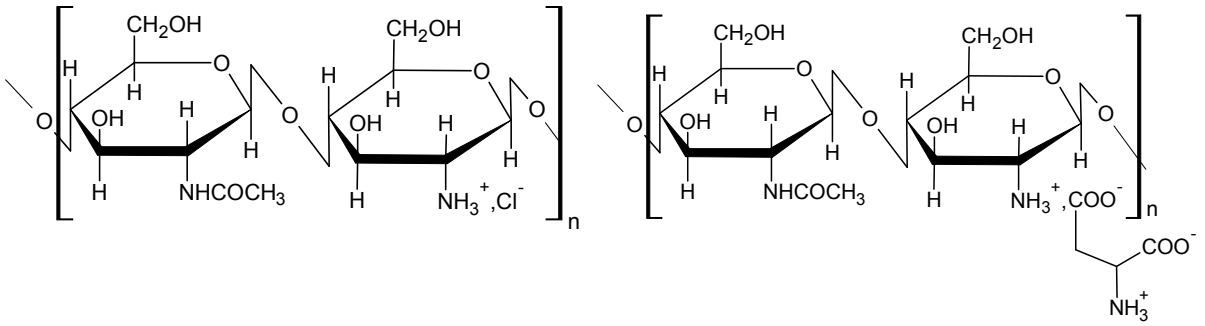


Figure 38 : Structure des chitosanes chlorhydrate et glutamate

Etant donné la complexité de la salification du chitosane au niveau du contrôle de la quantité précise d'acide ajouté, nous avons volontairement choisi de travailler à partir de sels de chitosane commerciaux (NovaMatrix, FMC BioPolymer AS, Norway).

1.3 Caractérisations des dérivés hydrosolubles du chitosane

Le produit est analysé par Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF), par résonance magnétique nucléaire du proton (^{1}H-RMN) et par pHmétrie / conductimétrie afin de mettre en évidence et quantifier les substitutions des groupes carboxyméthyls sur les amines et alcools primaires du chitosane modifié.

1.3.1 Analyse par InfraRouge à Transformé de Fourier (IRTF)

Une analyse IRTF en mode d'Atténuation Total de la Réflectance (ATR) a été réalisée afin d'identifier la substitution de groupements amines et alcools primaires du chitosane en amides, liées à la substitution par les groupements carboxyliques. L'analyse IRTF se fait en ATR diamant directement sur le produit solide. L'analyse est effectuée sur un spectromètre Vertex 70 (Bruker Optics, Ettlingen, Germany) et l'échantillon est scanné de 400 à 4000 cm^{-1}.

1.3.2 Analyse par RMN du proton

Ce type d'analyse permet, comme l'IRTF, de déterminer la présence éventuelle de substitutions de certains groupements du chitosane. L'intérêt de la RMN est de permettre la quantification de ces substitutions. Les échantillons sont préparés par dissolution des dérivés hydrosolubles du chitosane dans D_2O à raison de 2 mg/mL. L'acquisition est réalisée à température ambiante (25°C).

1.3.3 Analyse par dosage pHmétrique et conductimétrique : détermination du degré de substitution

Afin de déterminer un taux de substitution des groupements amines et alcools en groupements carboxyls, des dosages pHmétriques et conductimétriques sont réalisés en parallèle. Ainsi, il sera alors possible de quantifier la quantité de charges positives portées par le dérivé du chitosane en fonction du pH. Les dosages sont réalisés à partir d'une méthode dérivée des travaux de Jiang *et al*. décrits dans la littérature [211].

Dans 25 mL d' HCl (0,1 mol/L), 200 mg du dérivé hydrosoluble du chitosane sont préalablement dissout en présence de KCl (0,1 mol/L), puis dosé par NaOH (0,4 mol/L) en présence de KCl (0,1 mol/L). Le dosage est réalisé selon un protocole similaire à celui du chitosane (paragraphe 1.1.2.). En parallèle, la conductivité de la solution dosée est mesurée à l'aide d'un conductimètre (K912, Consort, Turnhout, Belgium) muni d'une électrode à 4 pôles. Les données acquises permettent le tracé du pH et de la conductivité en fonction du volume de solution titrante ajoutée et permet la détermination de ces points équivalents. Dans le cas du dosage conductimétrique, aucune force ionique n'a été utilisée afin que la mesure réalisée corresponde aux espèces à doser, et que leur faible concentration ne soit pas masquée par le sel de fond. Les ajouts de solution titrante ont été réalisés dans le mode incrémentiel afin que le temps entre deux ajouts soit suffisamment long pour permettre une réponse de l'électrode. Tous les volumes équivalents ont été déterminés avec une précision de 2 %.

2. L'insuline

Afin d'étudier la complexation de l'insuline avec le chitosane, deux types d'insuline sont à notre disposition au laboratoire : une insuline commerciale Umuline® (100 UI/mL, Eli Lilly, Indianapolis, USA) et une insuline cristalline (27,5 UI/mg, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France).

L'insuline commerciale Umuline® est une insuline humaine rapide soluble produite par génie génétique, par la technique de l'ADN recombinant sur couche d'*E.Coli*. Elle se présente sous forme d'une solution injectable et contient de nombreux excipients comme le glycérol (composé isotonique permettant également de prévenir la précipitation de l'insuline [213]), le méta-crésol (pour stabiliser l'insuline et prévenir sa désamidation [214]), de l'acide chloryhydrique et de l'hydroxyde de sodium pour ajuter le pH à une valeur neutre (7,2-7,3) [215].

L'insuline cristalline est également une insuline humaine rapide produite par génie génétique. A la différence de l'Umuline®, elle contient uniquement de l'insuline sous forme sèche, sans aucun excipient. La concentration en insuline s'exprime généralement en Unités Internationales (UI), équivalent biologique correspondant à 1/22 mg soit 0,045 mg.

L'insuline commerciale Umuline® utilisée présente l'inconvénient de contenir des stabilisants qui permettent d'accroître sa durée de conservation. Parmi ces stabilisants, le *m*-crésol possède un cycle aromatique qui lui confère une absorbance dans le domaine de l'UV à 285 nm. Cette absorbance vient interférer avec le signal de l'insuline (280 nm) rendant impossible toute quantification. Pour pallier cet inconvénient, les quantifications d'insuline seront réalisées sur des nanoparticules complexées avec de l'insuline cristalline ne contenant aucun stabilisant. L'insuline cristalline est préparée après dissolution dans HCl 0,01 mol/L dans les mêmes contions que l'insuline Umuline® (concentration 3,5 mg/mL et pH ajusté à 7,2 avec NaOH 0,2 mol/L).

3. Formation de nanoparticules par la technique de coacervation complexe

3.1 Protocole de formation des nanoparticules chitosane / insuline

Les nanoparticules sont formées par coacervation complexe, procédé qui repose sur la formation de complexes entre le chitosane et l'insuline par le biais d'interactions électrostatiques. Le chitosane est mis en solution dans l'eau déminéralisée à la concentration de 1 mg/mL. L'insuline est utilisée sous sa forme commerciale Umuline® (100 UI/mL soit 3,5 mg/mL, pH 7,2-7,3).

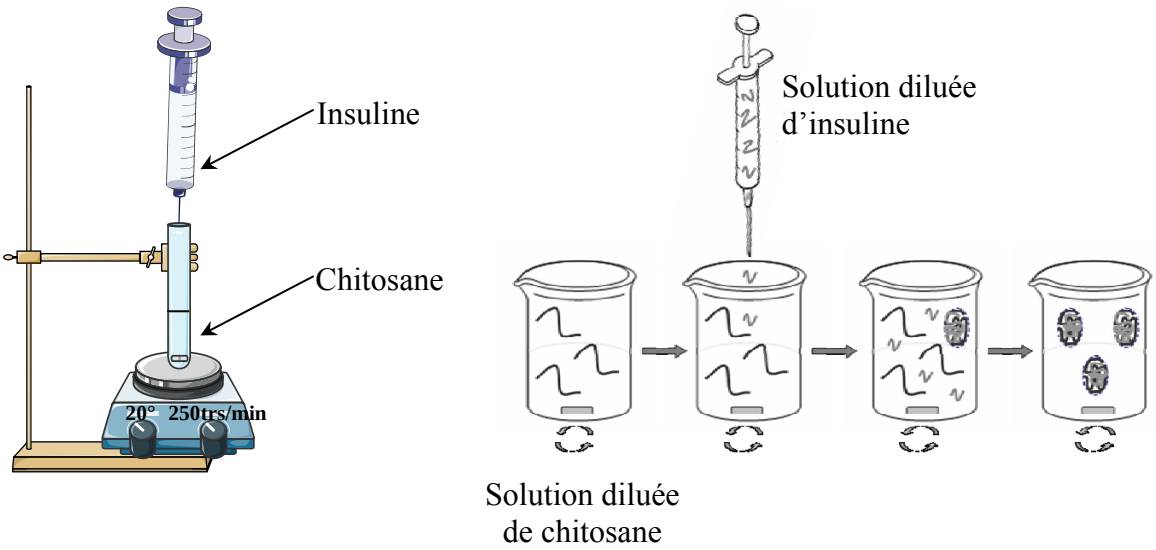


Figure 39 : Protocole de synthèse des nanoparticules chitosane / insuline : l'insuline est ajoutée au chitosane par l'intermédiaire d'une seringue munie d'une aiguille

Afin d'induire la formation des complexes, différents volumes d'insuline sont ajoutés, goutte à goutte à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille (diamètre 0,4 mm), à différents volumes de chitosane (figure 39). La complexation est réalisée sous agitation magnétique modérée (300 rpm) et à température ambiante (20-25°C). Lorsque l'apparition d'une opalescence est observée après ajout de l'insuline, celle-ci nous indique la formation de complexes. La suspension obtenue est alors conservée sous agitation magnétique pendant 15 minutes, afin de permettre la stabilisation des complexes formés.

Différentes fractions volumiques chitosane / insuline sont testées afin d'étudier les conditions de formation des complexes. Des mesures de turbidité sont alors réalisées dans le but de déterminer les fractions volumiques chitosane / insuline pour lesquelles la complexation est observée. Pour cela, la mesure de la densité optique (DO) à 500 nm (spectrophotomètre Varian Cary-500) des solutions après complexation est réalisée. Afin de déterminer la précipitation possible des complexes formés, deux mesures de DO sont réalisées à 2 heures d'intervalle. Ainsi, dans le cas de la formation de complexes de taille importante, après 2 heures de repos, une sédimentation peut être observée et la mesure de DO alors réalisée se fera sur la partie supérieure de l'échantillon ne contenant plus de particules en suspension. A l'aide de ces données, il est alors possible de tracer des diagrammes de turbidité dans lesquels apparaissent distinctement les zones de sédimentation et de complexation (figure 40).

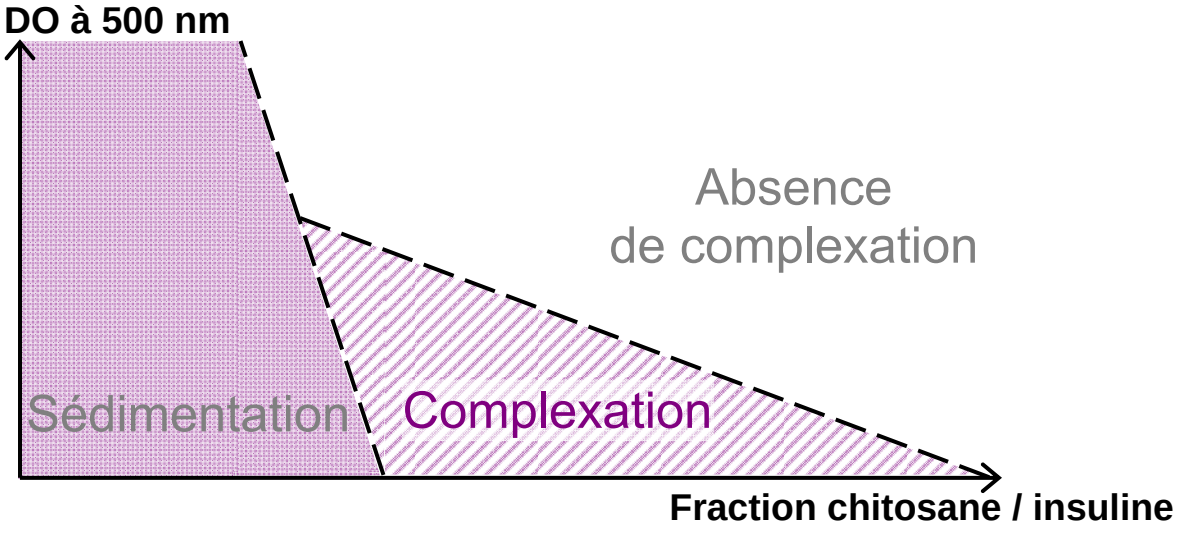


Figure 40 : Schéma d'un diagramme de turbidité indiquant les zones de complexation

Les différentes fractions volumiques sont définies d'après la terminologie décrite dans le tableau 6.

Fraction volumique chitosane : insuline	Volume chitosane (µl)	Volume insuline (µl)	Fraction massique chitosane : insuline
10 : 90	100	900	1 : 31,5
20 : 80	200	800	1 : 14
30 : 70	300	700	1 : 8,16
40 : 60	400	600	1 : 5,25
50 : 50	500	500	1 : 3,5
60 : 40	600	400	1 : 2,33
70 : 30	700	300	1 : 1,5
80 : 20	800	200	1 : 0,87
90 : 10	900	100	1 : 0,38

Tableau 6 : Fractions volumiques utilisées pour la complexation entre le chitosane et l'insuline

3.2 Lyophilisation des nanoparticules

Les nanoparticules doivent se présenter sous forme lyophilisée ou huileuse pour pouvoir être placées au sein du vecteur pharmaceutique (gélule gastro-résistante ou véhicule en alginate). La forme lyophilisée présente l'avantage d'avoir une meilleure stabilité à long terme, nous nous sommes donc orientés vers cette solution. La dispersion est congelée selon un processus rapide à l'aide d'un bain carboglace / isopropanol, puis lyophilisée (Lyophilisateur Flexi-dry, FTS system Inc., Stone Ridge, NY, USA) pendant 6 à 8 heures. Le lyophilisat est ensuite récupéré et stocké à 4°C.

3.3 Caractérisation des coacervats complexes

Le diamètre moyen des nanoparticules ainsi que le profil de répartition de leurs tailles (indice de polydispersité) et le potentiel zêta ont été évalués par diffusion dynamique de la lumière et électrophorèse laser Doppler respectivement.. La morphologie des nanoparticules a également été observée par microscopie électronique à transmission. L'efficacité d'encapsulation de l'insuline dans les nanoparticules a été mesurée de deux façons distinctes : de façon directe, c'est-à-dire en dosant l'insuline contenue dans les nanoparticules (après destruction de celles-ci) et de façon indirecte en dosant la quantité d'insuline non encapsulée. Ces différentes mesures ont été réalisées par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) et par spectrométrie UV.

3.3.1 Taille (Diffusion Dynamique de la Lumière)

Les mesures de taille ont été réalisées par diffusion de lumière à l'aide d'un granulomètre Zetasizer® Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Orsay, France). Les échantillons à analyser ont été dilués au 1/200e dans de l'eau déminéralisée, puis thermostatés, au sein de l'appareil, à 25°C avant d'être mesurés. Le diamètre est calculé à partir de la fonction de corrélation de l'intensité de lumière diffusée par les nanoparticules, assimilées à des sphères équivalentes. L'indice de polydispersité (PdI) correspond à la mesure de l'homogénéité de la dispersion, sa valeur est comprise entre 0 (dispersion homogène) et 1. Une valeur supérieure à 0,3 indique une large hétérogénéité. Les résultats exposés représentent une moyenne de 10 mesures réalisées en triplicats (3 échantillons distincts).

3.3.2 Potentiel zêta

Les mesures de potentiel zêta ont été réalisées par électrophorèse laser Doppler sur le Zetasizer® Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Orsay, France). Les échantillons ont été dilués au 1/10e dans une solution de chlorure de sodium 10^{-3} M avant mesure. Les mesures ont été réalisées dans une cellule d'électrophorèse capillaire à 25°C.

3.3.3 Morphologie des nanoparticules

L'étude de la morphologie des nanoparticules a été réalisée à l'aide d'un microscope électronique à transmission (CM12, Philipps, Eindhoven, Pays-Bas) équipé d'une caméra Megaview III (SIS-Olympus, Münster Germany) à 120kV. Après dilution au 1/100e dans de l'eau déminéralisée, 5µl de nanoparticules sont déposées sur des grilles en cuivre recouvertes d'un film de carbone (grilles 400 mesh, SPI, USA). Après adsorption pendant 1 minute, la grille est colorée négativement par une solution d'acétate d'uranyle à 2 % (dans l'eau) pendant 1 minute, puis séchée avant observation.

3.3.4 Efficacité d'encapsulation de l'insuline

La quantité d'insuline contenue dans les nanoparticules ainsi que le taux de charge en insuline peuvent être définis de la façon suivante :

$$\text{Efficacité d'encapsulation (\%)} = \frac{\text{Quantité totale d'insuline} - \text{Insuline non complexée}}{\text{Quantité totale d'insuline}} \text{ x } 100$$

$$\text{Taux de charge (\%)} = \frac{\text{Quantité totale d'insuline} - \text{Insuline non complexée}}{\text{Masse des nanoparticules}} \text{ x } 100$$

Afin de déterminer ces deux grandeurs, 1 mL de milieu de complexation contenant les nanoparticules est centrifugé 30 min à 21 000 x g, afin de séparer les nanoparticules de l'insuline non complexée. Ainsi, les nanoparticules solides contenant l'insuline vont former un culot et l'insuline non encapsulée restera en solution dans le surnageant (figure 41). Le surnageant est séparé du culot et les nanoparticules sont décomplexées à l'aide d'une solution de NaOH 0,2 mol/L. Ainsi l'insuline, auparavant encapsulée, est libérée pour permettre sa quantification. Afin de ne pas modifier les charges portées par l'insuline et ainsi influencer sa conformation, le milieu est, après décomplexation, neutralisé à l'aide d'HCl 0,2 mol/L.

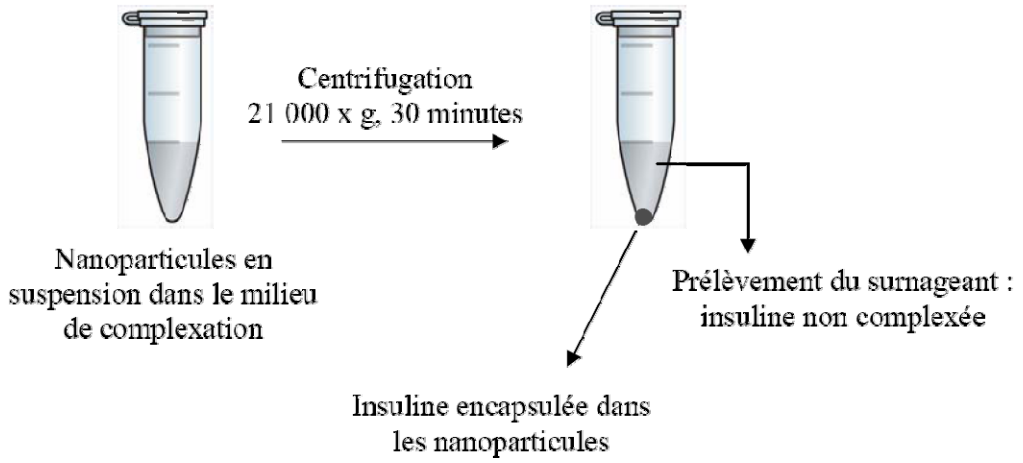


Figure 41 : Séparation par centrifugation des nanoparticules et de l'insuline non complexée

La quantité d'insuline contenue dans le culot décomplexé et dans le surnageant peut être analysée de deux manières différentes. Pour cela, deux analyses sont réalisées en parallèle : une mesure par CLHP (détection à 214 nm) et une mesure par spectroscopie UV (détection à 280 nm).

Les échantillons sont analysés par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) suivant un protocole inspiré des travaux de Xu *et al*. [216]. Les quantifications d'insuline sont

réalisées sur un système équipé d'un détecteur UV Gold LC-168, (Beckman Coulter, Fullerton, CA), d'une colonne EC50/2 Nucleodur C18 pyramid 3 µm (Macherey-Nagel, Düren, Germany) et d'une pompe LC-126 (Beckman Coulter, Fullerton, CA). La phase mobile est constituée d'acétonitrile et de sulfate de sodium 0,2 mol/L en solution aqueuse (27:73), de l'acide phosphorique est utilisé pour ajuster le pH à 2,3. Le débit est régulé à 0,3 mL/min et les chromatogrammes sont enregistrés à 214 nm.

La spectrophotométrie UV est réalisée à 280 nm. Des courbes d'étalonnages sont tracées, pour chacune de ces techniques, à partir de concentrations connues d'insuline. Chaque échantillon est mesuré en triplicat et les résultats obtenus sont analysés à l'aide du logiciel 32 Karat. Le poids des nanoparticules est déterminé après lyophilisation des nanoparticules pendant 8 heures.

3.4 Vieillissement des nanoparticules

La stabilité des nanoparticules dans le temps a été étudiée. Pour cela, les nanoparticules ont été conservées à 4°C dans leur milieu de complexation. Afin d'évaluer leur stabilité, la taille, le potentiel zêta ainsi que l'efficacité d'encapsulation (mesurée par UV) ont été déterminées à différents intervalles de temps pendant 6 jours.

4. Comportement des nanoparticules : études *in vitro*

4.1 Comportement des nanoparticules en milieux simulés

Pour tester le comportement des nanoparticules en milieux simulés, des mesures de turbidimétrie ont été réalisées, par suivi de la densité optique des suspensions de nanoparticules. Les nanoparticules sont placées en conditions simulées (avec ou sans enzymes) dans des proportions équi-volumiques, puis incubées à 37°C. Afin de tenir compte de l'effet de dilution sur la DO, des mesures similaires ont été réalisées en parallèle sur des nanoparticules diluées dans les mêmes proportions dans de l'eau. Les milieux testés sont les suivants :

- conditions gastriques simulées : une solution d'électrolytes est préparée selon les normes de la pharmacopée européenne 6.0 avec des produits de grade pharmaceutique, selon les quantités définies. Le milieu gastrique simulé est composé de 2 g de NaCl et 80 mL de HCl 1

mol/L et 3,2 g de pepsine dans un volume final de 1 L. Le pH est ajusté à 1,2 à 37°C avec du HCl 1 mol/L.

- conditions intestinales simulées : le milieu contient 6,8 g de KPO_3^- dissous dans 250 mL d'eau mélangé à 77 mL de NaOH 0,2 mol/L et 10 g de pancréatine, le tout complété à 1 L avec de l'eau. Le pH est ajusté à 6,8 à 37°C avec du NaOH 0,2 mol/L.

4.2 Etude de relargage

La quantité d'insuline relarguée des nanoparticules est quantifiée au cours du temps. Pour cela, les nanoparticules sont placées dans des proportions 1/5 en milieux simulés, puis incubées à 37°C. Les échantillons sont ensuite prélevés et centrifugés. La quantité d'insuline libérée dans le surnageant est alors quantifiée par UV à 280 nm. Le suivi est réalisé sur 4 jours consécutifs. Puis, afin de s'assurer que la complète libération de l'insuline, les nanoparticules sont décomplexées à l'aide d'une solution de NaOH 0,2 mol/L.

5. Effet hypoglycémiant des nanoparticules : études *in vivo*

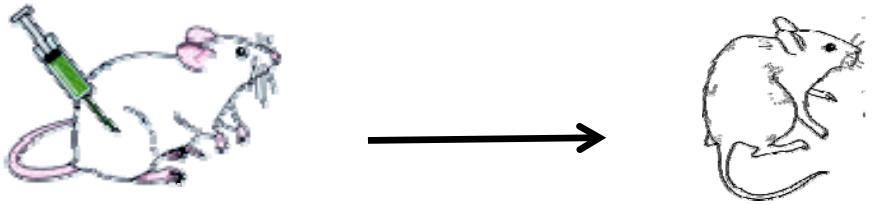
Dans le but de déterminer la capacité des nanoparticules à réduire la glycémie, des essais *in vivo* ont été réalisés sur des rats préalablement rendus diabétiques. Ces essais ont consistés à administrer les nanoparticules par différentes voies (en comparaison à de l'insuline libre) et à suivre les variations de la glycémie des animaux.

5.1 Modèle de rat diabétique et induction du diabète

Les animaux sont des rats mâles Wistar de 200-250 g (Depré) nourri *ad libitum* avec un accès libre à leur eau de boisson. Le diabète a été induit par une injection intra-péritonéale de 100 mg/kg de streptozotocine (Sigma-Aldrich), un antibiotique à large spectre d'action qui induit un état hyperglycémique en 2 à 3 jours (figure 42).

Les rats sont considérés comme diabétiques s'ils présentent une glycémie supérieure à 3 g/L dès le lendemain. Si tel n'est pas le cas, l'animal n'est pas inclus dans l'expérience. La streptozotocine est rapidement dégradée en solution et sa stabilité est maximale à pH 4, c'est

pourquoi elle est préparée extemporanément en solution dans un tampon citrate de pH 4,5 et conservée dans la glace le temps de procéder aux injections de l'ensemble des rats [217].



Rat sain → **Rat diabétique**

→ Injection de streptozotocine (100 mg/kg) → Glycémie > 3 g/L

Figure 42 : Induction du diabète chez les rats

L'induction du diabète par la streptozotocine est liée à la nécrose des cellules β des îlots de Langerhans qui sécrètent l'insuline. La partie glucidique de la molécule fortement similaire à celle du glucose (figure 43) lui fait emprunter le même chemin. La streptozotocine entraîne alors leur destruction via trois évènements majeurs induisant la mort cellulaire : un processus de méthylation associé à la production de radicaux libres et de monoxyde d'azote. La production d'insuline n'est alors plus possible, ce qui conduit à un animal diabétique.

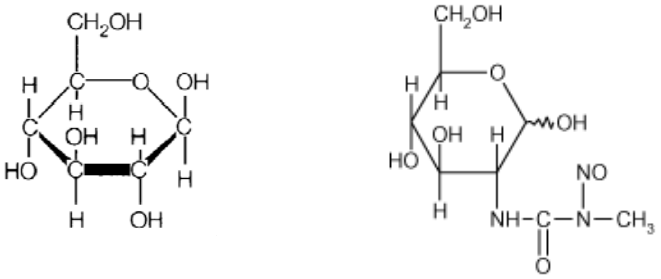


Figure 43 : Formules du glucose (à gauche) et de la streptozotocine (à droite)

5.2 Vérification de la biofonctionnalité des nanoparticules

La biofonctionnalité des nanoparticules est observée via le suivi de l'évolution de la glycémie des rats diabétiques après administration des nanoparticules. Les lectures de glycémie sont réalisées à l'aide d'un lecteur Accu-Chek® Go et de bandelettes réactives adaptées (Roche diagnostics, Mannheim, Allemagne). Afin de pouvoir évaluer au mieux le pouvoir hypoglycémiant des nanoparticules, les rats ne sont pas à jeun au moment de l'administration mais n'ont plus eu accès à leur nourriture lors des expérimentations. L'eau est *ad libitum*.

Deux voies d'administrations sont utilisées, nous permettant l'obtention de diverses informations. Les nanoparticules sont administrées soit par injection sous-cutanée, soit par voie intra-duodénale (figure 44).

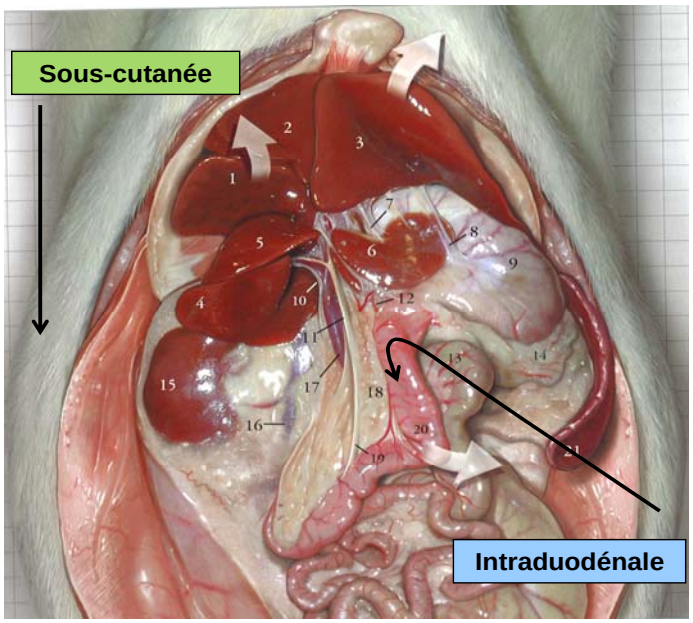


Figure 44 : Deux voies d'administration des nanoparticules permettant l'étude de leur biofonctionnalité [218]

5.2.1 Administrations des nanoparticules par voie sous-cutanée

L'administration par voie sous-cutanée permet le passage de l'insuline via les vaisseaux sanguins l'entraînant jusqu'à la circulation sanguine et/ou systémique. Ce type d'administration permet d'obtenir des renseignements quant à l'efficacité biologique de l'insuline. En effet, si une diminution de la glycémie est observée après ce type d'injection, cela signifie que l'insuline a été acheminée jusqu'à la circulation sanguine et qu'elle a joué son rôle biologique au sein de l'organisme, nous informant ainsi que le procédé d'encapsulation n'a pas modifié son activité biologique.

La biofonctionnalité des nanoparticules d'insuline Umuline® a été vérifiée en administrant par voie sous-cutanée des doses équivalentes d'insuline non encapsulée et d'insuline encapsulée dans les nanoparticules dans des quantités correspondant à 10 UI/kg.

5.2.2 Administrations des nanoparticules par voie intra-duodénale

L'administration par voie intra-duodénale nous permet d'obtenir directement des informations concernant son encapsulation. Via ce type d'administration, les nanoparticules vont être introduite dans l'organisme au niveau de l'intestin après implantation d'un cathéter. Les nanoparticules vont alors devoir être adsorbées par les cellules intestinales afin de traverser l'épithélium intestinal pour rejoindre la circulation sanguine et/ou systémique.

Dans le cas d'une administration d'insuline en solution c'est-à-dire sans protection, la présence d'enzymes au niveau de l'intestin va conduire à une dégradation de l'insuline. Celle-ci dégradée, ne sera donc plus biologiquement active et aucune diminution de la glycémie ne pourra être observée. Dans le cas où une diminution de glycémie est observée après administration intra-duodénale de nanoparticules contenant de l'insuline, cela signifie que l'insuline n'aura pas été dégradée et que les nanoparticules auront joué leur rôle protecteur ainsi qu'un rôle de transport à travers la barrière physique qu'est l'épithélium intestinal.

L'administration intra-duodénale nous permet donc d'obtenir des informations concernant l'efficacité de protection des nanoparticules, leur capacité à transporter l'insuline à travers l'épithélium intestinal et à la relarguer en temps voulu.

La biofonctionnalité des nanoparticules d'insuline Umuline® a été vérifiée à l'aide de suivis glycémiques réalisés après administration par voie intra-duodénale de doses équivalentes d'insuline non encapsulée en solution et d'insuline encapsulée dans les nanoparticules. La dose minimale de nanoparticules à administrer pour atteindre la normoglycémie a été déterminée par administration de différentes doses d'insuline correspondant à 50, 75 et 100 UI/kg. Sachant que des nanoparticules non lyophilisées correspondent à 50 UI/kg pour 1 mL de suspension. La lyophilisation des nanoparticules a été nécessaire de façon à permettre la concentration des échantillons afin d'obtenir de telles concentrations en insuline.

5.3 Détermination de la bioefficacité des nanoparticules

Etant donné que l'administration d'insuline par injection sous-cutanée permet d'éviter toute rencontre enzymatique susceptible de limiter l'activité de l'insuline, cette voie sera utilisée comme référence correspondant à 100 % d'insuline efficace [219]. Elle permet ainsi

le calcul de la bioefficacité des nanoparticules. Celle-ci se définit comme le rapport de la dose minimale d'insuline en solution administrée par la voie sous-cutanée (SC) (exprimée en UI d'insuline par kg de masse corporelle) et nécessaire pour atteindre la normoglycémie sur cette même dose pour les nanoparticules administrées par voie intra-duodénale (ID) :

$$\text{Bioefficacité (\%)} = \frac{\text{dose minimale d'insuline en solution (en UI/kg) administrée par SC}}{\text{dose minimale d'insuline encapsulée (en UI/kg) administrée par ID}} \text{ x } 100$$

La détermination de la dose minimale d'insuline en solution à administrer par voie sous-cutanée pour atteindre la normoglycémie ayant déjà été préalablement définie (10 UI/Kg) [219], les administrations d'insuline en solution seront réalisées en tant que contrôle positif dans les expériences.

Pour chaque type d'administration, du sérum physiologique sera également administré en tant que contrôle négatif afin de visualiser les éventuelles diminutions glycémiques engendrées par le jeun et le stress subis par les animaux lors de la manipulation.

Chapitre I

Synthèse et caractérisation d'un dérivé hydrosoluble du chitosane

Le chitosane est un polymère naturel, uniquement soluble en milieu acide dilué. Cette insolubilité à pH neutre et basique le rend inutilisable pour certaines applications, notamment dans le domaine de la libération intestinale de principes actifs. En effet, celui-ci devenant insoluble, se trouve alors dans l'impossibilité de libérer le principe actif qu'il transporte.

Or, nous souhaitons ici formuler des nanoparticules d'insuline à base de chitosane, stables en milieu intestinal et capables de libérer l'insuline dans le sang et/ou le liquide interstitiel. Il est donc essentiel que le composé utilisé présente une solubilité à pH physiologique afin de pouvoir libérer l'insuline. D'autre part, la capacité du chitosane à améliorer la perméabilité intestinale, par ouverture des jonctions serrées, est influencée par le pH. Ainsi, il a été montré qu'un chitosane ayant une solubilité accrue à pH intestinal était capable d'augmenter fortement cette perméabilité en comparaison avec un chitosane natif. [220]

Afin de complexer l'insuline, il est indispensable que les deux espèces à complexer portent des charges de nature opposée. Ces conditions sont réunies lorsque la valeur du pH est à la fois, supérieure au point isoélectrique de l'insuline et inférieure au pKa du chitosane. Ces conditions de pH particulières ne sont réunies que dans une zone étroite de pH comprise entre 5,5 et 6,5 (figure 45).

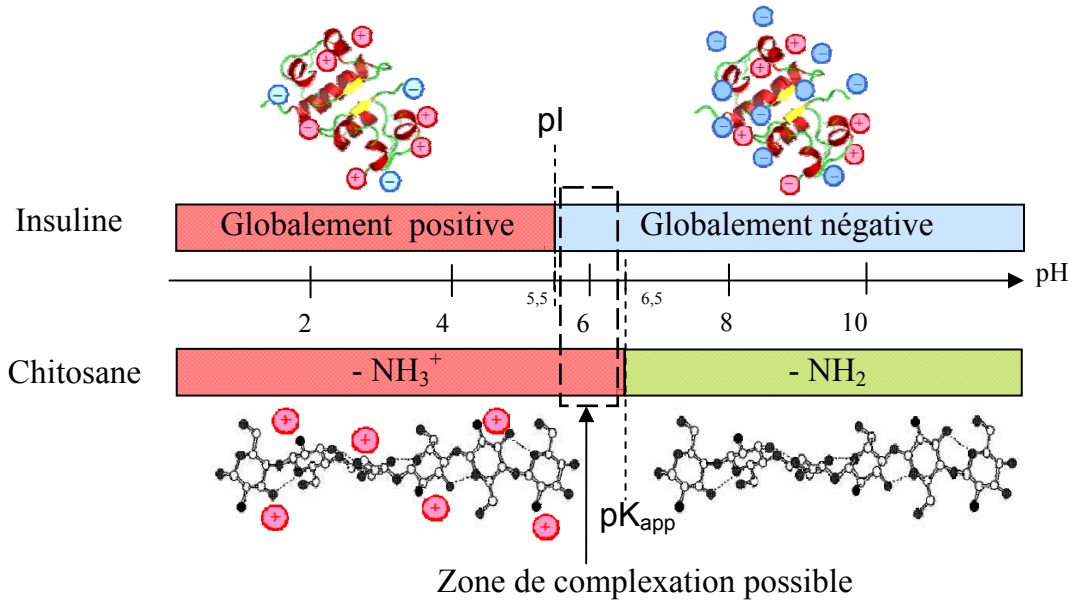


Figure 45 : Charges portées par l'insuline et le chitosane en fonction du pH

Néanmoins, il s'avère que le chitosane présente une insolubilité sévère dans cette zone, seule et unique zone de pH où la complexation est envisageable (figure 46).

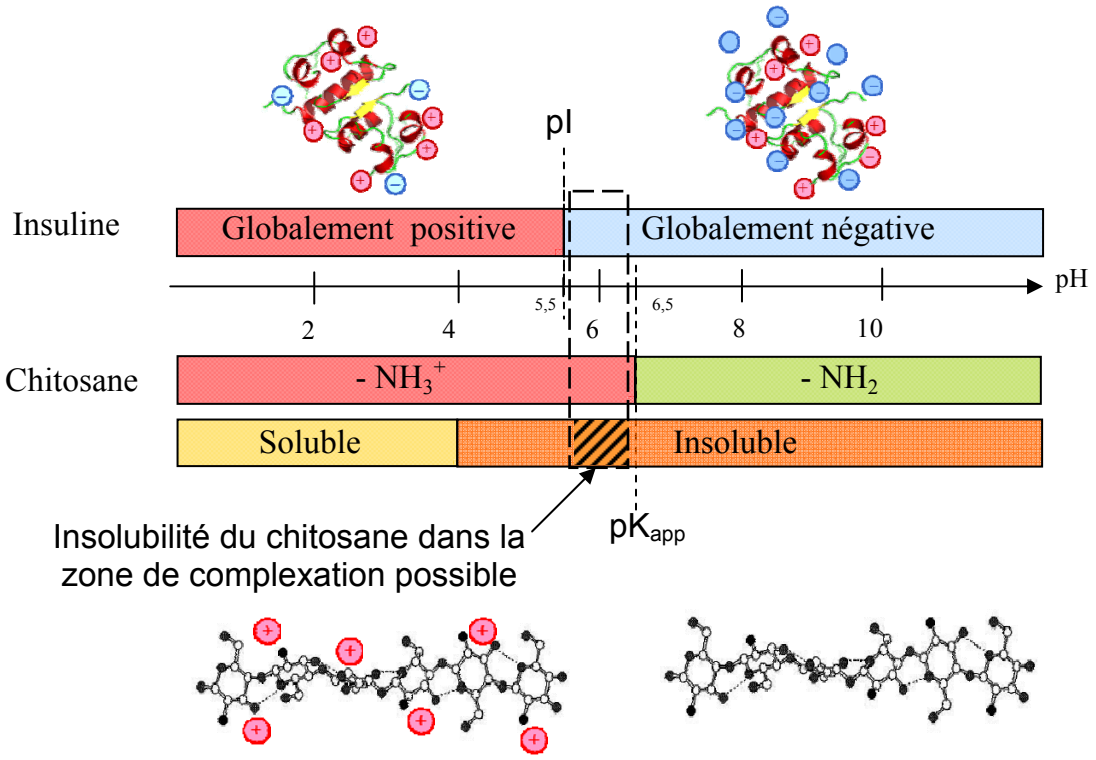


Figure 46 : Charge de l'insuline vs. charge et solubilité du chitosane en fonction du pH

C'est pourquoi, diverses stratégies sont utilisées dans le but de modifier sa solubilité. Parmi les techniques généralement utilisées et précédemment décrites (paragraphe 7.2), la dépolymérisation et la dérivatisation du chitosane sont deux outils fréquemment décrits pour permettre l'obtention de composés hydrosolubles (figure 47).

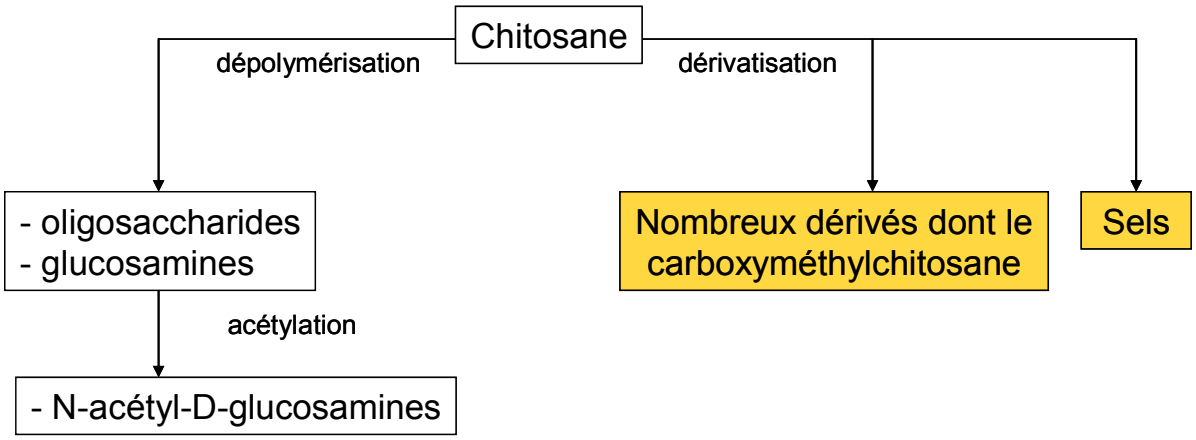


Figure 47 : Obtention de dérivés solubles à partir du chitosane, d'après [221]

En effet, la dépolymérisation, procédé visant à réduire la longueur des chaînes, permet l'obtention d'oligosaccharides solubles mais conduit à la perte des propriétés complexantes requises par la formation d'un complexe avec l'insuline. C'est pourquoi, l'utilisation de la dérivatisation du chitosane a été privilégiée, permettant ainsi la conservation de la longueur des chaînes. La modification chimique et l'utilisation de sels de chitosane sont les deux techniques qui présentent le plus grand intérêt pour l'encapsulation d'insuline. Ces deux types de modifications ont donc été réalisés dans le but de modifier la solubilité du chitosane et permettre la complexation de l'insuline.

Nous avons vu que la complexation de l'insuline à l'aide de chitosane n'était possible que dans des conditions de pH relativement strictes où les deux composés portent des charges opposées. Or, les propriétés électrostatiques du chitosane dépendent fortement de son degré de désacétylation (DDA), de sa masse molaire et de la distribution des deux types de motifs sur la chaîne (acétylés et désacétylés). Ces propriétés électrostatiques dépendent fortement de la valeur du pH, par l'intermédiaire d'une constante d'acidité appelée Ka. Lorsqu'un monoacide AH passe en solution aqueuse, un équilibre acido-basique s'établit sous la forme :

$$AH + H_2O \rightleftarrows A^- + H_3O^+ \quad \text{avec} \quad Ka = \frac{[A^-][H_3O^+]}{[AH]}.$$

Il est d'usage de parler préférentiellement de pKa, grandeur associée au caractère acide de l'espèce. En effet, plus la valeur du pKa est faible, plus l'acide est fort. On définit alors le pKa à l'aide de la relation $pKa = -\log(Ka)$. Dans le cas d'une monobase en solution aqueuse, l'équilibre peut alors s'écrire sous deux formes :

$$B + H_2O \rightleftarrows BH^+ + OH^- \quad \text{avec} \quad Kb = \frac{[BH^+][OH^-]}{[B]}$$

ou

$$BH^+ + H_2O \rightleftarrows H_3O^+ + B \quad \text{avec} \quad Ka = \frac{[H_3O^+][B]}{[BH^+]}.$$

Il existe alors une relation reliant Ka et Kb (constante de basicité) et définissant la constante d'équilibre de l'eau Ke avec $Ke = [H_3O^+][OH^-] = Ka.Kb$ et $pK_a + pK_b = 14$. De la même façon, il est possible d'obtenir $pKb = -\log(Kb)$. Plus pKb est grand, plus la base est forte.

Il est également possible de définir un coefficient de dissociation α :

$$\alpha = \frac{\text{nombre de moles dissociées}}{\text{nombre initial de moles}} = \frac{[A^-]}{[AH]_0} = \frac{[A^-]}{[A^-]+[AH]} \qquad \text{et} \qquad \alpha = \frac{[BH^+]}{[B]_0}.$$

Dans le cas des monoacides, le Ka est indépendant de α. Dans le cas des polyacides, le comportement est différent. La présence de groupements voisins ionisables et donc d'interactions à courtes et longues portées, modifie le comportement électrostatique d'un polyacide par rapport à un monoacide, notamment en ce qui concerne les interactions répulsives. Il est d'usage de définir une grandeur adaptée au cas des acides portés par des chaînes polymériques : le pK apparent. Celui-ci est défini par la relation $pK_{app} = pH - \log\frac{\alpha}{1-\alpha}$. La différence entre le pK_{app} et le pKa est liée à l'énergie libre apportée par les interactions entre monomères [222]. Dans le cas du chitosane (polybase), la réaction de dissociation s'écrit :

$$\text{R-NH}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftarrows \text{R-NH}_3^+ + \text{H}_2\text{O} \qquad \text{avec} \qquad Ka = \frac{[NH_2][H^+]}{[NH_3^+]}$$

Etant donné que le pK dépend de la longueur des chaînes, de la position et de la densité des groupements ionisables ainsi que de son environnement, il est donc indispensable de connaître précisément les relations entre les pKa, DDA et coefficient de dissociation α [223]. C'est pourquoi, une caractérisation approfondie du chitosane est nécessaire. Ainsi, il sera possible de déterminer les variations de charges du chitosane en fonction de pH. Nous pourrons alors envisager de procéder à la complexation avec l'insuline dans les conditions de charges optimales ainsi déterminées.

Les différents types de chitosanes utilisés dans le cadre de la synthèse de nanoparticules par coacervation complexe, ont été caractérisés précisément de façon à connaître leurs propriétés, notamment en ce qui concerne l'ionisation en fonction du DDA et du pKa. Le DDA est couramment déterminé par résonance magnétique nucléaire (RMN) et le pKa par dosage acide-base. Il correspond en effet à la valeur du pH à la demi-équivalence.

A l'aide des précédentes relations établies, il est possible de déterminer une relation entre la valeur du pH, le pKa et la quantité d'espèces ionisées :

$$Ka = \frac{[NH_2][H^+]}{[NH_3^+]} \quad \text{et} \quad Ka = 10^{-pKa} \quad \text{d'où} \quad \frac{[NH_2]}{[NH_3^+]} = 10^{pH-pKa}$$

Il est alors possible de tracer la proportion d'espèces chargées en fonction du pH (figure 48).

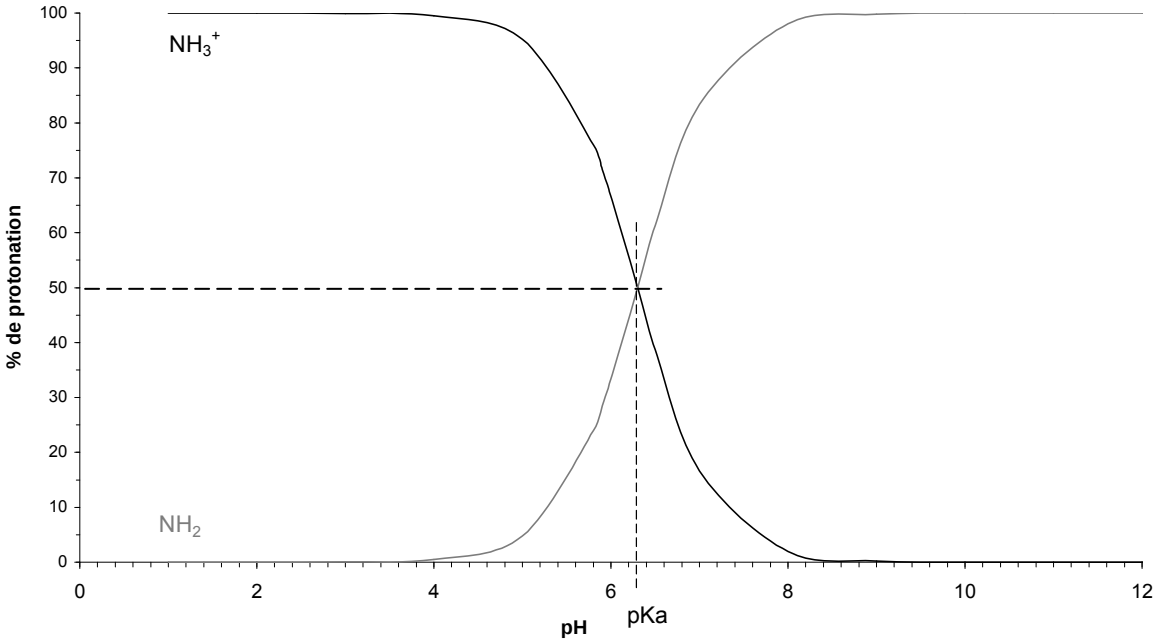


Figure 48 : Concentration des espèces $[NH_2]$ (gris) et $[NH_3^+]$ (noir) du chitosane (pKa = 6,3) en fonction du pH

Ainsi, à l'aide de ces données, il sera possible de déterminer dans quelle zone optimale de pH, le chitosane est suffisamment chargé pour être capable de complexer l'insuline.

Dans ce chapitre, la solubilité du chitosane sera modifiée par (i) modifications chimiques et par (ii) salification afin d'améliorer son hydrosolubilité. Puis diverses techniques de caractérisation seront présentées, dans le but de déterminer précisément les valeurs de DDA et de pKa du chitosane ainsi que des dérivés solubles obtenus par les deux techniques précédemment présentées.

I. Modifications chimiques : carboxyméthylation du chitosane

I.1. Article

- Article soumis à *Polymer*

Synthesis and adverse characterization of N-,O-carboxymethyl chitosan

A. Callet [a,*], S. Sigrist [b,c], Y. Frère [a]

[a] Institut Charles Sadron, CNRS-UPR 22, 23 rue du Loess, F-67034 Strasbourg Cedex, France
[b] Centre Européen d'Etude du Diabète, Boulevard René Leriche, F-67200 Strasbourg, France
[c] Université de Strasbourg (UdS), 4 rue Blaise Pascal, F-67081 Strasbourg cedex, France

* **Corresponding author**

- Résumé

Le chitosane est un biopolymère naturel d'origine animale, présentant des caractéristiques spécifiques comme le degré de désacétylation (DDA) et la masse molaire. Celles-ci peuvent différer selon l'espèce animale, son origine géographique ainsi qu'en fonction du fournisseur et du lot de fabrication. Fréquemment utilisé pour des applications pharmaceutiques, le chitosane est un polyélectrolyte cationique pouvant être utilisé pour former des complexes de polyélectrolytes (PEC). L'objectif est de former des systèmes nanoparticulaires par coacervation complexe avec l'insuline, afin de promouvoir son administration orale. Néanmoins, la faible solubilité du chitosane à pH physiologique limite ses possibilités de complexation avec l'insuline. Des modifications chimiques par N-,O-carboxyméthylation ont été réalisées afin d'améliorer l'hydrosolubilité du chitosane. Etant donné que la formation de PEC est fortement influencée par la charge des polyélectrolytes, le DDA et la masse molaire du chitosane, il est nécessaire de bien les caractériser. Jusqu'à présent, aucun travail comparable n'a été réalisé dans le but de caractériser un chitosane issu d'un même lot de fabrication. Cet article décrit, pour la première fois, la caractérisation d'un chitosane et d'un N-,O-carboxyméthyl chitosane (NOCC) par différentes techniques telles que la ^{1}H-RMN, la spectroscopie infrarouge et le dosage pHmétrique-conductimétrique.

Synthesis and adverse characterization of N-,O-carboxymethyl chitosan

A. Callet [a,*], S. Sigrist [b,c], Y. Frère [a]

[a] Institut Charles Sadron, CNRS-UPR 22, 23 rue du Loess, F-67034 Strasbourg Cedex, France
[b] Centre Européen d'Etude du Diabète, Boulevard René Leriche, F-67200 Strasbourg, France
[c] Université de Strasbourg (UdS), 4 rue Blaise Pascal, F-67081 Strasbourg cedex, France

* **Corresponding author**
Tel. : +33 3 88 41 40 00 ; Fax : +33 3 88 41 40 99
E-mail address: adeline.callet@ics-cnrs.unistra.fr

Abstract :

Chitosan is a natural biopolymer from animal source, with specific characteristics such as deacetylation degree (DDA) and molecular weight values. They may differ depending on animal species, origin, suppliers and products batches. Highly used in pharmaceutical applications, chitosan is a cationic polyelectrolyte which can be used to form polyelectrolyte complexes (PEC). In this context, the aim is to form nanoparticulate systems by complex coacervation with insulin, to promote its oral administration. Otherwise, low chitosan solubility at physiological pH limits complexation possibilities with insulin. Chemical modifications by N-,O-carboxymethylation were done to improve chitosan water-solubility. As PEC formation is highly influenced by polyelectrolytes charges, DDA and molecular weight of chitosan, they may be well characterized. At present, any comparable work was made in order to characterize a chitosan from the same batch. For the first time, this paper described adverse characterization of chitosan and N-,O-carboxymethyl chitosan (NOCC) by ^{1}H-NMR, infrared spectroscopy and potentiometric-conductimetric titration.

Keywords: carboxymethyl chitosan, NMR, potentiometric titration

1. Introduction

Chitosan, a cationic polysaccharide, is obtained by N-deacetylation of chitin, the most widely used biopolymer with cellulose. Chitosan molecule is a copolymer of N-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine with the D-glucosamine content called the degree of deacetylation (DDA). Due to its unique polycationic nature, chitosan has been used for

various applications in biomedical, food, biotechnological and pharmaceutical applications [1, 2]. Chitosan has several very interesting properties such as biocompatibility, non toxicity, antibacterial activity and mucoadhesive properties. For these reasons, chitosan was chosen for the further aim of this work which is to form nanoparticulate systems by polyelectrolyte complexation (PEC) between a polyelectrolyte (chitosan) and a protein (insulin).

Insulin is a well known protein involved in blood glucose level reduction and used in diabetes mellitus treatment. Polyelectrolyte complexation involved electrostatic interactions between oppositely charged polyelectrolytes. In order to make this complexation possible, chitosan and insulin should be oppositely charged, meaning that both insulin isoelectric point (pI) and chitosan apparent pK values must be known. Tanford and Epstein [3] have defined insulin pI at 5.5, meaning that insulin is neutral at this pH value, negatively charged for upper pH and positively charged for lower pH values. In case of chitosan, pK values of 6.5 were generally observed [4,5] leading to positively charged species for pH below pK. However, its poor solubility at neutral and alkaline pH limits its applications. Indeed, chitosan should be soluble at physiological pH in order to permit both insulin complexation and release.

Some chemical modifications have been attempted to modify and enhance chitosan water solubility such as quaternary ammonium, N-alkylated or graft copolymers derivatives [6]. An important chemical modification method is carboxymethylation. Carboxylate functionalities on polymers have been shown to enhance its biological properties [7]. Carboxymethylation of chitosan leads to the formation of water soluble derivatives which may offer a large variety of applications. Moreover, its original structure based on N-acetyl glucosamine enhances its performances and makes it more biocompatible, hydrophilic and biodegradable than other synthetic polymers [8]. According to reacting conditions, several derivatives could be obtained as O-, N- or N-,O-carboxymethyl chitosan. All theses derivatives show very complex structures.

PEC formation is controlled by many factors such as the nature of polyelectrolytes, their molecular weight and molecular weight distribution, pH of polyelectrolytes solutions, mixing ratio, etc … Jintapattanakit *et al*. [9] have shown that polymer/insulin charge ratio played an important role in PEC and nanoparticules formation. PEC formation is highly dependent on chitosan characteristics such as DDA or charge density. Several studies have demonstrated that DDA and molecular weight value of chitosan highly influenced pK values [4,10]. DDA and molecular weight values influenced not only PEC formation but also *in vitro* nanoparticules uptake and toxicity [11], that's why an accurate and complete characterization is essential before complexation. As chitosan is obtained from a natural source, properties will

also differ from animal species, geographical source and will also depend on other parameters such as suppliers and products batches. For these reasons, each chitosan is unique and need to be perfectly characterized. Moreover, every chitosan or carboxymethyl derivatives described in the literature have different suppliers and batches, modified in different reaction conditions and characterized by several different techniques. This leads to lot of independent studies where cannot be compared to each other.

Our purpose is, for the first time, to compare different characterization techniques on the same chitosan batch. Characterization of chitosan and its carboxymethylated derivatrives is usually investigated by NMR, elemental analysis, titration and spectroscopy. So far, there is no common reference investigating all these different techniques. This paper concerns the description of adverse characterization of N-,O-carboxymethyl chitosan (NOCC) such as ^{1}H-NMR, infrared spectroscopy and potentiometric-conductimetric titration on the same chitosan batch.

2. Material and methods

2.1. Materials

Chitosan PROTASAN UP B 80/20 with 200 kDa molecular weight and a deacetylation degree of 85 % was supplied by NovaMatrix (FMC BioPolymer AS, Norway). Isopropanol and monochloroacetic acid were purchased by Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France). Other reagents were supplied by Sigma with the reagent grade.

2.2. Methods

2.2.1. NOCC synthesis and characterizations

NOCC was synthesized by chemical modification on chitosan described in the literature [12]. Briefly, 200 mg of chitosan were suspended in 10 mL of isopropanol. 2.5 mL of 10 N aqueous sodium hydroxide solution were slightly added in five portions at 5 min intervals. The slurry was stirred for additional 30 min, after when 6 g of monochloroacetic acid were added in five equal portions at 1 min intervals. Then, the mixture was stirred and heated at 65°C during 3 hours. The resulting mixture was filtered and the solid product washed with methanol and dried at room temperature for 48 hours.

2.2.2. NMR and IRTF characterizations

Chitosan and NOCC were characterized by proton nuclear magnetic resonance (^{1}H-NMR) on Avance 400 MHz (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany) to determine degree of deacetylation (DDA) and by Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR) in Attenuated Total Reflectance mode (ATR) on Vertex 70 (Bruker Optics, Ettlingen, Germany) to identify substitutions of amino and primary hydroxyl groups by carboxymethyl groups.
NMR studies were performed in deuterium oxide with chitosan dissolved in DCl 2% in D_2O and NMR acquisition was done at 70°C. NOCC was dissolved in pure D_2O and NOCC spectrum was acquired at room temperature. IRTF measurements were done on both chitosan and NOCC samples scanned from 400 to 4000 cm^{-1}. DDA was obtained after calculations made with peak integration with accuracy of 5 %.

2.2.3. Potentiometric and conductimetric titrations

The average DA (degree of acetylation) and DS (degree of substitution) were determined from potentiometric and conductimetric titration according to a method derived from Jiang *et al.* [13]. Chitosan and NOCC were dissolved in 25 mL of 0.1 N standard HCl aqueous solution (Titrisol, Merck Chemicals). After complete dissolution, the solution was then topped up to 40 mL with distilled water and calculated amount of KCl was added to adjust the ionic strength to 0.1. The titrant was aqueous 0.4 N NaOH solution containing 0.1 N KCl. All titrations were made in triplicates and carried out under nitrogen atmosphere in a thermostated double-walled glass cell with temperature controlled at 25.0 ± 0.1°C. Automated titrator (DL50 Graphix Titrator, Mettler Toledo, Viroflay, France) was used for titration and pH measurements. Conductimeter (K912, Consort, Turnhout, Belgium) was parallely used for conductivity monitoring with a 4-pole electrode. Titrations were either made by incremental or dynamic addition of titrant.

2.2.4. Titration program

The titration program allows two titration modes: (1) incremental, in which the volume increments remain fixed during the titration with steps of 0.02 mL and (2) dynamic, where the volume increments are modified automatically and are inversely proportional to the slope of the titration curve. In both modes, a waiting time was fixed before each addition step and the

measurements were only accepted when two successive values differ by a pre-determined value defined as 0.5 mV. The time between consecutive measurements was long enough to compensate for variations in response time of the glass electrode. Titration was made with equivalence point titration mode and accurate data was obtained as the time needed to reach titration equilibrium near the equivalence point was long. A graphical representation of the titration curve was obtained from calculation and graphical representation of the first and second derivative curves.

Potentiometric titration was made in dynamic mode, volume of added NaOH and pH values were recorded. Conductimetric titration was made without any ionic force (any KCl used) by incremental titration. Both pH and conductivity values were measured as function of volume of added NaOH. Equivalent volumes were determined with a 2 % accuracy.

3. Results and discussion

3.1. Chitosan characterizations

3.1.1. ^{1}H-RMN characterizations of chitosan

Aqueous 2% DCl is the best solvent for chitosan NMR. Naturally, this acid media produces the hydrolysis of some of the N-acetyls groups and production of some free AcOH. Therefore, for DA determination, both the N-acetyls and AcOH signals should be considered for integration [14]. Acquisition was made at 70°C where a shift to lower field experienced of HOD signal was observed and contributed to separate this residual water peak from the zone of interest and allows an easier and more precise integration of the H_2-H_6 multiplet [14, 15]. DA determination was made according to several following equations described in the literature [15]:

$$DDA_{(1)} = \left(\frac{I_{H_1(D)}}{I_{H_1(D)} + I_{H_1(A)}} \right) \times 100$$

$DDA_{(1)}$ equation is usually used for DDA higher than 10 % and derived from peaks of protons $H_{(1)}$ of both deacetylated and acetylated monomer ($H_{(1)}A$ et $H_{(1)}D$), is sometimes not suitable when $H_{(1)}A$ is not visible or not well defined in the spectra. Otherwise, this reason encourages

to calculate DDA using integrals of the peak of proton $H_{(2)}$-$H_{(6)}$ of the saccharide unit and of the three protons of acetyl group (H_{Ac}) according to the following equation:

$$DDA_{(2)} = \left(1 - \frac{\frac{1}{3} I_{H_{Ac}}}{\frac{1}{6} I_{H_2 - H_6}}\right) \times 100$$

According to previous definition of DDA and spectra intregation (figure 1), equations give $DDA_{(1)}$ = 87 ± 5 % and equation $DDA_{(2)}$ = 85 ± 5 %. In our case, these results could be considered as coherent.

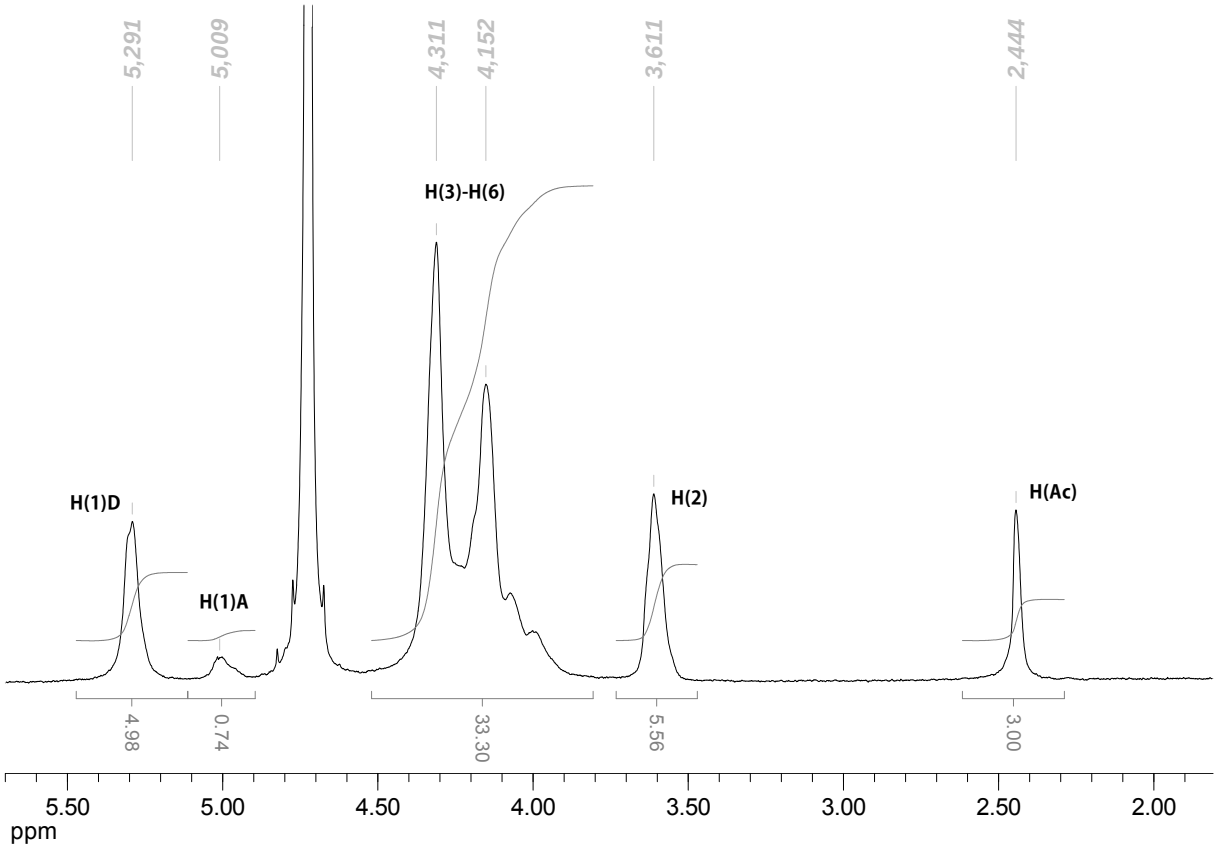


Figure 1: ^{1}H-NMR spectra of chitosan dissolved in D_2O and acquire at 70°C

3.1.2. Potentiometric and conductimetric titrations of chitosan

Potentiometric and conductimetric have already been used to determine DDA of chitosan. Balázs *et al.* [16] have shown that corrections need to be done to compensate some ash and

moisture effects. Dos Santos *et al.* [17] have investigated conductimetric and elemental analysis techniques to determine DDA and conclude that conductimetric titration was the simplest way to obtain accurate values in comparison with elemental analysis, IRTF and NMR analysis. Since potentiometric and conductimetric titrations both shown accurate values in agreement with NMR determination, these two techniques were investigated.

Chitosan titration curve was acquired in triplicate and plotted in figure 2. A background HCl titration (blank titration) was made without chitosan to determine exact NaOH concentration. This curve was also use as a control to confirm that all functions of protonated groups were titrated after chitosan precipitation (in dotted lines on figure 2). Since chitosan titration curves were superposed with blank titration curve after chitosan precipitation, it can be assumed that all protonated groups were titrated.

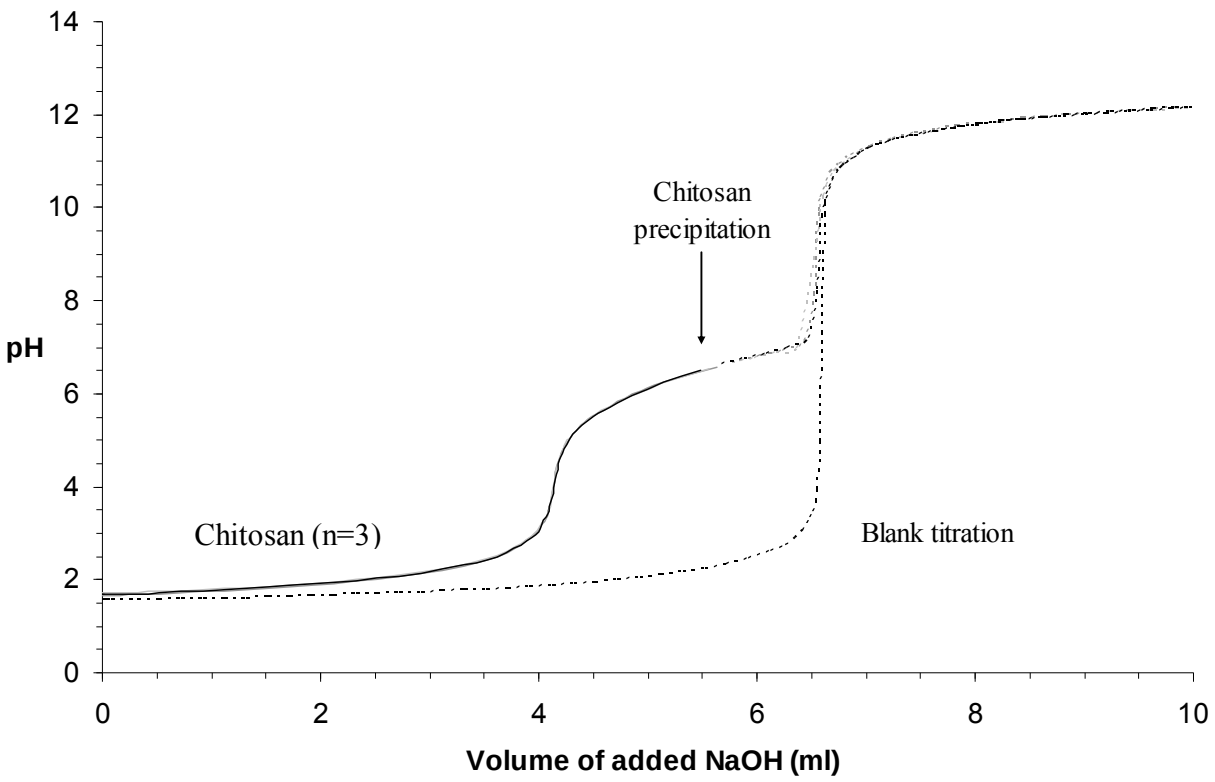


Figure 2: Potentiometric titration of chitosan compared with blank titration

All the DDA values determined in the literature are calculated as a function of M, the average molar mass unit of the repetitive unit of chitosan, with the following equation[18]:

$$DDA_{(3)} = \left(\frac{M * (V_2 - V_1) * [NaOH]}{m} \right) \times 100$$

where: M is the average molar mass of repetitive unit of chitosan, V_1 and V_2 are the volume of NaOH added to reach the first and second inflexion point, respectively, [NaOH] is the titrant concentration (mol/l) and m the mass of chitosan (mg) contained in the titrated sample. Otherwise, this value is directly dependent of the DDA value as it is defined as:

$$M = \left(DDA * M(DeAc) + DA * M(Ac) \right) \times 100$$

Where: M(Ac) and M(DeAc) are the molar mass of the acetylated and deacetylated monomer unit, respectively known as M(DeAc) = 161 g/mol and M(Ac) = 203 g/mol.

By this way, the average degree of deacetylation $DDA_{(3)}$, is calculated with M based on a known or estimated DDA value. For this reason, DDA was calculated according to the following equation:

$$DDA_{(4)} = \left(\frac{1}{1 + \frac{m - (V_2 - V_1) * [NaOH] * M(DeAc)}{M(Ac) * (V_2 - V_1)[NaOH]}} \right) \times 100$$

Where : V_1 and V_2 are the volume of NaOH added to reach the first and second inflexion point, respectively, m is the mass of chitosan (mg) contained in the titrated sample, M(Ac) and M(DeAc) the molar mass of the acetylated and deacetylated monomer units, respectively.

According to equation with V_1 and V_2 directly obtained from the potentiometric titration curve, $DDA_{(4)}$ is equal to 76 ± 2 %. On the other way, titration curve also gives pKa determination as it is defined by the pH value at the semi-equivalence point, leading to pKa value of 6.4 ± 0.1. Potentiometric titration of chitosan was done at the same time as potentiometric titration. After superposition of potentiometric and conductimetric curves on the same plot (figure 3), equivalence points can be observed at similar values of NaOH, meaning that both titrations were accurate.

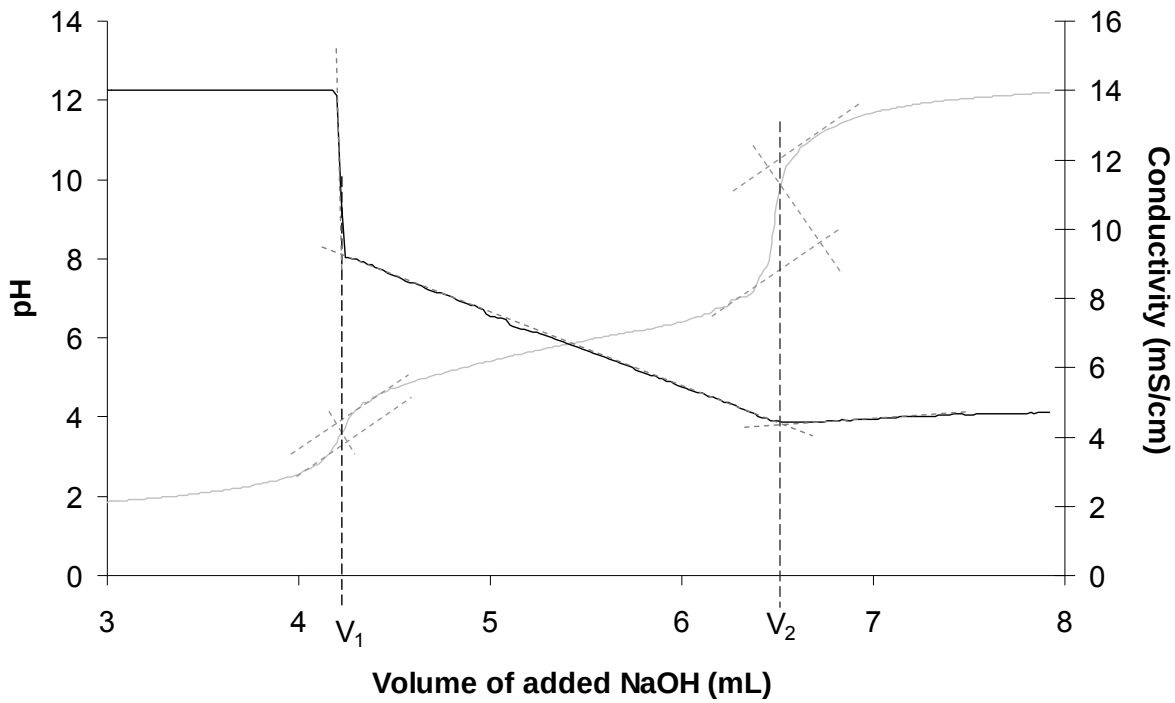


Figure 3: Potentiometric (grey) and conductimetric (black) titration of chitosan with equivalence point at V_1 and V_2

As V_1 and V_2 are determined as 4.22 and 6.50 mL on the conductimetric curve, respectively, $DDA_{(4)}$ of chitosan was equal to 74 ± 2 %. It can be clearly seen in table 1 that a good agreement was obtained between NMR and potentiometric/conductimetric determination of DDA. Conductimetric titration, a simple and inexpensive method, can be used as a safe technique for DDA determination of chitosan.

Technique	DDA (%)	pKa
^{1}H-NMR	85 ± 5	-
Potentiometric titration	76 ± 2	6.4 ± 0.1
Conductimetric titration	74 ± 2	-

Table 1: Chitosan DDA values determination by different techniques

The chitosan supplier gives a DDA value of 85 %. NMR is the most accurate techniques for DDA determination. This may due to the moisture content of chitosan which may cause errors on both chitosan weight and excess HCl concentration. Chitosan drying could be done; otherwise it could lead to molecular weight or structure modifications. Since all titrated

samples were measured with 10 % moisture (measured by thermogravimetry, data not shown), measurements were done in similar conditions and could be considered as equivalent.

3.2. NOCC synthesis and characterizations

According to the literature, several carboxymethylated derivatives of chitosan have already been studied. The choice of the appropriate reaction conditions and reagents allows several kinds of substitutions such as N-, O-, N-,N- or N-,O-carboxymethylations [19-21]. Their properties were highly dependent on their structural characteristics especially on the degree of substitution and its localization (amino or hydroxyl group). It has been reported that reaction of chitosan with glyoxylic acid and sodium cyanoborohydride leads to N-carboxymethylation [22]. Otherwise, reaction with chloroacetic acid and aqueous NaOH has been reported as a way to obtain N-,O-carboxymethylated derivatives of chitosan. When the reaction with chloroacetic acid is carried out at room temperature, O-substitution is favored whereas N-substitution predominated if reaction temperature is raised [23]. In this study, reaction takes places at 65°C in presence of monochloroacetic acid and lead to N-,O-carboxymethylation of chitosan (figure 4).

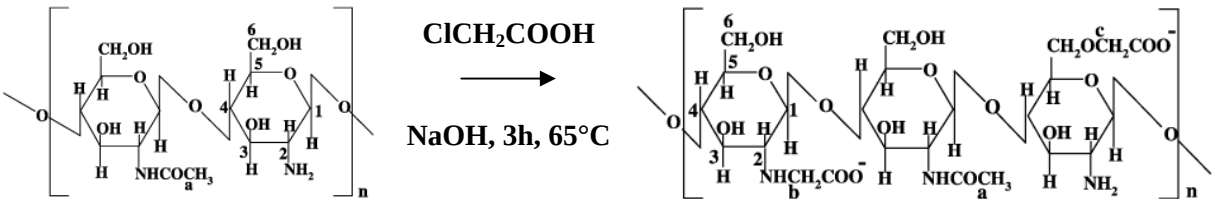


Figure 4: Carboxymethylation reaction of chitosan with monochloroacetic acid and NaOH

3.2.1. IRTF and NMR analysis of NOCC

FTIR spectra of chitosan and NOCC are shown in figure 5. The spectrum of chitosan shows the band at 1630 cm^{-1} which can be attributed to amino group ($-NH_2$ deformation). On the NOCC spectrum, peaks at 1570 cm^{-1} for carboxyl groups ($-COO^-$ anti-symmetric stretch) and at 1245 cm^{-1} for –C-O-C stretching vibration band of the group $–CH_2$-COOH, confirm the NOCC formation by the presence of carboxymethyl groups [20, 24]. From a comparison of the spectra of chitosan and NOCC, the peak at 1630 cm^{-1} representing amino groups disappeared on NOCC meaning that carboxymethylation occurs on amino groups. At 3420

cm^{-1}, the band becomes wider and weaker suggesting that carboxymethylation occurs on both hydroxyl and amino groups of the glucosamine units of chitosan [25]. IRTF spectra confirm the carboxymethylation of chitosan on both hydroxyl and amino groups.

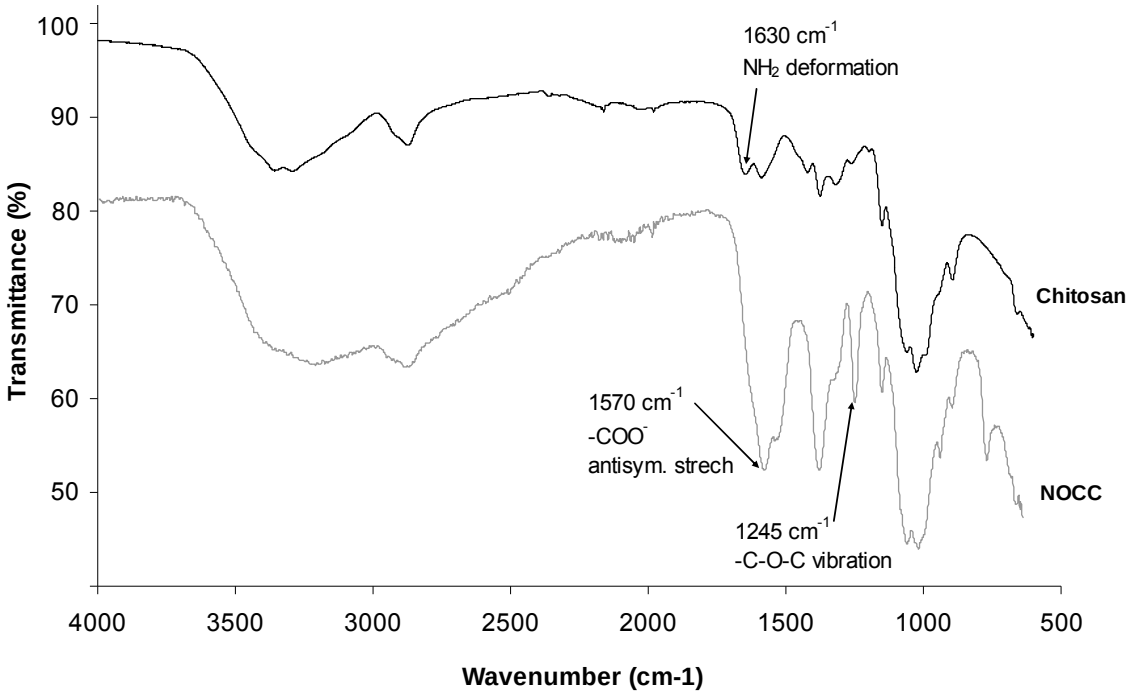


Figure 5: IRTF spectra of chitosan and NOCC

NMR is a well known technique usually used for quantification of substitutions after chemical reactions. Nevertheless, DDA of NOCC was not investigated by ^{1}H-NMR. As seen on figure 6, the signals of the three protons of acetyl group (H_{Ac}) usually taken as reference, changed during the carboxymethylation reaction. This was confirmed by making "a background reaction" on chitosan with acetic acid instead of monochloroacetic acid to assess the same conditions reaction to chitosan but avoiding carboxymethylation. The obtained product was dissolved in DCl 2 % in D_2O and NMR study was made at 70°C. By this way, it can easily be seen that intensity of the acetyl peak changed meaning that deacetylation reaction occurs during carboxymethylation reaction (figure 6). Some hydrolysis of acetyl groups also occurs during the reaction leading to a split peak. As the reference usually taken for DDA determination changed after carboxymethylation reaction (from 85 % to 67 %), ^{1}H-NMR doesn't permit this kind of investigation.

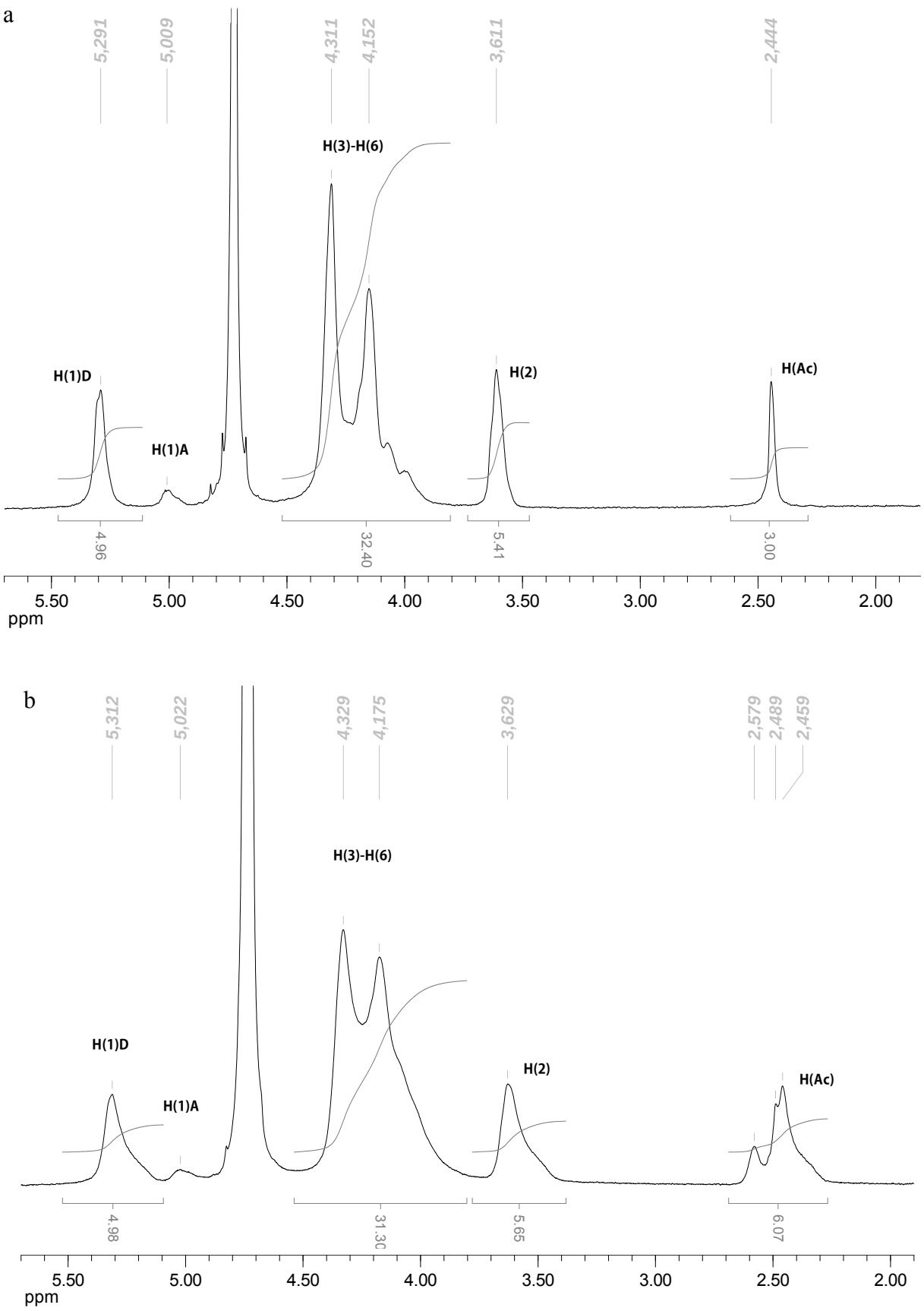


Figure 6: NMR spectra of chitosan (a) and chitosan after “background reaction” (b)

Otherwise, DS could be determined by NMR technique. The spectrum of NOCC is shown in figure 8. NOCC has been frequently described in the literature but NOCC has a very complex structure especially depending on the reaction conditions. Since various authors worked on different chitosan and NOCC in each study, it leads to several characterization methods description. For instance, Chen *et al.* [12] and Xang *et al.* [26] both visualized N- and O-substitution on NOCC after NMR acquisition at 25°C. According to An work [27], after acquisition at 80°C, only N-substitution was observed. Otherwise, An *et al.* show that both mono- and di-substitution can occur on N-position depending on the reaction condition especially on chitosan/monochloroacetic acid ratio (figure 7). An *et al.* has shown that the higher the mass ratio of chitosan/monochloroacetic acid, the lower the mono-substitution.

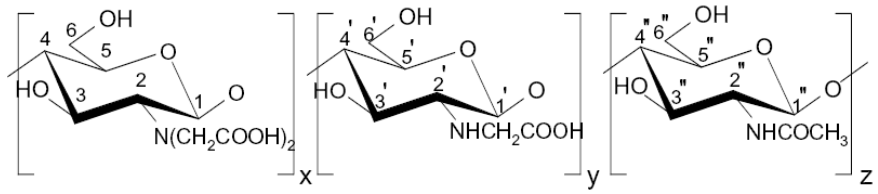


Figure 7: Structure of N-carboxymethyl chitosan derivative as described in [27]

Depending on the acquisition temperature of NMR spectrum, HOD signal was shifted to lower field permitting a better observation of interesting zone. Otherwise, the resolution and peak displacement is quite different. Muzzarelli *et al.* [28] attributed NMR signals at 3.5 ppm to mono and di-substituted carboxyl groups on N-carboxymethyl chitosan (with acquisition made at 80°C). In our study, mass ratio of chitosan/monochloroacetic acid used is 1/30, meaning that not only mono-substitution occurs on N-position but also di-substitution, as excess of monochloroacetic acid reacts on all mono-substituted amino groups. It was confirmed by NMR spectra where only one quadruplet signal for amino group was observed (figure 9). No mono-substitution was observed in these reaction conditions as di-substitution immediately occurred on mono-substituted groups. By this way, degree of substitution could be calculated as:

$$DS_{N,N-di} = \left(\frac{I_{H_1(di-sub)}}{I_{H_1(di-sub)} + I_{H_1'(mono-sub)} + I_{H_1''(Ac)}} \right) \times 100$$

According to this equation, DS $_{N,N\text{-disub}}$ is equal to 84 ± 5 % for acquisition at RT and 88 ± 5 % at 80°C. Both DDA and DS determination by ^{1}H-NMR is quite difficult to investigate. That's why titration has been done to further characterize NOCC.

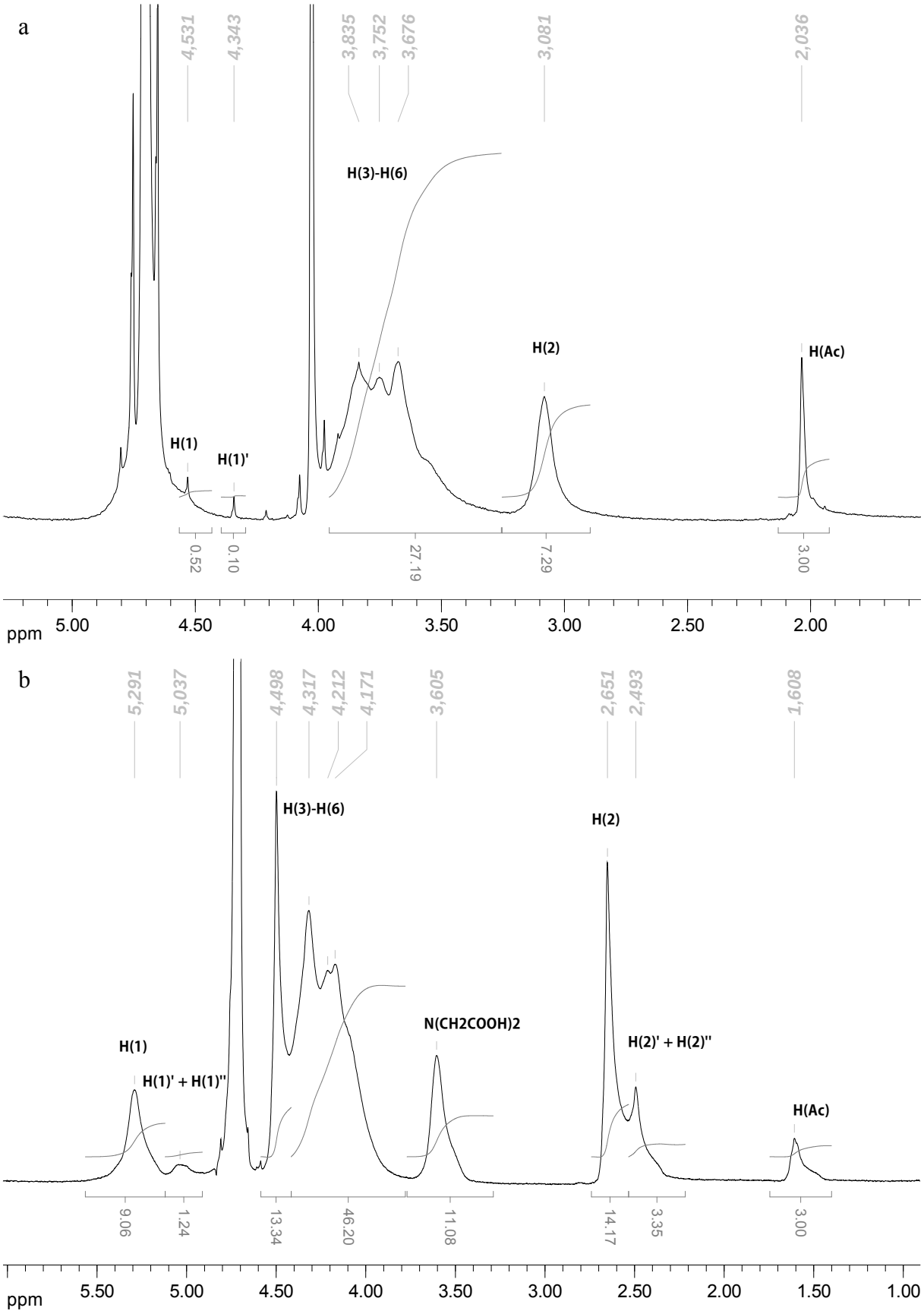


Figure 8: NMR spectra of NOCC, acquisition at RT (a) and at 80°C (b)

3.2.2. Potentiometric and conductimetric titrations of NOCC

Potentiometric titration of NOCC was done at the same time as potentiometric titration in order to evaluate the average contents of carboxymethyl groups on NOCC. Potentiometric and conductimetric curves were plotted together (figure 9). First, conductivity decreases until V_2 was reach and then increases until the end of titration. In addition, some slope breaking points could be observed for V_1, V_2 and V_3, corresponding to 4 different steps of the titration. It's interesting to see that V_2 and V_3 were obtained at similar values for both potentiometric and conductimetric titration.

The NOCC conductimetric curve looks like a typical curve which consists in 4 linear branches. The first one corresponds to the volume of base added to neutralize the excess of HCl in solution. The second is due to the neutralization of carboxymethyl groups on NOCC. The third corresponds to the neutralization of protonated amino groups and the forth and last one, is due to the addition of NaOH. The values of the equivalent volumes were used to calculate DS of NOCC usually defined in the literature using the following equation:

$$DS = \left(\frac{(V_2 - V_1) * DDA}{V_3 - V_2} \right) \quad \text{with} \quad DDA_{(4)} = \left(\frac{1}{1 + \frac{m - (V_3 - V_2) * [NaOH] * M(DeAc)}{M(Ac) * (V_3 - V_2)[NaOH]}} \right) \times 100$$

On figure 9, the four typical branches can be easily identified and the second one, corresponding to acid groups titration, show several changes in slope, probably due to titration of different acidic species.

These 3 additional breaking points correspond to 3 different pKa values of approximately 2.52, 2.67 and 2.95 respectively. According to the literature, these values could be attributed to pKa of several carboxylic acids such as aspartic and glycolic acids as followed:

H_2N-CH(CH_2COOH)-**COOH** (pKa$_1$ = 2.09) > HO-CH_2-**COOH** (pKa = 2.34) > H_2N-CH(CH_2**COOH**)-COOH (pKa$_2$ = 3.86)

Since carboxylic groups of NOCC would differently behave according to their environment, pKa values were slightly different from those of isolated carboxylic groups; otherwise the

difference between pKa values was in the same range. Based on these interpretations, pKa values of NOCC could be attributed according to figure 10.

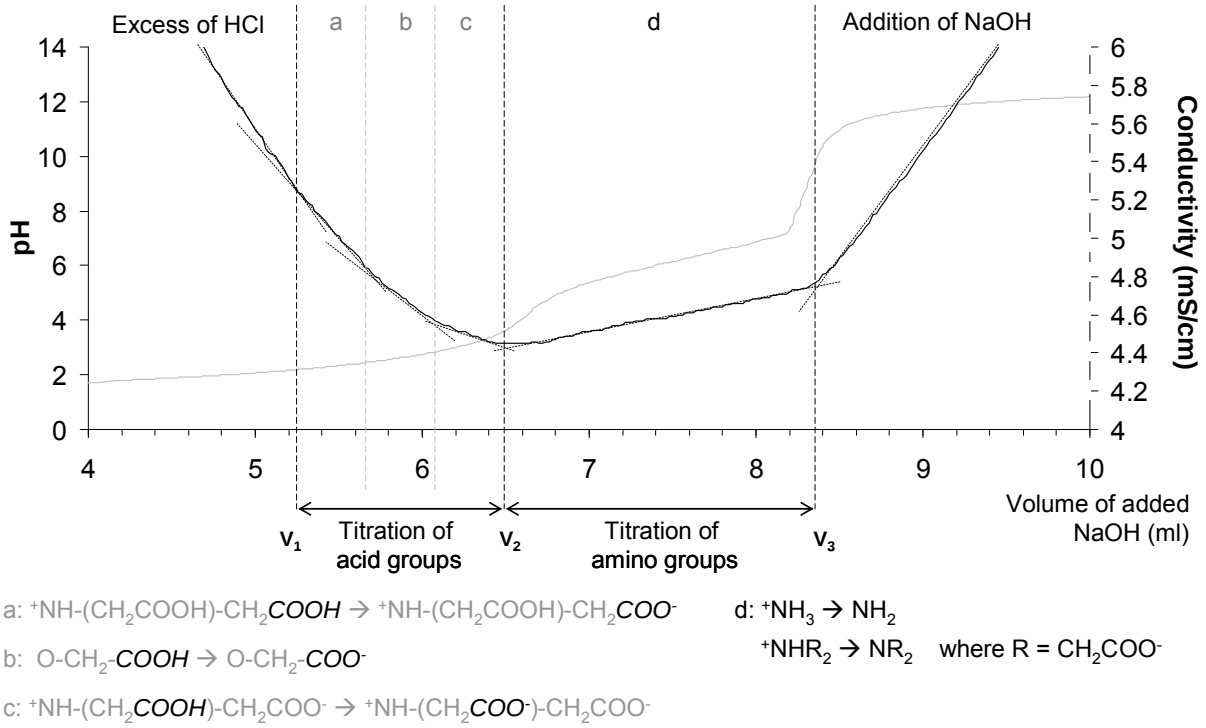


Figure 9: Attribution of linear branches to titrated groups of NOCC by conductimetric method

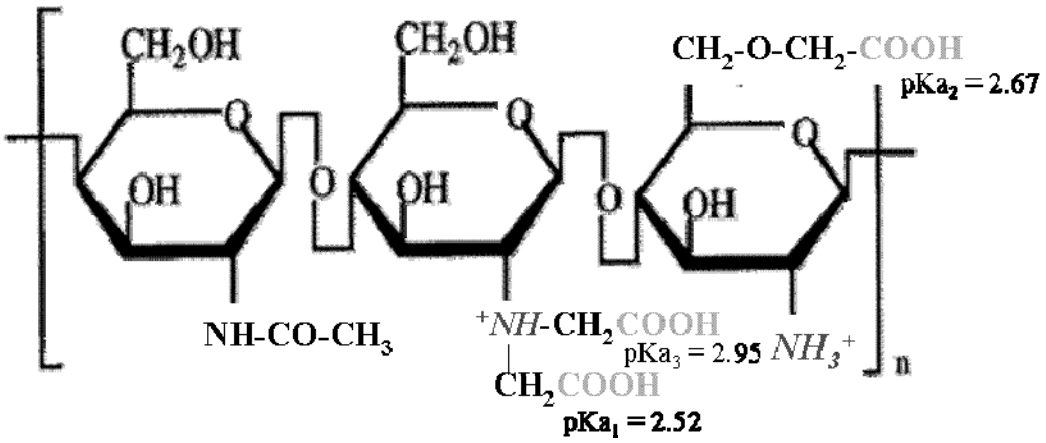


Figure 10: Localization of carboxyl and amino groups on NOCC and attributed pKa values

Depending on the conductimetric titration accuracy, the second branch could be separate in several zones with neutralization of different species according to differences between pKa values of O- and N-disubstituted carboxyl groups of NOCC. In a similar way, pKa of amino

groups was graphically determined as 9.77. Based on usual carboxylic acids and amines pKa values, the deprotonation occurred as followed:

1: $^{+}NH-(CH_2COOH)-CH_2\mathit{COOH} \rightarrow {}^{+}NH-(CH_2COOH)-CH_2\mathit{COO}^{-}$

2: $O-CH_2-\mathit{COOH} \rightarrow O-CH_2-\mathit{COO}^{-}$

3: $^{+}NH-(CH_2\mathit{COOH})-CH_2COO^{-} \rightarrow {}^{+}NH-(CH_2\mathit{COO}^{-})-CH_2COO^{-}$

4: $^{+}NH_3 \rightarrow NH_2$ and $^{+}NHR_2 \rightarrow NR_2$ where $R = CH_2COO^{-}$

Wang *et al.* [26] confirmed this unusual behavior of NOCC as "the primary ammonium of NOCC would begin to dissociate preferentially, as the neutralization proceeded since the effect of electrical potential of this polycation is weaker than that of the secondary ammonium". The unusual two-stage dissociation behavior of amino groups on NOCC is highly dependent on charge types, local charge density and their distribution due to free amine and carboxyl content, and ionic strength of the media. For these reasons, the second branch of conductimetric curve could be divided into 3 parts. In the first one, deprotonation of only one of the two N,N-disubstituted carboxymethyl groups occurred (the one with the lowest pKa). In the second one, the O-substituted group was deprotonated and in the third and last one, the second N,N-di-substitued carboxymethyl group was neutralized. According to the previous equations, $DDA_{(4)}$ and DS of NOCC were evaluated at 60 ± 2 % and 43 ± 1 %, respectively. According to conductimetric titration accuracy, DS could be attributed as 15 % for $[-N-(CH_2COOH])_1$, 15 % for $[-N-(CH_2COOH)]_2$ and 13 % for O-substitution. Resulting DDA and DS values of NOCC were sum up in table 2. Conductimetric titration was more accurate than potentiometric one and could inform about substitution localization according to pKa value of acid groups. Indeed, V_1 could be clearly identified and deprotonation of all carboxyl substituted groups could be observed. Moreover, N- versus O-substitution could be separately identified and quantified.

Technique	DDA (%)	DS (%)
^{1}H-NMR	-	84 ± 5 (RT) - 88 ± 5 (80°C)
Potentiometric titration	60 ± 2	-
Conductimetric titration		43 ± 1 (30 % N-disub.; 13 % O-sub.)

Table 2: DDA and DS values of NOCC according to different techniques

4. Conclusions

In this paper, several characterization techniques such as ^{1}H-NMR, infrared spectroscopy and potentiometric-conductimetric titration were conducted, for the first time, on the same sample of chitosan and its N-,O-carboxymethylated derivatives. Concerning DDA determination of chitosan, both determination by NMR or titration were accurate. Nevertheless, NMR seems to be the more precise technique since there is no influence of the sample moisture. About NOCC characterization, NMR cannot be used for DDA determination as intensity of acetyl peaks used as reference for calculation changed due to deacetylation reaction involved by alkaline conditions of carboxymethylation reaction. DDA investigations were made by titration techniques which gives satisfying results. Substitution degree of NOCC was investigated either by NMR or titration. NMR determination was quite difficult to obtain as spectra resolution and temperature of acquisition highly influenced calculations. Potentiometric titration wasn't accurate enough to precisely determine equivalent volume for DDA determination. Conductimetric titration, a very simple and inexpensive technique, gives the opportunity to obtain accurate determination of equivalent volume by well defined breaking slope on titration curves. Moreover, this accuracy given by conductimetric titration permits to separately observe the different acidic groups of NOCC. By this way, N- and O-substitution can be observed. As no one has already determined N- versus O-substitution of NOCC by conductimetric titration, this study show that conductimetric titration is a well-defined technique for substitution degree of carboxymethylated chitosan. Our work shows that adverse characterization on unique chitosan batch could reasonably obtained with values according to the literature and highly accurate results.

Acknowledgments

This work is financially supported by a grant given by the Région Alsace (France). We are grateful to Philippe Lorchat and Michel Rawiso for their knowledge and collaboration in this work. Special thanks to Christian Blanck for his work and precious help.

References

1. Harish Prashanth, K.V. and Tharanathan, R.N., *Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential--an overview.* Trends in Food Science & Technology, 2007. **18**(3): p. 117-131.
2. Thanou, M. and Junginger, H.E., *Pharmaceutical applications of chitosan and derivatives,*, in *Polysaccharides. Structural diversity and functional versatility, 2nd ed.*, D. S, Editor. 2005, Marcel Dekker Publ.: New York. p. 661-677.
3. Tanford, C. and Epstein, J., *The Physical Chemistry of Insulin. I. Hydrogen Ion Titration Curve of Zinc-free Insulin.* Journal of the American Chemical Society, 1954. **76**(8): p. 2163-2169.
4. Anthonsen, M.W. and Smidsrod, O., *Hydrogen-Ion Titration of Chitosans with Varying Degrees of N-Acetylation by Monitoring Induced H-1-Nmr Chemical-Shifts.* Carbohydrate Polymers, 1995. **26**(4): p. 303-305.
5. Denuziere, A., Ferrier, D., and Domard, A., *Chitosan-chondroitin sulfate and chitosan-hyaluronate polyelectrolyte complexes. Physico-chemical aspects.* Carbohydrate Polymers, 1996. **29**(4): p. 317-323.
6. Kurita, K., *Controlled functionalization of the polysaccharide chitin.* Progress in Polymer Science, 2001. **26**(9): p. 1921-1971.
7. Anitha, A.*, et al.*, *Synthesis, characterization, cytotoxicity and antibacterial studies of chitosan, O-carboxymethyl and N,O-carboxymethyl chitosan nanoparticles.* Carbohydrate Polymers, 2009. **78**(4): p. 672-677.
8. Muzzarelli, R.A.A., *Carboxymethylated Chitins and Chitosans.* Carbohydrate Polymers, 1988. **8**(1): p. 1-21.
9. Jintapattanakit, A.*, et al.*, *Peroral delivery of insulin using chitosan derivatives: A comparative study of polyelectrolyte nanocomplexes and nanoparticles.* International Journal of Pharmaceutics, 2007. **342**(1-2): p. 240-249.
10. Sorlier, P.*, et al.*, *Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan.* Biomacromolecules, 2001. **2**(3): p. 765-772.
11. Huang, M., Khor, E., and Lim, L.Y., *Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: Effects of molecular weight and degree of deacetylation.* Pharmaceutical Research, 2004. **21**(2): p. 344-353.
12. Chen, S.-C. and Wu, Y.-C., *A novel pH-sensitive hydrogel composed of N,O-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery.* Journal of controlled release, 2004 **96**: p. 285-300.
13. Jiang, X.A., Chen, L.R., and Zhong, W., *A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosan.* Carbohydrate Polymers, 2003. **54**(4): p. 457-463.
14. Fernandez-Megia, E.*, et al.*, *Optimal routine conditions for the determination of the degree of acetylation of chitosan by 1H-NMR.* Carbohydrate Polymers, 2005. **61**(2): p. 155-161.
15. Lavertu*, et al.*, *A validated 1H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan*. Vol. 32. 2003, Amsterdam, Pays-Bas: Elsevier. 10.
16. Balázs, N. and Sipos, P., *Limitations of pH-potentiometric titration for the determination of the degree of deacetylation of chitosan.* Carbohydrate Research, 2007. **342**(1): p. 124-130.
17. dos Santos, Z.M.*, et al.*, *Determination of deacetylation degree of chitosan: a comparison between conductometric titration and CHN elemental analysis.* Carbohydrate Research, 2009. **344**(18): p. 2591-2595.

18. de Abreu, F.R. and Campana-Filho, S.P., *Characteristics and properties of carboxymethylchitosan.* Carbohydrate Polymers, 2009. **75**(2): p. 214-221.
19. Le Dung, P.*, et al.*, *Water-Soluble Derivatives Obtained by Controlled Chemical Modifications of Chitosan.* Carbohydrate Polymers, 1994. **24**(3): p. 209-214.
20. Chen, X.-G. and Park, H.-J., *Chemical characteristics of O-carboxymethyl chitosans related to the preparation conditions.* Carbohydrate Polymers, 2003. **53**(4): p. 355-359.
21. Rinaudo, M., Le Dung, P., and Milas, M., *A new and simple method of synthesis of carboxymethyl chitosans*, in *Advances in chitin and chitosan*, P.A.S.J.P.Z. C.J. Brine, Editor. 1992, Elsevier. p. 516-525.
22. Muzzarelli, R.A.A.*, et al.*, *N-(carboxymethylidene)chitosans and N-(carboxymethyl)chitosans: Novel chelating polyampholytes obtained from chitosan glyoxylate.* Carbohydrate Research, 1982. **107**(2): p. 199-214.
23. Tokura, S.*, et al.*, *Studies on Chitin VIII. Some Properties of Water Soluble Chitin Derivatives.* Polymer Journal, 1983. **15**(6): p. 485-489.
24. Zhuang, X.P. and Liu, X.F., *Blend films of O-carboxymethyl chitosan and cellulose in N-methylmorpholine-N-oxide monohydrate*. 2006. p. 4601-4605.
25. Miao, J.*, et al.*, *Preparation and characterization of N,O-carboxymethyl chitosan (NOCC)/polysulfone (PS) composite nanofiltration membranes.* Journal of Membrane Science, 2006. **280**(1-2): p. 478-484.
26. Wang, L.C.*, et al.*, *Dissociation behaviors of carboxyl and amine groups on carboxymethyl-chitosan in aqueous system.* Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics, 2008. **46**(14): p. 1419-1429.
27. An, N.T.*, et al.*, *Water-soluble N-carboxymethylchitosan derivatives: Preparation, characteristics and its application.* Carbohydrate Polymers, 2009. **75**(3): p. 489-497.
28. Muzzarelli, R.A.A., Ilari, P., and Petrarulo, M., *Solubility and structure of N-carboxymethylchitosan.* International Journal of Biological Macromolecules, 1994. **16**(4): p. 177-180.

II. « Modifications ioniques » : salification du chitosane

Le chitosane n'est soluble qu'en milieu acide dilué (acide acétique, citrique, glutamique …) alors que les sels de chitosane présentent l'avantage d'être solubles dans l'eau, ce qui représente un avantage indéniable dans l'encapsulation de principes actifs sensibles au pH comme les protéines. De plus, leur solubilité dans une plus large gamme de pH permet d'accéder à une plus large gamme d'applications. La salification du chitosane conduit à une modification de la solubilité du chitosane (figure 49). De plus, en fonction de la nature du contre-ion utilisé, celle-ci est modulable et conduit à des sels présentant des propriétés physico-chimiques diverses.

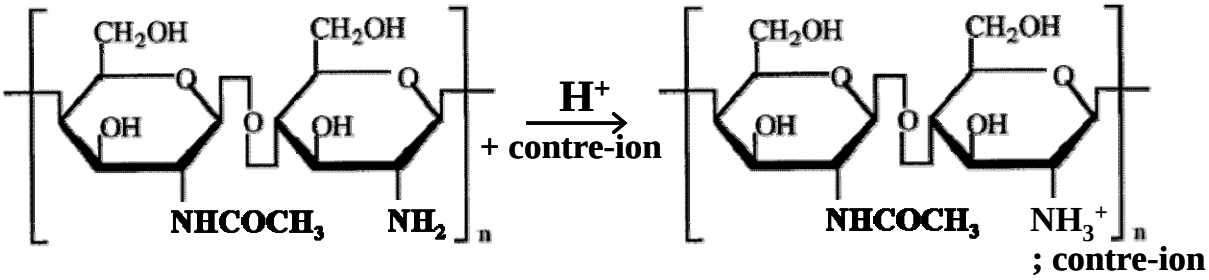


Figure 49 : Protonation du chitosane lors de l'ajout d'un acide

Différents types de sels de chitosane ont été étudiés dans la littérature. Parmi eux, on trouve notamment ; les sels d'acides glutamique et aspartique [207, 208], citrique, lactique et chlorhydrique [207] ainsi que les chitosanes lactate [224] et acétate [206]. Les travaux de Orienti *et al*. [207] ont montré l'aptitude des sels de chitosane à relarguer du diclofénac de sodium dans l'intestin. De plus, ils ont observé que les sels d'aspartate et de glutamate étaient ceux qui présentaient la plus grande capacité à ralentir la libération à pH gastrique (acide) et à l'accentuer à pH intestinal (basique). Enfin, la solubilité en milieu basique permet de faciliter l'action de la bêta-glucosidase ce qui conduit à une accélération de la dégradation du complexe avec le chitosane et à la libération du principe actif.

D'autre part, Li *et al.* [206] ont observé que la méthode traditionnelle de modification de la solubilité du chitosane par le biais de modifications chimiques (introduction de liaisons covalentes) pouvait conduire à une perte de certaines de ses propriétés. La salification, par l'utilisation de liaisons électrovalentes, permet d'améliorer la solubilité par protonation des groupements amines. Ils ont également observé que la solubilité du chitosane acétate était identique à celle d'un chitosane solubilisé dans l'acide acétique et que sa structure et ses

propriétés étaient conservées. De plus, la salification permet d'obtenir une forme solide augmentant sa stabilité et permettant une conservation plus longue, associée à une préparation aisée en solution aqueuse.

Etant donné la complexité de la salification du chitosane au niveau du contrôle de la quantité précise d'acide ajouté, nous avons volontairement choisi de travailler à partir de sels de chitosane commerciaux (NovaMatrix, FMC BioPolymer AS, Norway). Le chitosane étant disponible dans une large gamme de masse molaire et de degré de désacétylation, nous avons choisi de travailler avec les produits présentés dans le tableau 7. Les différents chitosanes utilisés présentent un degré de désacétylation constant (~ 85 %). Les variations se situent au niveau du contre-ion utilisé (chlorure vs. glutamate) et de la viscosité, variant de 10 à plus de 150 mPa.s, proportionnelle à la masse molaire. Celle-ci est calculée à partir de la viscosité intrinsèque à l'aide de la relation de Mark-Houwink-Sakurada : $[\eta]=K.M^a$ où K et a sont des constantes. Ces coefficients K et a varient en fonction de nombreux paramètres comme le couple polymère / solvant dans lequel la viscosité est mesurée, ainsi que la température de mesure. Des tables existent, indiquant les valeurs de ces coefficients en fonction de ces paramètres. Néanmoins, concernant le cas du chitosane, ces coefficients dépendent également de grandeurs caractéristiques du chitosane comme le DDA, la répartition des motifs … La relation entre viscosité et masse molaire sera ainsi différente pour chaque chitosane, comme on peut l'observer pour les chitosanes chlorhydrate et glutamate (figure 50).

Type de sels de chitosane	Nom commercial	Données techniques		
		Masse molaire (kDa)	Viscosité (mPa.s)	DDA (%)
Chlorhydrate	CL 113	80	9	83
Chlorhydrate	CL 213	370	150	86
Glutamate	G 113	160	16	86
Glutamate	G 213	412	75	85

Tableau 7 : Principales données caractéristiques des sels de chitosane utilisés

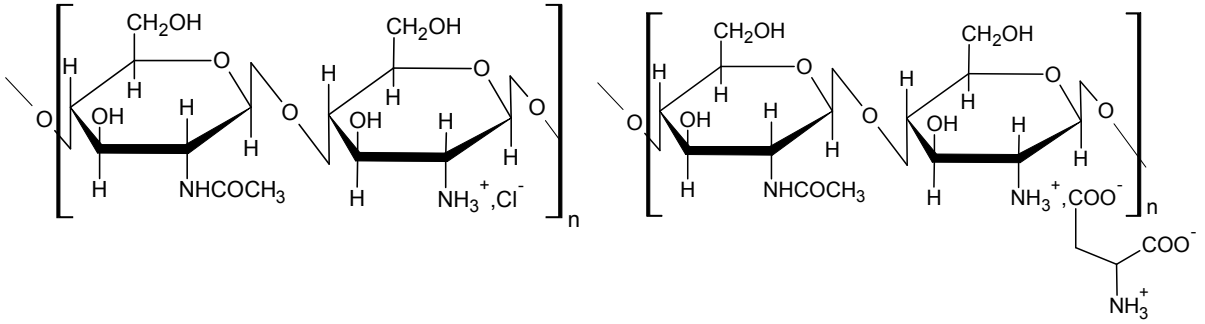


Figure 50 : Structure des chitosanes chlorhydrate et glutamate

Ces chitosanes commerciaux ont été caractérisés par ^{1}H-RMN et dosage pHmétrique à leur réception. Pour des raisons de clarté, nous avons choisi de conserver leurs noms commerciaux (annexe A).

II.1. Caractérisation des sels de chitosane

II.1.1. RMN du proton

Les spectres RMN des sels de chitosane sont réalisés, comme dans le cas du chitosane natif, à une température de 70°C afin de déplacer le pic du solvant (HOD) et de permettre une meilleure visualisation des pics souhaités. Les valeurs de DDA ont été déterminées par intégration des pics des protons $H_{(2)}$-$H_{(6)}$ de l'unité saccharidique et des 3 protons du groupe acétyl (H_{Ac}) puis calculées à l'aide de l'équation suivante :

$$DDA = \left(1 - \frac{\frac{1}{3} I_{H_{Ac}}}{\frac{1}{6} I_{H_2 - H_6}}\right) \times 100$$

avec : H_2-H_6 : l'aire obtenue par intégration des pics des protons $H_{(2)}$-$H_{(6)}$ de l'unité saccharidique, en cm^{-2}

H_{Ac} : l'aire obtenue par intégration des 3 protons du groupement acétyl, en cm^{-2}

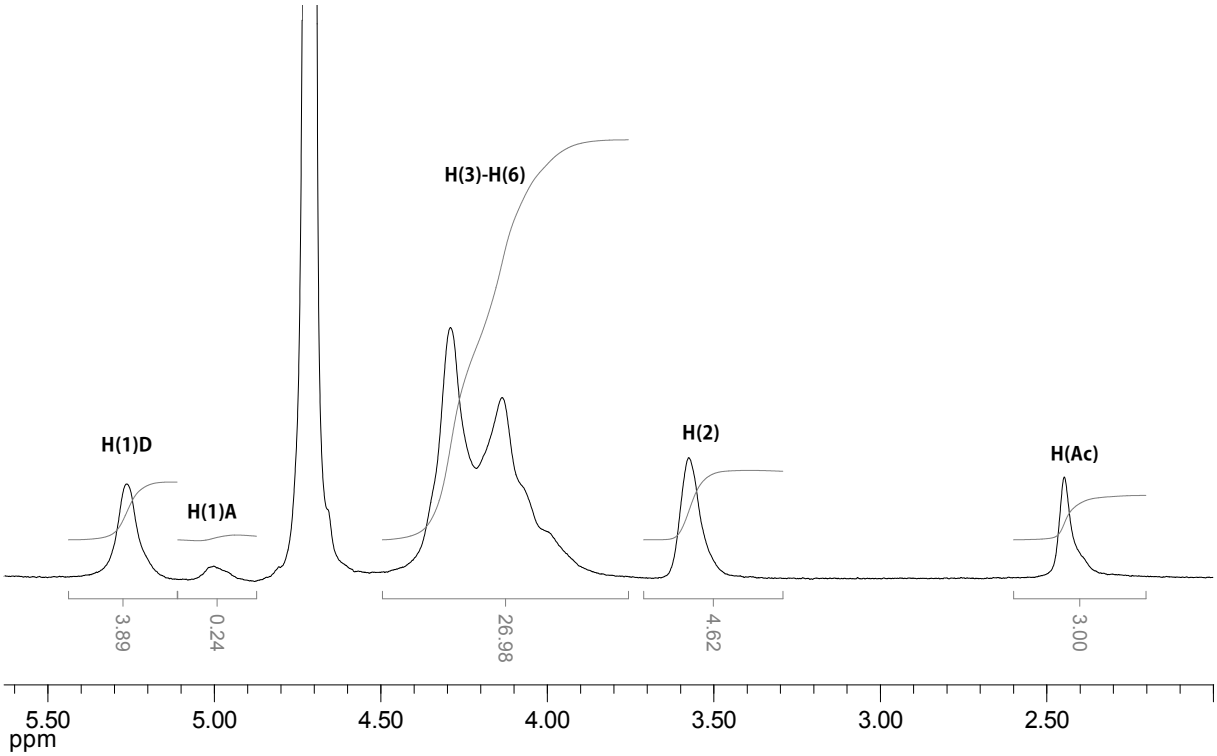


Figure 51 : Spectre RMN du CL 113, dans D_2O à 70°C

Les intégrations sont réalisées sur les différents spectres (figure 51 et annexe B) et les DDA obtenus sont regroupés dans le tableau 8. Les résultats obtenus par cette technique, montrent une excellente corrélation avec les résultats fournis par le fabricant.

Nom commercial	Données du fournisseur	Caractérisations
	DDA (%)	DDA (%-RMN)
CL 113	83	83 ± 5
CL 213	86	87 ± 5
G 113	86	82 ± 5
G 213	85	84 ± 5

Tableau 8 : DDA obtenus après intégration des spectres RMN

II.1.2. Dosage pHmétrique

Les sels de chlorhydrate et de glutamate ont été dosés dans des conditions similaires à celles du dosage du NOCC. Ces dosages par pHmétrie sont présentés en figures 52 et 53. Les courbes des sels de chlorhydrate CL 113 et CL 213 sont relativement similaires et l'on peut aisément repérer deux zones distinctes sur les courbes. La première partie correspond au dosage de l'excès d'acide chlorhydrique. La seconde correspond au dosage des fonctions amines qui se déprotonent au fur et à mesure de l'ajout du titrant NaOH.

Le premier point équivalent du chitosane chlorhydrate est obtenu pour un volume de NaOH ajouté supérieur à celui d'un chitosane sans contre-ion. Cela signifie qu'un volume plus important de titrant est nécessaire pour atteindre la même valeur de pH, indiquant alors une quantité d'acide libre en solution plus importante. En effet, le chitosane étant déjà sous forme protonée, la quantité d'acide initialement ajoutée n'est pas utilisée pour protoner les amines du chitosane et reste donc en solution. Ainsi, la quantité d'acide en excès au début du dosage est plus importante que pour un chitosane sans contre-ion ayant besoin de protoner ses amines à l'aide de cette quantité initiale. A cause de cette différence, la valeur du premier volume équivalent est supérieure. La suite du dosage reste d'allure inchangée ; seul le décalage des volumes est conservé.

Cette courbe de titration permet d'avoir accès au DDA, au pKa ainsi qu'à la quantité d'amines initialement protonées, portées par le sel de chlorhydrate commercial. D'après les

volumes équivalents obtenus, il est possible d'estimer la quantité d'acide chlorhydrique présent dans les sels de chitosane à 28 ± 1 % pour CL 113 et 27 ± 1 % pour CL 213.

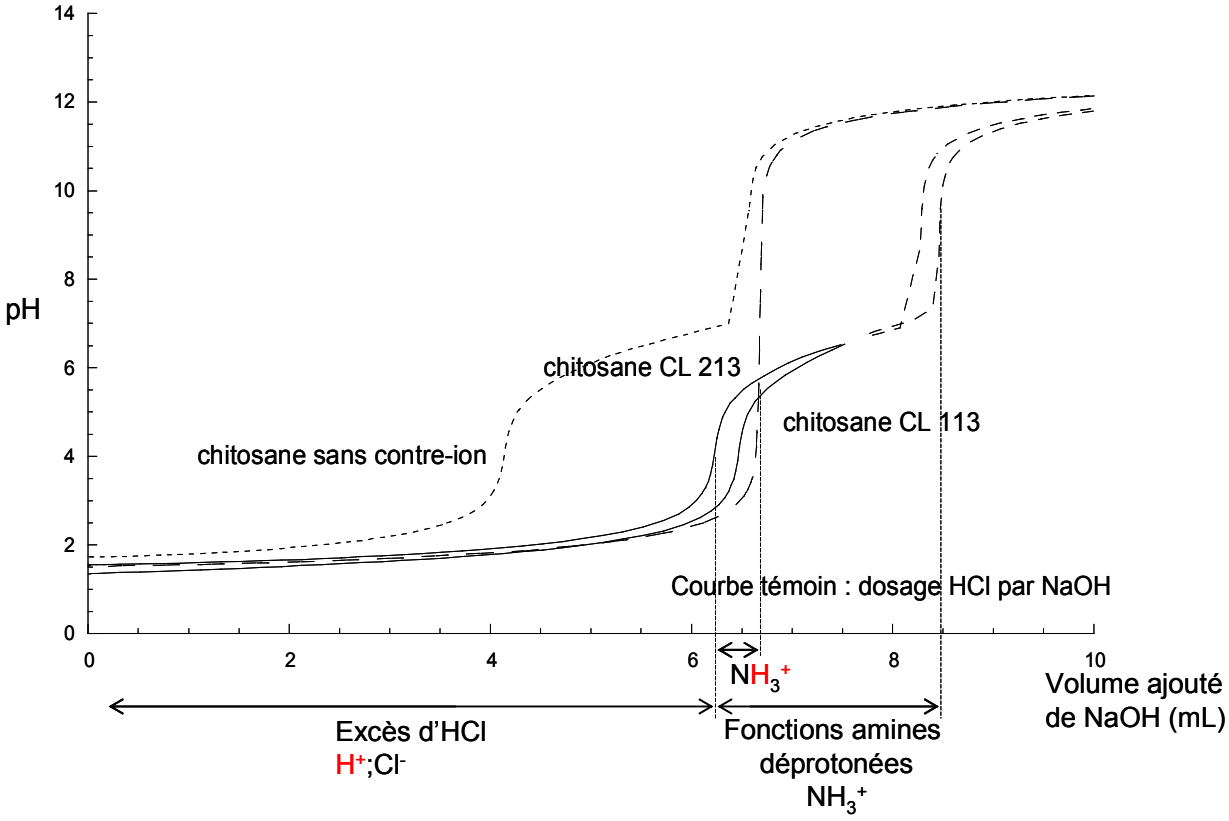


Figure 52 : Dosage pHmétrique des sels de chitosane chlorhydrate CL 113 et CL 213

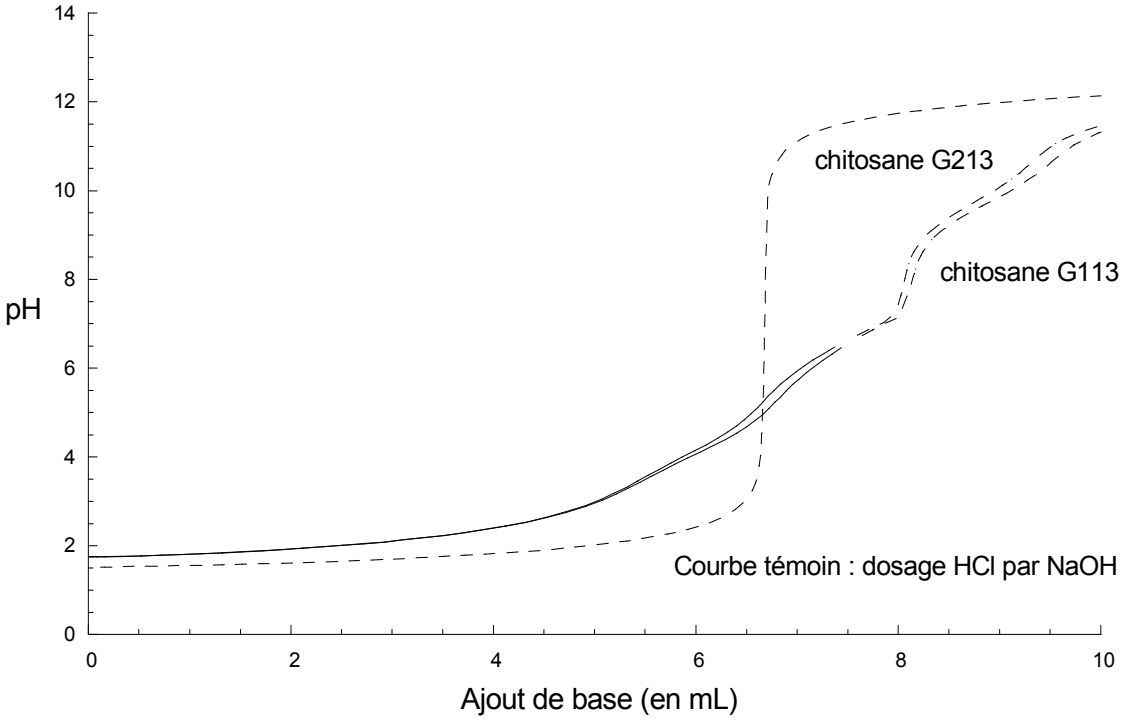


Figure 53 : Dosage pHmétrique des sels de chitosane glutamate G 113 et 213

En ce qui concerne le dosage des sels d'acide glutamique (figure 53), aucune exploitation n'est réalisable sur la courbe en l'état. En effet, l'acide glutamique est un acide aminé qui présente plusieurs pKa (figure 54). Parmi eux, deux fonctions acides dosables par NaOH ont des pKa différents. Cela conduit à deux points équivalents. Etant donné la présence d'acides faibles parmi ces fonctions, aucun changement brutal de pH ne pourra être observé et le point équivalent ne pourra donc pas être déterminé graphiquement.

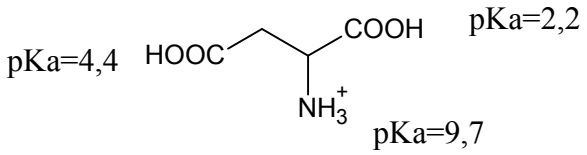


Figure 54 : Formule et pKa de l'acide glutamique

Les différentes variations de pH peuvent être attribuées en observant les variations de la première dérivée (figure 55). En effet, ces variations peuvent ainsi être attribuées aux différentes espèces présentes : à savoir les acides carboxyliques de l'acide glutamique, les amines protonées du chitosane ainsi que les amines protonées de l'acide glutamique.

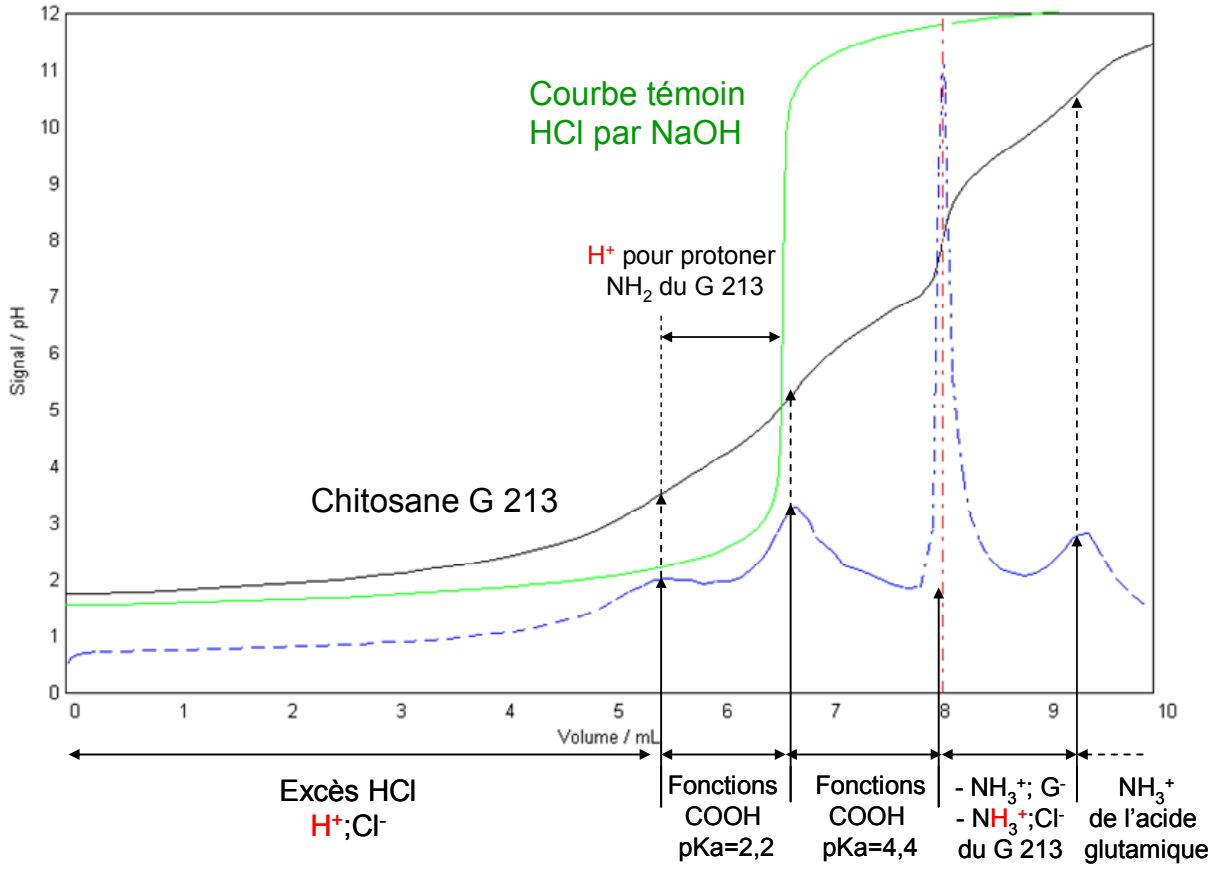


Figure 55 : Attribution des volumes équivalents aux espèces dosées pour le sel de chitosane glutamate G 213 (exploitation similaire réalisée pour le G 113)

D'après les volumes équivalents obtenus, il est possible d'estimer la quantité d'acide glutamique présent dans les sels de chitosane à 22 ± 1 % pour le G 113 et 20 ± 1 % pour le G 213. Le tableau 9 regroupe les différentes valeurs de DDA et de pKa obtenues par les diverses techniques de caractérisations précédemment présentées. Aux vues des données techniques du fournisseur, nous pouvons considérer notre technique comme adaptée.

Nom commercial	Données du fournisseur	Caractérisation			
	DDA (%)	DDA (%-RMN)	DDA (%-pHmétrie)	pKa (pHmétrie)	Taux de salification (%-pHmétrie)
CL 113	83	83 ± 5	65 ± 2	6,4 ± 0,1	28 ± 1
CL 213	86	87 ± 5	66 ± 2	6,3 ± 0,1	27 ± 1
G 113	86	82 ± 5	82 ± 2	6,6 ± 0,1	22 ± 1
G 213	85	84 ± 5	76 ± 2	6,5 ± 0,1	20 ± 1

Tableau 9 : Caractéristiques des sels de chitosane obtenues par RMN du proton et dosages pHmétriques

Dans la littérature, les sels de chitosane sont couramment utilisés dans le domaine de la vectorisation de principes actifs, mais aucune technique permettant leur caractérisation n'est présentée.

Au cours de ce travail, nous avons utilisé la RMN, technique simple et fiable, conduisant à une excellente caractérisation du DDA. Cette technique ne nous permet cependant pas d'accéder à certaines informations telles que le pKa ou le taux de salification de ces dérivés du chitosane. En revanche, nous avons pu à l'aide de la pHmétrie, via un dosage acide-base, permettre cette caractérisation complémentaire. Elle ne peut néanmoins pas être utilisée en remplacement de la RMN à cause d'une mauvaise corrélation entre les DDA, due aux interférences des acides chlorhydrique et glutamique. Nous avons donc pu déterminer la complémentarité de ces deux techniques, qui représentent une méthode simple et fiable de caractérisation des sels de chitosane. Ainsi, nous avons pu mettre en place des techniques simples, fiables et peu coûteuses permettant la caractérisation des sels de chitosane avec des résultats conformes à ceux présentés dans la littérature.

Conclusions du chapitre I

Dans le but de former des nanoparticules de chitosane par complexation avec l'insuline, il a été nécessaire de modifier la solubilité du chitosane afin que celui-ci puisse être soluble dans la zone de pH où l'insuline et le chitosane présentent des charges de nature opposée. Pour cela, deux approches ont été utilisées : la modification chimique via une réaction de carboxyméthylation et la salification du chitosane.

Afin d'être en mesure de former des nanoparticules avec l'insuline, il est nécessaire de connaître précisément les caractéristiques de ces dérivés hydrosolubles. Bien que la caractérisation du chitosane soit relativement complexe, et qu'aucune étude d'un même lot de chitosane n'ait été décrite dans la littérature, nous avons pu parvenir à caractériser précisément le chitosane et ses dérivés.

Les différents types de chitosanes utilisés dans le cadre de la formation de nanoparticules par coacervation complexe ont été ainsi caractérisés de façon à connaître leurs propriétés notamment en termes de DDA et de pKa. En effet, ces deux paramètres influencent fortement la complexation de l'insuline, la formation de nanoparticules et éventuellement leur structure. Le DDA correspond à la proportion de groupements ionisables et le pKa nous informe sur la quantité de groupements ionisés en fonction du pH. Ainsi, à l'aide de ces données, il est possible de déterminer dans quelle zone de pH, le chitosane est suffisamment chargé pour être capable de complexer l'insuline (figure 56).

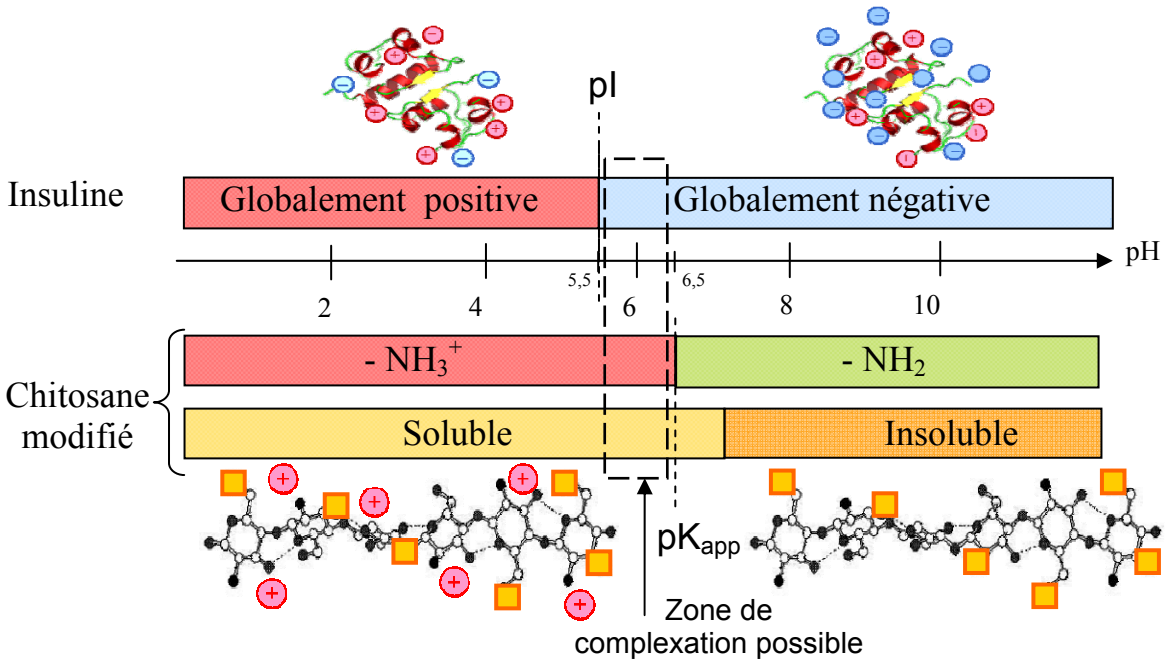


Figure 56 : Possibilités de complexation entre le chitosane hydrosoluble et l'insuline en fonction du pH

Grâce aux diverses modifications du chitosane et caractérisations réalisées, nous possédons maintenant un chitosane parfaitement caractérisé, soluble dans la zone de complexation, nous permettant maintenant d'envisager la complexation avec l'insuline. Les caractéristiques des différents chitosanes utilisés sont regroupées dans le tableau 10.

Type de chitosane	Nom	Caractérisations			
		Masse molaire (kDa)	DDA (%)	pKa	DS ou taux de salification (%)
Modification chimique	NOCC	< 150	60 ± 2	-	43 ± 1
Sels de chitosane	CL 113	80	83 ± 5	6,4 ± 0,1	28 ± 1
	CL 213	370	87 ± 5	6,3 ± 0,1	27 ± 1
	G 113	160	82 ± 5	6,6 ± 0,1	22 ± 1
	G 213	412	84 ± 5	6,5 ± 0,1	20 ± 1

Tableau 10 : Caractéristiques des chitosanes hydrosolubles utilisés pour complexer l'insuline

La complexation entre ces différents chitosanes et l'insuline est étudiée et décrite dans le chapitre suivant.

Chapitre II

Formation de nanoparticules par complexation de l'insuline

II.1. Conditions de formation des complexes

Deux dérivés hydrosolubles du chitosane précédemment obtenus : le N-,O-carboxyméthyl chitosane (NOCC) et le chitosane chlorhydrate, sont désormais précisément caractérisés permettant ainsi de définir leurs propriétés complexantes vis-à-vis de l'insuline.

Il a été montré que dans le cas du chitosane, son DDA et sa masse molaire étaient des facteurs influençant fortement sa capacité à augmenter la perméabilité intestinale par ouverture des jonctions serrées. En effet, une faible masse molaire associée à un DDA inférieur à 65 % ne permet pas cette augmentation de perméabilité. En revanche, un DDA élevé conduit à une cytotoxicité importante ; il est donc indispensable de trouver le bon équilibre entre perméabilité et toxicité. Shipper *et al.* ont ainsi montré qu'un bon compromis était atteint pour un chitosane (en solution) de masse molaire d'environ 170 kDa et d'un DDA de 65 % [225]. Kiang *et al.* ont étudié l'influence du DDA du chitosane sur la formation de nanoparticules et ont pu montré que l'utilisation d'un chitosane de DDA plus faible (à masse molaire constante) nécessitait un ajout de chitosane en quantité plus importante pour atteindre un rendement d'encapsulation identique [226]. Du point de vue des masses molaires, Chae *et al.* ont montré que l'utilisation d'une masse molaire élevée (~ 250 kDa) conduisait à une diminution de l'absorption *in vitro* du chitosane [224].

De plus, la formation de complexes est également influencée par d'autres paramètres tels que la température, le pH [227], la densité de charges ou encore la vitesse d'ajout des deux polyélectrolytes. Afin d'obtenir des conditions de formation de nanoparticules insuline/chitosane optimales, il est nécessaire de réaliser une étude de ces différents paramètres. Pour y parvenir, une étape d'optimisation est mise en place afin de réduire les zones dans lesquelles la formation des complexes est possible (figure 57). L'optimisation des conditions de complexation passe par différentes étapes présentées ci-dessous :

- l'étude de l'influence de la variation du pH de la solution de chitosane. Lorsque le pH de la solution de chitosane diminue, la quantité d'amines protonées portées par le chitosane augmente. La quantité de charges positives devient plus importante, permettant ainsi d'accroître le nombre d'interactions électrostatiques potentielles entre le chitosane et l'insuline. Le pH sera fixé pour la valeur permettant la plus importante complexation entre le chitosane et l'insuline.

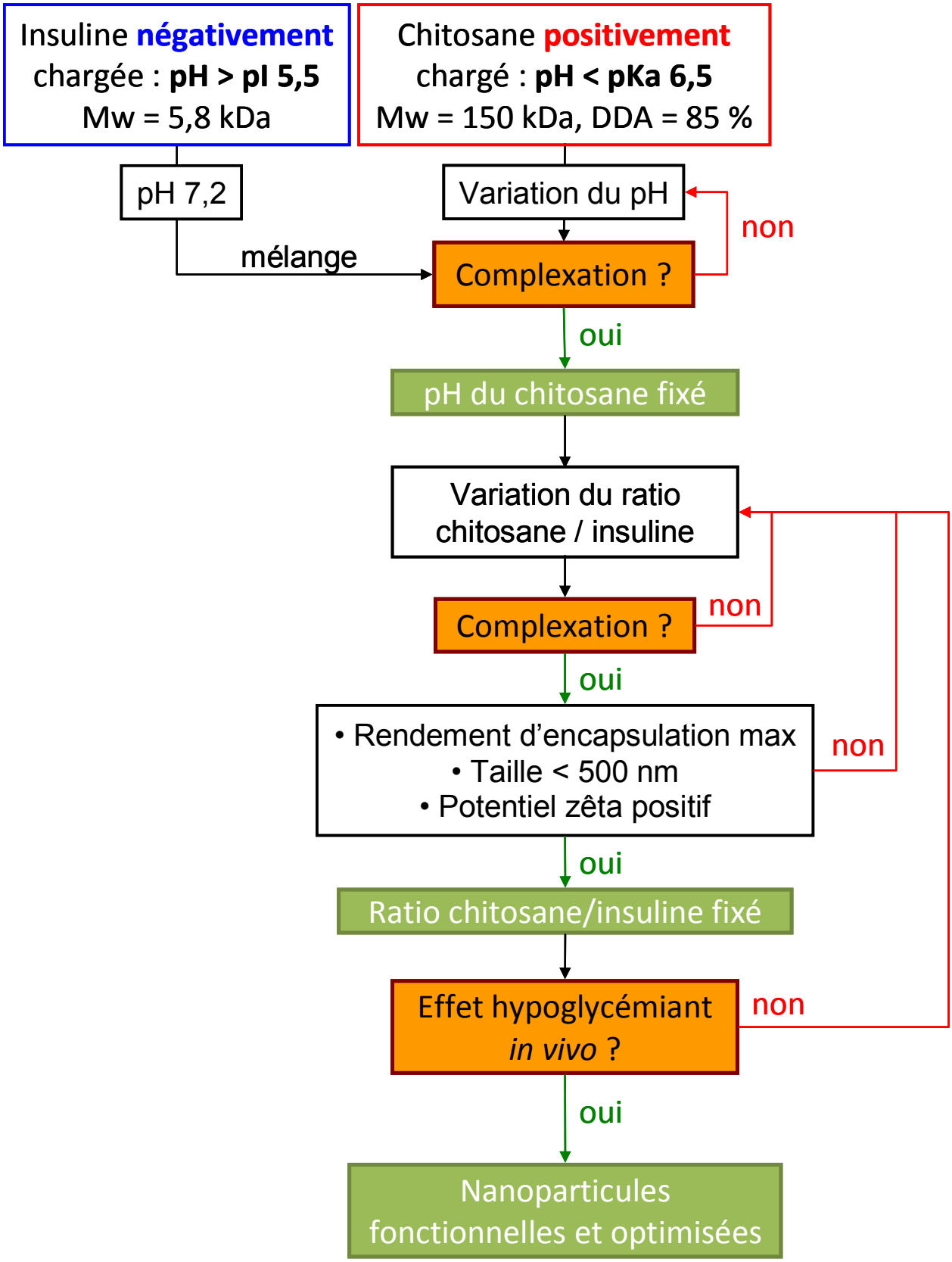


Figure 57 : Diagramme d'optimisation des nanoparticules

- l'étude de la complexation en fonction des différentes quantités de chitosane et d'insuline ajoutées (variation de la fraction volumique). Les quantités dans lesquelles les composés sont ajoutés représentent également un facteur influençant la formation des complexes. En effet, la formation de complexes stables, uniformes et sphériques avec un rendement d'encapsulation maximal n'est possible que lorsque le ratio de charge est optimisé [228]. Cette étude sera suivie de la caractérisation des complexes ainsi obtenus. La variation de cette fraction volumique sera réalisée jusqu'à ce que les complexes formés répondent aux critères préalablement fixés par le cahier des charges (énoncé dans l'introduction). Lorsque les complexes présentent un rendement d'encapsulation de l'insuline maximal, une taille inférieure à 500 nm ainsi qu'une charge positive, ceux-ci seront étudiés *in vivo* afin de déterminer leur effet hypoglycémiant sur des rats diabétiques.

Pour débuter cette étude, notre choix s'est porté vers des chitosanes de masses molaires moyennes (150 kDa) et de DDA de 85 %. De cette façon, les longues chaînes de chitosane serviront de molécules hôtes afin de condenser les molécules d'insuline et le DDA de 85 % nous permettra d'obtenir une densité de charge importante tout en limitant les risques potentiels de toxicité. Les concentrations en polyélectrolytes sont choisies de manière à être en présence d'un excès du polyélectrolyte de masse la plus élevée : le chitosane. La suspension finale présentera donc un excès de charges positives, devant stabiliser électrostatiquement les complexes formés.

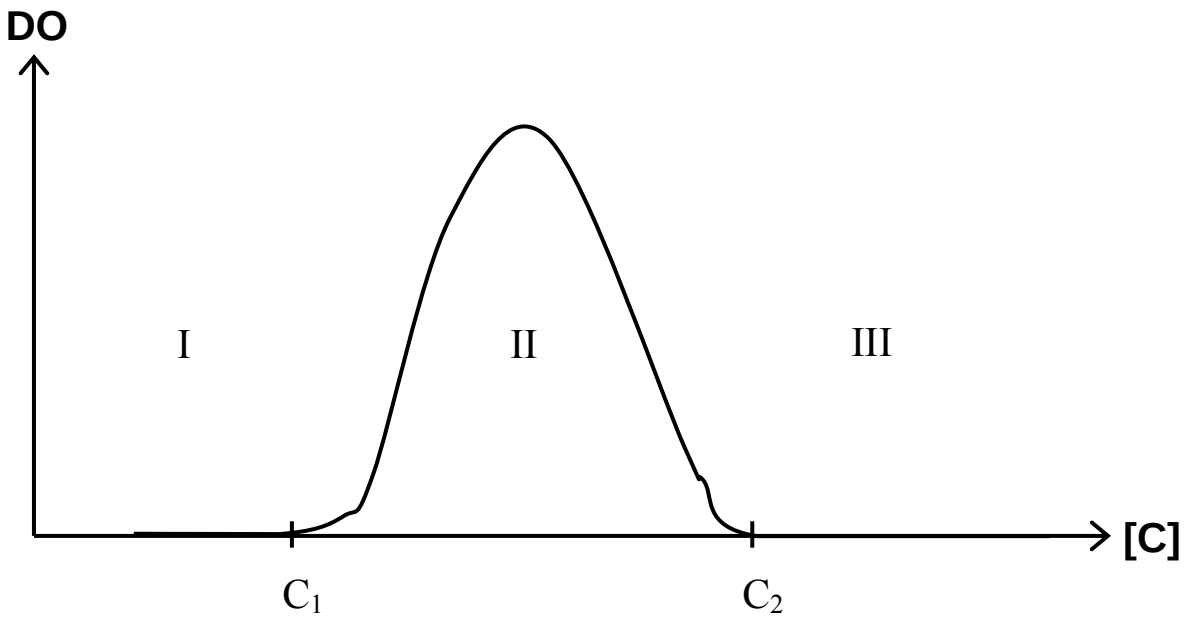


Figure 58 : Dosage turbidimétrique de complexes de polyélectrolytes

Afin de quantifier la complexation, des mesures de turbidité ont été réalisées. En effet, Kabanov *et al.* [152] ont montré que le tracé d'une courbe de dosage turbidimétrique permettait de déterminer les zones de complexation entre les polyélectrolytes. La mesure de la densité optique en fonction de la concentration en sel, conduit ainsi à l'obtention d'une courbe présentant 3 domaines distincts I, II et III (figure 58).

Cette étude de l'influence de la présence de sel peut être transposée à celle de l'étude de la variation des concentrations des deux polyélectrolytes. Dans le domaine I, aucun changement d'état du système n'est observé, celui-ci reste homogène (sous forme liquide). A partir d'une certaine concentration en polyélectrolyte C_1, le système devient turbide et hétérogène suite à l'apparition d'une phase solide (complexes de polyélectrolytes) au sein de la phase liquide. Enfin, pour une valeur de concentration supérieure C_2, le système redevient homogène et conserve cet état pour toute concentration supérieure. Ce type de transition, dans le cas de solutions diluées, est fréquemment observé dans le cas de complexes non stœchiométriques de polyélectrolytes (en termes de charges).

Ce chapitre présente l'étude de la complexation entre un dérivé hydrosoluble du chitosane et l'insuline. Il se divise en deux sous parties : la première consistant en l'étude de la complexation de l'insuline avec le chitosane N-,O-carboxyméthylé (NOCC) et la seconde traitant de la complexation à l'aide de sels de chitosanes.

II.2. Formation de nanoparticules NOCC/insuline

II.2.1. Article

Soumis à *Journal of Polymer Science, Part A : Polymer Chemistry*

Synthesis and characterization of nanoparticles formed by complex coacervation between modified-chitosan and insulin

A. Callet [a,*], S. Sigrist [b,c], Y. Frère [a]

[a] Institut Charles Sadron, CNRS-UPR 22, 23 rue du Loess, F-67034 Strasbourg Cedex, France
[b] Centre Européen d'Etude du Diabète, Boulevard René Leriche, F-67200 Strasbourg, France
[c] Université de Strasbourg (UdS), 4 rue Blaise Pascal, F-67081 Strasbourg cedex, France

* **Corresponding author**

- Résumé

Le chitosane est un biopolymère cationique fréquemment utilisé dans le domaine pharmaceutique. Néanmoins, sa capacité à former des complexes de polyélectrolytes (PEC) est limitée par sa faible solubilité à pH physiologique. Afin de l'améliorer, des modifications chimiques ont été réalisées dans le but d'obtenir un dérivé hydrosoluble du chitosane : le N-, O-carboxyméthyl chitosane (NOCC). Dans ce travail, la coacervation complexe entre le NOCC et l'insuline a été étudiée à l'aide de dosages turbidimétriques. Après caractérisation par diffusion de lumière et mesures du potentiel zêta, l'efficacité d'encapsulation de l'insuline a été déterminée par HPLC et mesures UV. Des nanoparticles stables ont été obtenues pour différentes fractions volumiques NOCC : insuline, avec des tailles moyennes de 350-550 nm, une charge de surface positive (+ 40 mV) et une efficacité d'encapsulation de 80-90 %.

Synthesis and characterization of nanoparticles formed by complex coacervation between modified-chitosan and insulin

A. Callet [a,*], S. Sigrist [b,c], Y. Frère [a]

[a] Institut Charles Sadron, CNRS-UPR 22, 23 rue du Loess, F-67034 Strasbourg Cedex, France
[b] Centre Européen d'Etude du Diabète, Boulevard René Leriche, F-67200 Strasbourg, France
[c] Université de Strasbourg (UdS), 4 rue Blaise Pascal, F-67081 Strasbourg cedex, France

* **Corresponding author**
Tel.: +33 3 88 41 40 00 ; Fax : +33 3 88 41 40 99
E-mail address: adeline.callet@ics-cnrs.unistra.fr

Abstract

Chitosan is a cationic biopolymer frequently used in pharmaceutical formulation. Nevertheless, its ability to form polyelectrolyte complexes (PEC) is limited by its low solubility at physiological pH. To improve it, chemical modifications were made to obtain a water-soluble chitosan derivative: N-,O-carboxymethylated chitosan (NOCC). In this work, complex coacervation between NOCC and insulin was investigated by turbidimetric titration. After nanoparticles characterization by dynamic light scattering and zeta potential measurements, encapsulation efficiency of insulin was determined by HPLC and UV measurements. Stable nanoparticles were obtained for different NOCC to insulin ratio, with 350-550 nm average diameter, positive charge (+ 40 mV) and encapsulation efficiency of 80-90 %.

Keywords: chitosan, insulin, complex coacervation

1. Introduction

In case of therapeutic applications, drugs are mainly administered by oral or parenteral route. Even though the oral route represents the most physiological and most comfortable way for the patient, it cannot be used for sensitive pharmaceuticals such as peptides and proteins. Their fragility towards the attacks met along the gastrointestinal tract (GIT), such as pH

variations and enzymes, will entail their degradation and loss of biological activity[1,2]. For these reasons, they are usually administered by injections. Several studies have shown that encapsulation is the best suitable strategy for oral administration of peptides and proteins[3,4]. Encapsulation leads to improvement of drugs bioavailability by protection from degradation and enhanced stability[5,6].

A wide variety of techniques are currently used for insulin encapsulation. Nevertheless most of them involve the use of organic solvent, surfactants or highly energetic process. All these techniques can potentially form toxic by-products for pharmaceutical use[7]. To by-pass these harmful processes, polyelectrolyte complex formation (PEC) has been widely studied[8,9]. This method has the great advantage to avoid utilization of aggressive conditions such as organic solvents, stabilizers or sonication. Due to the high versatility of the PEC method, different hydrophilic proteins or peptides could be designed in nanoparticles as drugs carriers[10].

Our work deals with the interest in insulin encapsulation to treat diabetes. Diabetes mellitus is a chronic disease that affects more than 280 millions people over the world. It is defined by a loss or defect of glycaemia control associated to an increase of the blood sugar level leading to glycaemia > 1.2 g/L (normoglycaemia value). Glycaemia is normally controlled by insulin which plays an important role to avoid hyperglycaemia. Among the various types of diabetes, the most known is the type 1 diabetes, formerly known as “insulino-dependent” diabetes. This lethal disease requires exogenous insulin injections as a treatment. These injections should be done by subcutaneous way, several times a day, to decrease the glycaemia but they entail discomfort for patients. Consequently, oral route represents a considerable advantage in insulin oral delivery because insulin would be directly delivered from the intestine to the liver, then avoiding hyperinsulinemic effects and severe microvascular complications due to glucotoxicity[11].
At present, no complex coacervation between NOCC and insulin by PEC was done. So, we decided to develop such a system.

Chitosan, a hydrophilic polysaccharide with biocompatible and biodegradable properties has been extensively used for drug delivery[12]. However, its limited solubility restricted its use to acidic pH (below 6.0), and pH values in the GIT are higher than 6.5, inducing chitosan insolubility. Quaternized chitosan derivatives have been evaluated to overcome this drawback but have shown cellular toxicity[13]. Chitosan is positively charged at pH < 6.5 due to

protonation of the amino groups. These highly reactive amino groups can be involved in chemical reactions leading to water soluble derivatives. One of them, N,O-carboxymethyl chitosan (NOCC), has already shown biocompatibility, biodegradability, no toxicity and mucoadhesive properties[14,15]. By addition of carboxylic groups, NOCC shows ampholytic properties which remain interesting to complex insulin.

Insulin can be either positively or negatively charged according to pH above or below its isoelectric point (apparent pI 5.5)[16]. Insulin is also a polyampholyte, giving more possible electrostatic interactions with NOCC to form nanoparticles. Physicochemical properties of particles such as surface charge and size have been described to play a crucial role in their interaction with epithelial barriers[17-19]. This interaction will be involved in the cellular uptake of the particles, influencing therefore the passage through the epithelial barrier and the release of the drug at the cellular level. Moreover, chitosan mucoadhesive properties should enhance nanoparticules adhesion to intestinal mucosa, facilitate intestinal crossing and insulin absorption.

The aim of this study was to introduce a new nanoparticulate system using biocompatible chitosan derivatives, with adequate size for intestinal delivery of insulin. First, attention was focused on NOCC synthesis and characterization. Then, NOCC/insulin nanoparticles formation by complex coacervation was investigated. Insulin-loaded nanoparticles were physically characterized in terms of size, zeta potential, encapsulation efficiency and loading capacity. Nanoparticles stability was also investigated during 6 days storage.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Chitosan PROTASAN UP B 80/20 with 200 kDa molecular weight and a deacetylation degree of approximately 85 % was supplied by NovaMatrix (FMC BioPolymer AS, Norway). Insulin was obtained either as regular human insulin of recombinant DNA origin (Umuline® 100 UI/ml) from Eli Lilly Company (Indianapolis, USA) or as a crystalline insulin supplied by Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Isopropanol and monochloroacetic acid were also supplied by Sigma-Aldrich. Other reagents were reagent grade.

2.2. Methods

2.2.1. NOCC synthesis and characterisation

NOCC was synthesized by a chemical modification on chitosan described in the literature[20]. 200 mg of chitosan were suspended in 10 ml of isopropanol. 2.5 ml of 10 N aqueous sodium hydroxide solution were slightly added in five portions at 5 min intervals. The slurry was stirred for an additional 30 min, then 6 g of monochloroacetic acid were added in five equal portions at 1 min intervals. The mixture was stirred and heated at 65°C during 3 hours. The resulting mixture was filtered and the solid product washed with methanol and dried at room temperature for 48 hours.

Chitosan and NOCC were characterized by ^{1}H-NMR on Avance 400 MHz (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany) and FTIR spectroscopy on Vertex 70 (Bruker Optics, Ettlingen, Germany) to identify substitutions of amino and primary hydroxyl groups by carboxymethyl groups. For NMR studies, native chitosan was dissolved in DCl 2% in D_2O and acquisition was done at 70°C. NOCC was dissolved in pure D_2O and its spectrum was acquired at room temperature. Potentiometric and conductimetric titration were used to determine the substitution degree of NOCC according to our previous work[21].

2.2.2. Preparation of nanoparticles

NOCC nanoparticles were obtained by complex coacervation of NOCC with insulin. NOCC was dissolved in deionised water at 1 mg/ml concentration (pH 5.2). Crystalline insulin was prepared by dissolution in 0.1 N HCl at 3.5 mg/ml, then the pH was adjusted to 7.2.

Different volumes of insulin were added drop-wise to different volumes of NOCC under magnetic stirring (300 rpm) at room temperature for 15 min (figure 1). Different NOCC to insulin volumic fraction were studied (40:60; 50:50 and 60:40). If opalescent suspension could be seen, it was assumed that complexation took place between positively charged NOCC and negatively charged insulin. Turbidity measurements were carried out to determine the complexation zone of NOCC with insulin to form nanoparticles. The turbidity of the NOCC/insulin mixture was determined from the absorbance at 500 nm in 1 cm optical cell against deionised water with a Cary-500 spectrophotometer (Varian, USA). In order to detect a possible precipitation of the components followed by sedimentation, two measurements were performed at 2 hours intervals.

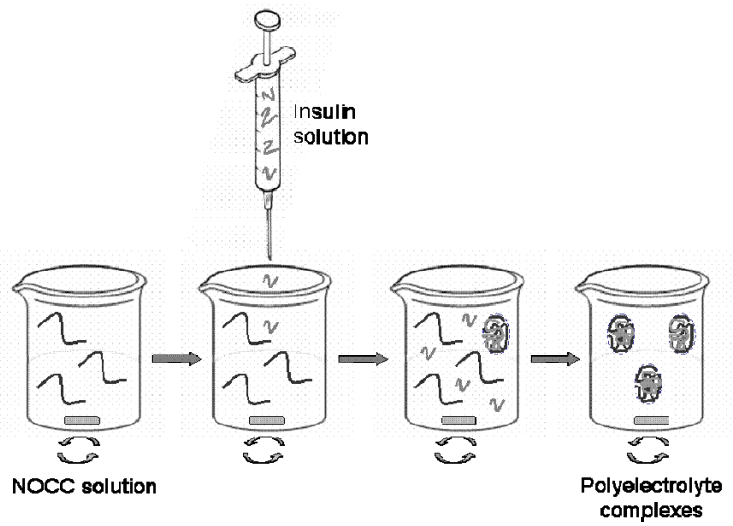


Figure 1: nanoparticles formation by complex coacervation between NOCC and insulin

2.2.3. Morphological and particle size analysis

Size distribution of nanoparticles was determined by dynamic light scattering on Malvern NanoZS (Malvern Instruments Ltd., UK) at 25°C, after dilution in deionised water. The diameter is calculated from the autocorrelation function of particles light scattered intensity, assuming a spherical form. Nanoparticles sizes were expressed as intensity mean diameter (nm) ± standard deviation (S.D.) values related to the mean of triplicate runs.

The polydispersity index (PdI) measuring the dispersion homogeneity was also determined. It ranges from 0 to 1 with values close to 0 indicating a homogeneous dispersion while values greater than 0.3 indicate a high heterogeneity.

The morphological examination of nanoparticles was made by transmission electron microscopy (TEM) (CM12, Philipps, Eindhoven, Netherlands). Samples were prepared on cupper/carbon grids, negatively stained for 1 minute with uranyl acetate (2 % in water) and dried at room temperature.

2.2.4. Zeta potential measurements

Zeta potential measurements were performed by laser Doppler electrophoresis using a Malvern NanoZS (Malvern Instruments Ltd., UK). Measurements were carried out in a folded capillary electrophoresis cell at 25°C using NaCl 10^{-3} mol/L solution as diluent. Data analysis is presented as mean and standard deviation of triplicates runs.

2.2.5. Encapsulation efficiency and quantitative determination of insulin

To determine the encapsulation efficiency and loading capacity of insulin inside nanoparticles, 1 ml of nanoparticles was centrifuged at 21 000 x g during 30 min to separate nanoparticles containing insulin from aqueous supernatant containing free insulin. Isolated nanoparticles were decomplexed with a 0.2 N NaOH solution (used as dissolution buffer) to release encapsulated insulin for quantification. To avoid interaction between aromatic substituents of insulin and its commercial preservatives such as *m*-cresol, measurements were made on nanoparticules complexed with crystalline insulin (without any preservative).
The amount of both encapsulated and free insulin was measured by HPLC and UV-spectrophotometry. HPLC system was equipped with an UV detector (Model Gold LC-168, Beckman Coulter, Fullerton, CA), a C18 column (EC50/2 Nucleodur C18 pyramid 3 µm, Macherey-Nagel, Düren, Germany) and pump (Model LC-126, Beckman Coulter, Fullerton, CA). The mobile phase consisted of acetonitrile and sodium sulphate 0.2 mol/L aqueous solution (27:73), H_3PO_4 was used to adjust the pH to 2.3. The flow was set at 0.3 mL/min and the chromatograms were recorded at 214 nm according to the literature[22]. UV-spectrophotometry was done at 280 nm. Insulin standard curves were used as reference for both HPLC and UV measurements. All samples were measured in triplicate both by HPLC and UV. The nanoparticles weight was determined on freeze-dryed nanoparticles. The encapsulation efficiency and loading capacity of insulin were calculated according to the following equations:

Encapsulation efficiency (%) = [(Total amount of insulin – insulin in supernatant) / Total amount of insulin] x 100

Loading capacity (%) = [(Total amount of insulin – insulin in supernatant) / Weight of nanoparticles] x 100

2.2.6. Stability of nanoparticles

The stability of nanoparticles was determined by monitoring their mean size, zeta potential and encapsulation efficiency over time. After production, nanoparticles were stored at 4°C and measurements were done after 3 and 6 days.

3. Results and discussion

3.1. NOCC synthesis and characterisations

FTIR spectra of chitosan and NOCC are shown in figure 2. In the NOCC spectrum, the peak for carboxylic acid salt (-COO^- anti-symmetric stretch) can be identified at 1600 cm^{-1}, hinting that there were carboxymethyl groups on NOCC[23,24]. In contrast, on chitosan spectrum, a peak was observed at 1650 cm^{-1} representing the amino group (NH_2 deformation).
The peak observed at 1029 cm^{-1} corresponds to the primary hydroxyl group (characteristic peak of -CH_2-OH in primary alcohols, C-O stretch). The peak intensity in NOCC decreased compared to chitosan, as a consequence of its carboxymethylation. It shows that the carboxymethyl group was substituted for -CH_2-OH at C_6 position of NOCC, confirming the O-carboxymethylation.

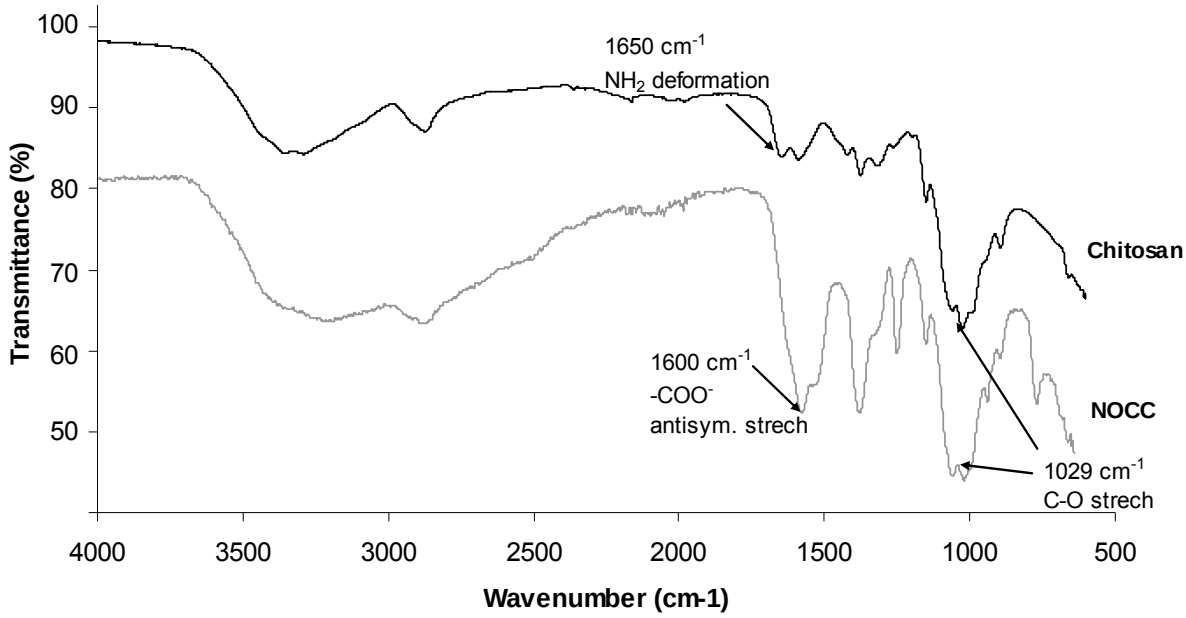


Figure 2: FTIR spectra of chitosan and NOCC

^{1}H-NMR spectra of chitosan and NOCC are shown in figure 3a and 3b, respectively. As chitosan and NOCC acquisitions were done at different temperature, 70 and 25°C respectively, peaks were located at different displacements. This is due to temperature rising, which is known to bring some energy to minimize inter-molecular interactions, reducing steric hindrance. As the molecular environment has changed, peaks were slightly displaced.

The peak at 2.45 ppm corresponding to H_a of $–NHCOCH_3$ on chitosan is shifted to 2 ppm for NOCC and two new peaks representing carboxymethyl groups at O-position of C_6 (4.55 ppm) and the N-position of C_2 (4.35 ppm) of NOCC, appeared after chitosan modification. This suggests that carboxymethyl groups were substituted to some of the primary hydroxyl and amino sites of NOCC[21,25]. According to our previous work[21], the substitution degree of NOCC, obtained by conductimetric titration, was 43 % (mol/mol).

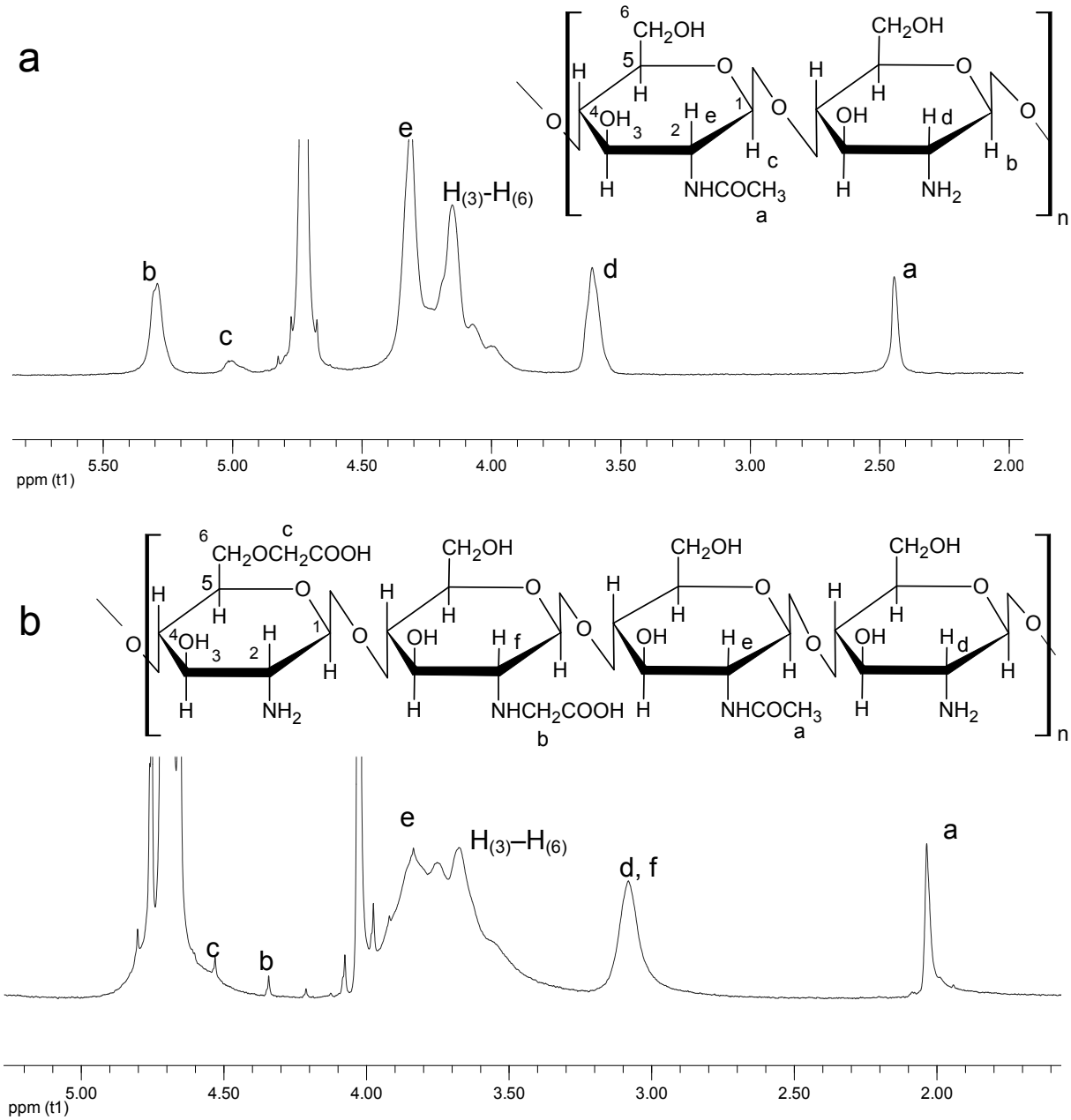


Figure 3: ^{1}H-NMR spectra of chitosan (a) and NOCC (b)

3.2. Nanoparticles preparation

Insulin encapsulation in NOCC nanoparticles has already been studied in the literature. Lin *et al.* have formed nanoparticles by ionotropic gelation induced by tripolyphosphate. In our work, NOCC nanoparticles (Np NOCC) were obtained by another technique: complex coacervation, between only NOCC and insulin. Turbidity measurements were carried out to optimize the coacervation system[26]. Absorbance was measured at 500 nm where neither NOCC nor insulin absorbs. The appearance of turbidity is usually attributed to the formation of scattering particles or droplets in the medium, related to coacervate formation[27]. Light scattering is dependent on the size of the dispersed particles, on the wavelength of the light, on the particles/medium refractive index ratio and on the particle concentration. This method was used to monitor the complex coacervate formation from positive NOCC and negative insulin. The total mixture volume was kept constant; conversely the relative volume of the two suspensions varied. In figures 4 and 5, the absorbance of the NOCC/insulin mixture has been plotted versus the NOCC volumic fraction.

At complexation time, a maximum of absorbance was observed between 10 and 30 % of NOCC. Since the observed turbidity disappeared after 2 hours, it can be identified as a precipitation of the system (figure 4). Precipitation could be related to the formation of large and dense aggregates which sedimentated.

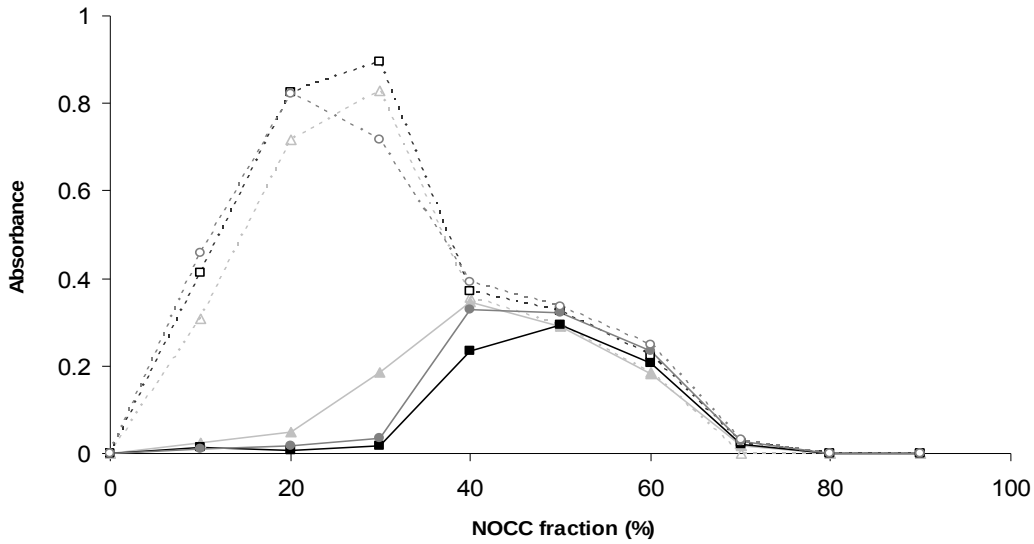


Figure 4. Effect of time on the absorbance (500 nm) of NOCC/insulin mixture vs. NOCC concentration (v/v) ((▲) day of complexation; (■) after 3 days; (●) after 6 days); dashed line stands for first measurement and straight line for second measurement after 2 h.

Optimal complexation conditions were obtained between 40 and 60 % of NOCC, where no precipitation occurred (figure 5). After 6 days, the measured absorbance did not change meaning that the complexation equilibrium was already reached. Associated mass and charge ratio are shown in table 1.

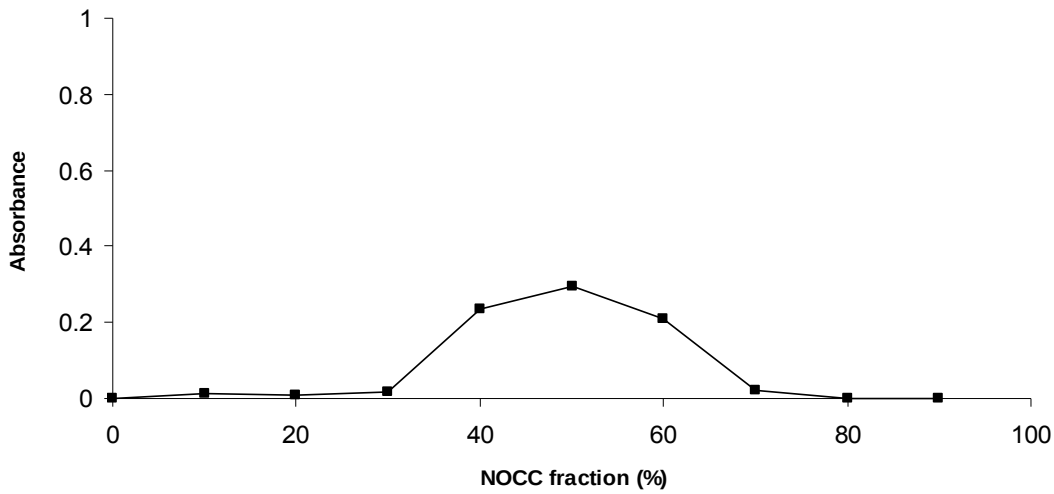


Figure 5. Turbidity of NOCC/insulin mixture vs. NOCC concentration (v/v).

To confirm nanoparticles formation by complexation between NOCC and insulin, morphological observations were made by TEM. Regardless of NOCC to insulin ratio variations, nanoparticles were always individualized and spherical as illustrated in figure 6. No aggregation of nanoparticles was observed.

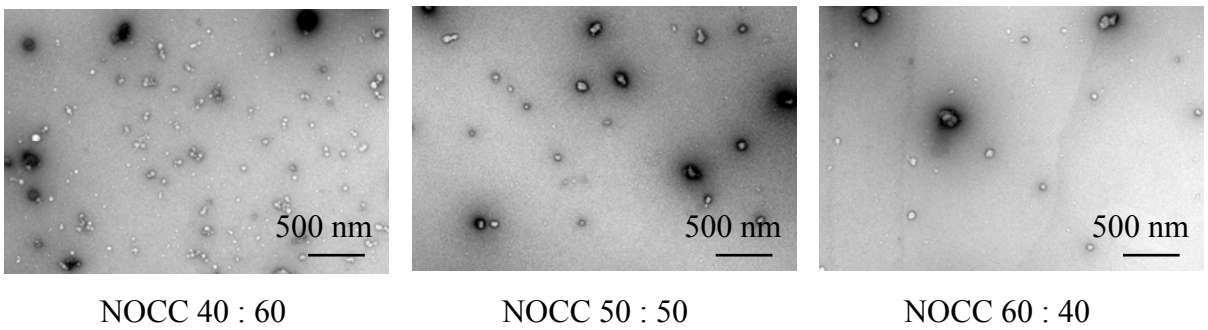


Figure 6. Morphology and size of NOCC nanoparticles according to TEM micrograph (Np dilution 1/50; bar is 500 nm)

Table 1. Conditions of complexation in terms of NOCC to insulin volumic fraction, mass and charge ratio.

Volumic fraction NOCC : Ins	Mass ratio NOCC : Ins	Charge ratio NOCC : Ins
40 : 60	1 : 5.25	3.43 + : 1-
50 : 50	1 : 3.5	4.91+ : 1-
60 : 40	1 : 2.33	7.5 + : 1-

3.3. Nanoparticles characterization by particle size analysis and zeta potential measurements

Mean diameter values of NOCC/insulin nanoparticles prepared with different formulations (varying volumic fraction NOCC to insulin) are presented in table 2.

Table 2. Effect of NOCC to insulin ratio on particle size, zeta potential, encapsulation efficiency and loading capacity. Data are shown as mean ± S.D.

Volumic fraction NOCC : Ins	Suspension pH after	Mean particle size (nm)	Polydispersity index	Zeta potential (mV)	Encapsulation efficiency (%)	Loading capacity (%)
40 : 60	6	560 ± 58	0.485	35 ± 1.2	93 ± 0.6	21.8 ± 1
50 : 50	5.9	495 ± 42	0.374	40 ± 1.1	85 ± 2.5	19.9 ± 2
60 : 40	5.8	360 ± 58	0.407	44 ± 1.2	78.5 ± 2	13.6 ± 3

NOCC nanoparticles displayed sizes from 360 to 560 nm and a positive zeta potential in the range of 40 mV. The large size difference between light scattering and microscopy was essentially due to dehydratation of nanoparticles required for TEM processing.

Obtained nanoparticles sizes (around 500 nm) and charges (+ 40 mV) should be suitable for their intestinal barrier adhesion and crossing to deliver insulin in blood circulation[28,29].

The particle size decreased whereas the zeta potential increased with increasing NOCC to insulin fraction (figure 7). The reason behind this behaviour may be that the higher NOCC to insulin ratio, the lower insulin concentration and the higher density of electrostatic interaction between positive and negative charges leading to a more compact structure with a smaller size. Higher NOCC concentration means more positively charged amino groups and a higher zeta potential suggesting that excess of positive NOCC was located on the outer surface of the particles. Correlation between both NOCC to insulin fraction, size and zeta potential were linearly dependent. Similar results obtained by Sæther *et al.* showed that average size decreased and zeta potential increased with an increase in +/- charge ratio[30].

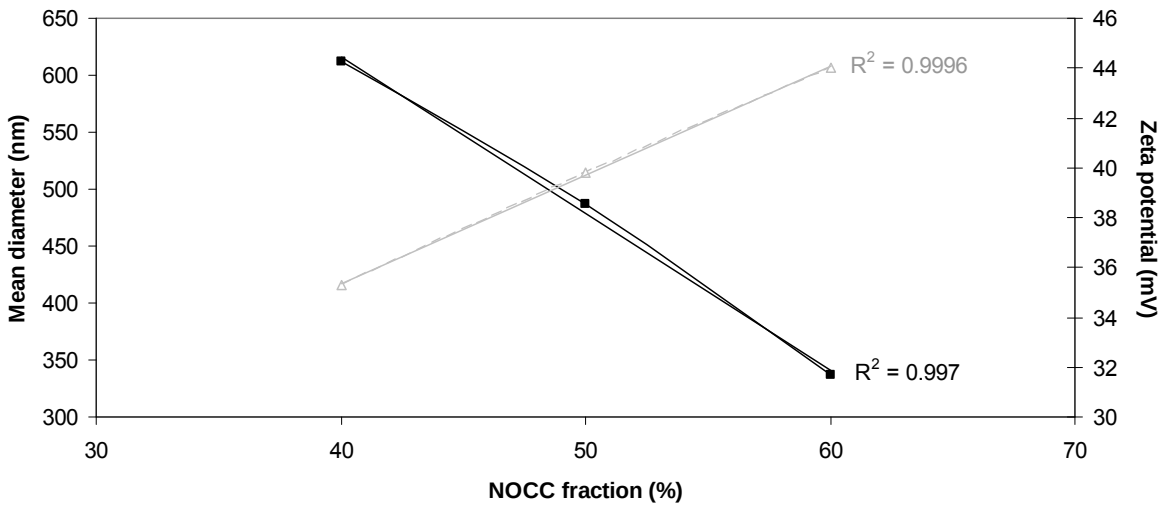


Figure 7. Effect of NOCC concentration on the particle size (■) and zeta potential (△) of NOCC/insulin nanoparticles.

These observations can also be linked to the pH variations of complexation media, induced by various NOCC (pH 5.2) to insulin (pH 7.2) ratios. pH of nanoparticles suspension was measured after complexation. Variations from 5.8 to 6.0 were observed for NOCC to insulin ratio varying from 60:40 to 40:60, respectively.

pH values progressively increase upon drop-wise insulin addition into NOCC. This increase induced particle size increase and negatively charged zeta potential decrease. A greater amount of carboxylic salts (-COO-) appeared with the pH increase leading to fewer electrostatic interactions between NOCC and insulin. This behaviour confirmed the formation of less compact and less charged structures due to lower density of coacervates. In addition, higher carboxylic salts concentration means lower global positive charge of NOCC leading to a zeta potential decrease. Correlation between both pH, NOCC to insulin ratio, size and zeta potential of nanoparticles were linearly dependent. Our observations confirmed the similar observations made by Lin *et al.* concerning NOCC nanoparticles obtained by ionotropic gelation[31].

3.5. Encapsulation efficiency and quantitative determination of insulin

The encapsulation efficiency as well as loading capacity were calculated by HPLC and UV measurements and reported in table 1. Both increased with increasing insulin fraction as shown in figure 8. Encapsulation efficiency evaluates the ability of NOCC to complex insulin whereas loading capacity informs about matter quantity needed to form particles. The higher

NOCC concentration is, the lower encapsulation efficiency is, due to lower insulin concentration. Therefore, the higher NOCC concentration is, the more matter quantity is used, leading to higher loading capacity as more NOCC chains are involved in particles formation. Correlation between NOCC to insulin volumic fraction and encapsulation efficiency of insulin inside NOCC particles were linearly dependent. Same tendency was observed by Sæther *et al.* on alginate/chitosan complexes[30].

Complex coacervation between NOCC and insulin allowed higher encapsulation efficiency than ionotropic gelation. Indeed, Xu et *al.* have reported that only 50-60 % of insulin was encapsulated, depending on NOCC to TPP ratio[22]. Our technique allows an almost complete insulin complexation.

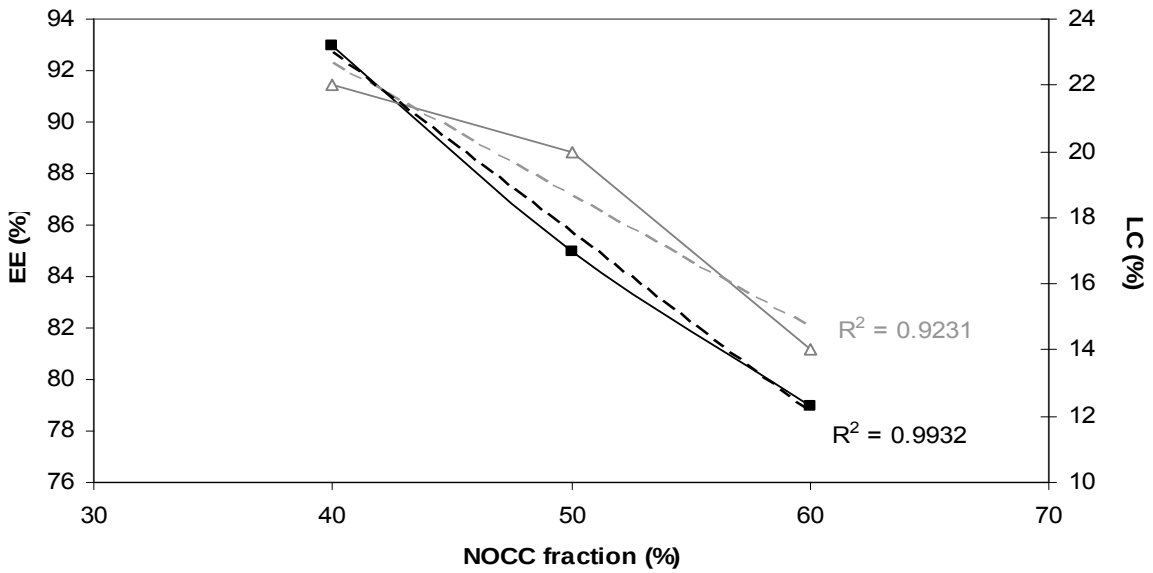


Figure 8. Effect of NOCC concentration on the encapsulation efficiency EE (■) and loading capacity LC (△) of insulin in nanoparticles.

3.6. Stability of nanoparticles

As plotted in figure 9, no difference of particle size and zeta potential were observed after 6 days meaning that nanoparticles were already at thermodynamic equilibrium. Even if, species exchange between complexation media and coacervates took place, global structure of nanoparticles remain unchanged.

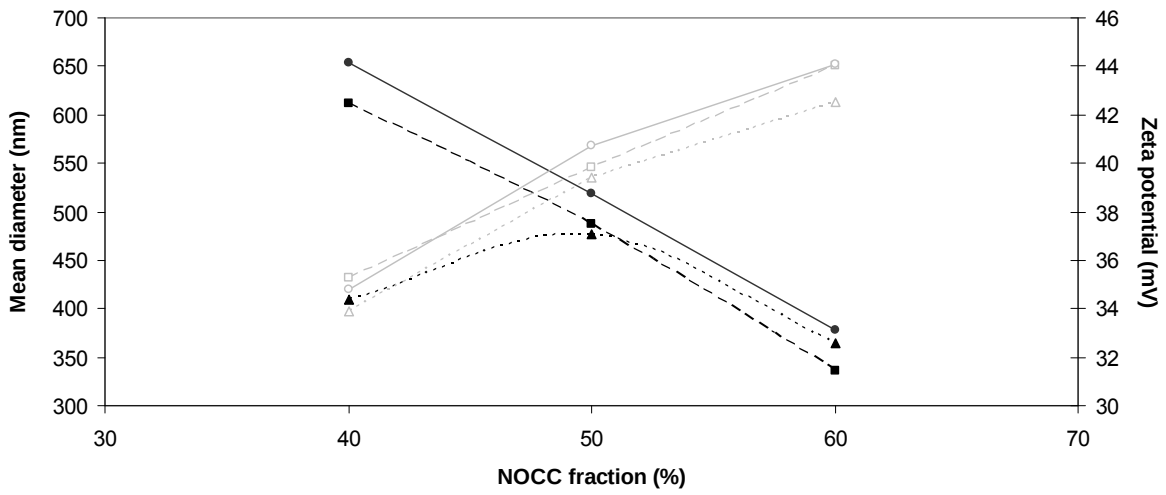


Figure 9. Effect of NOCC concentration and time ((▲) day of complexation; (■) after 3 days; (●) after 6 days) on the particle size (black) and zeta potential (grey) of NOCC/insulin nanoparticles.

Concerning encapsulation efficiency of insulin inside NOCC nanoparticles (figure 10), no change was observed after 6 days, meaning that almost no insulin was release when nanoparticles were aged at 4°C.

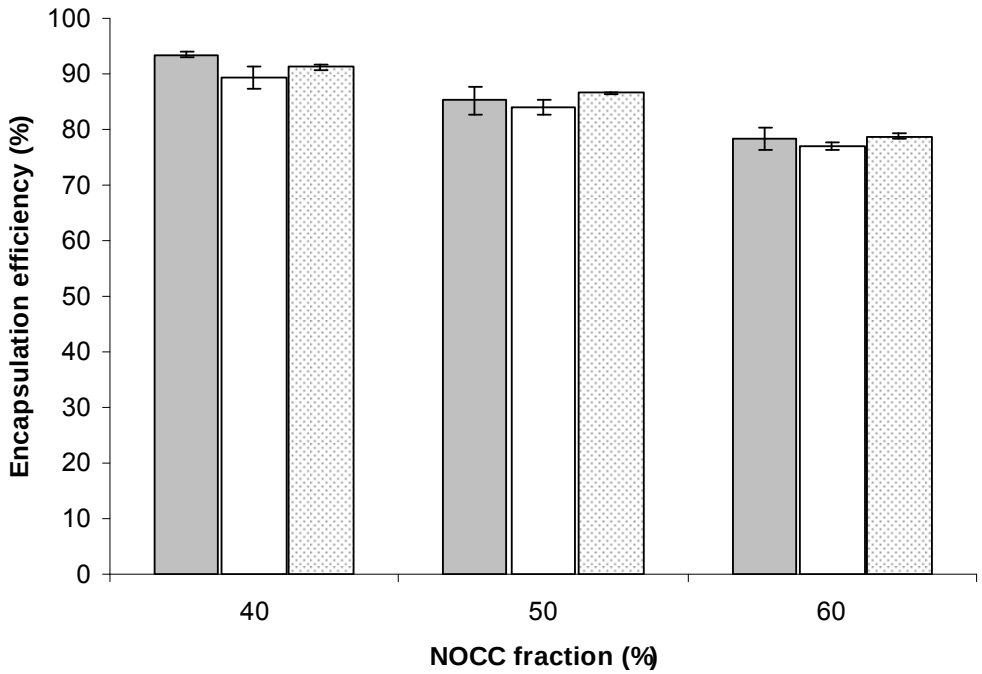


Figure 10. Effect of time on encapsulation efficiency of insulin inside NOCC nanoparticles ((grey) day of complexation; (white) after 3 days; (dots) after 6 days).

NOCC nanoparticles containing insulin were stable in terms of size, zeta potential and encapsulation efficiency after 6 days storage at 4°C. By this way, one can conclude that thermodynamic equilibrium between NOCC and insulin complexation was already reached immediately after complexation.

Conclusion

This paper deals with the investigation of nanoparticles formation by complex coacervation between insulin and a water soluble derivative of chitosan: N-,O-carboxymethylated chitosan called NOCC. NOCC was synthesized to obtain specific characteristics. After characterization by FTIR and ^{1}H-NMR, NOCC was validated as a well-defined product.

The complexation domains between different volumic fractions of NOCC to insulin were determined by turbidimetric titrations. Nanoparticles, with different characteristics, could be obtained for different NOCC to insulin ratio. Resulting nanoparticles were positively charged (+ 35-45 mV), with a 350-550 nm diameter range and nearly spherical shape, and encapsulation efficiency of 80-90 % depending on the NOCC to insulin ratio. Good stability in terms of size, zeta potential and encapsulation efficiency was observed after 6 days when stored at 4°C.

This work shows that nanoparticles formed between NOCC and insulin, either by complex coacervation or by ionotropic gelation with phosphates[31], have similar properties. Otherwise, our works does not need any tripolyphosphate to induce chitosan gelation and leads to better encapsulation efficiency.

Both nanoparticles sizes and charges were determined as adequate to able intestinal barrier adhesion and crossing. According to these characteristics, further *in vitro* experiments will be done to investigate nanoparticles uptake by intestinal epithelial cells. *In vivo* studies on diabetic rats will also be investigated to quantify the hypoglycemiant effect of such nanoparticles.

Acknowledgements

The authors are indebted to the Eli Lilly Company (Indianapolis, USA) for a generous supply of Umuline® insulin solution. This work is financially supported by a grant given by the Région Alsace (France). We are grateful to Marc Schmutz for his knowledge and help in this

work and especially concerning microscopy. Special thanks to Christian Blanck, Audrey Parat and Emmanuelle Monchaux for their work and collaboration.

References

1. Lee, V. H. L. In Protein and Peptide Drug Delivery; Lee, V. H. L., Ed.; Marcel Dekker: New York, 1991.
2. Bajer, J.; Hidalgo, I. J.; Borchardt, R. T. In Peptide and Protein Drug Delivery; Lee, V. H. L., Ed.; Marcel Dekker: New York, 1991.
3. Khafagy, E.-S.; Morishita, M.; Onuki, Y.; Takayama, K. Advanced Drug Delivery Reviews 2007, 59, 1521-1546.
4. Agarwal, V.; Khan, M. A. Pharmaceutical Technology 2001, 25, 76-90.
5. Takeuchi, H.; Yamamoto, H.; Kawashima, Y. Advanced Drug Delivery Reviews 2001, 47, 39-54.
6. Delie, F.; Blanco-Prieto, M. J. Molecules 2005, 10, 65-80.
7. Yeo, Y.; Baek, N.; Park, K. Biotechnology and Bioprocess Engineering 2001, 6, 213-230.
8. Patil, J. S.; Kamalapur, M. V.; Marapur, S. C.; Kadam, D. V. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures 2010, 5, 241-248.
9. Krayukhina, M. A.; Samoilova, N. A.; Yamskov, I. A. Uspekhi Khimii 2008, 77, 854-869.
10. de Kruif, C. G.; Weinbreck, F.; de Vries, R. Current Opinion in Colloid & Interface Science 2004, 9, 340-349.
11. Saffran, M.; Pansky, B.; Budd, G. C.; Williams, F. E. Journal of Controlled Release 1997, 46, 89-98.
12. Sinha, V. R.; Singla, A. K.; Wadhawan, S.; Kaushik, R.; Kumria, R.; Bansal, K.; Dhawan, S. International Journal of Pharmaceutics 2004, 274, 1-33.
13. Tezel, U.; Georgia Institute of Technology, 2009.
14. Costain, D. J.; Kennedy, R.; Ciona, C.; McAlister, V. C.; Lee, T. D. G. Surgery 1997, 121, 314-319.
15. Zhou, J.; Lee, J. M.; Jiang, P.; Henderson, S.; Lee, T. D. G. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, In Press, Corrected Proof.
16. Wintersteiner, O.; Abramson, H. A. Journal of Biological Chemistry 1933, 99, 741-753.
17. Eldridge, J. H.; Hammond, C. J.; Meulbroek, J. A.; Staas, J. K.; Gilley, R. M.; Tice, T. R. Journal of Controlled Release 1990, 11, 205-214.
18. LeFevre, M. E.; Hancock, D. C.; Joel, D. D.; Taylor & Francis, 1980, p 691 - 704.

19. Mathiowitz, E. Nature 1997, 386, 410-414.

20. Chen, S.-C.; Wu, Y.-C. Journal of controlled release 2004 96, 285-300.

21. Callet, A.; Sigrist, S.; Frère, Y. Polymer Submitted.

22. Xu, X.; Fu, Y.; Hu, H.; Duan, Y.; Zhang, Z. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2006, 41, 266-273.

23. Miao, J.; Chen, G.; Gao, C.; Lin, C.; Wang, D.; Sun, M. Journal of Membrane Science 2006, 280, 478-484.

24. Chen, X.-G.; Park, H.-J. Carbohydrate Polymers 2003, 53, 355-359.

25. Wang, L. C.; Chen, X. G.; Liu, C. S.; Li, P. W.; Zhou, P. M. Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics 2008, 46, 1419-1429.

26. Ducel, V.; Richard, J.; Saulnier, P.; Popineau, Y.; Boury, F. Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects 2004, 232, 239-247.

27. Kabanov, V. A.; Zezin, A. B. Pure and Appl. Chem. 1984, 56, 343-354.

28. Alonso, M. J. In Microparticulte Systems For the Delivery of Proteins and Vaccines; Bernstein, C. C. a. H., Ed.; Marcel Dekker: New York, 1996, p 203-242.

29. Gaumet, M.; Gurny, R.; Delie, F. European Journal of Pharmaceutical Sciences 2009, 36, 465-473.

30. Sæther, H. V.; Holme, H. K.; Maurstad, G.; Smidsrød, O.; Stokke, B. T. Carbohydrate Polymers 2008, 74, 813-821.

31. Lin, C. C.; Lin, C. W. Drug Delivery 2009, 16, 458-464.

II.2.2. Résultats complémentaires : étude de l'influence du DDA et de la masse molaire du NOCC sur la formation des nanoparticules

La différence de masse molaire entre les deux polyélectrolytes utilisés dans la formation de complexes a déjà été démontrée comme étant un paramètre important. La masse molaire du polyélectrolyte en excès doit être supérieure à celle du polyélectrolyte en défaut [229]. Ainsi, le polyélectrolyte en défaut est considéré comme molécule invitée et celui en excès comme molécule hôte. Celle-ci forme alors la partie externe du complexe et joue le rôle de stabilisant stérique et/ou électrostatique.

Afin d'étudier l'influence de la masse molaire et du DDA du NOCC sur la formation des complexes avec l'insuline, des chitosanes de caractéristiques connues ont été modifiés sous forme de NOCC puis utilisés pour former les nanoparticules. Nous avons pu précédemment observer que la formation de complexes NOCC / insuline était possible dans le cas d'un NOCC de masse molaire 150 kDa (correspondant à une viscosité de 60 mPa.s) et de DDA 85 %. Nous avons donc choisi de faire varier indépendamment la masse molaire et le DDA à partir de ces valeurs. Les caractéristiques de ces différents produits sont regroupées dans le tableau 11 :

Viscosité (mPa.s) / DDA (%)	20	50	100	200
75		X		
85	X	X	X	X
95		X		

Tableau 11 : Viscosité et degré de désacétylation des NOCC utilisés

Les zones de complexation de ces différents NOCC ont été déterminées par dosage turbidimétrique, par l'intermédiaire de la mesure de densité optique à 500 nm. Le diagramme de turbidité obtenu dans le cas de la complexation de l'insuline avec le NOCC 75/50 est présenté dans la figure 59. Les diagrammes des autres NOCC sont présentés en annexe C.

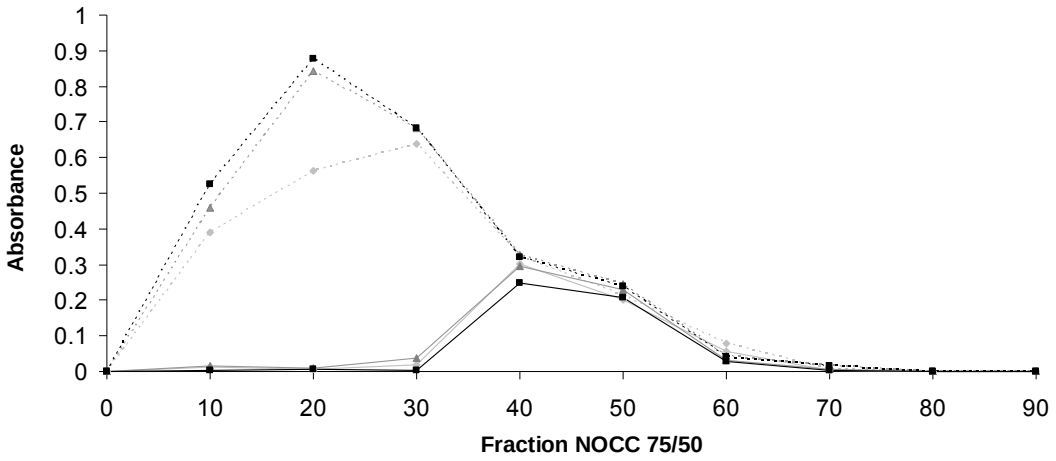


Figure 59 : Turbidité des solutions NOCC 75/50 / insuline en fonction de la fraction volumique en NOCC (ligne discontinue : t_0, ligne continue : $t = t_0+2h$)

Dans le cas du NOCC 75/50, on observe aisément qu'une interaction se produit pour les fractions comprises entre 10 : 90 et 50 : 50. Les mesures de turbidité étant réalisées en deux temps : immédiatement après complexation, puis après 2 heures de repos, il est possible d'observer une éventuelle sédimentation des échantillons.

Celle-ci est notamment observée dans le cas des fractions 10 : 90 à 30 : 70. En effet, la différence observée entre les lignes continues et discontinues nous permet d'estimer la sédimentation de l'échantillon : les objets formés présentent une taille si importante qu'elle induit la sédimentation de l'échantillon et la mesure suivante s'effectue donc sur les objets restants en suspension. Lorsque les deux mesures se superposent, l'échantillon est stable, c'est-à-dire que les objets mesurés sont toujours en suspension.

Il est alors possible de différencier une zone de sédimentation et une zone de complexation dans laquelle les complexes sont suffisamment petits pour ne pas être soumis à la gravité. Ce sont ces complexes que nous allons étudier.

Les différentes courbes de dosages turbidimétriques réalisées pour chacun des NOCC permettent l'attribution des zones de complexation présentées dans le tableau 12.

NOCC \ Ratio	30 : 70	40 : 60	50 : 50	60 : 40
75/50		✓	✓	✓
85/20	✓	✓	✓	✓
85/50	✓	✓		
95/50	✓	✓	✓	
85/100	✓	✓		
85/200	✓	✓		

Tableau 12 : Fractions volumiques pour lesquelles la complexation entre le NOCC et l'insuline est observée

Pour chacun de ces ratios, des mesures de taille (figure 60), de potentiel zêta (figure 61) et de rendement d'encapsulation (figure 62) ont été réalisées afin de caractériser les complexes obtenus.

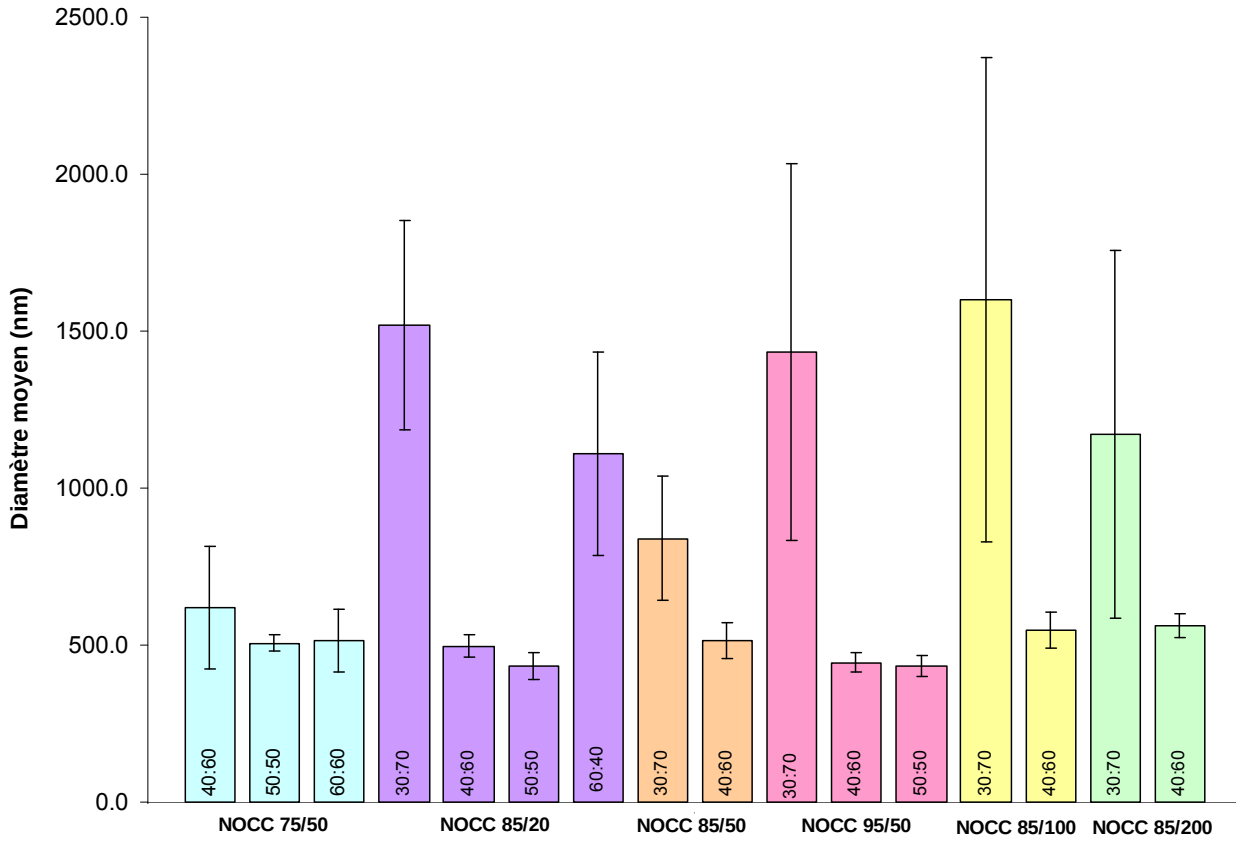


Figure 60 : Taille des complexes obtenus pour les différents NOCC et fractions volumiques pour lesquelles la complexation a été observée

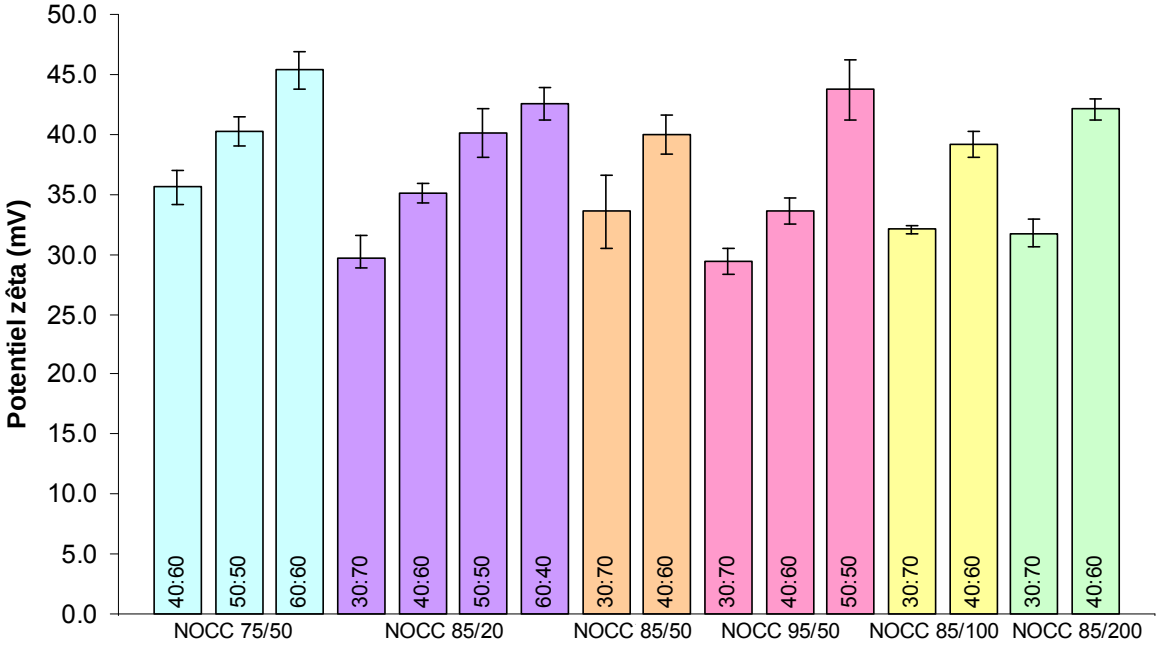


Figure 61 : Potentiel zêta des complexes obtenus pour les différents NOCC et fractions volumiques pour lesquelles la complexation a été observée

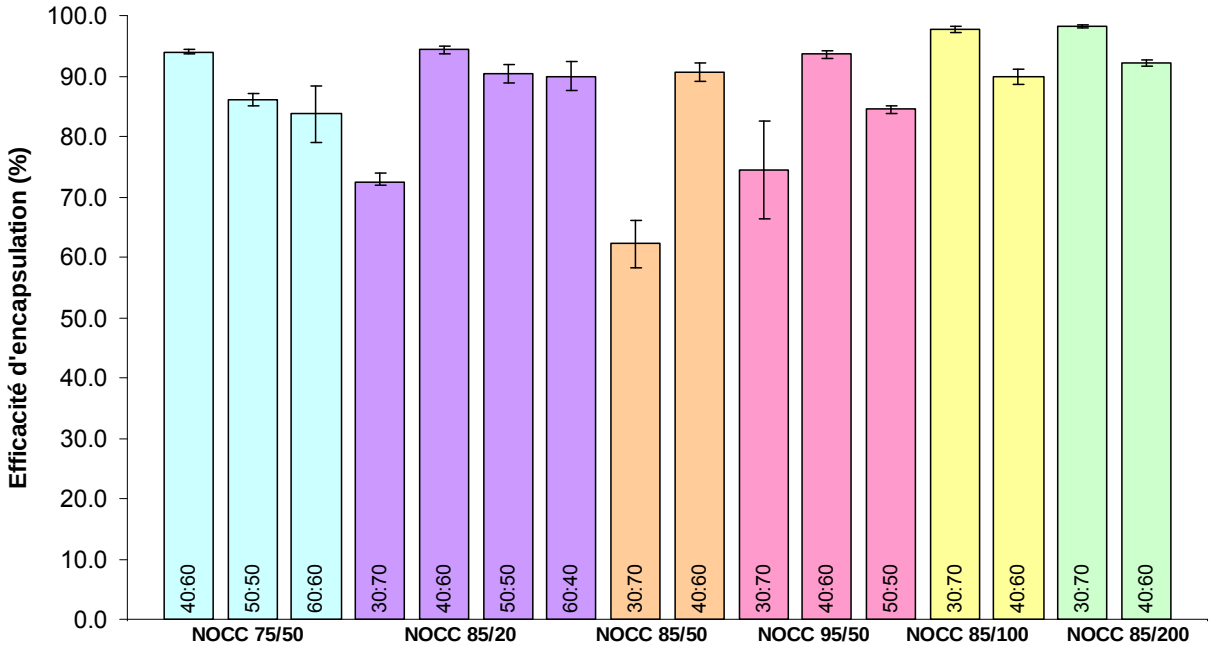


Figure 62 : Efficacité d'encapsulation des complexes obtenus pour les différents NOCC et fractions volumiques pour lesquelles la complexation a été observée

Des comportements similaires sont observés pour chaque groupe de NOCC : lorsque la fraction de chitosane augmente, la taille et l'efficacité d'encapsulation diminuent alors que le potentiel zêta augmente. Ce comportement est lié à une augmentation de la densité des complexes ainsi que de la quantité de matière engagée dans la formation de ces complexes.

On observe que les résultats obtenus avec la fraction 30 : 70 ne concordent pas avec la tendance générale. Ce comportement peut être expliqué de la façon suivante : étant donné que la quantité d'insuline est importante par rapport à celle du chitosane, cette fraction ne permet pas une complexation optimale. Elle correspond plus à une précipitation qu'à une véritable complexation avec des complexes présentant une taille importante et une faible encapsulation d'insuline (pour les faibles masses molaires).

Pour permettre de proposer une explication à ces variations de taille, de potentiel zêta et d'efficacité d'encapsulation, ces données ont été tracées pour l'une des fractions volumiques : la fraction 40 : 60. Celle-ci permet la formation de complexes et présente le meilleur compromis entre taille minimale et efficacité d'encapsulation maximale. La figure 63 présente la variation de la taille des nanoparticules en fonction de la longueur des chaînes et du DDA du NOCC.

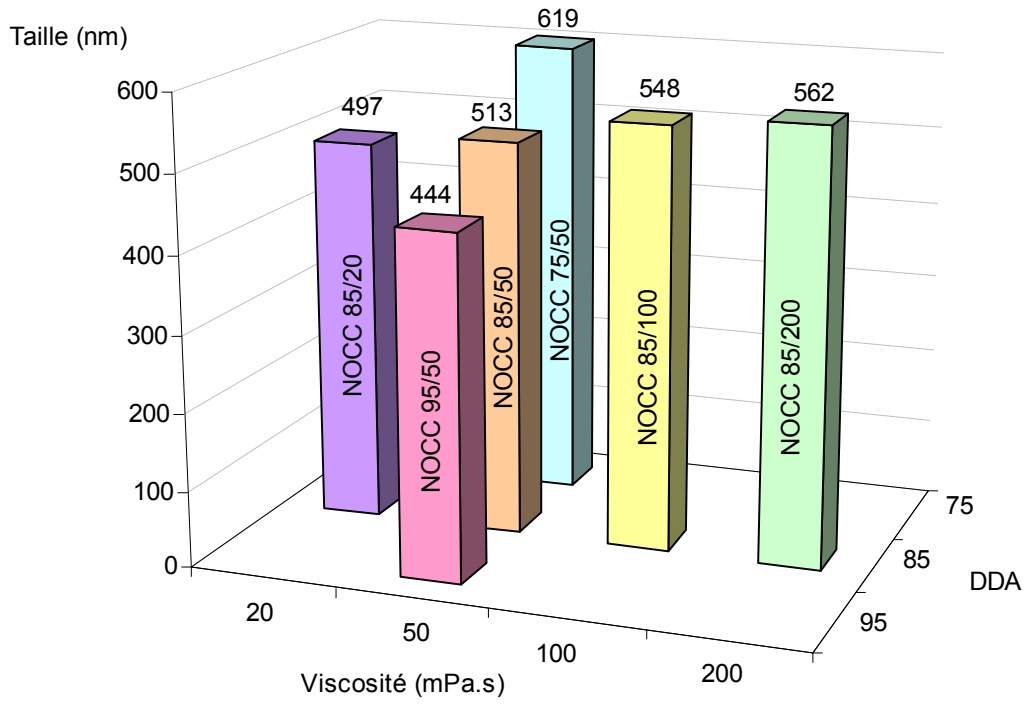


Figure 63 : Influence de la longueur des chaînes et du DDA du NOCC sur la taille des nanoparticules NOCC / insuline

On observe que la taille diminue lorsque le DDA augmente et que la taille augmente lorsque la longueur des chaînes augmente (proportionnellement à la viscosité). Ce comportement peut s'expliquer par l'hypothèse d'une augmentation de la densité du complexe formé conduisant à une diminution de sa taille. En effet, lorsque le DDA augmente, pour une longueur de chaîne constante, la proportion de groupements ionisables devient plus importante. Ainsi, à pH constant, la quantité de charge portée par le chitosane sera plus importante. Le rapport de charge +/- est donc encore plus élevé ce qui induit un plus grand nombre d'interactions électrostatiques entre le NOCC et l'insuline. La quantité d'espèces mises en jeu étant identique, un plus grand nombre de liaisons intermoléculaires s'établissent (figure 64).

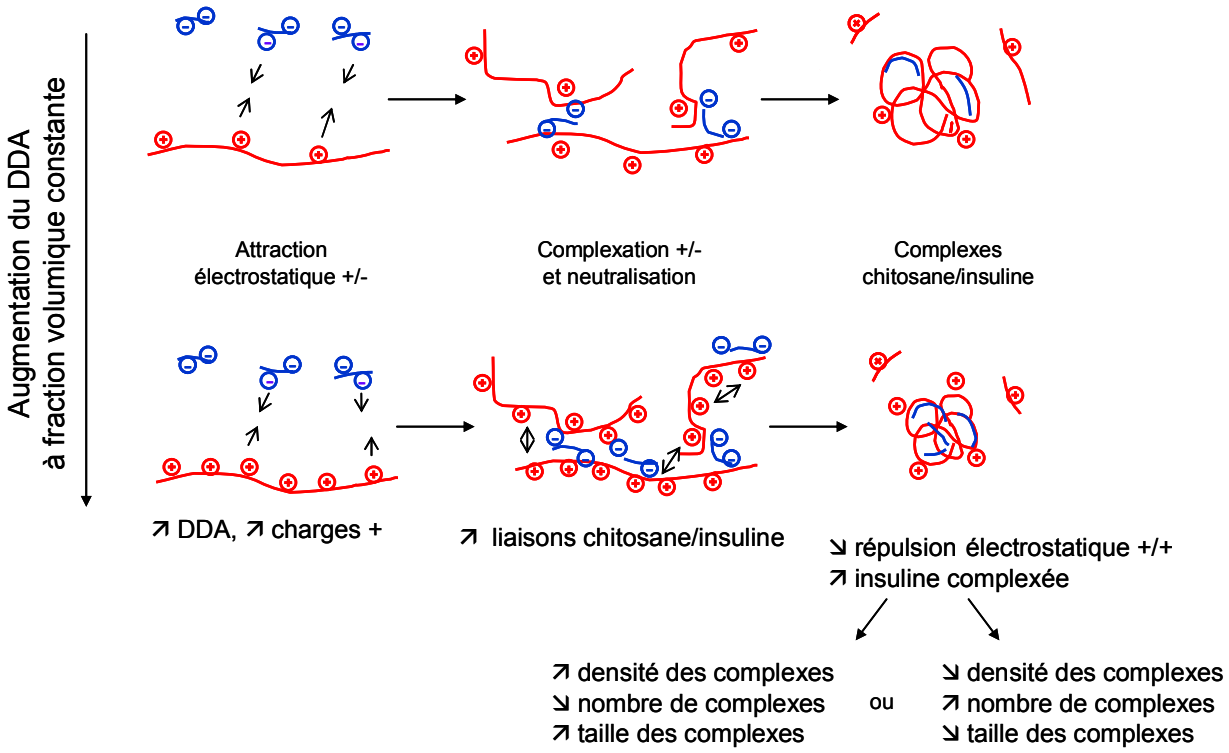


Figure 64 : Schéma de la formation des complexes en fonction du DDA du chitosane

Deux cas de figures peuvent alors être envisagés :

- la formation d'un plus grand nombre de complexes de petite taille,
- la formation de complexes de plus grande taille mais moins nombreux.

Etant donné que, dans notre cas, la taille diminue lorsque le DDA augmente, il semblerait que la quantité de complexes formés soit plus importante mais que ceux-ci présentent des tailles plus faibles.

En ce qui concerne la variation de la longueur des chaînes de chitosane (masse molaire), on observe que la taille des complexes formés augmente lorsque les chaînes sont plus longues.

Lorsque la longueur des chaînes augmente, la présence de charges positives sur celles-ci les oblige à se déployer pour limiter les répulsions électrostatiques intermoléculaires. Ainsi, la place que ces chaînes occupent dans l'espace devient elle aussi plus importante. On observe alors un encombrement stérique plus important, toujours présent après complexation et induisant une augmentation de la taille des complexes (figure 65). Gan *et al.* ont également observé des comportements similaires pour des nanoparticules de chitosane réticulées à l'aide de tripolyphosphate, montrant ainsi une augmentation de taille proportionnellement à la masse molaire du chitosane utilisé [230].

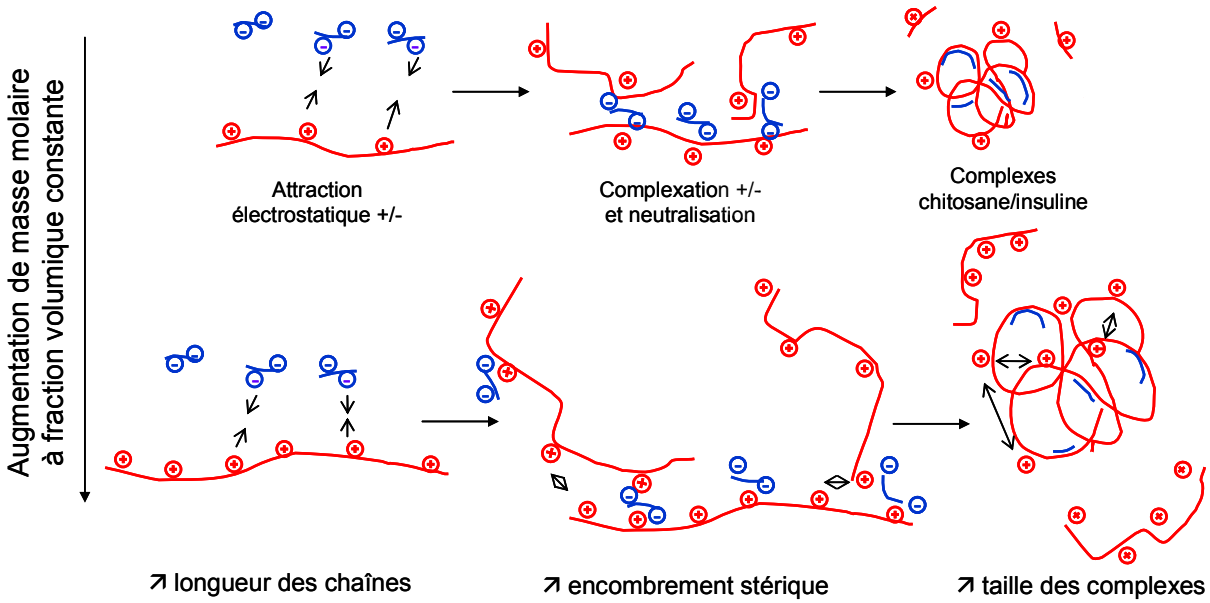


Figure 65 : Schéma de la formation des complexes en fonction de la masse molaire du chitosane

Concernant la charge de surface des nanoparticules mesurée à l'aide du potentiel zêta, celle-ci augmente lorsque que la longueur des chaînes augmente et diminue lorsque le DDA augmente (figure 66).

Lorsque le DDA du chitosane augmente, la quantité de charges positives est plus importante et les nanoparticules résultantes portent une charge positive d'autant plus forte. Lorsque la longueur des chaînes augmente, le nombre de charges positives augmente bien que le DDA reste constant. Comme le DDA représente le pourcentage d'amines portées par le chitosane par rapport au nombre de motifs total, étant donné que le nombre de motif

augmente, la quantité de fonctions amines augmente également. Ainsi, comme précédemment, la charge de surface sera plus fortement positivement chargée. Ces observations corrèlent avec les résultats obtenus par Kiang *et al.* [231].

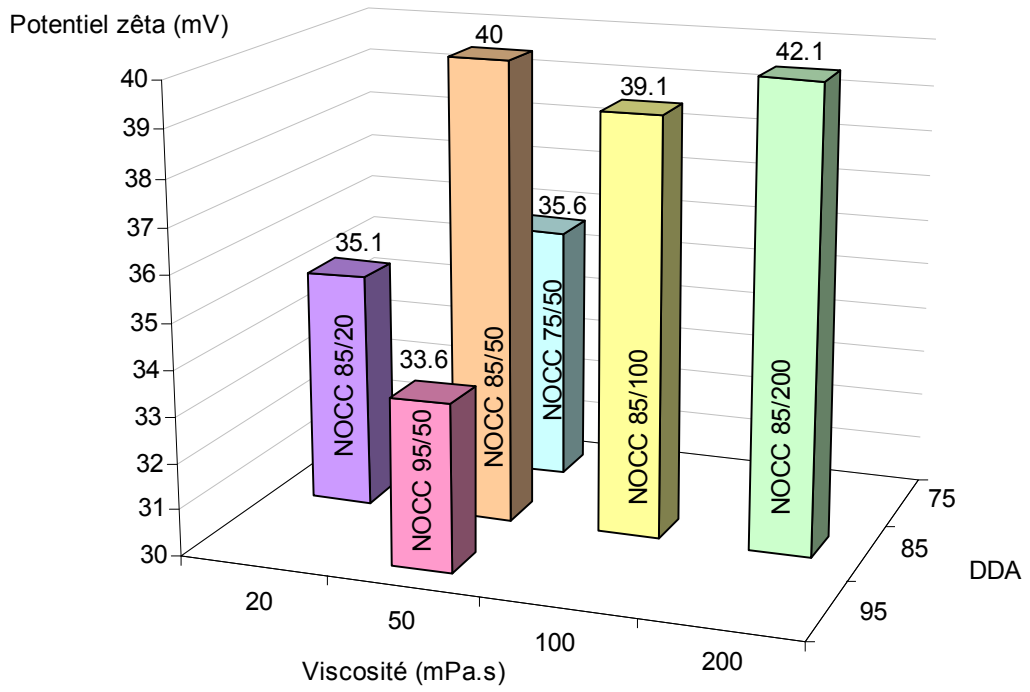


Figure 66 : Influence de la longueur des chaînes et du DDA du NOCC sur le potentiel zêta des nanoparticules NOCC / insuline

Concernant l'efficacité d'encapsulation de l'insuline au sein des nanoparticules NOCC (figure 67), on observe très peu de variations en fonction de la longueur des chaînes et du DDA du NOCC.

Les résultats obtenus concordent avec ceux obtenus dans la littérature [232]. Xu *et al.* n'ont observé aucune variation de l'efficacité d'encapsulation en fonction des DDA et masses molaires du chitosane, dans le cas de nanoparticules obtenues par gélation ionotropique avec l'albumine bovine (BSA), pour des cas de DDA supérieurs à 85 % et de masses molaires élevées.

En effet, dans le cas des chitosanes de DDA élevés (> 85 %), la quantité de groupements fonctionnels (amines protonées) capables de complexer l'insuline est déjà suffisamment importante pour complexer la quasi-totalité de la protéine (BSA ou insuline). Toute l'insuline

étant déjà sous forme complexée avec un chitosane de DDA de 75 %, aucune augmentation de l'efficacité d'encapsulation ne peut être observée.

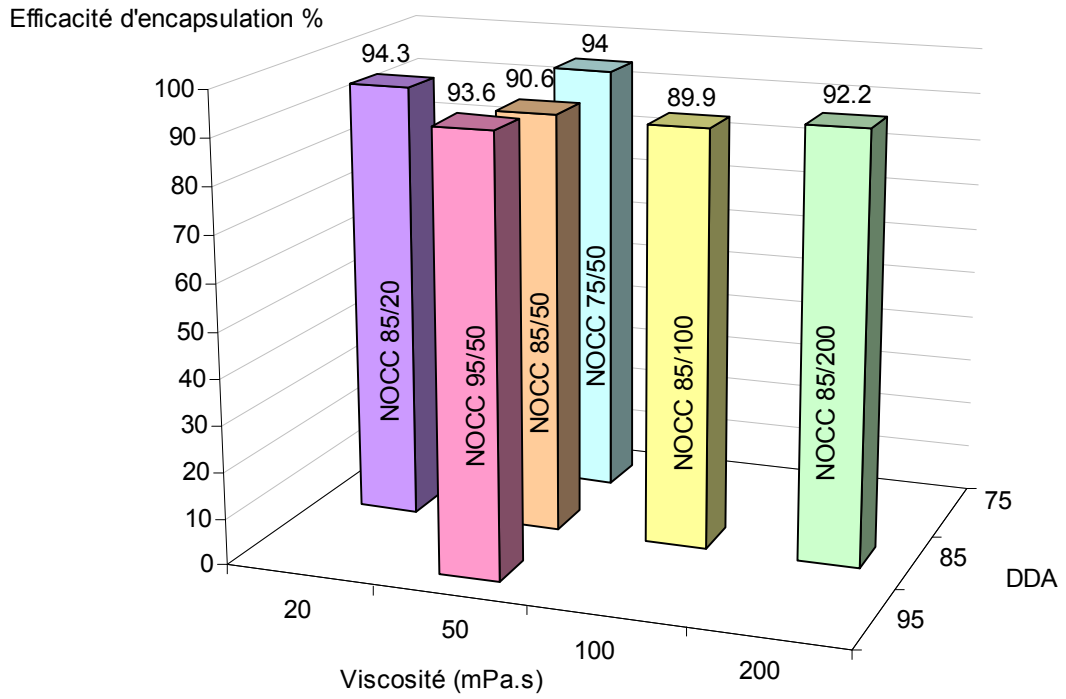


Figure 67 : Influence de la longueur des chaînes et du DDA du NOCC sur l'efficacité d'encapsulation de l'insuline au sein des nanoparticules

De la même façon, aucune variation n'est observée dans le cas des fortes masses molaires. Xu *et al.* ont ainsi pu observer, en accord avec les travaux de Flory [233], que bien que les masses molaires varient, la présence d'un DDA constant leur conférait le même nombre de groupements fonctionnels puisque par définition, le DDA définit la proportion de groupements amines par rapport aux groupements acétyls soit un taux d'amines par unités répétitives. Cette unité étant fixe, la quantité d'amine reste constante et la complexation n'est nullement influencée.

Les différents résultats obtenus pour les nanoparticules NOCC / insuline sont regroupés dans le tableau 13.

A l'aide des résultats obtenus, nous avons pu montrer que la masse molaire et le DDA du chitosane sont deux paramètres qui influencent fortement la complexation entre le NOCC et l'insuline. Le DDA influence ainsi la quantité de charges positives du chitosane et la masse

molaire influence la conformation des chaînes. Ainsi, ces deux paramètres contribuent à des variations de structures des nanoparticules (taille et de charge de surface) sans pour autant faire varier la quantité d'insuline qu'ils contiennent (efficacité d'encapsulation).

DDA (%) \ Viscosité (mPa.s)	20	50	100	200
75		Taille : - 40:60 : 619 ± 195 nm - 50:50 : 507 ± 24 nm - 60:40 : 513 ± 100 nm		
		Potentiel zêta : - 40:60 : 36 ± 1 mV - 50:50 : 40 ± 1 mV - 60:40 : 45 ± 1 mV		
		Efficacité d'encapsulation : - 40:60 : 94 ± 1 % - 50:50 : 86 ± 1 % - 60:40 : 84 ± 4 %		
85	Taille : - 30:70 : 1518 ± 333 nm - 40:60 : 497 ± 36 nm - 50:50 : 435 ± 43 nm - 60:60 : 1108 ± 324 nm	Taille : - 30:70 : 839 ± 198 nm - 40:60 : 513 ± 58 nm	Taille : - 30:70 : 1600 ± 773 nm - 40:60 : 548 ± 58 nm	Taille : - 30:70 : 1171 ± 585 nm - 40:60 : 562 ± 39 nm
	Potentiel zêta : - 30:70 : 28 ± 3 mV - 40:60 : 35 ± 1 mV - 50:50 : 40 ± 2 mV - 60:40 : 43 ± 1 mV	Potentiel zêta : - 30:70 : 34 ± 3 mV - 40:60 : 40 ± 1 mV	Potentiel zêta : - 30:70 : 32 ± 1 mV - 40:60 : 39 ± 1 mV	Potentiel zêta : - 30:70 : 32 ± 1 mV - 40:60 : 42 ± 1 mV
	Efficacité d'encapsulation : - 30:70 : 73 ± 1 % - 40:60 : 94 ± 1 % - 50:50 : 90 ± 2 % - 60:40 : 90 ± 22 %	Efficacité d'encapsulation : - 30:70 : 62 ± 4 % - 40:60 : 91 ± 2 %	Efficacité d'encapsulation : - 30:70 : 98 ± 1 % - 40:60 : 90 ± 1 %	Efficacité d'encapsulation : - 30:70 : 98 ± 1 % - 40:60 : 92 ± 1 %
95		Taille : - 30:70 : 1435 ± 600 nm - 40:60 : 444 ± 30 nm - 50:50 : 434 ± 32 nm		
		Potentiel zêta : - 30:70 : 29 ± 1 mV - 40:60 : 34 ± 1 mV - 50:50 : 44 ± 2 mV		
		Efficacité d'encapsulation : - 30:70 : 75 ± 8 % - 40:60 : 93 ± 1 % - 50:50 : 85 ± 1 %		

Tableau 13 : Récapitulatif des caractéristiques (taille, potentiel zêta et efficacité d'encapsulation) obtenues pour les nanoparticules NOCC / insuline en fonction de la longueur des chaînes (proportionnelle à la viscosité) et du DDA du NOCC

II.3. Formation de nanoparticules sels de chitosane/insuline

Dans le cadre de l'étude de la complexation de l'insuline avec un sel de chitosane, différents contre-ions ont été utilisés, permettant ainsi de faire varier la nature du sel de chitosane. Notre étude s'est dirigée vers les chitosanes chlorhydrate et glutamate.

L'étude de la complexation a été réalisée sur des sels de chitosane chlorhydrate et glutamate de DDA et de taux de salification constants mais de masses molaires variables. Les différents sels de chitosane utilisés pour complexer l'insuline sont présentés dans le tableau 14.

Sel de chitosane	Mw (kDa)	DDA (%)	pKa	Taux de salification (%)
CL 113	80	83 ± 5	6,4 ± 0,1	28 ± 1
CL 213	370	87 ± 5	6,3 ± 0,1	27 ± 1
G 113	160	82 ± 5	6,6 ± 0,1	22 ± 1
G 213	412	84 ± 5	6,5 ± 0,1	20 ± 1

Tableau 14 : Caractéristiques des sels de chitosane

Les différences résident essentiellement dans la longueur des chaînes et dans l'encombrement stérique du contre-ion, deux facteurs connus pour fortement influencer la complexation de polyélectrolytes [151, 208].

II.3.1. Détermination de la zone de complexation par dosage turbidimétrique

Comme dans le cas de la complexation avec le NOCC, la zone de complexation est déterminée par le tracé de diagramme de turbidité après mesure de la densité optique à 500 nm.

Les courbes de densité optique en fonction de la fraction en chitosane chlorhydrate nous informent sur le domaine dans lequel la complexation a lieu. Dans le cas du CL 113, celle-ci se produit pour des ratios de 40 : 60 et 50 : 50 en CL 113 : insuline, et est observée pour les ratios 40 : 50, 50 : 50 et 60 : 40 dans le cas du CL 213 : insuline (figure 68).

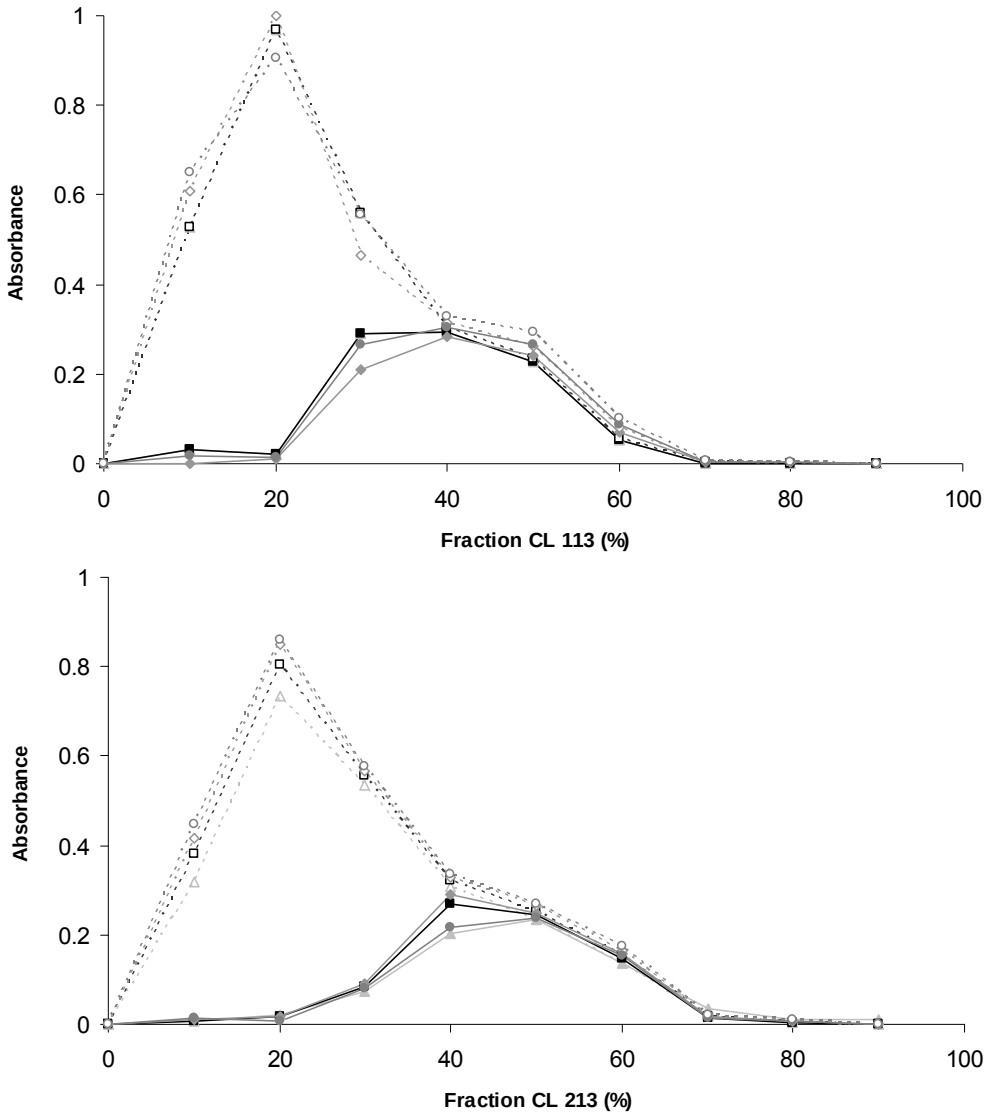


Figure 68 : Dosages turbidimétriques du CL 113 et CL 213
(sur 5 jours, ligne discontinue : t_0, ligne continue : $t = t_0+2h$)

En ce qui concerne le chitosane glutamate, des résultats similaires sont observés avec une complexation apparaissant dans le cas des fractions volumiques 50 : 50 et 60 : 40 pour les deux chitosanes glutamate G 113 et G 213 (figure 69). Les différentes fractions volumiques (chitosane : insuline) pour lesquelles une complexation est observée sont regroupées dans le tableau 15. Les zones de complexation ayant été définies, il est maintenant possible de passer à la caractérisation des complexes formés dans ces différentes zones. Afin de réduire les conditions expérimentales, les caractérisations ont été réalisées dans le cas de la fraction chitosane : insuline de 50 : 50. Cette fraction a été choisie à l'aide de critères purement pratiques ; celle-ci permettant l'utilisation d'une quantité minimale de réactifs (à notre

disposition en quantité limité) en équilibrant les consommations des deux composés (complexation équi-volumique).

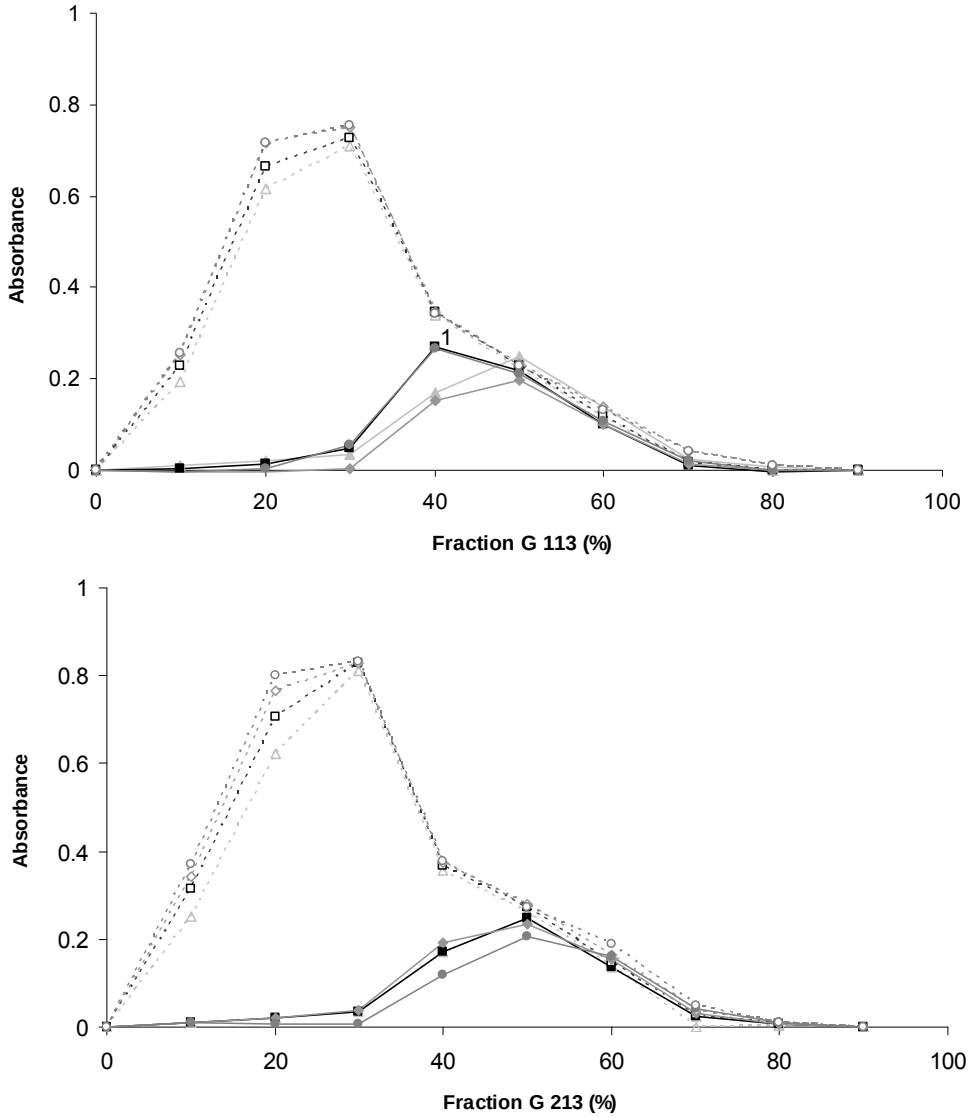


Figure 69 : Dosage turbidimétrique du G 113 (haut) et du G 213 (bas) sur 5 jours (ligne discontinue : t_0, ligne continue : $t = t_0+2h$)

Sel de chitosane \ Fraction volumique	40 : 60	50 : 50	60 : 40
CL 113 *Mw = 80 kDa*	✓	✓	
CL 213 *Mw = 370 kDa*	✓	✓	✓
G 113 *Mw = 160 kDa*		✓	✓
G 213 *Mw = 412 kDa*		✓	✓

Tableau 15 : Fractions volumiques pour lesquelles la complexation entre les sels de chitosane et l'insuline est observée

II.3.2. Caractérisation des particules sels de chitosane / insuline

Dans le cas de la complexation chitosane : insuline dans des proportions volumiques 50 : 50, les tailles ainsi que la polydispersité des complexes obtenus ont été mesurées par diffusion dynamique de la lumière. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 16 :

Sel de chitosane	Fraction volumique chitosane : Ins	Rapport massique chitosane : Ins	Rapport de charge chitosane : Ins	Diamètre moyen (nm)	Indice de polydispersité
CL 113	50 : 50	1 : 3,5	2,75 + : 1-	352 ± 17	0,342
CL 213	50 : 50	1 : 3,5	2,75 + : 1-	1128 ± 78	0,731
G 113	50 : 50	1 : 3,5	2,75 + : 1-	523 ± 11	0,522
G 213	50 : 50	1 : 3,5	2,75 + : 1-	672 ± 58	0,517

Tableau 16 : Taille et polydispersité des complexes obtenus pour les sels de chitosane dans des proportions volumiques 50 : 50 avec l'insuline

A fraction volumique chitosane : insuline constante, le CL 113 est le sel de chitosane qui permet l'obtention des particules de plus petites tailles et ce, avec la plus faible polydispersité. En effet, le contre-ion glutamate étant plus volumineux que l'ion chlorure, les tailles des particules obtenues sont supérieures. De plus, celui-ci restant dans une zone électrostatique relativement proche du chitosane, il vient stériquement gêner la formation du complexe et engendre donc la formation de complexes moins denses que dans le cas d'un ion peu volumineux. Ces données suggèrent que les complexes soient donc plus gros, de par la présence de l'ion glutamate et de la faible densité du complexe qu'il engendre [207]. Une tendance similaire a pu être observée dans les travaux de Luangtana-anan *et al.* confirmant que le volume du contre-ion jouait un rôle non négligeable dans la complexation et dans la conformation des nanoparticules [208].

En ce qui concerne l'influence de la masse molaire du sel de chitosane (à DDA et taux de salification constant) sur la formation des complexes, il est évident aux vues des valeurs du tableau 16, que plus la chaîne de chitosane est longue, plus elle va être capable de complexer l'insuline engendrant ainsi des complexes denses comportant une quantité importante de matière. Luangtana-anan *et al.* ont également observé des résultats similaires.

Il apparaît également que l'augmentation de taille des complexes formés, liée à une augmentation de la masse molaire du chitosane, est plus importante dans le cas des sels de chitosanes chlorhydrate que dans le cas des glutamates. Cette augmentation de taille, en

proportion plus faible dans le cas des chitosanes glutamates, peut s'expliquer par la faible densité des complexes. En effet, les complexes étant très peu denses, les longues chaînes de chitosane pourront ainsi se replier vers l'intérieur du complexe et induire une augmentation de densité sans pour autant conduire à une augmentation de leur taille.

Les nanoparticules obtenues avec le CL 113 étant celles présentant les tailles les plus faibles, la suite des études sera réalisée uniquement sur les particules complexées à l'aide de ce sel de chitosane.

II.3.3. Caractérisation des particules CL 113 / insuline

Passons désormais à l'étude des nanoparticules réalisées par complexation du sel de chitosane chlorhydrate CL 113 dans les proportions 40 : 60 et 50 : 50 avec l'insuline.

II.3.3.1. Observations microscopiques

Les nanoparticules ont été visualisées par microscopie à transmission électronique. Les dilutions nécessaires à la préparation des échantillons ont révélé un comportement inattendu des nanoparticules. En effet, il s'avère que la dilution influence fortement la taille des particules (figure 70). L'observation d'un échantillon non dilué conduit à la visualisation d'objets de tailles macrométriques, alors que des dilutions de 1/50 ou 1/2500 permettent l'observation d'objets individualisés de tailles comprises entre 15 et 20 nm.

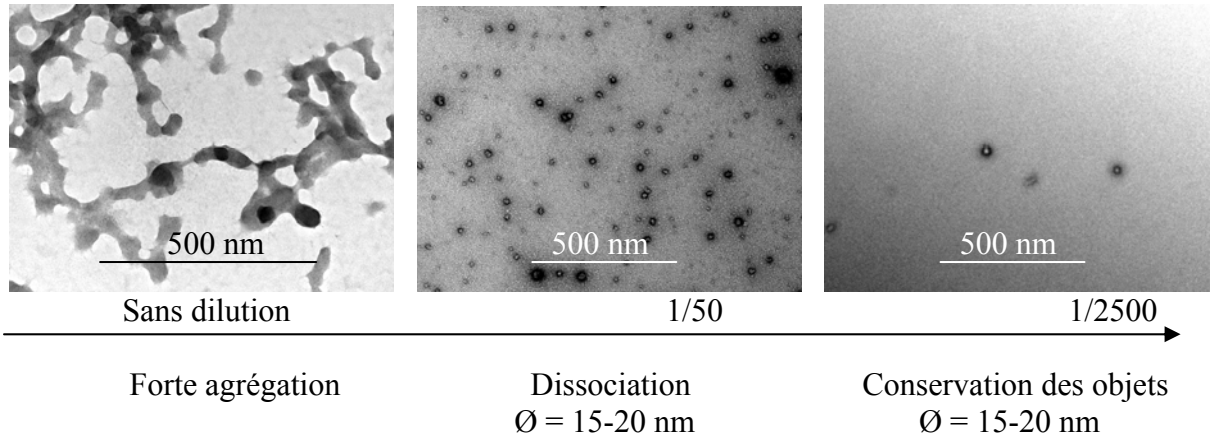


Figure 70 : Observations de l'effet de dilution sur les nanoparticules CL 113

Les objets macrométriques observés sont, en réalité, des agrégats de nanoparticules induits par la forte densité des nanoparticules lors de l'étape de séchage de l'échantillon. La taille des particules est donc soumise à un fort effet de dilution qu'il est nécessaire de prendre en compte pour la suite des caractérisations. Des données similaires ont été obtenues après observations préliminaires de nanoparticules NOCC : insuline mais n'ont pas été approfondies. Des comportements similaires ont déjà été observés dans la littérature [234, 235].

Afin d'évaluer son importance dans la mesure de la taille des particules, une étude identique est réalisée afin d'obtenir une comparaison de la mesure de taille entre la microscopie et la diffusion de lumière (figure 71).

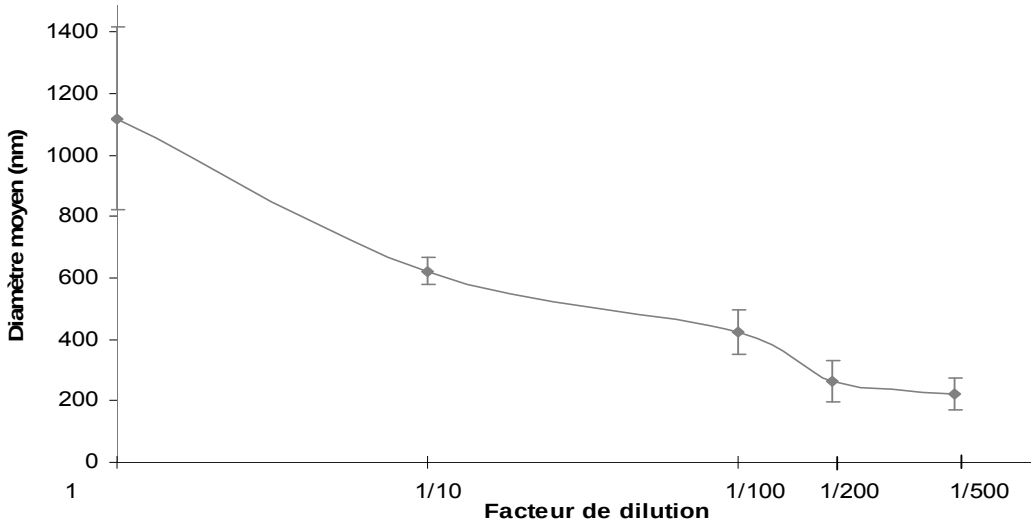


Figure 71 : Influence du facteur de dilution sur la taille des particules mesurée par diffusion de lumière

Aux vues de l'allure du tracé de la taille des particules en fonction du facteur de dilution, il apparaît que celle-ci a tendance à diminuer pour se stabiliser autour de 250 nm lorsque la dilution est comprise entre 1/200 et 1/500e. La taille des nanoparticules sera donc mesurée après dilution à 1/200 dans l'eau. L'étude des nanoparticules formées à l'aide du CL 113 est réalisée au cours du temps, en observant les variations de taille, de potentiel zêta et d'efficacité d'encapsulation des particules.

Les nanoparticules CL 113 de fraction 40 : 60 et 50 : 50 ont été observées par microscopie électronique à transmission après dilution dans l'eau déminéralisée (figure 72).

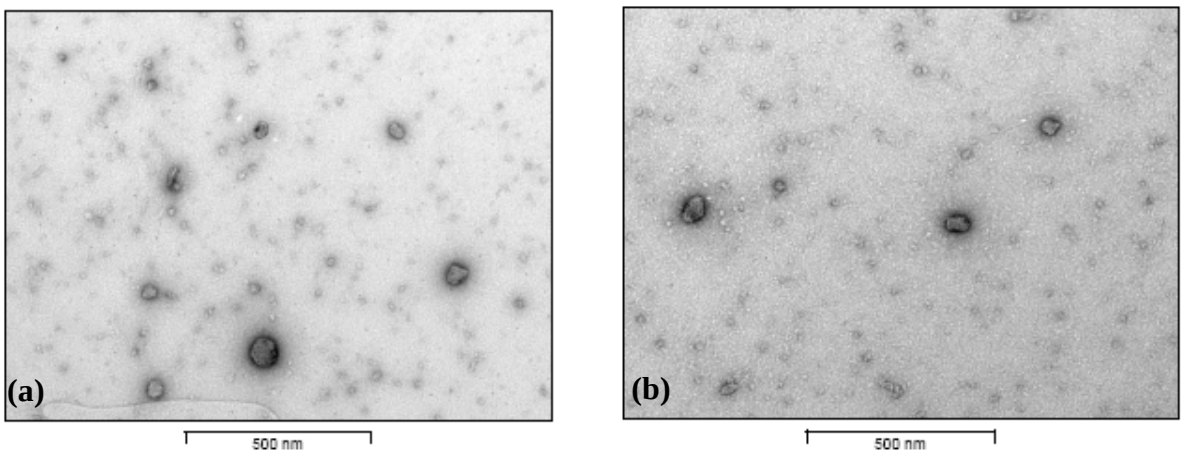


Figure 72 : Observations en microscopie électronique en transmission de nanoparticules CL 113 (a) fraction 40 : 60 et (b) 50 : 50 (dilution 1/200, barre d'échelle 500 nm)

Quelque soit la fraction volumique utilisée pour former les particules, celles-ci se présentent sous forme sphérique et présentent une polydispersité importante (également observée en diffusion de lumière).

II.3.3.2. Taille et potentiel zêta des nanoparticules CL 113 / insuline

La taille et la charge de surface des nanoparticules CL 113 ont été mesurées par diffusion de lumière et électrophorèse laser Doppler, respectivement. La figure 73 montre l'évolution de ces deux grandeurs caractéristiques des nanoparticules en fonction de la fraction volumique chitosane : insuline.

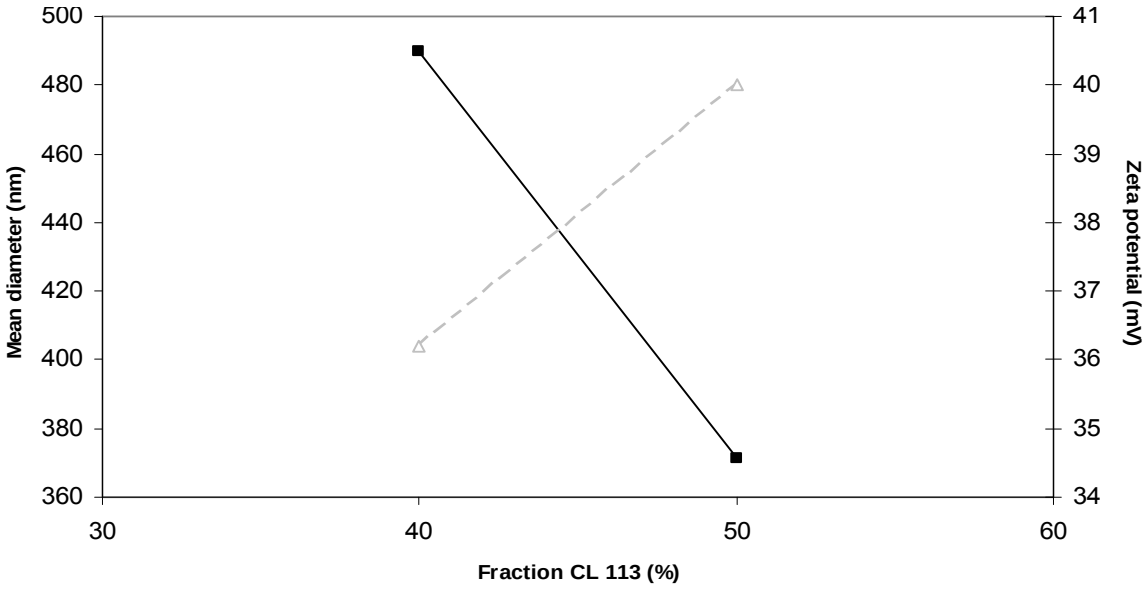


Figure 73 : Influence de la quantité de sel de chitosane (en fraction volumique) sur la taille (noir) et le potentiel zêta (gris) des particules CL 113/insuline

La taille des nanoparticules varie de 350 à 500 nm et a tendance à diminuer lorsque la quantité de chitosane augmente. Lorsque la fraction volumique chitosane : insuline augmente, la quantité de chitosane intervenant dans le complexe devient plus importante. La quantité de charges positives est alors d'autant supérieure à celle des charges négatives portées par l'insuline. Le complexe formé fait donc intervenir un plus grand nombre d'interactions électrostatiques. Suite à cette augmentation du nombre de liaisons chitosane/insuline, deux possibilités se présentent : les complexes sont formés en plus grand nombre mais de petite taille ou sont de plus grande taille mais peu nombreux.

A l'aide d'un calcul de rapport de charges (tableau 17), il est possible d'observer une tendance : un plus grand nombre de liaisons seront formées dans le cas de la fraction 40 : 60 que dans le cas de la fraction 50 : 50.

Dans le cas de la fraction 50 : 50, la quantité de matière (fraction massique) étant plus faible avec un ratio de charge plus important, on s'attend à ce que la complexation soit quasi-totale et donc à ce que les complexes formés soit de plus grande taille. Or, on observe une diminution de la taille des complexes pouvant être expliquée à l'aide de la figure 74.

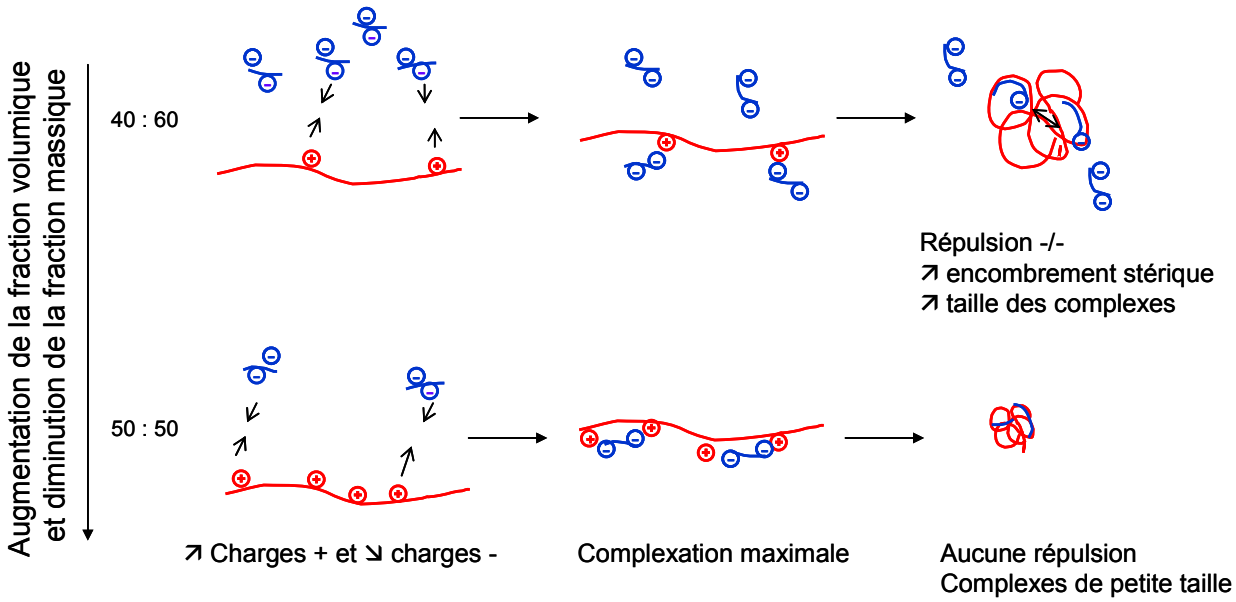


Figure 74 : Schéma de l'influence de la variation des fractions volumique et massique sur la formation des complexes

L'augmentation du ratio de charge induit une complexation maximale, très peu d'espèces libres restent non complexées. Ainsi, les complexes formés présentent peu de charges résiduelles conduisant à de très faibles répulsions électrostatiques et stériques. La taille des

complexes est donc minimisée, la densité du complexe sera plus importante et les tailles observées seront inférieures.

En ce qui concerne la charge de surface portée par les complexes, celle-ci diminue lorsque la quantité d'insuline ajoutée est plus importante (fraction 40 : 60). La plus large quantité d'insuline apporte des charges négatives supplémentaires. Etant donné que la valeur mesurée correspond à une charge globale, elle fait intervenir toutes les charges présentes. Ainsi, certaines charges positives du chitosane sont neutralisées par les charges négatives de l'insuline. Bien que la valeur mesurée reste positive, celle-ci est très légèrement inférieure.

Ainsi, il semble que plus le rapport de charge augmente, plus la surface des particules sera positivement chargée. Les travaux de Sæther *et al.* ont montré des tendances similaires pour des nanoparticules alginate / chitosane obtenues par coacervation complexe [236]. Ils ont également pu observer une diminution de taille et une augmentation de la charge de surface en fonction de la diminution du ratio de charge +/-.

Rapport de charges / Fraction volumique	Charges positives (+)	Charges négatives (-)	Fraction massique CL 113 : insuline	Taille moyenne (nm)	Potentiel zêta (mV)
40 : 60	1,45	1	1 : 5,25	475 ± 22	36,5 ± 0,5
50 : 50	2,75	1	1 : 3,5	352 ± 17	39,7 ± 0,8

Tableau 17 : Fraction volumique, massique et rapport de charge pour les nanoparticules CL 113

La taille et la charge de surface des nanoparticules ont également été étudiées en fonction du pH de la solution de chitosane chlorhydrate. Pour cela, le pH des solutions a été ajusté à différentes valeurs, puis la complexation avec l'insuline a été réalisée. La figure 75 présente les résultats ainsi obtenus.

Il semble apparaître une tendance indiquant que lorsque le pH de la solution de chitosane diminue, la taille des particules diminue également (de 500 à 350 nm). Inversement, la charge de surface augmente (de 33 à 41 mV) lorsque le pH de la solution diminue.

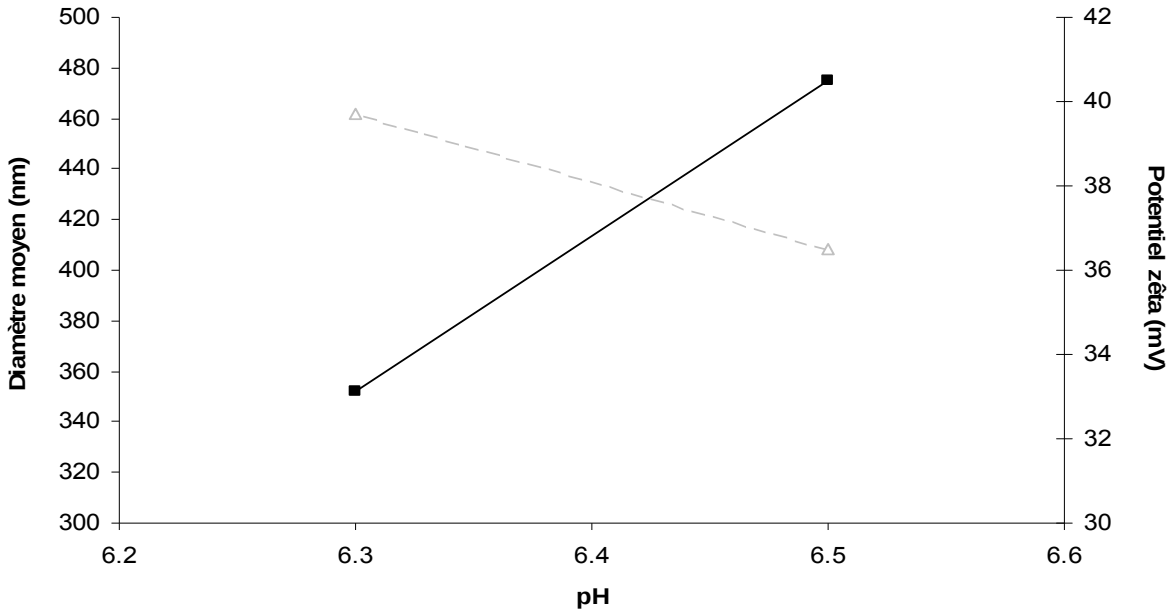


Figure 75 : Influence du pH de la solution de sel de chitosane sur la taille (noir) et le potentiel zêta (gris) des particules CL 113/insuline

Ce comportement peut s'expliquer par le taux de protonation du chitosane. En effet, plus le pH est faible, plus le chitosane est positivement chargé : la quantité de NH_3^+ devient plus grande que celle des NH_2 (figure 76).

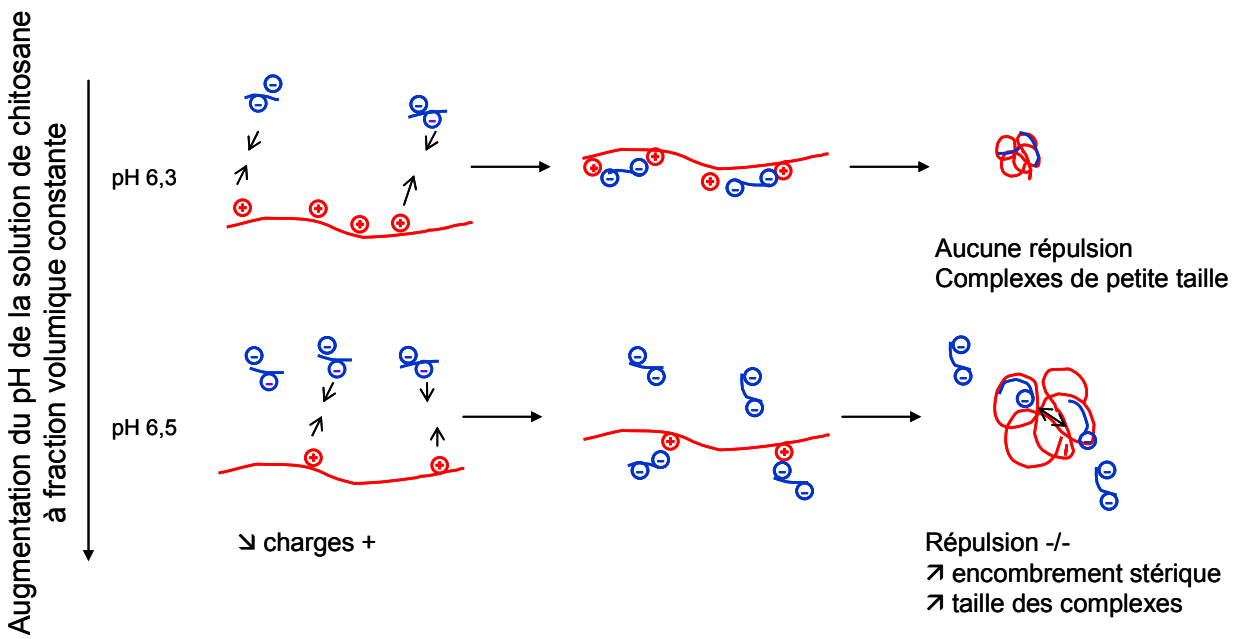


Figure 76 : Schéma de l'influence de la variation de pH sur la formation des complexes

Concernant la complexation, bien que les fractions volumiques et massiques restent identiques, le rapport de charge varie : la quantité de charges positives augmente alors que

celle en charges négatives reste constante. Ainsi, comme dans le cas précédent (fraction 50 : 50), la densité du complexe devient plus importante et les répulsions électrostatiques et stériques sont minimisées : la taille des nanoparticules diminue. La quantité de charges positives étant supérieures, les nanoparticules sont d'autant plus chargées en surface et les valeurs de potentiel zêta obtenues sont supérieures. Sun *et al*. ont pu observer le même type de tendance sur des complexes chitosane / héparine, indiquant une influence du pH sur la taille de ces complexes. Une fois aux alentours du point isoélectrique du chitosane, la taille des complexes augmente jusqu'à ce qu'une précipitation soit observée pour des pH supérieurs à 7 [237].

II.3.3.3. Efficacité d'encapsulation de l'insuline dans les nanoparticules CL 113 / insuline

L'efficacité d'encapsulation de l'insuline au sein des nanoparticules de chitosane chlorhydrate a été déterminée par mesure de l'absorption UV à l'aide d'insuline cristalline. De la même façon, le taux de charge en insuline des nanoparticules a été calculé à partir de la masse des nanoparticules obtenue après lyophilisation.

La figure 77 présente la variation de l'efficacité d'encapsulation et du taux de charge en fonction de la fraction en chitosane CL 113.

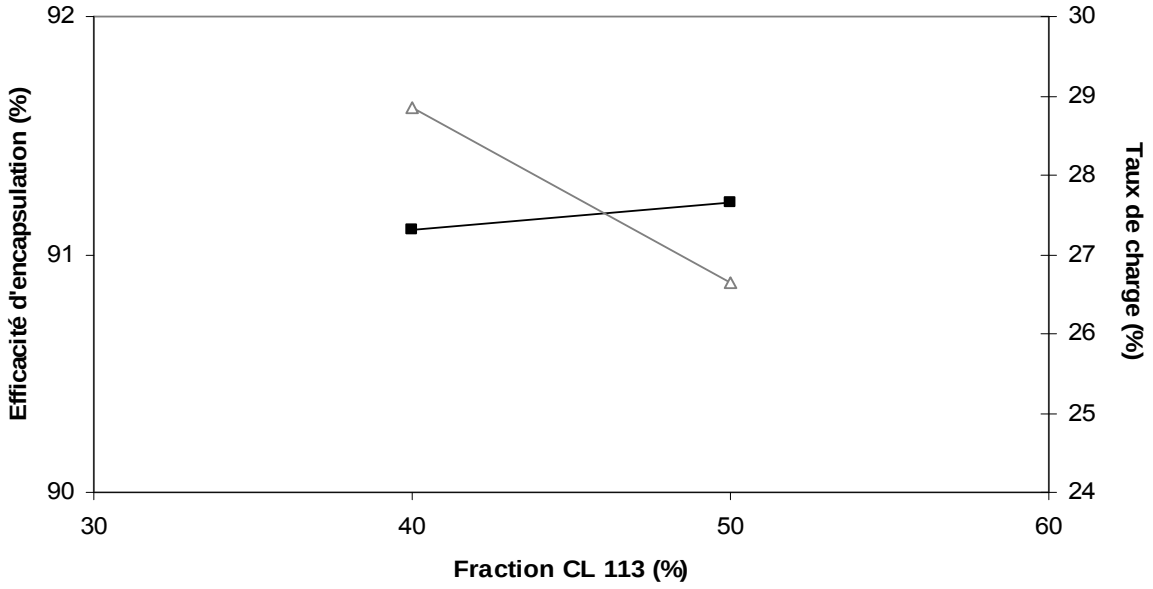


Figure 77 : Influence de la fraction volumique en sel de chitosane sur l'efficacité d'encapsulation (noir) et le taux de charge en insuline (gris) des particules CL 113

On observe que bien que l'efficacité d'encapsulation soit relativement constante, le taux de charge semble diminuer lorsque la quantité de chitosane augmente. En effet, la quantité d'insuline contenue dans les nanoparticules est identique mais la quantité de matière utilisée est plus importante. Ainsi, la capacité de chargement en insuline est inférieure puisqu'une quantité de chitosane supérieure est nécessaire à l'encapsulation d'une quantité identique d'insuline [232].

II.3.3.4. Stabilité des nanoparticules CL 113 / insuline

La stabilité des nanoparticules dans le temps a été étudiée après stockage et conservation des nanoparticules à 4°C dans le milieu de complexation. La taille, le potentiel zêta ainsi que l'efficacité d'encapsulation ont été mesurés au cours du temps (sur 6 jours).

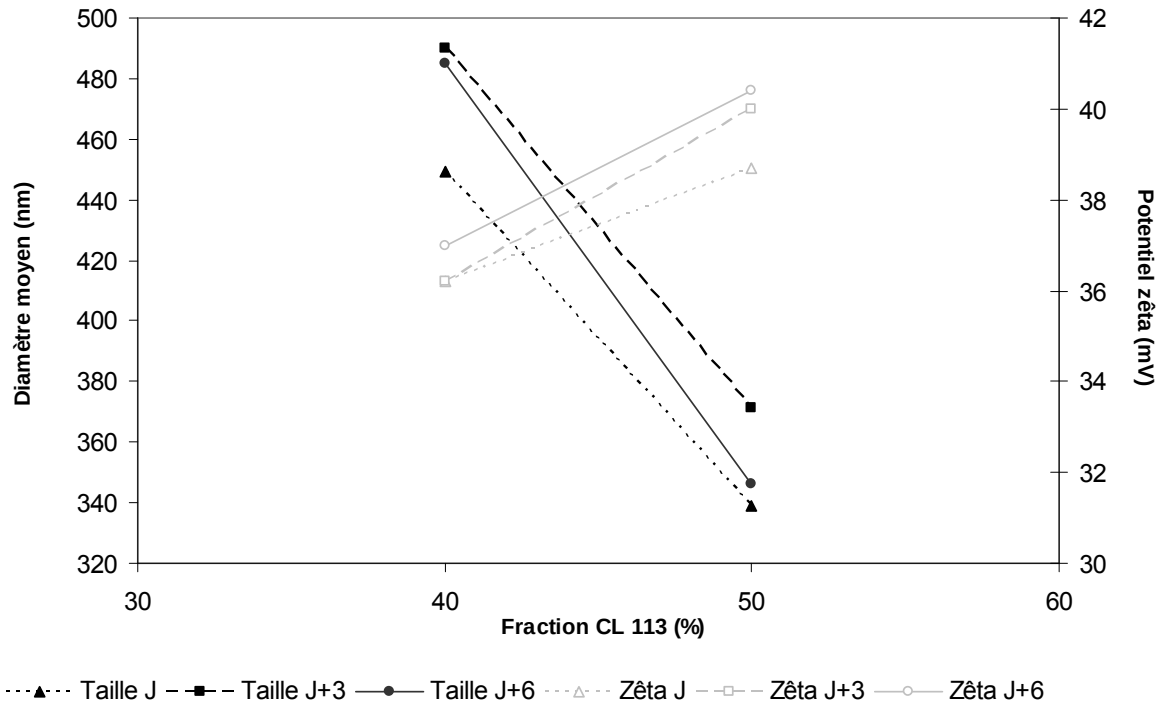


Figure 78 : Influence de la fraction volumique en sel de chitosane et du temps sur la taille (noir) et le potentiel zêta (gris) des particules CL 113

La figure 78 montre que la taille et le potentiel zêta des nanoparticules varient peu en fonction du temps. De même, l'efficacité d'encapsulation (figure 79) reste constante au cours du temps.

Ces constatations nous indiquent que, dès la première mesure (réalisée quelques heures après la complexation), l'équilibre entre les chaînes libres et complexées s'est déjà établi. De plus, bien qu'un équilibre s'installe entre les complexes et les chaînes de polyélectrolytes libres en solution, ces réarrangements ne modifient pas les caractéristiques des nanoparticules indiquant alors leur stabilité thermodynamique.

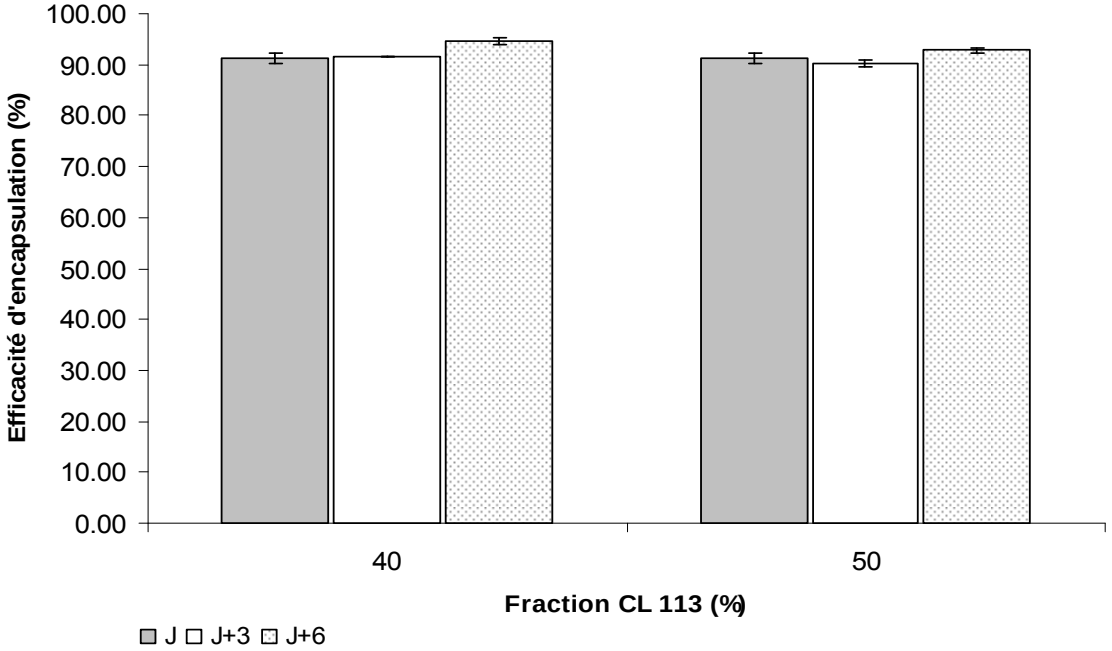


Figure 79 : Influence de la quantité de sel de chitosane (en fraction volumique) et du temps sur le rendement d'encapsulation de l'insuline dans les particules CL 113

La complexation entre le chitosane chlorhydrate et l'insuline a été observée pour les fractions volumiques chitosane : insuline de 40 : 60 et 50 : 50. Les nanoparticules obtenues dans ces deux conditions présentent une taille comprise entre 350 et 450 nm, associée à une charge de surface positive (36-40 mV) et présentent une efficacité d'encapsulation supérieure à 90 %. Ces nanoparticules sont relativement stables (à 4°C) en termes de taille, de charge de surface et ne relarguent pas d'insuline dans leur milieu de complexation, même après 6 jours. Les propriétés des nanoparticules à base de chitosane chlorhydrate sont regroupées dans le tableau 18 :

Fraction volumique CL 113 : Ins	Rapport massique CL 113 : Ins	Rapport de charge CL 113 : Ins	Diamètre moyen (nm)	Polydispersité	Potentiel zêta (mV)	Efficacité d'encapsulation (%)	Taux de charge (%)
40 : 60	1 : 5,25	1,45 + : 1-	475 ± 22	0,445	36,5 ± 0,5	92,4 ± 1,9	28,8 ± 0,1
50 : 50	1 : 3,5	2,75 + : 1-	352 ± 17	0,342	39,7 ± 0,8	91,5 ± 1,3	26,6 ± 0,2

Tableau 18 : Caractéristiques des nanoparticules CL 113 / insuline

Les résultats obtenus ont montré une excellente corrélation avec les travaux décrits par Fernandez-Urrusuno *et al.* concernant des nanoparticules obtenues par gélation ionotropique ; notamment en termes de taille, de charge de surface et d'efficacité d'encapsulation [238].

Néanmoins, afin de permettre l'obtention de ces nanoparticles, il a été nécessaire de procéder à l'ajout de tripolyphosphate afin de réticuler le chitosane et d'obtenir la structure des nanoparticules.

Or, il est important de ne pas perdre de vue, que ce type de nanoparticules est destiné à un usage thérapeutique. Ainsi, l'utilisation de la coacervation complexe, nous a permis d'éviter l'utilisation d'un trop grand nombre de composés, permettant ainsi de restreindre la quantité de matière mise en jeu, tout en conservant les propriétés requises. Les nanoparticules formées par cette technique permettront donc de limiter l'apport de composés étrangers au sein de l'organisme.

Conclusions du chapitre II

Deux types de complexes chitosane / insuline ont pu être obtenus à l'aide des deux chitosanes précédemment caractérisés : le chitosane N-,O-carboxyméthylé (NOCC) et le chitosane chlorhydrate (CL 113). Grâce à la mise en place d'une étape d'optimisation, nous avons pu obtenir des nanoparticules présentant des caractéristiques conformes au cahier des charges établi, à savoir des nanoparticules :

- obtenues à partir d'un polymère naturel et bioassimilable : le chitosane,
- formées à l'aide d'un procédé ne nécessitant ni solvant, ni additif : la coacervation complexe,
- présentant une taille inférieure à 500 nm, permettant le passage de la barrière intestinale,
- une charge de surface positive (+ 40 mV),
- et une efficacité d'encapsulation maximale (~ 90 %).

Nous avons également pu montrer que le DDA, la masse molaire et le pH de la solution de chitosane sont des facteurs influençant la complexation avec l'insuline, notamment en termes de taille et de charge de surface des complexes. Les caractéristiques des différents types de nanoparticules obtenues sont regroupées dans le tableau 19.

Type de chitosane	Fraction chitosane : insuline			Caractéristiques des nanoparticules			
	volumique	massique	charges +/-	Diamètre moyen (nm)	Potentiel zêta (mV)	Efficacité d'encapsulation (%)	Taux de charge (%)
NOCC Mw < 150 kDa ; DA = 60 % DS = 43 %	40 : 60	1 : 5,25	1,53 : 1	574 ± 80	35 ± 1,2	94 ± 1	22 ± 1
	50 : 50	1 : 3,5	2,47 : 1	508 ± 26	40 ± 1,1	85 ± 2	20 ± 2
	60 : 40	1 : 2,33	3,64 : 1	522 ± 274	44 ± 1,2	80 ± 2	14 ± 3
CL 113 Mw = 80 kDa ; DA = 83	40 : 60	1 : 5,25	1,45 : 1	436 ± 69	36 ± 1,5	87 ± 3	28 ± 1
	50 : 50	1 : 3,5	2,75 : 1	326 ± 58	39 ± 1,4	87 ± 4	27 ± 1

Tableau 19 : Caractéristiques des nanoparticules NOCC et CL 113 obtenues par complexation avec l'insuline

Ces travaux nous ont permis de mieux comprendre la formation des complexes entre ces différents chitosanes et l'insuline. Ils feront donc l'objet d'une publication en cours de préparation.

Les nanoparticules répondant au cahier des charges, nous pouvons maintenant passer à l'étude *in vitro* de leur stabilité en conditions physiologiques et à la détermination *in vivo* de leur activité hypoglycémiante.

Chapitre III

Etude comparative *in vitro* et *in vivo* des nanoparticules NOCC / insuline et CL 113 / insuline

Ce troisième et dernier chapitre porte sur l'étude comparative des différents systèmes précédemment obtenus et caractérisés. Les nanoparticules ont été obtenues par coacervation complexe de deux dérivés hydrosolubles du chitosane avec l'insuline : un dérivé chimiquement modifié, le N-,O-carboxyméthyl chitosane (NOCC) et un dérivé obtenu par salification, le chlorhydrate de chitosane (CL).

Les conditions de formation des complexes avec ces deux dérivés du chitosane ont été déterminées par dosage turbidimétrique à l'aide de la densité optique mesurée à 500 nm, pour différentes fractions volumiques entre le chitosane et l'insuline. Lorsque la formation de complexes a été observée, ceux-ci ont été caractérisés par une mesure de taille par diffusion de lumière, par une mesure de charge de surface à l'aide du potentiel zêta et par une détermination de leur efficacité d'encapsulation c'est-à-dire la quantité d'insuline contenue dans ces complexes.

Les nanoparticules formées par complexation avec le NOCC ont été obtenues pour des fractions volumiques chitosane : insuline de 40:60, 50:50 et 60:40. Elles présentent une taille comprise entre 350 et 550 nm, une charge de surface positive (+ 35-45 mV) et une efficacité d'encapsulation de 80-90 %.

Concernant les nanoparticules obtenues par complexation avec le sel de chitosane, leur formation a été observée pour des fractions volumiques chitosane : insuline de 40:60 et 50:50 conduisant à une taille de 350 et 500 nm, une charge de surface positive (+ 35-40 mV) et une efficacité d'encapsulation supérieure à 90 %.

Les nanoparticules obtenues pour chacune de ces fractions ont été étudiées *in vitro* et *in vivo*. Leurs comportements en milieux simulés et leur capacité de relargage de l'insuline ont été étudiés dans des conditions physiologiques simulées. Enfin, leurs effets hypoglycémiants ont été quantifiés après administration à des rats diabétiques et suivis de leur glycémie.

III.1. Etude *in vitro* des nanoparticules NOCC et CL 113

III.1.1. Comportement en milieux simulés

Les nanoparticules précédemment obtenues par coacervation complexe de dérivés hydrosolubles de chitosane (NOCC et chlorhydrate) avec l'insuline ont été étudiées en milieux physiologiques simulés. Afin de déterminer leur comportement dans ces conditions, elles ont été placées en milieux simulés (gastrique et intestinal sans enzyme). Une expérience similaire est réalisée dans l'eau déminéralisée, en tant que contrôle, afin de s'affranchir de la dilution dans le milieu. Enfin, un suivi de la densité optique des solutions a été réalisé nous permettant de suivre une éventuelle décomplexation des particules. En effet, si la densité optique des solutions diminue, il sera possible de conclure que la solution ne contient plus d'objets en suspension et ainsi que les particules n'existent plus sous la forme d'objets nanométriques.

Les figures 80 et 81 présentent respectivement les mesures de densité optique pour les nanoparticules NOCC et CL. Dans les deux cas (nanoparticules NOCC et CL), on observe que les nanoparticules ne résistent absolument pas en conditions gastriques (valeur nulle).

Concernant la résistance des nanoparticules en milieu intestinal, on observe dans les deux cas, une augmentation de la densité optique immédiatement après ajout du milieu intestinal. Cette augmentation se traduit par une précipitation et/ou agrégation des nanoparticules lors de l'ajout du milieu.

Etant donné que cette précipitation ne se produit qu'en conditions intestinales simulées, nous avons cherché à en connaître les raisons. Le milieu intestinal se compose de sels de phosphate associés à un pH de 6,8. Nous avons donc réalisé la même expérience en déposant les nanoparticules d'une part dans une solution de pH 6,8 et d'autre part dans une solution contenant des ions phosphate en quantité équivalente à celle du milieu simulé (figure 82). Suite à ces essais, nous avons pu observer que la précipitation n'était pas due au pH de la solution, mais uniquement à la présence de phosphate. En effet, ceux-ci sont connus pour induire une réticulation ionique du chitosane conduisant à une augmentation de la densité des nanoparticules et à leur précipitation [239, 240]. Prego *et al.* ont également pu observer une

augmentation de la taille de nanocapsules obtenues par émulsion et évaporation de solvant à partir d'un poly(éthylène glycol)-chitosane, après leur incubation en milieu intestinal [241].

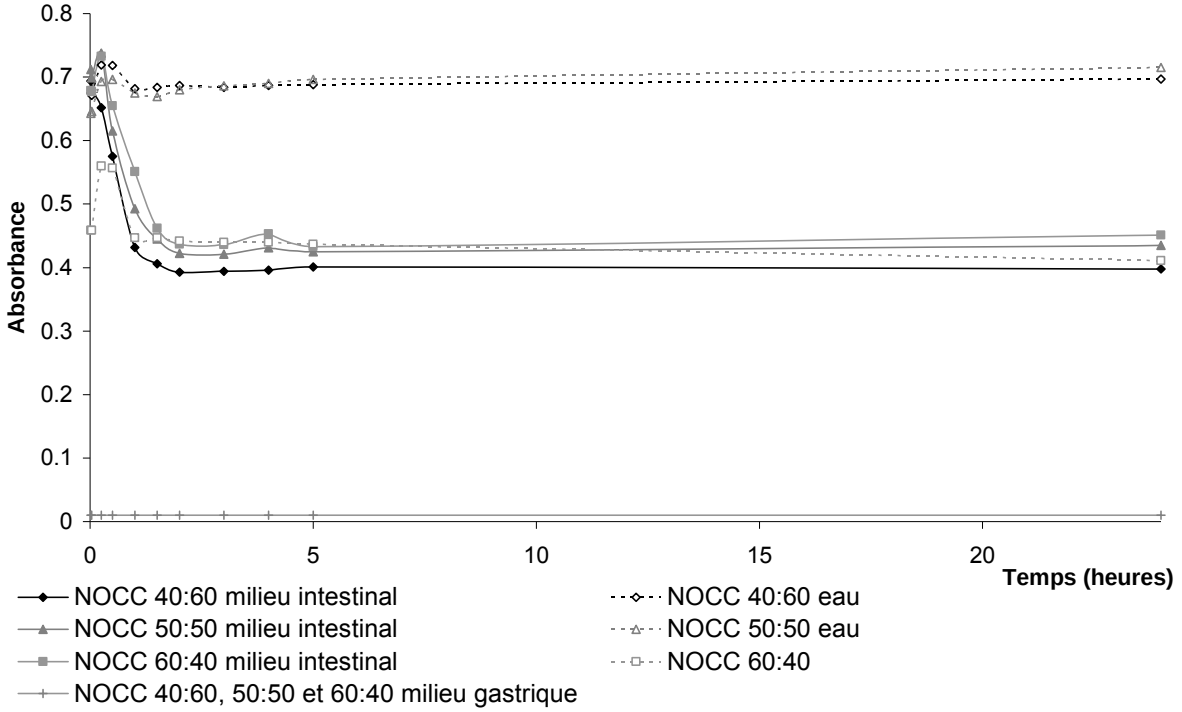


Figure 80 : Comportement des nanoparticules NOCC 40:60, NOCC 50:50 et NOCC 60:40 en milieux simulés

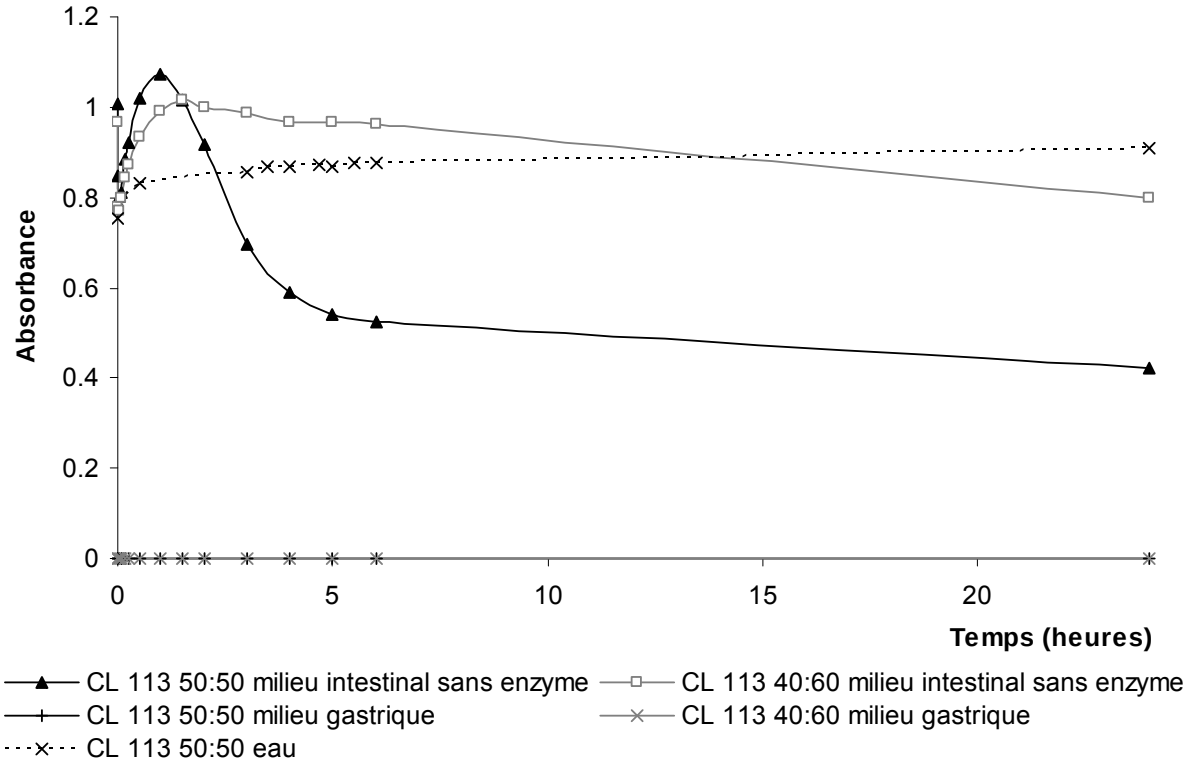


Figure 81 : Comportement des nanoparticules CL 113 40:60 et CL 113 50:50 en milieux simulés (gastrique et intestinal sans enzyme)

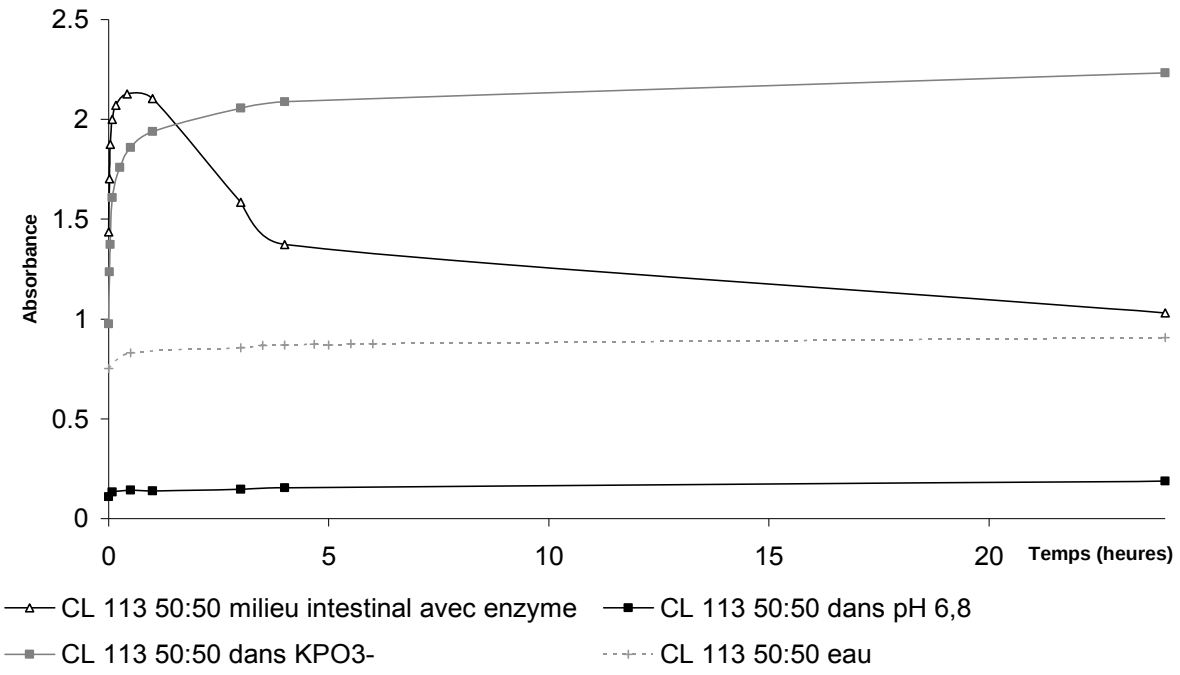


Figure 82 : Comportement des nanoparticules CL 113 50:50 en milieux simulés (intestinal avec enzyme, pH intestinal, force ionique intestinale)

A l'aide des expériences réalisées dans l'eau, on observe que la dilution des nanoparticules influe peu sur leur stabilité : la densité optique des solutions reste quasi-constante. Cette condition servira donc de contrôle en nous indiquant que, dans ces conditions, les nanoparticules sont toujours présentes. Ainsi, on observe que les solutions de nanoparticules en milieu intestinal simulé présentent une densité optique plus faible que celles dans l'eau, 15 minutes après introduction dans le milieu, pour les nanoparticules NOCC et 2 heures pour les nanoparticules CL 113. On estime que si la densité optique est plus faible, c'est très certainement dû à une disparition progressive des nanoparticules. Cette disparition progressive de la turbidité induite par la présence de nanoparticules en suspension, signifie que les nanoparticules sont peu à peu décomplexées par le milieu intestinal. Nous pouvons donc conclure que les nanoparticules présentent une résistance intestinale estimée à 15 minutes pour les nanoparticules NOCC et à 2 heures pour les nanoparticules CL 113.

L'absence totale de turbidité dans le cas des nanoparticules incubées en conditions gastriques, nous indique comme attendu, que les nanoparticules ne présentent aucune résistance en milieu gastrique. Ces résultats confirment la nécessité d'utiliser une double encapsulation à l'aide du vecteur pharmaceutique complexe afin d'apporter une protection gastrique aux nanoparticules contenant l'insuline.

Néanmoins, ces résultats sont à utiliser avec précaution. En effet, ces études n'ont été réalisées qu'en conditions simulées sans enzyme uniquement. La présence d'enzymes et de leurs substrats (chitosane et insuline) pourrait conduire à une dégradation beaucoup plus rapide des nanoparticules, ce qui pourrait engendrer une inactivation de l'insuline dans ces conditions simulées. Toutefois, des études préliminaires (figure 83) ont montré qu'en présence de milieu intestinal avec enzyme (pancréatine), les nanoparticules CL 113 50 :50 montraient une turbidité plus importante qu'en l'absence d'enzyme.

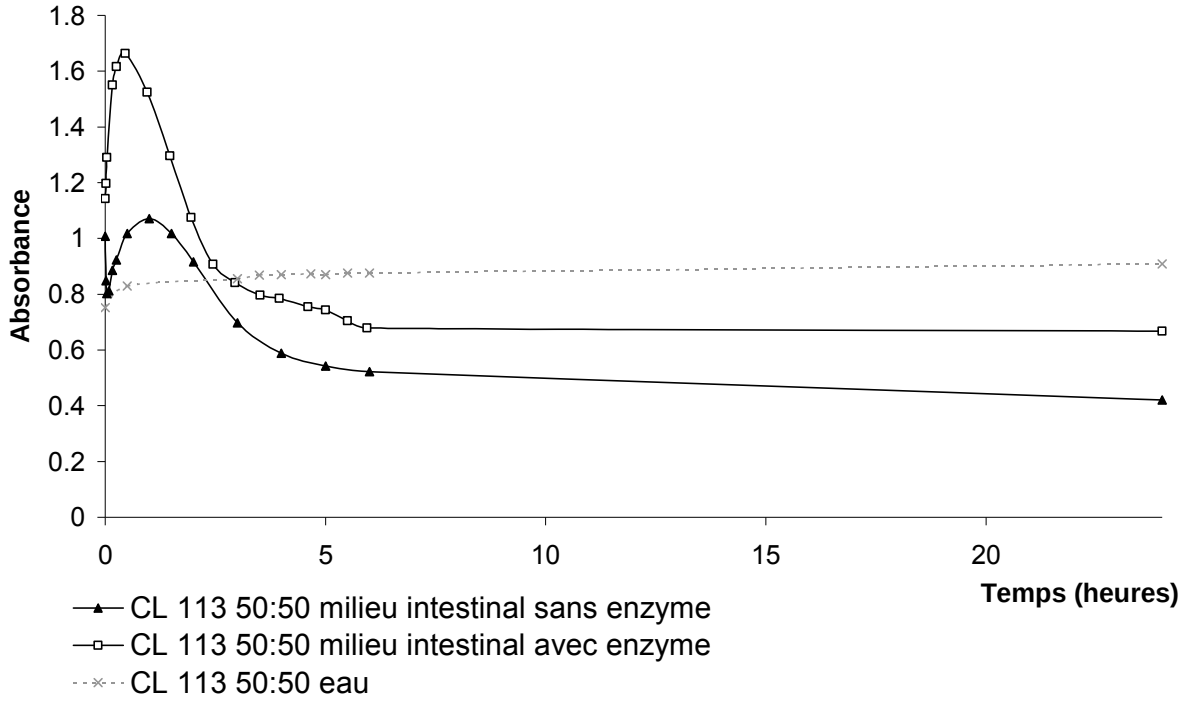


Figure 83 : Comportement des nanoparticules CL 113 50:50 en milieu intestinal simulé avec et sans enzyme

Etant donné qu'il est peu probable que les nanoparticules acquièrent une résistance intestinale par l'ajout de l'enzyme, nous envisageons une autre explication. La pancréatine étant en réalité un mélange de plusieurs enzymes, celles-ci présentent, tout comme l'insuline, des structures chargées, négativement pour la plupart (au pH du milieu). Ainsi, elles peuvent alors soit entrer en compétition avec l'insuline au sein des complexes et conduire à leur propre complexation, soit s'adsorber à la surface des nanoparticules positivement chargées. L'augmentation de turbidité pourrait alors être due à la complexation de ces différentes enzymes ou à l'agrégation des nanoparticules.

III.1.2. Etude de libération de l'insuline en milieux simulés

Dans le but de déterminer la quantité d'insuline libérée des nanoparticules au cours du temps, des études de relargage ont été réalisées en milieux simulés. Les nanoparticules sont incubées dans les différents milieux durant plusieurs heures, puis l'insuline libérée est dosée par UV à 280 nm. Les figures 84 et 85 représentent les quantités d'insuline cumulées relarguées respectivement par les nanoparticules NOCC et CL.

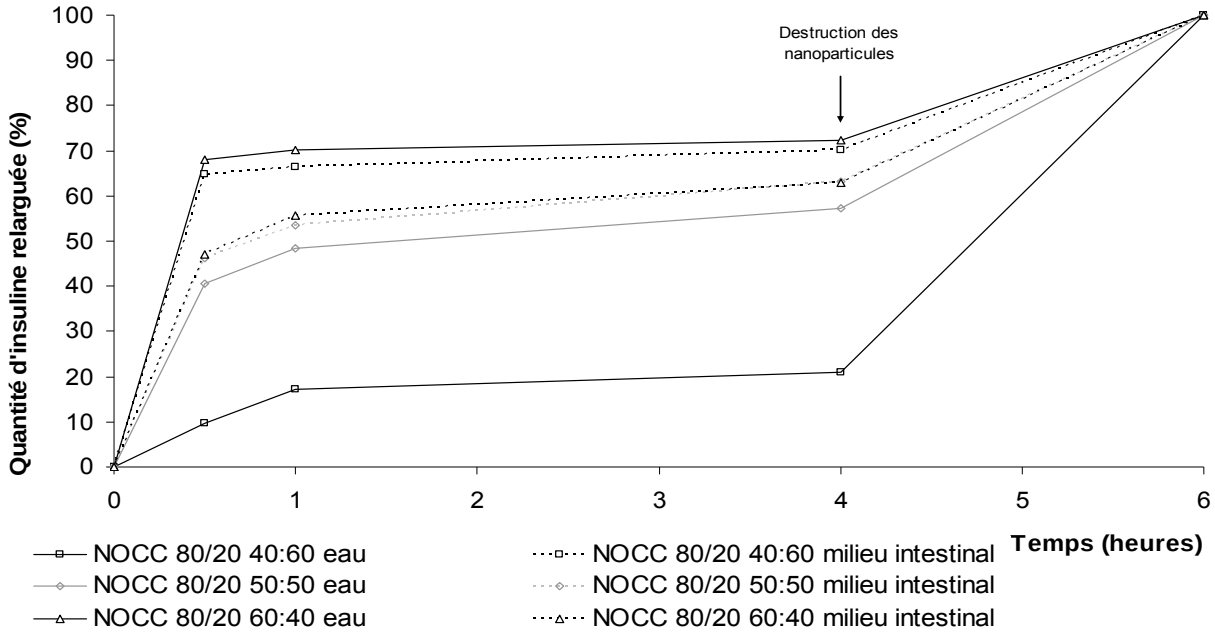


Figure 84 : Relargage de l'insuline des nanoparticules NOCC 40:60, NOCC 50:50 et NOCC 60:40 en conditions physiologiques (37°C en milieux simulés)

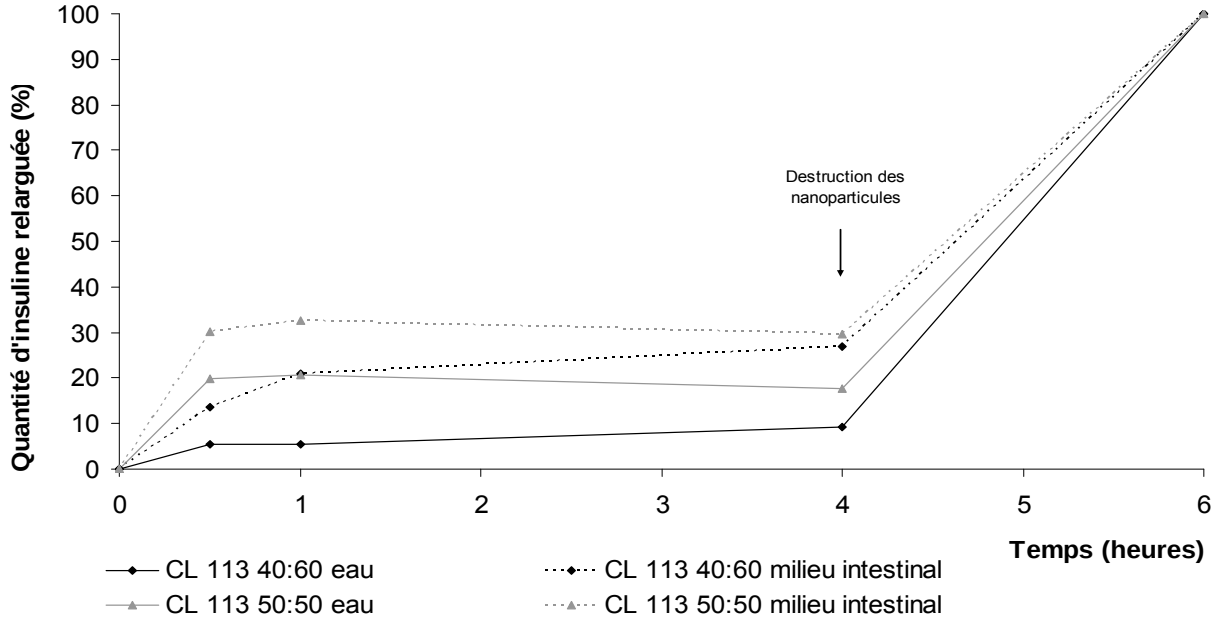


Figure 85 : Relargage de l'insuline des nanoparticules CL 113 40:60 et CL 113 50:50 en conditions physiologiques (37°C en milieux simulés)

Etant donné que les nanoparticules n'ont montré aucune résistance gastrique (libération de la totalité de l'insuline contenue), les courbes présentant la libération de l'insuline en conditions gastriques simulées n'ont volontairement pas été présentées.

Concernant la libération de l'insuline en milieu intestinal simulé sans enzyme, nous pouvons observer que les nanoparticules CL 113 et NOCC se comportent différemment. En effet, les nanoparticules NOCC conduisent instantanément à une libération de près de 50 % de la quantité d'insuline initiale (dès la première mesure). L'observation de ce « burst release » confirme la faible résistance des nanoparticules en conditions intestinales.

Des résultats similaires ont été obtenus par Cui *et al.* dans le cas de la libération d'insuline contenues dans des nanoparticules à base de chitosane greffé poly(méthyl méthacrylate) [242]. De la même façon, Lin *et al.* ont également montré la présence d'un « burst release » immédiatement après mise en contact des nanoparticules NOCC/insuline/TPP avec le milieu intestinal [243]. Dans le cas de ces nanoparticules obtenues par gélation ionotropique, la libération initiale d'insuline est comprise entre 70 et 90 % en fonction du ratio NOCC/TPP utilisé. Bien que nos nanoparticules aient montré une faible résistance en milieu intestinal, la libération d'insuline reste tout de même inférieure aux résultats présentés dans la littérature. Nous allons donc poursuivre l'étude de leurs propriétés biologiques en étudiant leur comportement *in vivo* et leur effet hypoglycémiant.

Dans le cas des nanoparticules CL 113, seuls 30 % sont libérés, et ce, même après 4 heures passées en milieu intestinal. Un léger « burst release » peut également être observé bien que la quantité d'insuline libérée soit faible. Dans le cas de nanoparticules à base de chitosane chlorhydrate obtenues par gélation ionotropique avec le TPP, Fernandez-Urrusuno et al. ont également observé la présence d'un « burst-release » conduisant à une libération totale de l'insuline après seulement 2 heures passées dans le milieu en l'absence d'enzyme [238]. Les nanoparticules obtenues par coacervation complexe présentent donc une meilleure complexation de l'insuline puisque celle-ci conduit à une plus faible libération d'insuline en milieux simulés, et ce, sans ajout de composé réticulant.

On observe, dans les deux cas, qu'après ajout d'une solution décomplexante (NaOH 0,2 mol/L), la totalité de l'insuline a pu être libérée. Il est donc possible de libérer l'intégralité de l'insuline contenue dans les nanoparticules.

III.1.3. Lyophilisation des nanoparticules

Afin de permettre l'étude de la biofonctionnalité des nanoparticules, différentes doses d'insuline libre et encapsulée dans les nanoparticules doivent être administrées aux rats diabétiques. Dans le cadre des administrations par voie intra-duodénale, il est important que les volumes soient inférieurs à 200 µL. Un volume trop important induirait un rinçage de l'intestin empêchant alors l'adhésion des nanoparticules à la muqueuse intestinale. Les nanoparticules seraient alors éliminées par le transit intestinal.

La dose minimale de nanoparticules à administrer permettant l'obtention de la normoglycémie doit être déterminée. Elle servira à quantifier la biodisponibilité. Pour cela, des administrations de différentes doses d'insuline correspondant à 10, 50, 75 et 100 UI/kg sont réalisées. Etant donné qu'un volume d'1 ml de nanoparticules équivaut à une quantité de 50 UI d'insuline par kg de masse corporelle, une concentration des échantillons est nécessaire pour atteindre des concentrations supérieures. Afin de pouvoir administrer les nanoparticules *in vivo* dans des quantités suffisantes, la centrifugation des nanoparticules a été réalisée (15 000 x g, 20 min). Celle-ci a conduit à l'obtention d'un culot et d'un surnageant limpide. Il n'a pas été possible de redisperser ce culot rendant impossible la récupération des nanoparticules. La centrifugation n'est donc pas la technique de séparation la plus adaptée à ce type d'objets. Une autre technique de séparation a été étudiée.

La lyophilisation des nanoparticules a été réalisée de façon à permettre l'obtention de telles concentrations en insuline. Les nanoparticules ont été lyophilisées sans cryoprotecteur. Après lyophilisation, les nanoparticules sont réhydratées et remises en suspension dans un volume connu d'eau déminéralisée. La suspension présente une opacité indiquant la présence d'objets de taille nanométriques. L'intégrité des nanoparticules a été vérifiée à l'aide d'observations en microscopie électronique à transmission confirmant la conservation de particules sphériques et individualisées (figure 86).

Afin de permettre leur administration *in vivo*, il est nécessaire de connaître la quantité d'insuline contenue au sein de ces nanoparticules. Pour cela, l'efficacité d'encapsulation a été déterminée après lyophilisation. Aucune variation de l'efficacité d'encapsulation n'a été observée (tableau 20).

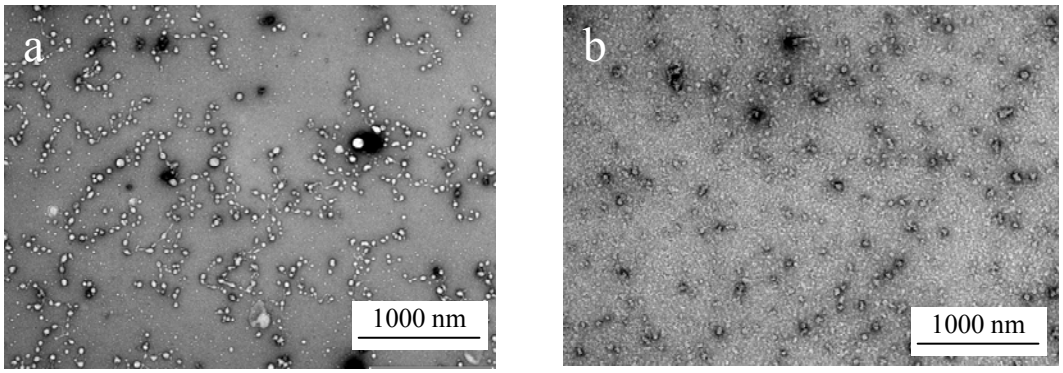


Figure 86 : Observations en microscopie électronique en transmission de nanoparticules CL 113 fraction 50 : 50 lyophilisées (a) et non lyophilisées (b) (dilution 1/50, barre d'échelle 1000 nm)

Type de chitosane	Fraction chitosane : insuline			Avant lyophilisation			Après lyophilisation (sans cryoprotecteur)
	volumique	massique	charges +/-	Diamètre moyen (nm)	Potentiel zêta (mV)	Efficacité d'encapsulation (%)	Efficacité d'encapsulation (%)
CL 113 Mw = 80 kDa ; DA = 83	40 : 60	1 : 5,25	1,45 : 1	436 ± 69	36 ± 1,5	87 ± 3	90 ± 1
	50 : 50	1 : 3,5	2,75 : 1	326 ± 58	39 ± 1,4	87 ± 4	88 ± 1
NOCC Mw < 150 kDa ; DA = 60 % DS = 42,5 %	40 : 60	1 : 5,25	1,53 : 1	574 ± 80	35 ± 1,2	94 ± 1	93 ± 3
	50 : 50	1 : 3,5	2,47 : 1	508 ± 26	40 ± 1,1	85 ± 2	82 ± 5
	60 : 40	1 : 2,33	3,64 : 1	522 ± 274	44 ± 1,2	80 ± 2	80 ± 3

Tableau 20 : Efficacité d'encapsulation de l'insuline dans les nanoparticules lyophilisées

Les nanoparticules ayant été caractérisées après lyophilisation, une étude de leurs propriétés peut débuter par l'intermédiaire d'essais *in vivo*.

III.2. Etude *in vivo* de l'effet hypoglycémiant des nanoparticules NOCC et CL 113

III.2.1. Injections sous-cutanées de nanoparticules non lyophilisées

Afin de déterminer la conservation de l'activité biologique de l'insuline après encapsulation au sein de nanoparticules, des solutions d'insuline non encapsulée (solution d'Umuline®) et des suspensions d'insuline encapsulée au sein de nanoparticules à base de NOCC ou de CL 113, sont administrées à des rats diabétiques par l'intermédiaire d'une injection sous-cutanée, à raison de 10 UI d'insuline par kg de masse corporelle. Des suivis glycémiques sont réalisés sur les animaux ayant reçus de l'insuline ainsi que sur des animaux contrôles ayant reçus une injection de sérum physiologique afin de mimer le stress subi lors de la manipulation.

La figure 87 montre la diminution de la glycémie chez des animaux ayant reçu les nanoparticules NOCC de fractions volumiques 40:60, 50:50 et 60:40. La figure 88 représente la diminution du taux de glucose sanguin des animaux ayant reçus les nanoparticules CL 113 de fractions 40:60 et 50:50.

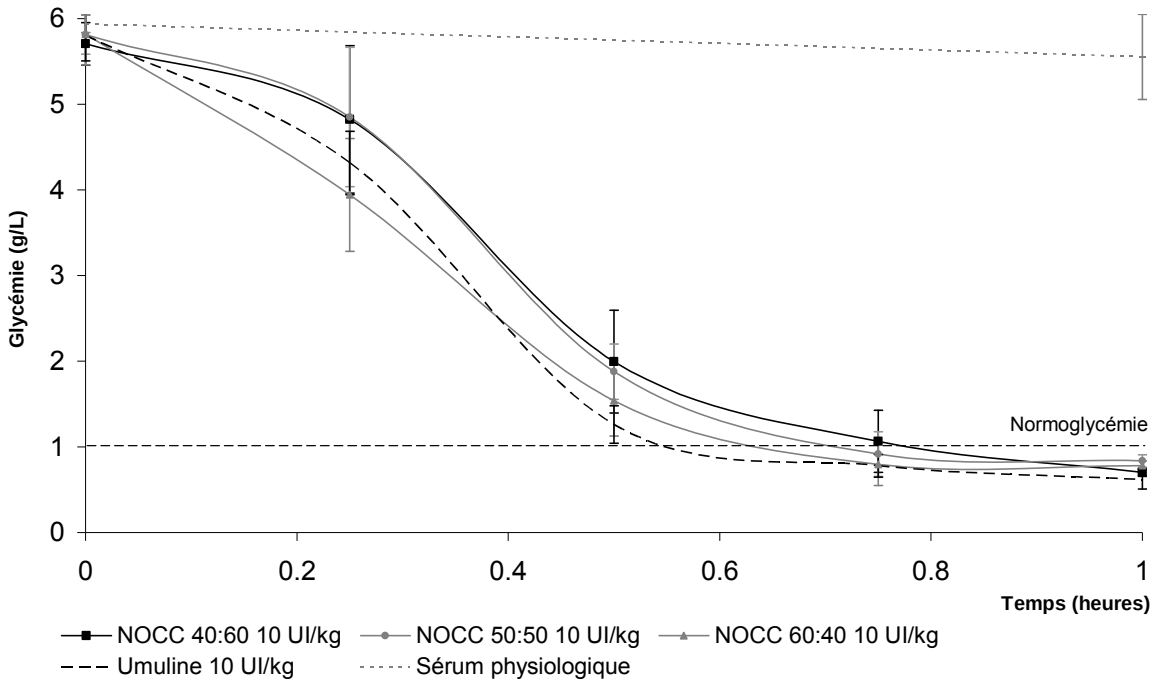


Figure 87 : Administration sous-cutanée de nanoparticules NOCC 40:60 (n=4), NOCC 50:50 (n=4) et NOCC 60:40 (n=4) en comparaison à de l'Umuline® non encapsulée (n=6) et du sérum physiologique (n=2)

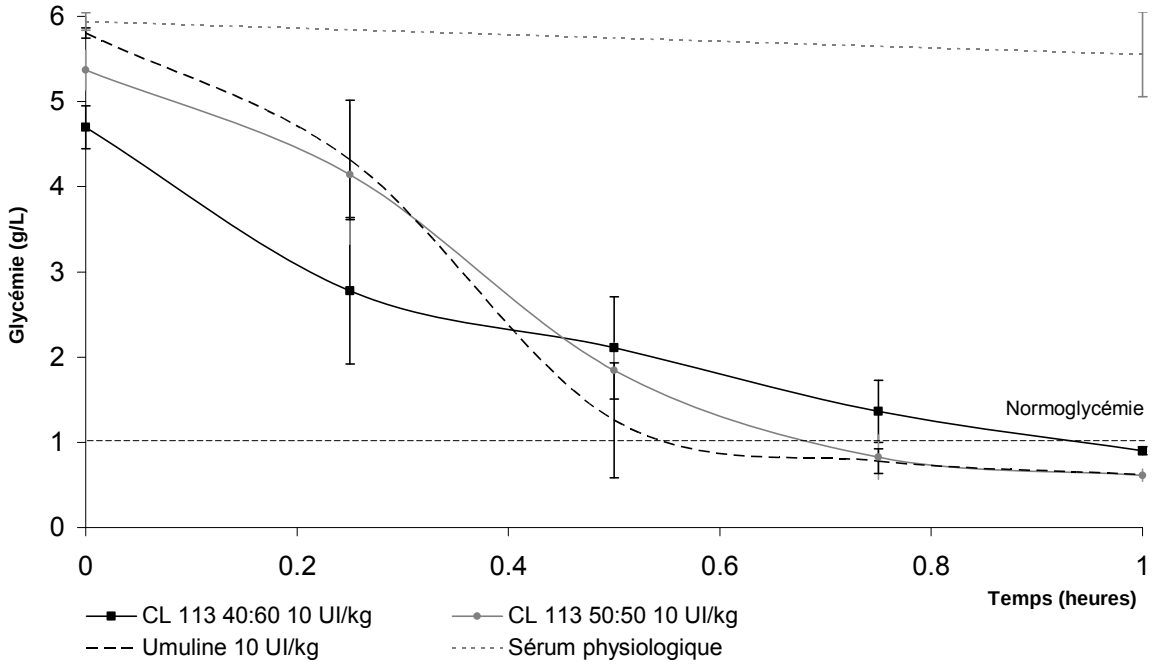


Figure 88 : Administration sous-cutanée de nanoparticules CL 113 40:60 (n=4) et CL 113 50:50 (n=4) en comparaison à de l'Umuline® non encapsulée (n=6) et du sérum physiologique (n=2)

Pour les nanoparticules obtenues dans chacune de ces conditions, une diminution de glycémie est observée et ce, jusqu'à l'obtention d'une normoglycémie, 45 minutes après injection. Etant donné que les animaux n'ayant pas reçu d'insuline ne présentent pas de diminution de la glycémie, cette diminution ne peut être attribuée qu'à cette administration. L'observation d'une diminution du taux de glucose sanguin des animaux signifie que l'encapsulation de l'insuline au sein des nanoparticules ne modifie pas son activité biologique puisque avec ou sans encapsulation, son activité est identique. De plus, dans les deux cas (insuline libre et insuline encapsulée), la normoglycémie est atteinte au même moment. Cette observation nous indique que l'encapsulation n'influence pas son délai d'action et que la libération d'insuline des nanoparticules est rapide. Cette libération rapide de l'insuline est due à la structure des nanoparticules. Les complexes de polyélectrolytes sont des structures stabilisées uniquement par interactions électrostatiques. Ainsi dès que celles-ci sont modifiées (variation de pH, force ionique, présence d'espèces chargées …), le complexe perd en stabilité. En conditions physiologiques, la présence de ces agents déstabilisants provoque une décomplexation rapide de l'insuline engendrant sa libération. Si cette libération s'effectue alors qu'elle n'est pas désirée, comme par exemple dans le milieu intestinal, elle peut conduire à une dénaturation de l'insuline la rendant par la suite biologiquement inactive. Ce comportement peut donc s'avérer être un inconvénient dans le cas où la libération de l'insuline se produirait avant l'absorption des nanoparticules par l'épithélium intestinal.

III.2.2. Injections sous-cutanées de nanoparticules lyophilisées

De façon analogue, des administrations d'insuline non encapsulée (solution d'Umuline®) et d'insuline encapsulée dans des nanoparticules (à base de NOCC ou de CL) lyophilisées sont réalisées chez des rats diabétiques par l'intermédiaire d'injections sous-cutanées, à raison de 10 UI d'insuline par kg de masse corporelle. Des suivis glycémiques sont réalisés sur les animaux ayant reçus de l'insuline afin de vérifier la conservation de l'activité biologique de l'insuline ainsi que l'intégrité des nanoparticules après lyophilisation. Dans le but de mimer le stress subi lors de la manipulation des animaux, des mesures de glycémie sont réalisées sur des animaux contrôles ayant reçus une injection de sérum physiologique.

Les figures 89 et 90 présentent respectivement la diminution de la glycémie chez des animaux ayant reçu les nanoparticules NOCC et CL (de fractions volumiques variables). Sur

les deux figures, les diminutions de glycémie conduisent à la normoglycémie des animaux environ 1 heure après injection des nanoparticules.

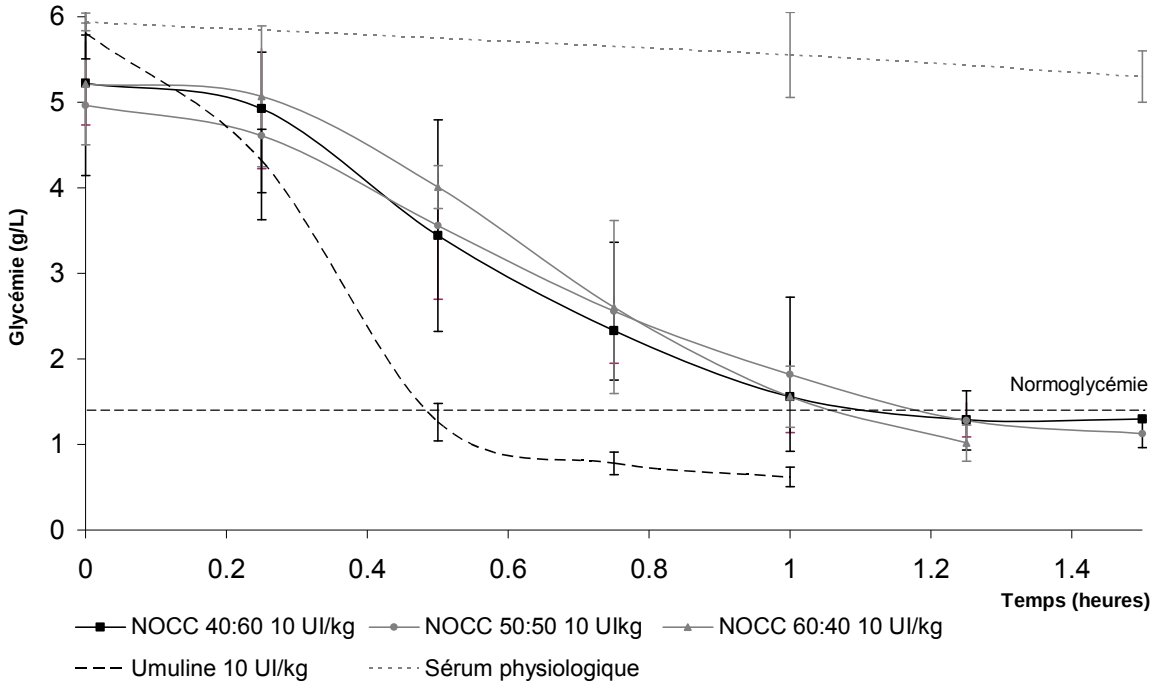


Figure 89 : Administration sous-cutanée de nanoparticules NOCC 40:60 (n=4), NOCC 50:50 (n=4) et NOCC 60:40 (n=3) lyophilisées en comparaison à de l'Umuline® non encapsulée (n=6) et du sérum physiologique (n=2)

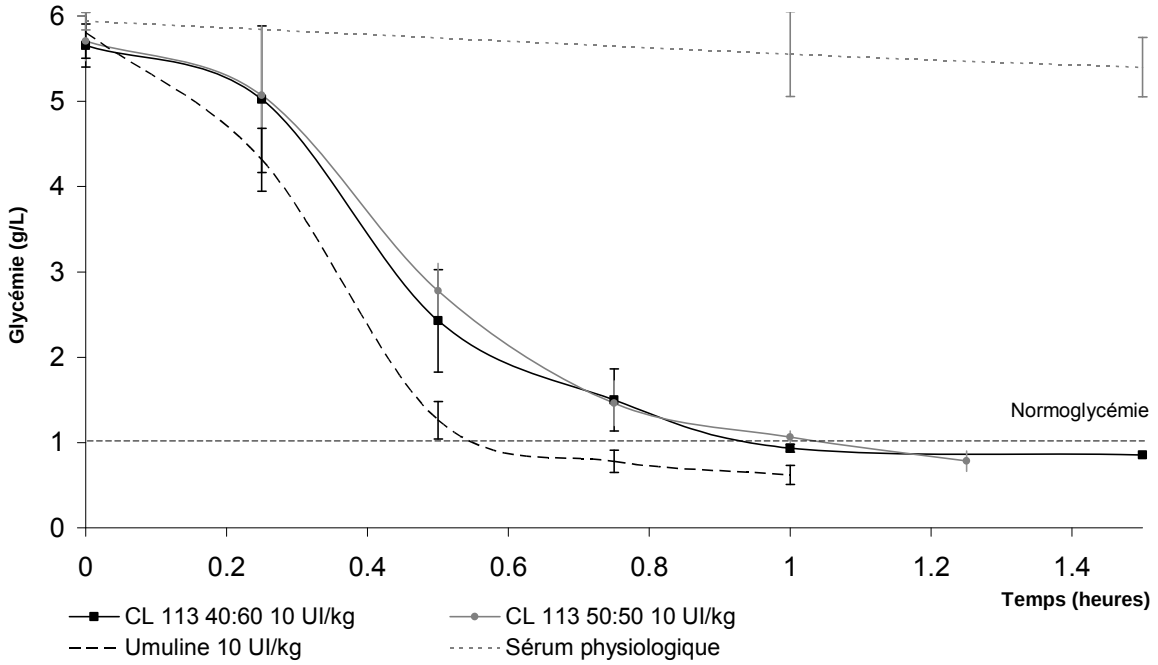


Figure 90 : Administration sous-cutanée de nanoparticules CL 113 40:60 (n=4) et CL 113 50:50 (n=4) lyophilisées en comparaison d'Umuline® non encapsulée (n=6) et du sérum physiologique (n=2)

On observe que la normoglycémie est atteinte près de 30 minutes après injection d'insuline non encapsulée et après 1 heure dans le cas des nanoparticules lyophilisées. La présence d'un retard à la normoglycémie, de près de 30 minutes, indique que la lyophilisation des nanoparticules induit un délai d'action de l'insuline plus long que pour des nanoparticules non lyophilisées.

Des injections d'insuline lyophilisée non encapsulée réalisées dans des conditions similaires n'ont montré aucune modification de son activité biologique, indiquant que la lyophilisation n'avait aucune influence sur l'insuline. Ce retard à la normoglycémie est donc directement imputable aux nanoparticules.

Il pourrait être expliqué par un changement de la structure des nanoparticules engendrant ainsi un comportement différent en conditions physiologiques. Elles pourraient notamment présenter une structure plus compacte, induite par la déshydratation, qui pourrait conduire à une surface plus solide. La décomplexation chitosane / insuline prendrait donc plus de temps à se faire. Nous avons vu que, dans le cas des nanoparticules non lyophilisées, la décomplexation relativement rapide pourrait conduire à une dénaturation de l'insuline si celle-ci était libérée avant que les particules n'aient été absorbées par l'épithélium intestinal.

Ainsi, la présence d'un délai d'action induit par la lyophilisation représente un avantage à l'utilisation de ce procédé. En effet, bien que l'insuline conserve son activité biologique après lyophilisation, ce procédé induit tout de même des modifications au niveau des nanoparticules pouvant permettre leur passage à travers l'épithélium intestinal avant que la décomplexation n'ait lieu, évitant ainsi une éventuelle dénaturation de l'insuline avant l'adsorption des nanoparticules. La lyophilisation a déjà été identifiée comme permettant de modifier le comportement des nanoparticules [244].

Nous pouvons ainsi conclure que la lyophilisation peut être utilisée afin d'atteindre des concentrations en insuline supérieures nécessaires aux administrations intra-duodénales de nanoparticules d'insuline.

III.2.3. Administrations intra-duodénales de nanoparticules

Afin de simuler au mieux les conditions physiologiques subies par les nanoparticules lors de leur administration orale, des administrations intra-duodénales sont réalisées. En effet,

l'utilisation d'un vecteur pharmaceutique complexe (précédemment présenté en introduction) inclut l'utilisation d'un véhicule gastro-résistant visant à libérer les nanoparticules en milieu intestinal. Ainsi, les nanoparticules sont administrées au niveau du duodénum à l'aide d'un cathéter préalablement implanté chez l'animal afin d'introduire les nanoparticules à l'endroit où elles devraient être libérées par le vecteur. Les nanoparticules à base de NOCC et de CL 113 contenant de l'insuline, sont donc administrées par voie intra-duodénale à des concentrations de 50, 75 et 100 UI par kg de masse corporelle. Des administrations de ces mêmes particules par voie sous-cutanée sont utilisées comme contrôle positif afin de confirmer la conservation de l'activité biologique des nanoparticules. Une injection intra-duodénale de sérum physiologique sert également de contrôle négatif afin de mimer le stress engendré par l'expérience.

Les figures 91 et 92 représentent les diminutions de glycémie associées à l'administration à 50 UI/kg de nanoparticules non lyophilisées et lyophilisées obtenues à base de NOCC et de CL 113 respectivement, pour la fraction volumique 50 : 50. Les résultats obtenus pour les autres conditions de formation des nanoparticules NOCC sont présentés en annexe D.

La figure 91, obtenue après administration des nanoparticles NOCC, montre une légère diminution de la glycémie. Toutefois, les animaux n'ayant reçu aucune injection d'insuline présentent également une diminution de glycémie dans des proportions similaires. Celle-ci ne peut donc être attribuée qu'à l'effet du jeun des animaux sur leur glycémie. Toutefois, il est possible d'observer que la pente des courbes pour les intervalles de temps proches de l'administration est significativement différente de celle des sujets ayant reçu du sérum physiologique. Il est donc envisageable que les animaux n'aient pas reçu suffisamment d'insuline pour atteindre la normoglycémie. Pour le vérifier, ces mêmes nanoparticules ont été administrées à des doses plus élevées (75 et 100 UI/kg) après lyophilisation (courbes en annexes D). Aucune de ces administrations n'a néanmoins permis d'atteindre la normoglycémie.

Ceci pourrait être expliqué par la faible résistance des nanoparticules préalablement observée en milieu intestinal simulé. En effet, les nanoparticules NOCC n'ont montré de résistance en conditions simulés que pendant les 15 premières minutes, temps beaucoup trop court pour qu'elles aient pu avoir le temps de s'adsorber et de traverser l'épithélium intestinal. Elles ont donc très certainement été décomplexées, libérant ainsi l'insuline, avant d'avoir pu

rejoindre la circulation sanguine. L'insuline, libérée en milieu intestinal, a donc été dégradée avant d'avoir pu permettre une diminution de la glycémie.

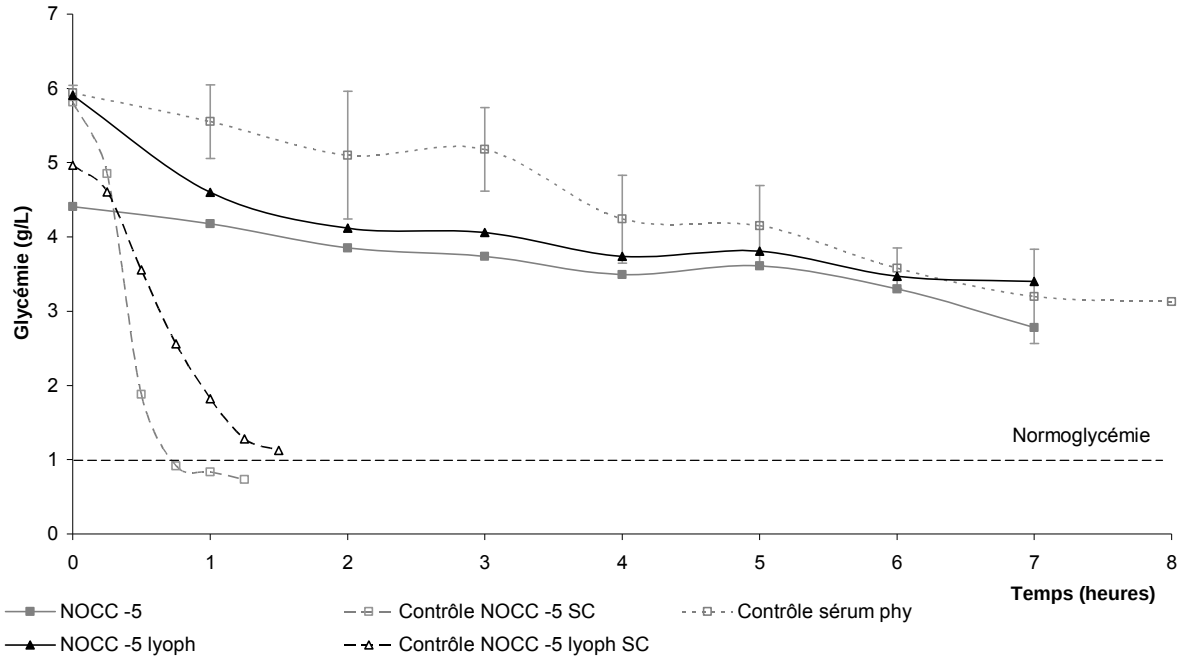


Figure 91 : Administration intra-duodénale de nanoparticules NOCC 50:50 lyophilisées (n=1) et non lyophilisées (n=1) à 50 UI/kg en comparaison à une injection sous-cutanée (10 UI/kg) de nanoparticules (n=4) et de sérum physiologique (n=2)

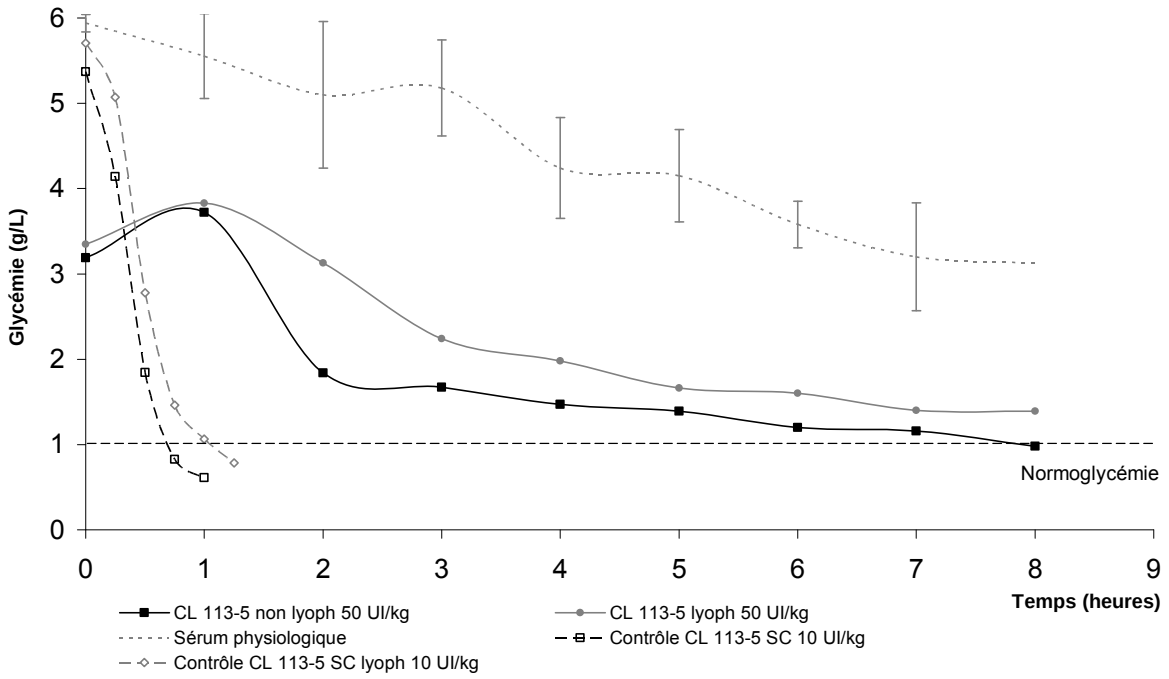


Figure 92 : Administration intra-duodénale de nanoparticules CL 113 50:50 lyophilisées (n=1) et non lyophilisées (n=1) à 50 UI/kg en comparaison à une injection sous-cutanée (10 UI/kg) de nanoparticules (n=4) et de sérum physiologique (n=2)

Le suivi de la glycémie des animaux ayant reçu une administration intra-duodénale de nanoparticules CL 113 (figure 92) permet l'observation d'une diminution de glycémie 1 heure après l'administration. La normoglycémie est atteinte 8 heures après administration des nanoparticules. Cette diminution étant significativement différente de celle observée chez les rats contrôles ayant reçu une solution de sérum physiologique, elle peut être directement attribuée à l'effet hypoglycémiant de l'insuline contenue dans les nanoparticules.

L'observation de cette normoglycémie nous permet d'affirmer que les nanoparticules ont parfaitement joué leur rôle de protection intestinale vis-à-vis de l'insuline. De plus, pour que cette diminution de glycémie ait pu avoir lieu, les nanoparticules ont été amenées à rejoindre la circulation sanguine, via l'épithélium intestinal, et à libérer l'insuline.

Ces nanoparticules ayant montré une résistance en milieu intestinal équivalente à 1 heure, elles ont ainsi pu, contrairement aux nanoparticules NOCC, traverser la barrière intestinale et libérer l'insuline avant que celle-ci soit exposée aux agressions intestinales.

Nous pouvons donc affirmer que les nanoparticules sont capables de traverser la barrière intestinale, tout en protégeant l'insuline et en permettant sa libération.

Nous avons également pu observer la présence d'un délai de 8 heures entre l'administration des nanoparticules et l'obtention de la normoglycémie, que nous avons cherché à attribuer.

Des travaux précédemment réalisés ont permis de montrer la présence d'une durée de 8 heures entre l'observation d'un pic d'insuline et la normoglycémie après administration intra-duodénale de nanoparticules d'insuline [219]. Ces résultats nous ont indiqué que l'action de l'insuline n'était pas immédiatement obtenue après ce type d'administration.

De plus, une étude de la durée du transit de nanoparticules administrées par voie orale a été estimée à 4 heures, temps nécessaire pour rejoindre le côlon [245]. Dans ces travaux, les animaux ont subi un jeun d'une durée d'une nuit afin de limiter l'interaction avec le contenu du bol alimentaire. Bien que dans notre cas, les nanoparticules soient administrées au niveau du duodénum, réduisant ainsi la durée du transit, les rats n'ont pas subi de jeun la nuit précédente l'expérience. Ainsi, le contenu intestinal a également pu ralentir la progression des nanoparticules.

Nous pouvons ainsi supposer que ce délai d'action n'est donc pas directement lié au comportement des nanoparticules, mais uniquement induit par le temps de transport nécessaire pour rejoindre leur lieu d'adhésion, puis traverser l'épithélium intestinal.

Ce délai obtenu avec des nanoparticules contenant une insuline rapide, pourrait être assimilé au comportement d'une insuline lente, proposant ainsi une autre alternative à l'utilisation de ces nanoparticules.

III.2.3. Détermination de la bioefficacité des nanoparticules

La bioefficacité des nanoparticules est définie comme le rapport de la dose minimale d'insuline en solution administrée par voie sous-cutanée (SC) nécessaire pour atteindre la normoglycémie sur cette même dose pour les nanoparticules administrées par voie intra-duodénale (ID) :

$$\text{Bioefficacité (\%)} = \frac{\text{dose minimale d'insuline en solution (en UI/kg) administrée par SC}}{\text{dose minimale d'insuline encapsulée (en UI/kg) administrée par ID}} \text{ x } 100$$

La dose minimale d'insuline non encapsulée à administrer par voie sous-cutanée a déjà été déterminée dans de précédentes études [219]. Il a en effet été montré qu'une dose correspondant à 10 UI/kg suffisait à induire une normoglycémie chez les animaux.

Concernant l'administration par voie intra-duodénale, nous avons pu déterminer dans le cas des nanoparticules NOCC qu'aucune des conditions testées ne permettait l'obtention de la normoglycémie.

Les nanoparticules CL 113 ont, quant à elles, permis d'atteindre cette normoglycémie pour des injections à 50 UI/kg. La bioefficacité des nanoparticules CL 113 obtenues pour le ratio 50 : 50 est de 20 %. Cela signifie que seule 20 % de la quantité d'insuline administrée participe à la diminution de la glycémie.

Etant donné que nous n'avons pas eu la possibilité de réaliser d'autres administrations à des doses inférieures, nous pouvons d'ores et déjà affirmer que la bioefficacité est d'au moins 20 %. Bien que cette valeur semble relativement faible, des résultats identiques ont été obtenus dans la littérature [97, 246].

Ces valeurs ne nous indiquent pas quelle est la quantité d'insuline qui traverse réellement la barrière de l'épithélium intestinal. Il faudrait pour cela avoir recours à la détermination de la biodisponibilité permettant de définir la quantité d'insuline présente dans le sang. Celle-ci peut être réalisée par le biais d'une administration de nanoparticules d'insuline suivie de

dosages insulinémiques de sang prélevé au niveau de la carotide afin d'éviter l'hémolyse du sang. L'hémolyse est un phénomène irréversible par lequel les globules rouges sont détruits. Ils libèrent alors l'insulinase (enzyme qui dégrade l'insuline) qu'ils contiennent, ce qui entraîne une sous-estimation de la quantité d'insuline [247]. Néanmoins, le dosage de l'insuline par cette technique ne permet pas de quantifier la quantité réelle d'insuline adsorbée au niveau intestinal. La présence du premier passage hépatique réduit la quantité d'insuline présente dans la veine porte de près de 50 % [248].

Pour cela, une autre technique a été mise au point. Elle consiste à administrer des nanoparticules contenant le peptide-C à la place de l'insuline. Le peptide-C fait partie du précurseur de l'insuline (pré-pro-insuline). Sécrété de façon équi-molaire à l'insuline, il permet le dosage de l'insuline sans être soumis ni à l'hémolyse, ni à l'extraction hépatique [249, 250].

Pour être utilisée, cette technique nécessite l'encapsulation du peptide-C dans les mêmes conditions que l'insuline. Or, la formation de nanoparticules par coacervation complexe est gouvernée par les interactions électrostatiques. Le point isoélectrique du peptide-C étant de 3,3 [251], la complexation se fera dans des conditions de charges différentes de celles de l'insuline. Afin de permettre la formation de ces nanoparticules, il est donc nécessaire de refaire toute l'étude de la complexation, c'est pourquoi elle n'a pas été réalisée.

Conclusions du chapitre III

Le comportement des nanoparticules obtenues à partir des chitosane NOCC et CL 113 a été étudié, *in vitro* en milieux simulés, ainsi qu'en conditions physiologiques *in vivo*.

Nous avons pu observer que les nanoparticules NOCC présentaient une résistance intestinale faible (15 minutes) contrairement aux nanoparticules CL 113, capables de résister une heure en conditions intestinales sans enzyme. Nous avons également observé que les nanoparticules relarguaient près de 50 % de l'insuline initialement contenue, alors que les nanoparticules à base de sel de chitosane ne libéraient pas plus de 30 % de cette même quantité initiale.

Des administrations sous-cutanées de nanoparticules à des rats diabétiques, suivies de prises de glycémie ont permis de montrer la conservation de l'activité biologique de l'insuline lors du procédé d'encapsulation. Les résultats obtenus suite aux administrations intra-duodénales de ces mêmes nanoparticules, ont permis de montrer l'activité hypoglycémiante de ces nanoparticules (tableau 21).

Les deux types de nanoparticules ont permis la diminution de la glycémie. Toutefois, étant donné leur faible résistance en milieu simulé et leur importante libération d'insuline, les nanoparticules NOCC n'ont pas montré d'activité hypoglycémiante suffisante pour atteindre la normoglycémie. Seules les nanoparticules obtenues avec le chitosane chlorhydrate ont permis d'obtenir une diminution de glycémie conduisant à la normoglycémie, près de 8 heures après l'administration des nanoparticules.

Les résultats *in vitro* obtenus en milieux physiologiques simulés ont montré une corrélation intéressante avec les résultats obtenus *in vivo*. Ils représentent ainsi une méthode simple permettant d'estimer le comportement *in vivo* des nanoparticules.

Type de chitosane	Fraction volumique chitosane : insuline	Caractéristiques des nanoparticules				Résistance *in vitro*		Normoglycémie atteinte *in vivo*
		Diamètre moyen (nm)	Potentiel zêta (mV)	Efficacité d'encapsulation (%)	Taux de charge (%)	Milieu gastrique	Milieu intestinal	
CL 113 Mw = 80 kDa ; DA = 83 %	40 : 60	436 ± 69	36 ± 1,5	87 ± 3	28 ± 1	×	1 heure	✓
	50 : 50	326 ± 58	39 ± 1,4	87 ± 4	27 ± 1	×	1 heure	✓
NOCC Mw < 150 kDa ; DA = 60 % DS = 43 %	40 : 60	574 ± 80	35 ± 1,2	94 ± 1	22 ± 1	×	15 min	×
	50 : 50	508 ± 26	40 ± 1,1	85 ± 2	20 ± 2	×	15 min	×
	60 : 40	522 ± 274	44 ± 1,2	80 ± 2	14 ± 3	×	15 min	×

Tableau 21 : Récapitulatif des caractéristiques des nanoparticules NOCC et CL

Nous pouvons désormais confirmer que ces nanoparticules permettent :

- la conservation de l'activité biologique de l'insuline,
- la protection de l'insuline vis-à-vis du milieu intestinal,
- la traversée de l'épithélium intestinal,
- la libération de l'insuline,
- ainsi que l'obtention d'une biodisponibilité d'au moins 20 %.

La poursuite de ces études devrait prochainement permettre la publication d'un article, actuellement en cours de préparation.

Conclusion générale et perspectives

Dans le cadre du traitement du diabète, l'administration d'insuline se fait, aujourd'hui, essentiellement par le biais d'injections inconfortables et contraignantes pour le patient. Les travaux visant à permettre son administration par voie orale deviennent de plus en plus prometteurs. Ainsi, nous avons pu contribuer à ces recherches par le biais du développement de nanoparticules d'insuline destinées à être administrées par voie orale après encapsulation dans un véhicule gastro-résistant pour former le vecteur pharmaceutique complexe.

Ce travail a uniquement porté sur le développement du système particulaire ayant pour but de contenir et de protéger l'insuline. Un cahier des charges a pu être établi, définissant ainsi les propriétés requises par ce système nanoparticulaire qui doit:

- Etre obtenu à partir d'un matériau naturel et bioassimilable,
- Etre développé à l'aide d'un procédé ne nécessitant ni solvant, ni additif,
- Contenir et protéger l'insuline avec un rendement d'encapsulation maximal,
- Etre stable dans des conditions physiologiques, notamment en milieu intestinal (la protection gastrique étant apportée par le véhicule),
- Présenter une taille inférieure à 500 nm lui permettant de traverser la barrière intestinale,
- Etre positivement chargé, de façon à maximiser le passage à travers la barrière intestinale,
- Présenter une activité hypoglycémiante.

Afin de répondre à ce cahier des charges, différentes études ont été réalisées pour conduire à l'obtention de ce système. Le chitosane a été choisi comme polymère naturel d'origine animale, présentant un caractère bioassimilable clairement identifié. Son utilisation dans le cadre de l'encapsulation d'insuline a nécessité d'accroître sa solubilité afin de permettre son utilisation à pH physiologique. Pour y parvenir, deux approches ont été utilisées : une approche chimique à l'aide d'un greffage covalent et une approche ionique à l'aide d'un procédé de salification. Afin de contrôler précisément ces modifications, il a été nécessaire de connaître parfaitement les caractéristiques du chitosane. Ainsi, des caractérisations de son DDA et de son pKa ont été réalisées par RMN et dosages pHmétrique/conductimétrique.

A l'aide d'une réaction de carboxyméthylation, un dérivé hydrosoluble du chitosane a pu être obtenu : le N-,O-carboxyméthyl chitosane (NOCC). Afin de permettre son utilisation

dans la complexation de l'insuline, il a également été nécessaire de connaître parfaitement ses caractéristiques telles que son degré de désacétylation, son pKa et son degré de substitution.

Au sein du laboratoire, des nanoparticules de PLGA obtenues par double émulsion et évaporation de solvant ont montré d'excellentes capacités hypoglycémiantes [219]. Néanmoins, ces nanoparticules, de par leur technique d'obtention, présentent des inconvénients potentiels à l'utilisation thérapeutique. En effet, la présence de solvants, de tensioactifs et d'un polymère synthétique plus difficilement dégradable, peut engendrer une toxicité éventuelle pour l'organisme.

Afin de s'affranchir de l'utilisation de solvants et d'additifs, nous avons choisi d'utiliser la technique de coacervation complexe permettant la formation de complexes de polyélectrolytes, dans des conditions aqueuses douces, non dénaturantes pour les principes actifs protéiques comme l'insuline. Une étude de la complexation entre les chitosanes (NOCC ou sels de chitosane) et l'insuline a été réalisée, dans le but de déterminer les conditions de formation de ces complexes. Des mesures de diffusion de lumière, de potentiel zêta et d'efficacité d'encapsulation ont été effectuées sur les complexes formés, afin de définir leurs caractéristiques.

Des complexes de diamètre moyen avoisinant les 500 nm ont été obtenus (400 nm pour le chitosane chlorhydrate, 550 nm pour le NOCC). Ils présentent une charge de surface fortement positive (+ 40 mV) et contiennent une quantité d'insuline équivalente à 90 % de la quantité initialement introduite. Ces nanoparticules ont montré une excellente stabilité dans le temps (6 jours à 4°C) en termes de taille et de charge de surface, et elles ne libèrent pas d'insuline dans leur milieu de complexation même après 6 jours.

Des essais *in vitro* ont permis l'étude de leur comportement en milieux physiologiques simulés. Ainsi, nous avons pu observer que les nanoparticules ne présentaient aucune résistance en conditions gastriques d'où la nécessité d'utiliser une protection gastro-résistante, apportée par le véhicule du vecteur pharmaceutique complexe. En conditions intestinales (sans enzyme), les nanoparticules obtenues à partir du NOCC montrent une faible résistance, limitée à 15 minutes et libèrent quasi-instantanément près de 50 % de leur contenu en insuline. Concernant les nanoparticules à base de chitosane chlorhydrate, celles-ci résistent près d'un 1 heure dans ces mêmes conditions et ne libèrent que 30 % d'insuline.

Afin de vérifier que les nanoparticules obtenues répondaient bien au cahier des charges établi, nous avons vérifié leur activité hypoglycémiante à l'aide de manipulations *in vivo* consistant en leur administration par voie sous-cutanée puis intra-duodénale à des rats préalablement rendus diabétiques. Les variations de glycémie ont été mesurées au cours du temps. Les administrations sous-cutanées ont permis d'affirmer que l'encapsulation de l'insuline au sein des nanoparticules NOCC et chitosane chlorhydrate n'engendrait aucune perte de l'activité biologique de l'insuline.

Les résultats préliminaires obtenus suite aux administrations intra-duodénales de ces mêmes nanoparticules, ont permis de montrer l'activité hypoglycémiante de ces systèmes nanoparticulaires. Néanmoins, seules les nanoparticules obtenues par coacervation complexe de l'insuline avec le chitosane chlorhydrate ont permis de démontrer cette activité.

Les nanoparticules NOCC n'ont, quant à elles, pas montré d'activité hypoglycémiante suffisante pour atteindre la normoglycémie. Les résultats *in vitro* obtenus en milieux physiologiques simulés ont montré une étroite corrélation avec les résultats obtenus *in vivo*. Ils représentent une méthode simple permettant d'estimer le comportement *in vivo* des nanoparticules.

La complexation entre les deux différents chitosanes et l'insuline a été réalisée avec succès. Le développement de la synthèse et de la caractérisation d'un dérivé hydrosoluble du chitosane a permis de réaliser la complexation à pH physiologique. Bien qu'une étape d'optimisation de nanoparticules obtenues avec ce dérivé du chitosane ait été réalisée, celle-ci n'a pas permis de démontrer une efficacité *in vivo* suffisante. Une étude portant sur la variation d'autres paramètres est à envisager afin de permettre d'accroître leur effet hypoglycémiant. Il serait notamment intéressant d'étudier le comportement en milieu simulé des nanoparticules obtenues avec des NOCC de DDA et masses molaires variables. De la même façon, une étude de l'influence du degré de substitution du NOCC sur la complexation et le comportement des nanoparticules obtenues serait à poursuivre.

De par leurs conditions d'obtentions, les nanoparticules présentent à leur surface des groupements chargés, qui pourront ainsi permettre leur fonctionnalisation ultérieure. Ainsi, le greffage de composés hydrophiles, tels que des copolymères à base de poly(éthylène glycol), pourrait leur apporter un caractère furtif face au système immunitaire, et le greffage de

composés mucoadhésifs (chitosane sulfuré, PEGylé ...) pourrait accroître leur adsorption par la muqueuse intestinale.

Il serait également possible d'améliorer leur tenue en conditions physiologiques, notamment par le biais d'une réticulation ionique à l'aide de composés phosphatés [239, 252] ou de génipine [253, 254].

Le sel de chitosane chlorhydrate, ayant permis l'obtention de nanoparticules fonctionnelles *in vivo*, présente l'avantage indéniable de ne pas avoir subi de modifications chimiques. L'absence de contact avec des réactifs chimiques permet d'éviter la présence d'éventuels résidus toxiques. La Pharmacopée sera donc plus favorable à accorder son utilisation dans le cadre d'applications pharmaceutiques. De plus, cette absence de modification conduit à une matière première moins coûteuse (pas de réactif, ni d'appareillage, temps de fabrication, main d'œuvre …) d'autant plus que ce type de produit est déjà commercialisé sous une forme de pureté suffisante pour ce type d'application (grade pharmaceutique).

Ces nanoparticules ayant montré une excellente efficacité *in vivo*, leur intégration au sein du vecteur pharmaceutique complexe peut être réalisée. La lyophilisation des nanoparticules a montré une excellente biofonctionnalité et des véhicules gastro-résistants sont déjà à notre disposition sous forme de billes d'alginate, de gélules (Capsugel®) ou de capsules molles contenant une huile (Catalent®). L'association des deux systèmes devrait permettre l'étude de l'efficacité de ces nanoparticules après leur administration par voie orale. Ce travail fait l'objet d'un projet entre différents partenaires visant à l'administration orale de ce système ainsi qu'à l'étude des modalités de passage de ces nanoparticules à travers l'épithélium intestinal par cytométrie de flux. Ce projet, nommé ORAIL 2, devrait débuter courant 2011 pour une durée de 4 ans. Il aura également pour but d'étudier et de comparer la toxicité des deux systèmes développés au laboratoire : les nanoparticules à base de chitosane et celles à base de PLGA, obtenues par double émulsion.

A terme, le protocole de synthèse des nanoparticules subira un changement d'échelle pour passer à une fabrication industrielle qui sera aisément transposable dans le cas de la technique de coacervation complexe. Cette production en masse permettra de réaliser des essais *in vivo* sur le Porc, animal physiologiquement plus proche de l'Homme.

Néanmoins, cette nouvelle forme galénique représente à elle seule, une nouvelle entité thérapeutique soumise à une nouvelle évaluation indépendante du principe actif qu'elle contient [255]. Les formes nanoparticulaires représentent, en effet, un format immunogène pouvant présenter des risques spécifiques notamment en termes d'agrégation. Des études *in vitro* particulières devront être réalisées dans le but de déterminer une éventuelle génotoxicité, cytotoxicité ou biopersistance. Une étude de leurs propriétés pharmacocinétiques devra également prendre part à cette évaluation, parallèlement à des études de toxicité, suite à des administrations uniques puis réitérées.

Ainsi, la formulation d'un système particulaire visant à l'administration orale d'insuline possède déjà de nombreux atouts montrant son efficacité. De nombreuses étapes restent encore à franchir avant le début des essais cliniques, nécessaires à l'attribution de son autorisation de mise sur le marché.

Références bibliographiques

1. *Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.* Diabetes Care, 1997. **20**: p. 1183-1197.
2. Wild, S.*, et al.*, *Global Prevalence of Diabetes*. 2004. p. 1047-1053.
3. Kusnik-Joinville, O.*, et al.*, *Diabète traité en France en 2007 : un taux de prévalence proche de 4% et des disparités géographiques croissantes.* Bull Epidémiol Hebd, 2008. **43**: p. 409-413.
4. Banting, F.G. and Best, C.H., *Internal secretions of pancreas.* Journal of Laboratory and Clinical Medicine 1921-1922. **7**: p. 251.
5. Sanger, F., *Chemistry of Insulin: Determination of the structure of insulin opens the way to greater understanding of life processes.* 1959. **129**(3359): p. 1340-1344.
6. Hodgkin, D.C., *Insulin, its chemistry and biochemistry.* Proc. R. Soc. Lond. B, 1974. **A338**: p. 251-275.
7. Raisonnier, A., *Structures Biologiques*. 2002: Université Paris-VI.
8. Jiménez, J.L.*, et al.*, *The protofilament structure of insulin amyloid fibrils*. 2002. p. 9196-9201.
9. Perlemuter, L. and Perlemuter, G., *Guide de thérapeutique*, ed. E. Masson. 2008, Issy-les-Moulineaux.
10. The Diabetes Control and Complications Trial Research, G., *The Effect of Intensive Treatment of Diabetes on the Development and Progression of Long-Term Complications in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus.* 1993. **329**(14): p. 977-986.
11. Owens, D.R., *New horizons - alternative routes for insulin therapy.* Nat Rev Drug Discov, 2002. **1**(7): p. 529-540.
12. Gómez-Pérez, F.J. and Rull, J.A., *Insulin Therapy: Current Alternatives.* Archives of Medical Research, 2005. **36**(3): p. 258-272.
13. Nagai, T., *Adhesive topical drug delivery system.* Journal of Controlled Release, 1985. **2**: p. 121-134.
14. Aungst, B.J., Rogers, N.J., and Shefter, E., *Comparison of nasal, rectal, buccal, sublingual and intramuscular insulin efficacy and the effects of a bile salt absorption promoter.* 1988. **244**(1): p. 23-27.
15. Yokosuka, M., *New Transparent Ferroelectric Ceramic, Lanthanum Modified Lead Barium Metaniobate (Pbln).* Japanese Journal of Applied Physics, 1977. **16**(2): p. 379-380.
16. Hoogstraate, J.A.J. and Wertz, P.W., *Drug delivery via the buccal mucosa.* Pharmaceutical Science & Technology Today, 1998. **1**(7): p. 309-316.
17. Veuillez, F.*, et al.*, *Factors and strategies for improving buccal absorption of peptides.* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2001. **51**(2): p. 93-109.
18. Senal, S.*, et al.*, *Delivery of bioactive peptides and proteins across the oral (buccal) mucosa.* Current Pharmaceut Design, 2001. **2**: p. 175-186.
19. Yang, T.-Z.*, et al.*, *Phospholipid Deformable Vesicles for Buccal Delivery of Insulin.* Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2002. **50**(6): p. 749-753.
20. Al-Walli, N., *Sublingual human insulin for hyperglycaemia in type 1 diabetes.* JPMA, 1999. **49**: p. 167-169.
21. Modi, P., Mihic, M., and Lewin, A., *The evolving role of oral insulin in the treatment of diabetes using a novel RapidMist (TM) System.* Diabetes-Metabolism Research and Reviews, 2002. **18**: p. S38-S42.
22. Cavello, M.*, et al.*, *Inhaled insulin in type 1 diabetes.* Lancet, 2001. **357**: p. 198.
23. Schwartz, S. and Modi, P., *Pharmacodynamics of oral insulin in healthy volunteers.* Diabetologia, 2000. **43**: p. 776.

24. Guevara-Aguirre, J., *et al.*, *Oral spray insulin in treatment of type 2 diabetes: a comparison of efficacy of the oral spray insulin (Oralin) with subcutaneous (SC) insulin injection, a proof of concept study*. 2004. p. 472-478.
25. Kost, J., *Ultrasound-assisted insulin delivery and noninvasive glucose sensing.* Diabetes Technol Therapeutics, 2002. **4**: p. 489-497.
26. Merkus, F., Schipper, N., and Verhoef, J., *The influence of absorption enhancers on intranasal insulin absorption in normal and diabetic subjects.* J Controlled Release, 1996. **41**: p. 69-75.
27. Hinchcliffe, M. and Illum, L., *Intranasal insulin delivery and therapy.* Advanced Drug Delivery Reviews, 1999. **35**: p. 199-234.
28. Chetty, D. and Chien, Y., *Novel methods of insulin delivery. An update.* Crit Rev™ Therapeutic Drug Carrier System, 1998. **15**: p. 629-670.
29. Wigley, F.W., *et al.*, *Insulin across respiratory mucosae by aerosol delivery.* 1971. **20**(8): p. 552-556.
30. Elliott, R.B., *et al.*, *Parenteral absorption of insulin from the lung in diabetic children.* 1987. **23**(5): p. 293-297.
31. Schultz, H., *Mechanisms and factors affecting intrapulmonary particle deposition: implications for efficient inhalation therapies.* Pharmaceut Sci Technol, 1998. **1**: p. 336-344.
32. Holman, R., *Intranasal insulin in type 1 diabetes*, in *Frontiers in Insulin Pharmacology*, G.F. Berger M, Editor. 1993, Thieme Verlag: Stuttgart. p. 138-143.
33. Frauman, A.G., *et al.*, *Long-term use of intranasal insulin in insulin-dependent diabetic patients.* 1987. **10**(5): p. 573-578.
34. Bruce, *et al.*, *Meal-time intranasal insulin delivery in type 2 diabetes*. Vol. 8. 1991, Oxford, ROYAUME-UNI: Blackwell. 5.
35. Salzman, *et al.*, *Intranasal aerosolized insulin: mixed-meal studies and long-term use in type I diabetes*. Vol. 312. 1985, Waltham, MA, ETATS-UNIS: Massachusetts Medical Society.
36. Hilsted, J., *et al.*, *Intranasal insulin therapy: the clinical realities.* Diabetologia, 1995. **38**(6): p. 680-684.
37. Lalej-Bennis, D., *et al.*, *Efficacy and tolerance of intranasal insulin administered during 4 months in severely hyperglycaemic Type 2 diabetic patients with oral drug failure: a cross-over study.* 2001. **18**(8): p. 614-618.
38. Lalej-Bennis, D., *et al.*, *Six month administration of gelified intranasal insulin in 16 type 1 diabetic patients under multiple injections: Efficacy vs subcutaneous injections and local tolerance*. Vol. 27. 2001, Paris: Masson.
39. Patton, J., *Mechanisms of macromolecule absorption by the lungs.* Advanced Drug Delivery Reviews, 1996. **19**: p. 3-36.
40. Patton, J. and Platz, R., *Pulmonary delivery of peptides and proteins for systemic action.* Advanced Drug Delivery Reviews, 1992. **8**: p. 179-196.
41. Patton, J., Bukar, J., and Nagarajan, S., *Inhaled insulin.* Advanced Drug Delivery Reviews, 1999. **35**: p. 235-247.
42. Martonen, T., *et al.*, *Human lung morphology models for particle deposition studies.* Inhalation Toxicol 2000. **12**: p. 109-121.
43. Farr, S., *et al.*, *Pulmonary insulin administration using the AERx™ system: physiological and physiochemical factors influencing insulin effectiveness in healthy fasting subjects.* Diabetes Technol Therapeutics, 2000. **2**: p. 185-197.
44. Bradvik, I., *et al.*, *One year follow-up of lung clearance of 99mTc-diethylene traimine penta-acetic acid and diseases activity in sarcodisis.* Vasculitis Diffuse Lung Dis, 2000. **17**: p. 281-287.

45. Minty, B.D., *et al.*, *The effect of nicotine on pulmonary epithelial permeability in man.* 1984. **86**(1): p. 72-74.
46. Meignan, M., *et al.*, *Exercise Increases the Lung Clearance of Inhaled Technetium-99m DTPA.* 1986. **27**(2): p. 274-280.
47. Fink, J., *Metered-dose inhalers, dry powder inhalers, and transitions.* Resp Care 2000. **456**: p. 623-635.
48. Khafagy, E.-S., *et al.*, *Current challenges in non-invasive insulin delivery systems: A comparative review.* Advanced Drug Delivery Reviews, 2007. **59**(15): p. 1521-1546.
49. Owens, D.R., *New horizons - Alternative routes for insulin therapy.* Nature Reviews Drug Discovery, 2002. **1**(7): p. 529-540.
50. Onuki, Y., *et al.*, *In vivo effects of highly purified docosahexaenoic acid on rectal insulin absorption.* International Journal of Pharmaceutics, 2000. **198**(2): p. 147-156.
51. Foldavri, M., *Non-invasive administration of drugs through the skin: challenged in delivery system design.* PSTT, 2000. **3**: p. 417.
52. Cullander, C. and Guy, R.H., *(D) Routes of delivery: Case studies: (6) Transdermal delivery of peptides and proteins.* Advanced Drug Delivery Reviews, 1992. **8**(2-3): p. 291-329.
53. Stephen, R., Petelenz, T., and Jacobsen, S., *Potential novel methods for insulin administration. I. Iontophoresis.* Biomed Biochim Acta, 1984. **43**: p. 553-558.
54. Langkjær, L., *et al.*, *Iontophoresis of monomeric insulin analogues in vitro: effects of insulin charge and skin pretreatment.* Journal of Controlled Release, 1998. **51**(1): p. 47-56.
55. Mitragotri, S., Blankschtein, D., and Langer, R., *Ultrasound-mediated transdermal protein delivery*. Vol. 269. 1995, Washington, DC, ETATS-UNIS: American Association for the Advancement of Science.
56. Cevc, G., *Transfersomes, liposomes and other liquid suspensions on the skin: permeation enhancement vesicle penetration and transdermal drug delivery.* Crit Rev Therapeutic Drug Carrier Systems, 1996. **13**: p. 257-388.
57. Chien, Y. and Banga, A., *Direct current iontopheric transdermal delivery of peptide and protein drugs.* J Pharmaceut Sci, 1989. **78**: p. 376-383.
58. Curdy, C., Kalia, Y.N., and Guy, R.H., *Non-invasive assessment of the effects of iontophoresis on human skin in-vivo.* Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2001. **53**: p. 769-777.
59. Le, L., Kost, J., and Mitragotri, S., *Combined effect of low frequency ultrasound and iontophoresis. Applications of transdermal heparin delivery.* Pharmaceut Res, 2000. **17**: p. 151-154.
60. Berger, M., *Oral insulin 1922-1992: the history of continuous ambition and failure*, in *Frontiers in Insulin Pharmacology*, G.F. Berger M, Editor. 1993, Plenum Press: Stuttgart.
61. Damgé, C., *Oral insulin*, in *Biotechnology of Insulin Therapy*, P. J, Editor. 1991, Blackwell Scientific: Oxford. p. 97-112.
62. Carino, G. and Mathiowitz, E., *Oral insulin delivery.* Advanced Drug Delivery Reviews, 1999. **35**: p. 249-257.
63. Hamman, J.H., Enslin, G.M., and Kotzé, A.F., *Oral Delivery of Peptide Drugs: Barriers and Developments.* 2005. **19**(3): p. 165-177.
64. Cournarie, F., *Nanocapsules et Emulsions Multiples : Vecteurs pour l'administration orale d'insuline ?, thèse soutenue le 9 juillet 2003 à l'université Paris XI.* 2003.
65. Oppenheim, R.C., *Solid colloidal drug delivery systems: Nanoparticles.* International Journal of Pharmaceutics, 1981. **8**(3): p. 217-234.

66. Alonso, M.J., *Nanoparticulate drug carrier technology*, in *Microparticulte Systems For the Delivery of Proteins and Vaccines*, C.C.a.H. Bernstein, Editor. 1996, Marcel Dekker: New York. p. 203-242.
67. Linnankoski, J.*, et al.*, *Paracellular porosity and pore size of the human intestinal epithelium in tissue and cell culture models.* Journal of Pharmaceutical Sciences, 2010. **99**(4): p. 2166-2175.
68. Mahato, R.I.*, et al.*, *Emerging trends in oral delivery of peptide and protein drugs.* Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 2003. **20**(2-3): p. 153-214.
69. Lane, M.E., O'Driscoll, C.M., and Corrigan, O.I., *Quantitative estimation of the effects of bile salt surfactant systems on insulin stability and permeability in the rat intestine using a mass balance model.* Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2005. **57**(2): p. 169-175.
70. Uchiyama, T.*, et al.*, *Enhanced Permeability of Insulin across the Rat Intestinal Membrane by Various Absorption Enhancers: Their Intestinal Mucosal Toxicity and Absorption-enhancing Mechanism of n-Lauryl-beta-D-maltopyranoside.* Journal of Pharmacy and Pharmacology, 1999. **51**: p. 1241-1250.
71. Morishita, M.*, et al.*, *The dose-related hypoglycemic effects of insulin emulsions incorporating highly purified EPA and DHA.* International Journal of Pharmaceutics, 2000. **201**(2): p. 175-185.
72. Morishita, M.*, et al.*, *Site-Dependent Effect of Aprotinin, Sodium Caprate, Na2edta and Sodium Glycocholate on Intestinal-Absorption of Insulin.* Biological & Pharmaceutical Bulletin, 1993. **16**(1): p. 68-72.
73. Salama, N.N., Eddington, N.D., and Fasano, A., *Tight junction modulation and its relationship to drug delivery.* Advanced Drug Delivery Reviews, 2006. **58**(1): p. 15-28.
74. Fasano, A. and Uzzau, S., *Modulation of intestinal tight junctions by Zonula occludens toxin permits enteral administration of insulin and other macromolecules in an animal model.* Journal of Clinical Investigation, 1997. **99**(6): p. 1158-1164.
75. Gordberg, M. and Gomez-Orellana, I., *Challenges for the oral delivery of macromolecules.* Nat Rev Drug Discov, 2003. **4**: p. 289-295.
76. Yamamoto, A.*, et al.*, *Effects of various protease inhibitors on the intestinal absorption and degradation of insulin in rats.* Pharmaceutical Research, 1994. **11**(10): p. 1496-1500.
77. Agarwal, V., Reddy, I.K., and Khan, M.A., *Oral Delivery of Proteins: Effect of Chicken and Duck Ovomucoid on the Stability of Insulin in the Presence ofalpha-Chymotrypsin and Trypsin.* Pharmacy and Pharmacology Communications, 2000. **6**: p. 223-227.
78. Agarwal, V., Reddy, I.K., and Khan, M.A., *Polymethyacrylate based microparticulates of insulin for oral delivery: Preparation and in vitro dissolution stability in the presence of enzyme inhibitors.* International Journal of Pharmaceutics, 2001. **225**(1-2): p. 31-39.
79. Agarwal, V.*, et al.*, *Transport studies of insulin across rat jejunum in the presence of chicken and duck ovomucoids.* Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2001. **53**: p. 1131-1138.
80. Marschutz, M.K. and Bernkop-Schnurch, A., *Oral peptide drug delivery: polymer-inhibitor conjugates protecting insulin from enzymatic degradation in vitro.* Biomaterials, 2000. **21**(14): p. 1499-1507.
81. Morishita, M.*, et al.*, *In situ ileal absorption of insulin in rats: Effects of hyaluronidase pretreatment diminishing the mucous/glycocalyx layers.* Pharmaceutical Research, 2004. **21**(2): p. 309-316.

82. Aoki, Y., *et al.*, *Region-dependent role of the mucous/glycocalyx layers in insulin permeation across rat small intestinal membrane.* Pharmaceutical Research, 2005. **22**(11): p. 1854-1862.
83. Takeuchi, H., *et al.*, *Enteral Absorption of Insulin in Rats from Mucoadhesive Chitosan-Coated Liposomes.* Pharmaceutical Research, 1996. **13**(6): p. 896-901.
84. Chowdary, K.P.R. and Rao, Y.S., *Mucoadhesive microspheres for controlled drug delivery.* Biol. Pharm. Bull., 2004. **27**: p. 1717-1724.
85. Hejazi, R. and Amiji, M., *Chitosan-based gastrointestinal delivery systems.* Journal of Controlled Release, 2003. **89**(2): p. 151-165.
86. Peppas, N.A., *Devices based on intelligent biopolymers for oral protein delivery.* International Journal of Pharmaceutics, 2004. **277**(1-2): p. 11-17.
87. Dorkoosh, F.A., *et al.*, *Feasibility study on the retention of superporous hydrogel composite polymer in the intestinal tract of man using scintigraphy.* Journal of Controlled Release, 2004. **99**(2): p. 199-206.
88. Lamprecht, A., *et al.*, *Lipid nanocarriers as drug delivery system for ibuprofen in pain treatment.* International Journal of Pharmaceutics, 2004. **278**(2): p. 407-414.
89. Bernkop-Schnürch, A., Kast, C.E., and Richter, M.F., *Improvement in the mucoadhesive properties of alginate by the covalent attachment of cysteine.* Journal of Controlled Release, 2001. **71**(3): p. 277-285.
90. Bernkop-Schnürch, A. and Krajicek, M.E., *Mucoadhesive polymers as platforms for peroral peptide delivery and absorption: synthesis and evaluation of different chitosan-EDTA conjugates.* J. Control. Release, 2001. **50**: p. 215-223.
91. Lehr, C.-M., *Lectin-mediated drug delivery:: The second generation of bioadhesives.* Journal of Controlled Release, 2000. **65**(1-2): p. 19-29.
92. Lowman, A.M., *et al.*, *Oral delivery of insulin using pH-responsive complexation gels.* 1999. **88**(9): p. 933-937.
93. Nakamura, K., *et al.*, *Oral insulin delivery using P(MAA-g-EG) hydrogels: effects of network morphology on insulin delivery characteristics.* Journal of Controlled Release, 2004. **95**(3): p. 589-599.
94. Foss, A.C., *et al.*, *Development of acrylic-based copolymers for oral insulin delivery.* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2004. **57**(2): p. 163-169.
95. Lopez, J.E. and Peppas, N.A., *Effect of Poly (Ethylene Glycol) Molecular Weight and Microparticle Size on Oral Insulin Delivery from P(MAA-g-EG) Microparticles.* 2004. **30**(5): p. 497-504.
96. Morishita, M., *et al.*, *Mucosal insulin delivery systems based on complexation polymer hydrogels: effect of particle size on insulin enteral absorption.* Journal of Controlled Release, 2004. **97**(1): p. 115-124.
97. Pan, Y., *et al.*, *Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo.* International Journal of Pharmaceutics, 2002. **249**(1-2): p. 139-147.
98. Bernkop-Schnürch, A., *Thiomers: A new generation of mucoadhesive polymers.* Advanced Drug Delivery Reviews, 2005. **57**(11): p. 1569-1582.
99. Bernkop-Schnürch, A., Brandt, U.M., and Clausen, A.E., *Synthesis and in vitro evaluation of chitosan-cysteine conjugates.* Sci. Pharm., 1999. **67**: p. 196-208.
100. Bernkop-Schnürch, A., Hornof, M., and Zoidl, T., *Thiolated polymers--thiomers: synthesis and in vitro evaluation of chitosan-2-iminothiolane conjugates.* International Journal of Pharmaceutics, 2003. **260**(2): p. 229-237.
101. Bernkop-Schnürch, A. and Hopf, T.E., *Synthesis and in vitro evaluation of chitosan-thioglycolic acid conjugates.* Sci. Pharm., 2001. **69**: p. 109-118.

102. Bernkop-Schnürch, A. and Steininger, S., *Synthesis and characterisation of mucoadhesive thiolated polymers.* International Journal of Pharmaceutics, 2000. **194**(2): p. 239-247.
103. Bernkop-Schnürch, A., Clausen, A.E., and Hnatyszyn, M., *Thiolated polymers: synthesis and in vitro evaluation of polymer-cysteamine conjugates.* International Journal of Pharmaceutics, 2001. **226**(1-2): p. 185-194.
104. Bernkop-Schnürch, A., Scholler, S., and Biebel, R.G., *Development of controlled drug release systems based on thiolated polymers.* Journal of Controlled Release, 2000. **66**(1): p. 39-48.
105. Bernkop-Schnürch, A.*, et al.*, *Thiomers: potential excipients for non-invasive peptide delivery systems.* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2004. **58**(2): p. 253-263.
106. Junginger, H.E., *Bioadhesive polymer systems for peptide delivery.* Acta Pharm. Technol., 1990. **36**: p. 110-126.
107. Ponchel, G.*, et al.*, *Mucoadhesion of colloidal particulate systems in the gastro-intestinal tract.* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 1997. **44**(1): p. 25-31.
108. Pettit, D.K. and Gombotz, W.R., *The development of site-specific drug-delivery systems for protein and peptide biopharmaceuticals.* Trends in Biotechnology, 1998. **16**(8): p. 343-349.
109. Daugherty, A.L. and Mrsny, R.J., *Transcellular uptake mechanisms of the intestinal epithelial barrier Part one.* Pharmaceutical Science & Technology Today, 1999. **2**(4): p. 144-151.
110. Sarciaux, J.M., Acar, L., and Sado, P.A., *Using microemulsion formulations for oral drug delivery of therapeutic peptides.* International Journal of Pharmaceutics, 1995. **120**(2): p. 127-136.
111. Katsuma, M.*, et al.*, *Effects of absorption promoters on insulin absorption through colon-targeted delivery.* International Journal of Pharmaceutics, 2006. **307**(2): p. 156-162.
112. Katayama, K.*, et al.*, *Double Liposomes: Hypoglycemic Effects of Liposomal Insulin on Normal Rats.* 2003. **29**(7): p. 725-731.
113. Degim, Z.*, et al.*, *The effect of various liposome formulations on insulin penetration across Caco-2 cell monolayer.* Life Sciences, 2004. **75**(23): p. 2819-2827.
114. Ye, S.*, et al.*, *New loading process and release properties of insulin from polysaccharide microcapsules fabricated through layer-by-layer assembly.* Journal of Controlled Release, 2006. **112**(1): p. 79-87.
115. Wang, L.-Y.*, et al.*, *Preparation and improvement of release behavior of chitosan microspheres containing insulin.* International Journal of Pharmaceutics, 2006. **311**(1-2): p. 187-195.
116. Hillery, A., Jani, P., and Florence, A., *Comparative, Quantitative Study of Lymphoid and Non-Lymphoid Uptake of 60 nm Polystyrene Particles.* 1994. **2**(2): p. 151-156.
117. van der Lubben, I.M.*, et al.*, *Chitosan and its derivatives in mucosal drug and vaccine delivery.* European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2001. **14**(3): p. 201-207.
118. Brayden, D.J., Jepson, M.A., and Baird, A.W., *Keynote review: Intestinal Peyer's patch M cells and oral vaccine targeting.* Drug Discovery Today, 2005. **10**(17): p. 1145-1157.
119. Desai, M.P.*, et al.*, *The Mechanism of Uptake of Biodegradable Microparticles in Caco-2 Cells Is Size Dependent.* Pharmaceutical Research, 1997. **14**(11): p. 1568-1573.

120. Watnasirichaikul, S., *et al.*, *Preparation of Biodegradable Insulin Nanocapsules from Biocompatible Microemulsions.* Pharmaceutical Research, 2000. **17**(6): p. 684-689.
121. Kisel, M.A., *et al.*, *Liposomes with phosphatidylethanol as a carrier for oral delivery of insulin: studies in the rat.* International Journal of Pharmaceutics, 2001. **216**(1-2): p. 105-114.
122. Jung, T., *et al.*, *Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake?* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2000. **50**(1): p. 147-160.
123. Jones, M.-C. and Leroux, J.-C., *Polymeric micelles - a new generation of colloidal drug carriers.* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 1999. **48**(2): p. 101-111.
124. Shakweh, M., *et al.*, *Poly (lactide-co-glycolide) particles of different physicochemical properties and their uptake by peyer's patches in mice.* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2005. **61**(1-2): p. 1-13.
125. Gaumet, M., Gurny, R., and Delie, F., *Localization and quantification of biodegradable particles in an intestinal cell model: The influence of particle size.* European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009. **36**(4-5): p. 465-473.
126. Vauthier, C. and Couvreur, P., *Nanotechnologies pour la thérapeutique et le diagnostic, Réf. NM 4 010*. Techniques de l'Ingénieur, ed. Weka. 2008, Illustrations reproduites avec l'accord de l'éditeur.
127. Yeo, Y., Baek, N., and Park, K., *Microencapsulation methods for delivery of protein drugs.* Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2001. **6**(4): p. 213-230.
128. Burgess, D.J. and Hickey, A.J., *Microsphere technology and applications*, in *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, J.S.a.J.C. Boylan, Editor. 1994, Marcel Dekker, Inc.: New York, USA. p. 1-29.
129. Yang, H., James, R., and Wright, J., *Calcium alginate*, in *Cell Encapsulation Technology and Therapeutics*, R.P.L. W. M. Kuhtreiber, and W. L. Chick, Editor. 1999, Birkhauser: Boston, USA. p. 79-89.
130. Soon-Shiong, P., *et al.*, *An immunologic basis for the fibrotic reaction to implanted microcapsules.* Transplant. Proc. , 1991. **23**: p. 758-759.
131. Clayton, H.A., *et al.*, *The Effect of Capsule Composition on the Biocompatibility of Alginate-Poly-L-Lysine Capsules.* Journal of Microencapsulation, 1991. **8**(2): p. 221-233.
132. Pavanetto, F., *et al.*, *Solvent Evaporation, Solvent-Extraction and Spray Drying for Polylactide Microsphere Preparation.* International Journal of Pharmaceutics, 1992. **84**(2): p. 151-159.
133. Wan, L.S.C., Heng, P.W.S., and Chia, C.G.H., *Plasticizers and Their Effects on Microencapsulation Process by Spray-Drying in an Aqueous System.* Journal of Microencapsulation, 1992. **9**(1): p. 53-62.
134. Giunchedi, P. and Conte, U., *Spray-Drying as a Preparation Method of Microparticulate Drug-Delivery Systems - an Overview.* Stp Pharma Sciences, 1995. **5**(4): p. 276-290.
135. Takenaka, H., Kawashima, Y., and Lin, S.Y., *Polymorphism of Spray-Dried Microencapsulated Sulfamethoxazole with Cellulose-Acetate Phthalate and Colloidal Silica, Montmorillonite, or Talc.* Journal of Pharmaceutical Sciences, 1981. **70**(11): p. 1256-1260.
136. Bodmeier, R. and Chen, H.G., *Preparation of Biodegradable Polylactide Microparticles Using a Spray-Drying Technique.* Journal of Pharmacy and Pharmacology, 1988. **40**(11): p. 754-757.

137. Whateley, T.L., *Microcapsules: preparation by interfacial polymerization and interfacial complexation and their application*, in *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications*, S. Benita, Editor. 1996, Dekker: New York, USA. p. 349-375.
138. Mathiowitz, E. and Kreitz, M.R., *Microencapsulation*, in *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*, E. Mathiowitz, Editor. 1999, Jone Wiley & Sons, Inc.: New York, USA. p. 493-546.
139. Nihant, N.*, et al.*, *Microencapsulation by Coacervation of Poly(Lactide-Co-Glycolide) .3. Characterization of the Final Microspheres.* Polymer International, 1994. **34**(3): p. 289-299.
140. Kas, H.S. and Oner, L., *Microencapsulation using coacervation*, in *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*, D.L. Wise, Editor. 2000, Marcel Dekker, Inc.: New York, USA. p. 301-328.
141. Bakan, J.A., *Microencapsulation*, in *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy*, L.L.H.A.L.a.J.L. Kanig, Editor. 1986, Lea & Febiger: Philadelphia, USA. p. 412-429.
142. Andrianov, A.K., Chen, J.P., and Payne, L.G., *Preparation of hydrogel microspheres by coacervation of aqueous polyphosphazene solutions.* Biomaterials, 1998. **19**(1-3): p. 109-115.
143. Thomasin, C., Gander, B., and Merkle, H.P., *Coacervation of biodegradable polyesters for microencapsulation: A physicochemical approach.* Proc. Int. Symp. Controlled Release Bioact. Mater., 1993. **July 25-30**(Washington D.C., USA).
144. Takada, S.*, et al.*, *Application of a spray drying technique in the production of TRH-containing injectable sustained-release microparticles of biodegradable polymers.* PDA J. Pharm. Sci. Technol, 1995. **49**: p. 180-184.
145. Thomasin, C.*, et al.*, *A contribution to overcoming the problem of residual solvents in biodegradable microspheres prepared by coacervation.* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 1996. **42**(1): p. 16-24.
146. Jizomoto, H., *Phase-Separation Induced in Gelatin Base Coacervation Systems by Addition of Water-Soluble Nonionic Polymers. 1-Microencapsulation.* Journal of Pharmaceutical Sciences, 1984. **73**(7): p. 879-882.
147. Jizomoto, H., *Phase-Separation Induced in Gelatin Base Coacervation Systems by Addition of Water-Soluble Nonionic Polymers. 2-Effect of Molecular Weight.* Journal of Pharmaceutical Sciences, 1985. **74**(4): p. 469-472.
148. Benoît, J.P. and Richaud, J., *Microencapsulation, Réf.J2210*. Techniques de l'Ingénieur, ed. Weka. 2000, Illustrations reproduites avec l'accord de l'éditeur.
149. Sarmento*, et al.*, *Development and characterization of new insulin containing polysaccharide nanoparticles*. Vol. 53. 2006, Amsterdam, PAYS-BAS: Elsevier. 10.
150. Bayat, A.*, et al.*, *Nanoparticles of quaternized chitosan derivatives as a carrier for colon delivery of insulin: Ex vivo and in vivo studies.* International Journal of Pharmaceutics, 2008. **356**(1-2): p. 259-266.
151. Krayukhina, M.A., Samoilova, N.A., and Yamskov, I.A., *Polyelectrolyte Complexes of Chitosan: Formation, Properties, and Applications.* Uspekhi Khimii, 2008. **77**(9): p. 854-869.
152. Kabanov, V.A. and Zezin, A.B., *Soluble interpolymeric complexes as a new class of synthetic polyelectrolytes.* Pure and Appl. Chem., 1984. **56**(3): p. 343-354.
153. Bayat, A.*, et al.*, *Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and its quaternized derivatives.* Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2008. **4**(2): p. 115-120.
154. Fredericq, E., *La courbe de titration de l'insuline et de ses fractions.* 1954. **12**(1): p. 287-300.

155. Li, C., *Protein hormones*, in *The proteins*, B.K. Neurath H, Editor. 1954, Acad. Press: New York. p. 636.
156. Tanford, C. and Epstein, J., *The Physical Chemistry of Insulin. I. Hydrogen Ion Titration Curve of Zinc-free Insulin.* Journal of the American Chemical Society, 1954. **76**(8): p. 2163-2169.
157. Brange, J., *Galenics of insulin, The physico-chemical and pharmaceutical aspects of insulin and insulin preparations*. 1987: Springer-Verlag.
158. Humbel, R.E., Bosshard, H.R., and Zahn, H., *The chemistry of insulin*, in *Handbook of Physiology. Endocrinology. Section 7*, D.F. Steiner, Freinkel, N., Editor. 1972, American Physiological Society: Washington, D.C. p. 111-132.
159. Matteo Prochet Widmark, E., *Observations on the Solubility of Insulin.* Biochem J., 1923. **17**(4-5): p. 668-670.
160. Jederstrom, G.*, et al.*, *Formulating Insulin for Oral Administration: Preparation of Hyaluronan-Insulin Complex.* Pharmaceutical Research, 2004. **21**(11): p. 2040-2047.
161. Jederstrom, G.*, et al.*, *Blood Glucose-Lowering Activity of a Hyaluronan/Insulin Complex After Oral Administration to Rats with Diabetes.* Diabetes Technology & Therapeutics, 2005. **7**(6): p. 948-957.
162. Jederstrom, G., Low Molecular Weight Hyaluronic Acid with Peptid or Protein. 1995.
163. Wang, L.H.*, et al.*, *Chitosan-alginate PEC membrane as a wound dressing: Assessment of incisional wound healing.* Journal of Biomedical Materials Research, 2002. **63**(5): p. 610-618.
164. Li, Z.S.*, et al.*, *Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering.* Biomaterials, 2005. **26**(18): p. 3919-3928.
165. Dutkiewicz, J.*, et al.*, *New forms of chitosan polyelectrolyte complexes*, in *Advances in Chitin and Chitosan*, S.P. Brine C , Zikakis J Editor. 1992, Elsevier: London. p. 496-505.
166. Roberts, G.A.F., *Chitin chemistry*. 1992, London: MacMillan.
167. Mathur, N.K. and Narang, C.K., *Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals.* Journal of Chemical Education, 1990. **67**(11): p. 938.
168. Abdou, E.S., Nagy, K.S.A., and Elsabee, M.Z., *Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources.* Bioresource Technology, 2008. **99**(5): p. 1359-1367.
169. Percot*, et al.*, *Characterization of shrimp shell deproteinization*. Vol. 4. 2003, Washington, DC, ETATS-UNIS: American Chemical Society. 6.
170. Lamarque, G.*, et al.*, *New Route of Deacetylation of α- and β-Chitins by Means of Freeze−Pump Out−Thaw Cycles.* Biomacromolecules, 2005. **6**(3): p. 1380-1388.
171. Liu, X.F.*, et al.*, *Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan.* Journal of Applied Polymer Science, 2001. **79**(7): p. 1324-1335.
172. Pospieszny, H.*, et al.*, *New applications of chitosan in agriculture*, in *Chitin World*, A.W.-P. Z. S. Karnicki, M. Brzeski, P. Bykowski, Editor. 1994, Wirtschaftsverlag NW: Bremerhaven. p. 246 - 254.
173. Thanou, M., Verhoef, J.C., and Junginger, H.E., *Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives.* Advanced Drug Delivery Reviews, 2001. **52**(2): p. 117-126.
174. Thanou, M. and Junginger, H.E., *Pharmaceutical applications of chitosan and derivatives,*, in *Polysaccharides. Structural diversity and functional versatility, 2nd ed.*, D. S, Editor. 2005, Marcel Dekker Publ.: New York. p. 661-677.
175. Anthonsen, M.W. and Smidsrod, O., *Hydrogen-Ion Titration of Chitosans with Varying Degrees of N-Acetylation by Monitoring Induced H-1-Nmr Chemical-Shifts.* Carbohydrate Polymers, 1995. **26**(4): p. 303-305.

176. Denuziere, A., Ferrier, D., and Domard, A., *Chitosan-chondroitin sulfate and chitosan-hyaluronate polyelectrolyte complexes. Physico-chemical aspects.* Carbohydrate Polymers, 1996. **29**(4): p. 317-323.
177. Chao, A.-C*., et al.*, *Enzymatic grafting of carboxyl groups on to chitosan - to confer on chitosan the property of a cationic dye adsorbent.* Bioresource Technology, 2004. **91**(2): p. 157-162.
178. Bratskaya*, et al.*, *Comparative study of humic acids flocculation with chitosan hydrochloride and chitosan glutamate*. Vol. 38. 2004, Oxford, ROYAUME-UNI: Elsevier. 7.
179. Struszczyk, M.H., *Chitin and chitosan - Part II. Applications of chitosan.* Polimery, 2002. **47**(6): p. 396-403.
180. Baxter, S., Zivanovic, S., and Weiss, J., *Molecular weight and degree of acetylation of high-intensity ultrasonicated chitosan.* Food Hydrocolloids, 2005. **19**(5): p. 821-830.
181. Cravotto, G*., et al.*, *Chemical modification of chitosan under high-intensity ultrasound.* Ultrasonics Sonochemistry, 2005. **12**(1-2): p. 95-98.
182. Liu, H., Du, Y.M., and Kennedy, J.F., *Hydration energy of the 1,4-bonds of chitosan and their breakdown by ultrasonic treatment.* Carbohydrate Polymers, 2007. **68**(3): p. 598-600.
183. Czechowska-Biskup, R., *Degradation of chitosan and starch by 360-kHz ultrasound.* Carbohydrate Polymers, 2005. **60**: p. 175-184.
184. Kato, Y., *Depolymerization of N-succinyl-chitosan by hydrochloric acid* Carbohydrate Research, 2002. **337**: p. 561-564.
185. Tommeraas, K*., et al.*, *Preparation and characterisation of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerisation of chitosans.* Carbohydrate Research, 2001. **333**(2): p. 137-144.
186. Ilyina, A.V*., et al.*, *Enzymic preparation of acid-free-water-soluble chitosan.* Process Biochemistry, 2000. **35**(6): p. 563-568.
187. Kurita, K., *Controlled functionalization of the polysaccharide chitin.* Progress in Polymer Science, 2001. **26**(9): p. 1921-1971.
188. Domard, A. and Rinaudo, M., *Preparation and Characterization of Fully Deacetylated Chitosan.* International Journal of Biological Macromolecules, 1983. **5**(1): p. 49-52.
189. Domard, A., Rinaudo, M., and Terrassin, C., *New Method for the Quaternization of Chitosan.* International Journal of Biological Macromolecules, 1986. **8**(2): p. 105-107.
190. Hu, Y.Q*., et al.*, *Preparation and characterization of poly(ethylene glycol)-g-chitosan with water- and organosolubility.* Carbohydrate Polymers, 2005. **61**(4): p. 472-479.
191. Gorochovceva, N. and Makuska, R., *Synthesis and study of water-soluble chitosan-O-poly(ethylene glycol) graft copolymers.* European Polymer Journal, 2004. **40**(4): p. 685-691.
192. dos Santos, J.E., Dockal, E.R., and Cavalheiro, E.T.G., *Synthesis and characterization of Schiff bases from chitosan and salicylaldehyde derivatives.* Carbohydrate Polymers, 2005. **60**(3): p. 277-282.
193. Chung, Y.C., Kuo, C.L., and Chen, C.C., *Preparation and important functional properties of water-soluble chitosan produced through Maillard reaction.* Bioresource Technology, 2005. **96**(13): p. 1473-1482.
194. Rinaudo, M., *Chitin and chitosan: Properties and applications.* Progress in Polymer Science, 2006. **31**(7): p. 603-632.
195. Harish Prashanth, K.V. and Tharanathan, R.N., *Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential--an overview.* Trends in Food Science & Technology, 2007. **18**(3): p. 117-131.

196. Thatte, M.R., *Synthesis and antibacterial assessment of water-soluble hydrophobic chitosan derivatives bearing quaternary ammonium functionality*. 2004, Louisiana State University: Baton Rouge.
197. Xinge, Z.*, et al.*, *Nasal absorption enhancement of insulin using PEG-grafted chitosan nanoparticles*. Vol. 68. 2008, Amsterdam, PAYS-BAS: Elsevier. 9.
198. Callet, A., *Encapsulation d'insuline dans des particules plaines obtenues par coacervation complexe*. 2007, Université Louis Pasteur: Strasbourg.
199. Shi, X.*, et al.*, *Effect of degree of substitution and molecular weight of carboxymethyl chitosan nanoparticles on doxorubicin delivery.* 2006. **100**(6): p. 4689-4696.
200. Zhou, J.*, et al.*, *Reduction in postsurgical adhesion formation after cardiac surgery by application of N,O-carboxymethyl chitosan.* The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. **In Press, Corrected Proof**.
201. Muzzarelli*, et al.*, *Removal of trace metal ions from industrial waters, nuclear effluents and drinking water, with the aid of cross-linked N-carboxymethyl chitosan*. Vol. 11. 1989, Kidlington, ROYAUME-UNI: Elsevier.
202. Rinaudo, M., Le Dung, P., and Milas, M., *A new and simple method of synthesis of carboxymethyl chitosans*, in *Advances in chitin and chitosan*, P.A.S.J.P.Z. C.J. Brine, Editor. 1992, Elsevier. p. 516-525.
203. Le Dung, P.*, et al.*, *Water-Soluble Derivatives Obtained by Controlled Chemical Modifications of Chitosan.* Carbohydrate Polymers, 1994. **24**(3): p. 209-214.
204. Chen, X.-G. and Park, H.-J., *Chemical characteristics of O-carboxymethyl chitosans related to the preparation conditions.* Carbohydrate Polymers, 2003. **53**(4): p. 355-359.
205. Tokura, S.*, et al.*, *Studies on Chitin VIII. Some Properties of Water Soluble Chitin Derivatives.* Polymer Journal, 1983. **15**(6): p. 485-489.
206. Li, Y.*, et al.*, *Physicochemical characterization and antibacterial property of chitosan acetates.* Carbohydrate Polymers, 2007. **67**(2): p. 227-232.
207. Orienti, I.*, et al.*, *Influence of different chitosan salts on the release of sodium diclofenac in colon-specific delivery.* International Journal of Pharmaceutics, 2002. **238**(1-2): p. 51-59.
208. Luangtana-anan, M.*, et al.*, *Effect of Chitosan Salts and Molecular Weight on a Nanoparticulate Carrier for Therapeutic Protein.* Pharmaceutical Development and Technology, 2005. **10**(2): p. 189-196.
209. Frère, Y., Danicher, L., and Belcourt, A., Vecteur pour administration par voie orale. 2004.
210. Lavertu*, et al.*, *A validated 1H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan*. Vol. 32. 2003, Amsterdam, Pays-Bas: Elsevier. 10.
211. Jiang, X.A., Chen, L.R., and Zhong, W., *A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosan.* Carbohydrate Polymers, 2003. **54**(4): p. 457-463.
212. Chen, S.-C. and Wu, Y.-C., *A novel pH-sensitive hydrogel composed of N,O-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery.* Journal of controlled release, 2004 **96**: p. 285-300.
213. Blackshear, P.J.*, et al.*, *Glycerol prevents insulin precipitation and interruption of flow in an implantable insulin infusion pump.* Diabetes Care, 1983. **6**(4): p. 387-392.
214. Smith, G.D.*, et al.*, *R6 hexameric insulin complexed with m-cresol or resorcinol.* Acta Crystallographica Section D, 2000. **56**(12): p. 1541-1548.
215. Brange*, et al.*, *Chemical stability of insulin. 3: Influence of excipients, formulation, and pH*. Vol. 4. 1992, Stockholm, SUEDE: Swedish Pharmaceutical Press.

216. Xu, X., *et al.*, *Quantitative determination of insulin entrapment efficiency in triblock copolymeric nanoparticles by high-performance liquid chromatography.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006. **41**(1): p. 266-273.
217. Damgé, C., *et al.*, *New approach for oral administration of insulin with polyalkylcyanoacrylate nanocapsules as drug carrier.* 1988. **37**(2): p. 246-251.
218. Aprahamian, M. and Freund, Y., *Anatomie viscérale abdominale du rat*: AFSTAL.
219. Reix, N., *Administration orale d'insuline : validation in vitro et in vivo d'un système basé sur une double encapsulation de l'insuline*. 2009, Strasbourg.
220. Kotzé, A.F., *et al.*, *Comparison of the effect of different chitosan salts and N-trimethyl chitosan chloride on the permeability of intestinal epithelial cells (Caco-2).* Journal of Controlled Release, 1998. **51**(1): p. 35-46.
221. Crini, G., Badot, P.M., and Guibal, E., *Chitine et chitosane : du biopolymère à l'application*. 2009, Besançon: Presses universitaires de Franche-Comté.
222. Ullner, M., Jonsson, B., and Widmark, P.-O., *Conformational properties and apparent dissociation constants of titrating polyelectrolytes: Monte Carlo simulation and scaling arguments.* The Journal of Chemical Physics, 1994. **100**(4): p. 3365-3366.
223. Sorlier, P., *et al.*, *Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan.* Biomacromolecules, 2001. **2**(3): p. 765-772.
224. Chae, S.Y., Jang, M.-K., and Nah, J.-W., *Influence of molecular weight on oral absorption of water soluble chitosans.* Journal of Controlled Release, 2005. **102**(2): p. 383-394.
225. Schipper, N.G.M., Varum, K.M., and Artursson, P., *Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs .1. Influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cells.* Pharmaceutical Research, 1996. **13**(11): p. 1686-1692.
226. Kiang, T., *et al.*, *Formulation of chitosan-DNA nanoparticles with poly(propyl acrylic acid) enhances gene expression.* Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition, 2004. **15**(11): p. 1405-1421.
227. Ma, Z.S., Yeoh, H.H., and Lim, L.Y., *Formulation pH modulates the interaction of insulin with chitosan nanoparticles.* Journal of Pharmaceutical Sciences, 2002. **91**(6): p. 1396-1404.
228. Jintapattanakit, A., *et al.*, *Peroral delivery of insulin using chitosan derivatives: A comparative study of polyelectrolyte nanocomplexes and nanoparticles.* International Journal of Pharmaceutics, 2007. **342**(1-2): p. 240-249.
229. Kasaikin, V.A., *et al.*, *Principles of the Formation of Water-Soluble Polyelectrolyte Complexes.* Vysokomolekulyarnye Soedineniya Seriya B, 1979. **21**(2): p. 84-85.
230. Gan, Q. and Wang, T., *Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier - Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release.* Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 2007. **59**(1): p. 24-34.
231. Kiang, T., *et al.*, *The effect of the degree of chitosan deacetylation on the efficiency of gene transfection.* Biomaterials, 2004. **25**(22): p. 5293-5301.
232. Xu, Y. and Du, Y., *Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles.* International Journal of Pharmaceutics, 2003. **250**: p. 215-226.
233. Flory, P.J., *Principles of Polymer Chemistry*. 1983, New York: Cornell University Press.
234. Thiele, G., Poston, M., and Brown, R., *A case Study in Sizing Nanoparticles*. 2010, Micromeritics.
235. Durrieu, V., Putaux, J.L., and Gandini, A., *Cryo-TEM and Image Analysis of Polymer Nanoparticle Dispersions.* Microscopy and analysis, 2004. **18**(1): p. 19-21.

236. Sæther, H.V., *et al.*, *Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan.* Carbohydrate Polymers, 2008. **74**(4): p. 813-821.
237. Sun, W., *et al.*, *Self-assembled polyelectrolyte nanocomplexes between chitosan derivatives and enoxaparin.* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2008. **69**(2): p. 417-425.
238. Fernandez-Urrusuno, R., *et al.*, *Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles.* Pharmaceutical Research, 1999. **16**(10): p. 1576-1581.
239. Mi, F.L., *et al.*, *Chitosan-polyelectrolyte complexation for the preparation of gel beads and controlled release of anticancer drug. II. Effect of pH-dependent ionic crosslinking or interpolymer complex using tripolyphosphate or polyphosphate as reagent*. 1999. p. 1093-1107.
240. Mi, F.L., *et al.*, *Kinetic study of chitosan-tripolyphosphate complex reaction and acid-resistive properties of the chitosan-tripolyphosphate gel beads prepared by in-liquid curing method*. 1999. p. 1551-1564.
241. Prego, C., *et al.*, *Chitosan-PEG nanocapsules as new carriers for oral peptide delivery: Effect of chitosan pegylation degree.* Journal of Controlled Release, 2006. **111**(3): p. 299-308.
242. Cui, F., *et al.*, *Preparation, Characterization, and Oral Delivery of Insulin Loaded Carboxylated Chitosan Grafted Poly(methyl methacrylate) Nanoparticles.* Biomacromolecules, 2009. **10**(5): p. 1253-1258.
243. Lin, C.C. and Lin, C.W., *Preparation of N,O-carboxymethyl chitosan nanoparticles as an insulin carrier.* Drug Delivery, 2009. **16**(8): p. 458-464.
244. Abdelwahed, *et al.*, *Freeze-drying of nanoparticles : Formulation, process and storage considerations*. Vol. 58. 2006, Kidlington, ROYAUME-UNI: Elsevier. 26.
245. Li, M.G., *et al.*, *Distribution, transition, adhesion and release of insulin loaded nanoparticles in the gut of rats.* International Journal of Pharmaceutics, 2007. **329**(1-2): p. 182-191.
246. Damge, C., Maincent, P., and Ubrich, N., *Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats.* Journal of Controlled Release, 2007. **117**(2): p. 163-170.
247. Sapin, R., Gasser, F., and Grucker, D., *Prévention des effets de l'hémolyse sur le dosage d'insuline.* Immuno-analyse & Biologie Spécialisée, 1997. **12**(4): p. 206-208.
248. Selam, J.L., *et al.*, *Determination of Portal Insulin Absorption from Peritoneum Via Novel Nonisotopic Method.* Diabetes, 1990. **39**(11): p. 1361-1365.
249. Polonsky, K., *et al.*, *Differences in the Hepatic and Renal Extraction of Insulin and Glucagon in the Dog - Evidence for Saturability of Insulin Metabolism.* Acta Endocrinologica, 1983. **102**(3): p. 420-427.
250. Polonsky, K., *et al.*, *Metabolism of C-Peptide in the Dog - Invivo Demonstration of the Absence of Hepatic Extraction.* Journal of Clinical Investigation, 1983. **72**(3): p. 1114-1123.
251. Melles, E., *et al.*, *Electroimmobilization of proinsulin C-peptide to a quartz crystal microbalance sensor chip for protein affinity purification.* Analytical Biochemistry, 2005. **341**(1): p. 89-93.
252. Wong, T.W., *Chitosan and Its Use in Design of Insulin Delivery System.* Recent Patents on Drug Delivery; Formulation, 2009. **3**: p. 8-25.
253. Mi, *et al.*, *In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant*. Vol. 23. 2002, Oxford, ROYAUME-UNI: Elsevier. 11.
254. Agnihotri, S.A., Mallikarjuna, N.N., and Aminabhavi, T.M., *Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery.* Journal of Controlled Release, 2004. **100**(1): p. 5-28.

255. AFSSAPS, *Recommandations relatives à l'évaluation toxicologique des médicaments sous forme nanoparticulaire*. 2008.

Annexes

Annexe A

Dénomination commerciale des sels de chitosane

Différents sels de chitosane commerciaux ont été utilisés au cours de ce travail. Afin de simplifier leur dénomination, nous avons conservé leur nomenclature commerciale. Elle se présente sous la forme du nom du contre-ion utilisé suivi de son classement par rapport à la viscosité du sel de chitosane. Pour chaque type de sel, celui possédant la plus faible viscosité porte la valeur 113, le second la valeur 213. Ainsi les différents sels de chitosane à notre disposition portent les noms suivants :

Nom commercial	Type de sels	Données techniques		
		Viscosité (mPa.s)	Masse molaire (kDa)	DDA (%)
CL 113	Chlorhydrate	9	80	83
CL 213	Chlorhydrate	150	370	86
G 113	Glutamate	16	160	86
G 213	Glutamate	75	412	85

Tableau A1: Nomenclature utilisée pour nommer les sels de chitosane

Annexe B

Spectres RMN des sels de chitosane

Les spectres RMN des sels de chitosane sont réalisés, comme dans le cas du chitosane natif, à une température de 70°C afin de déplacer le pic HOD et de permettre une meilleure visualisation des pics souhaités. Les valeurs de DDA ont été déterminées par intégration des pics des protons $H_{(2)}$-$H_{(6)}$ de l'unité saccharidique et des 3 protons du groupe acétyl (H_{Ac}) et sont regroupées dans le tableau 8 (page 120).

Les spectres des différents sels de chitosane sont présentés dans cette annexe.

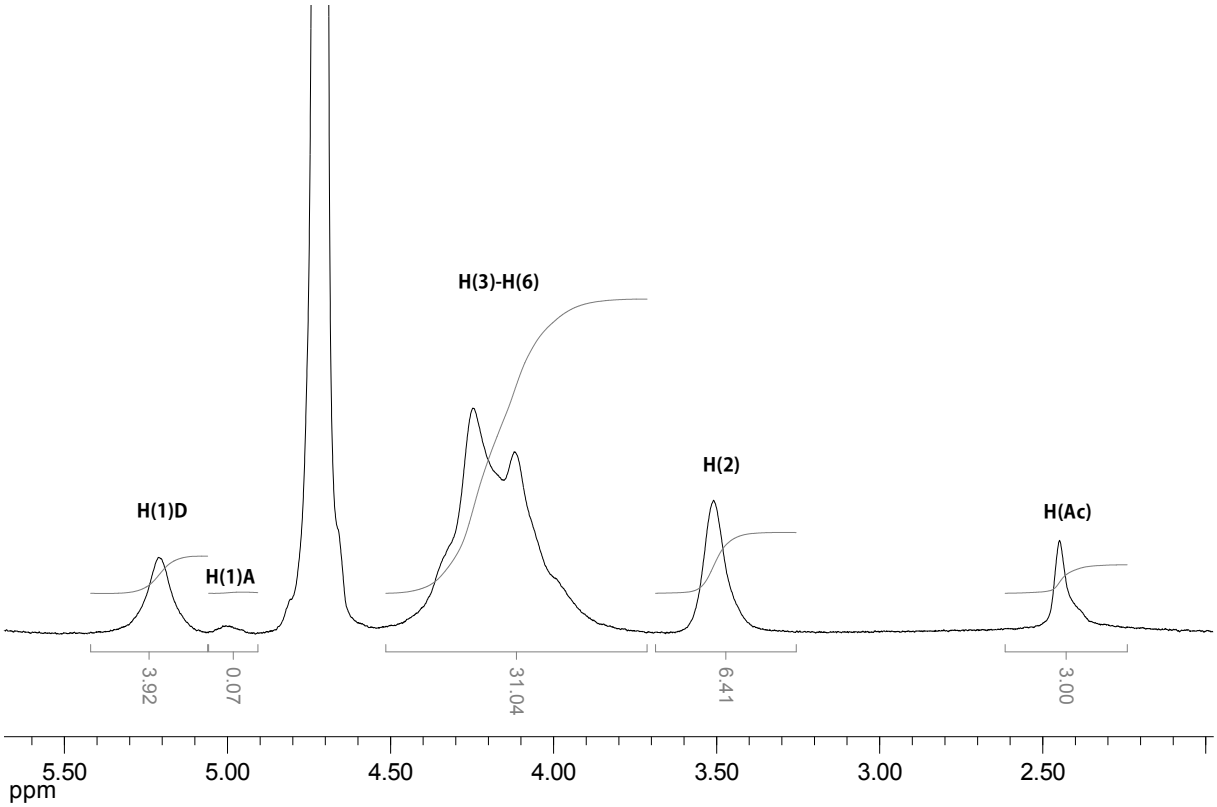


Figure B1 : Spectre RMN du CL 213, dans D_2O à 70°C

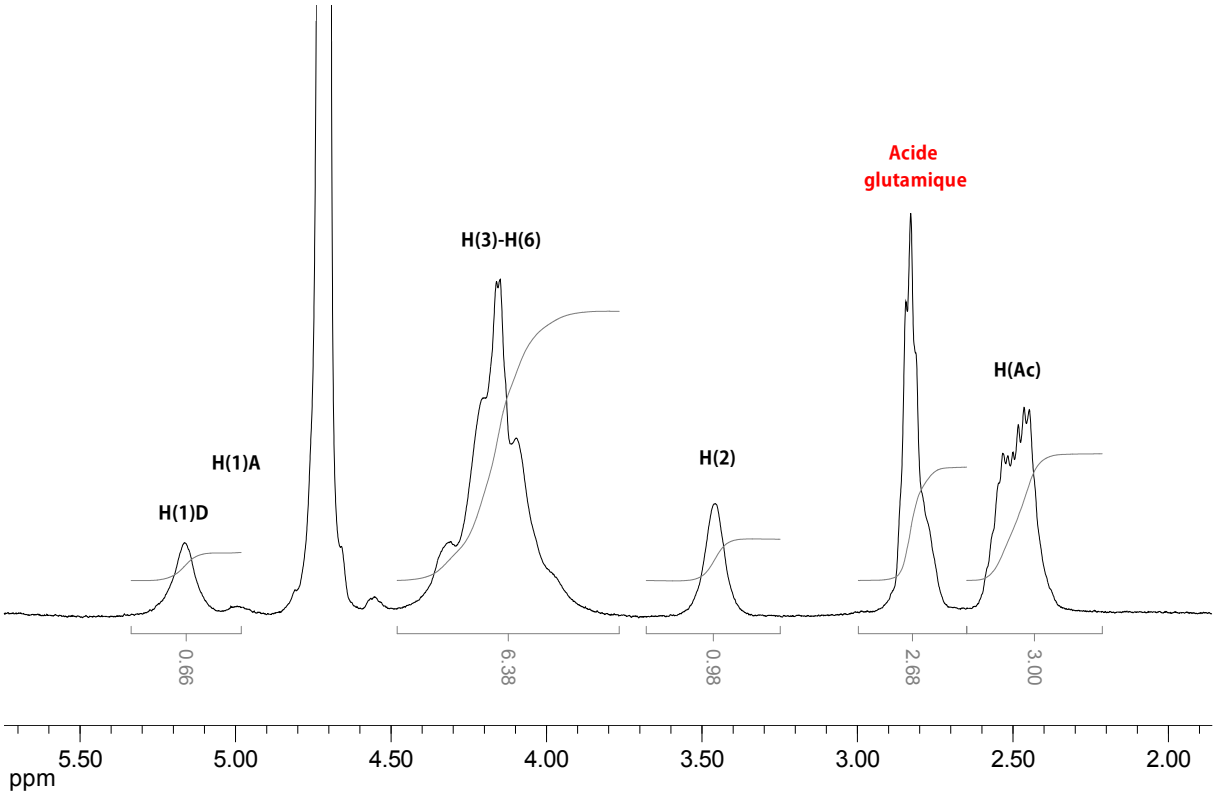


Figure B2 : Spectre RMN du G 113, dans D_2O à 70°C

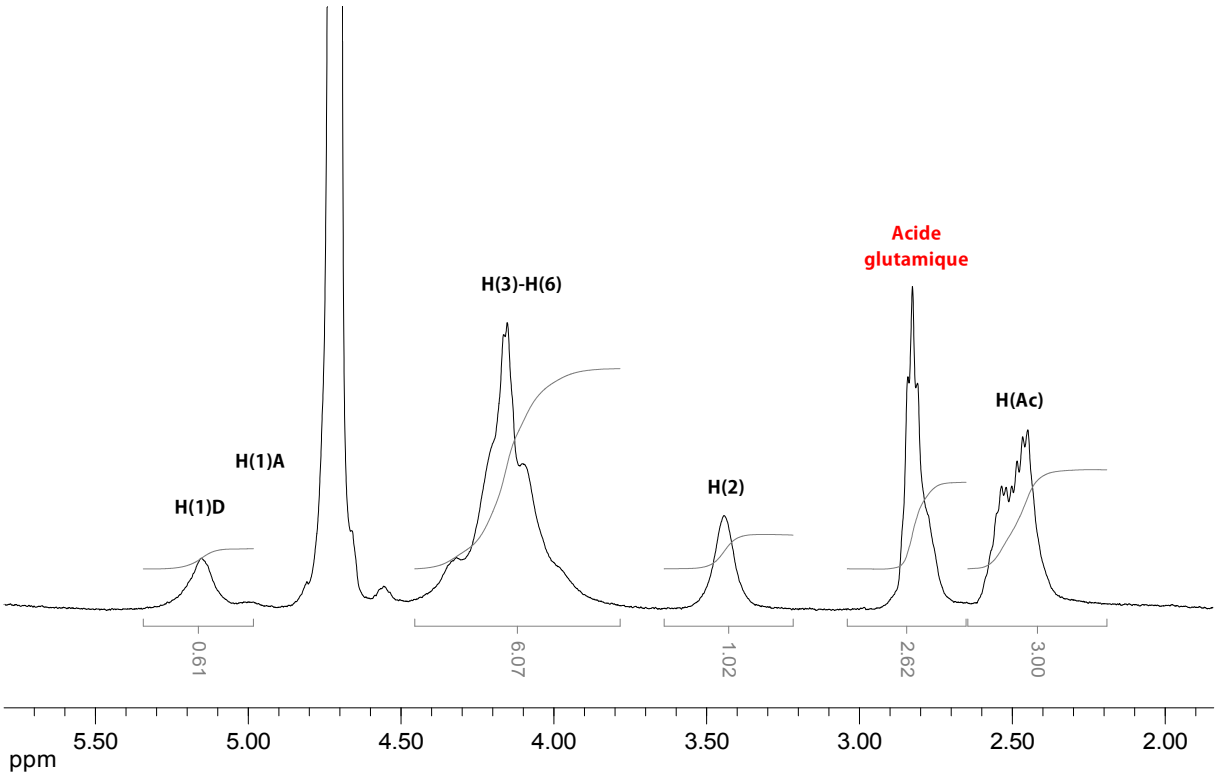


Figure B3 : Spectre RMN du G 213, dans D_2O à 70°C

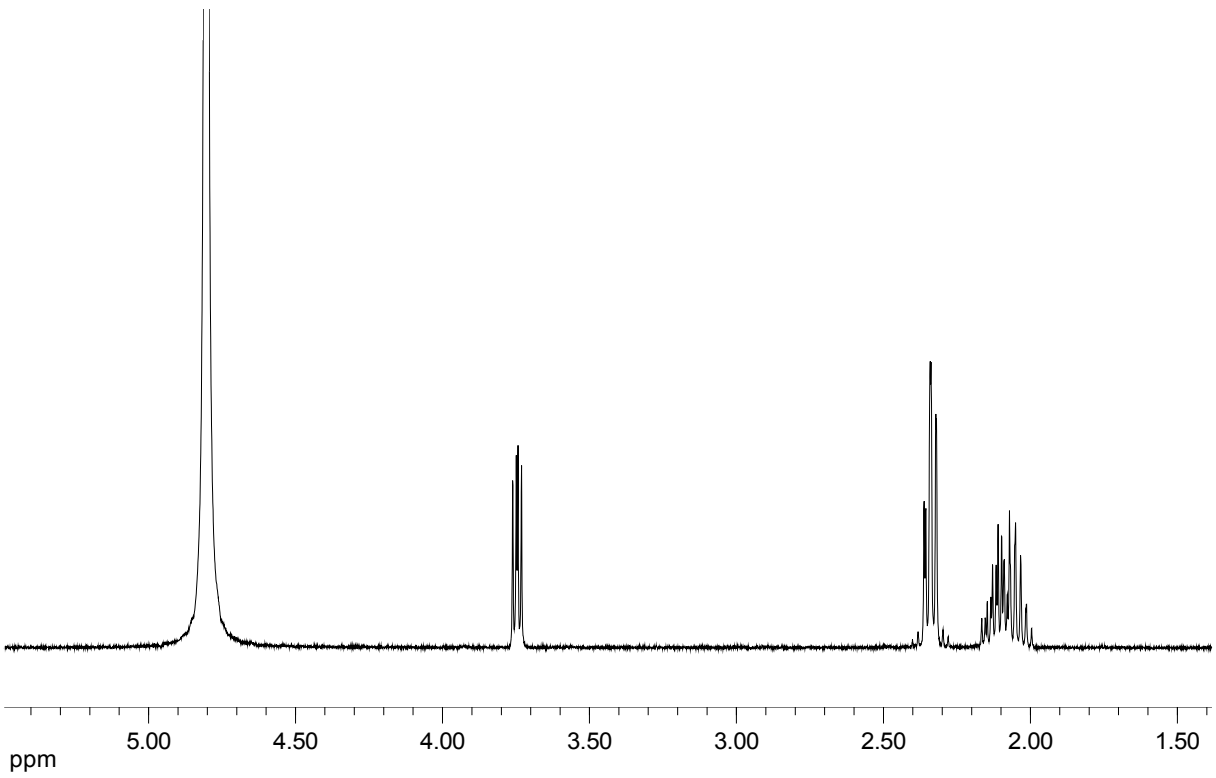


Figure B4 : Spectre RMN de l'acide glutamique dans D_2O à 25°C

Annexe C

Diagramme de turbidité des NOCC de DDA et masse molaire variables

Les zones de complexation de NOCC de différents DDA et masse molaire ont été déterminées par dosage turbidimétrique, par l'intermédiaire de la mesure de densité optique à 500 nm. Les diagrammes de turbidité obtenus dans le cas de la complexation de l'insuline avec ces différents NOCC sont présentés dans cette annexe.

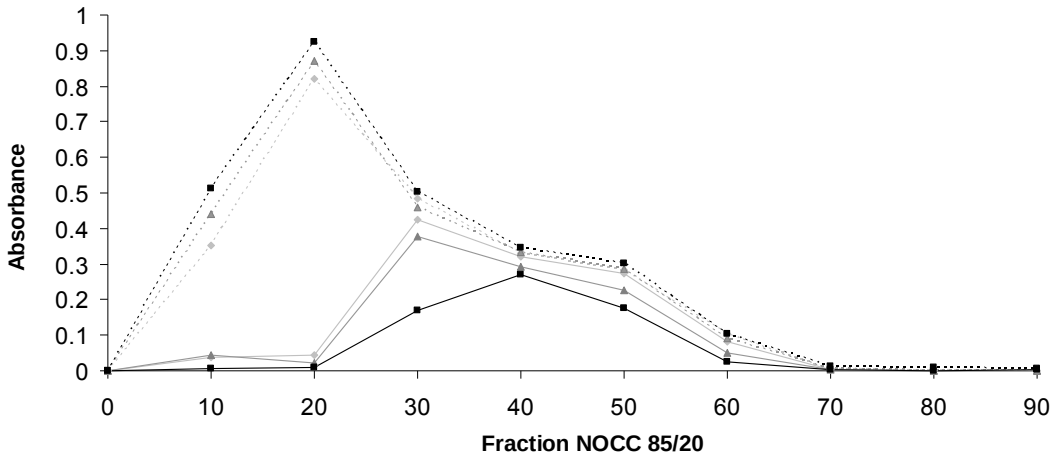


Figure C1 : Turbidité des solutions NOCC 85/20 / insuline en fonction de la fraction volumique en NOCC (ligne discontinue : t_0, ligne continue : $t = t_0+2h$)

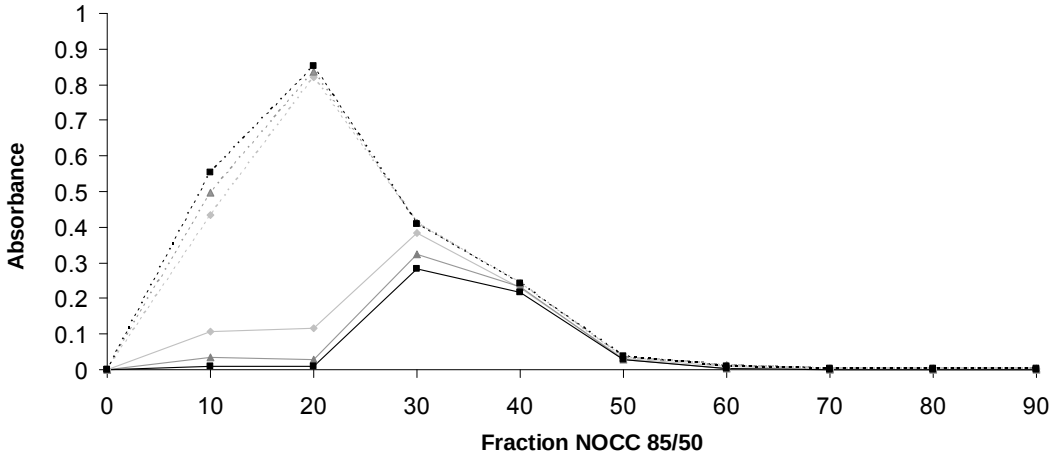


Figure C2 : Turbidité des solutions NOCC 85/50 / insuline en fonction de la fraction volumique en NOCC (ligne discontinue : t_0, ligne continue : $t = t_0+2h$)

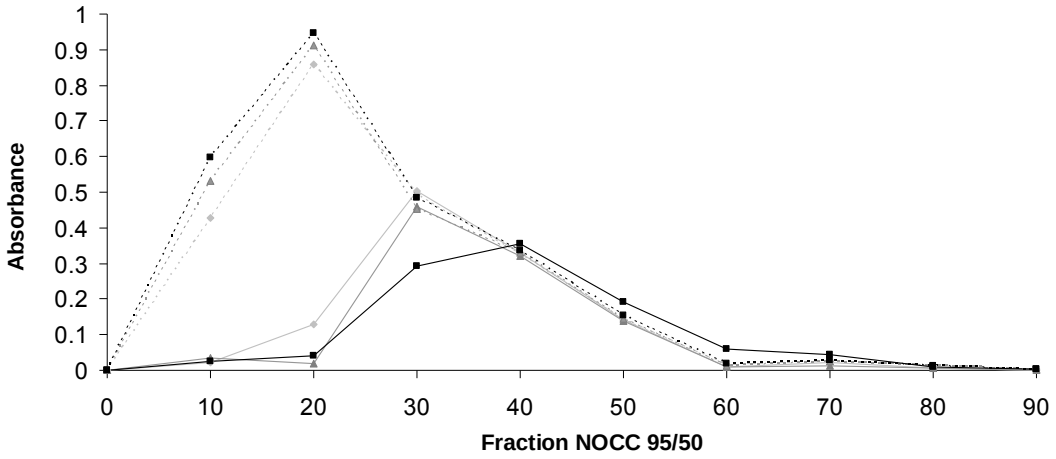


Figure C3 : Turbidité des solutions NOCC 95/50 / insuline en fonction de la fraction volumique en NOCC (ligne discontinue : t_0, ligne continue : $t = t_0+2h$)

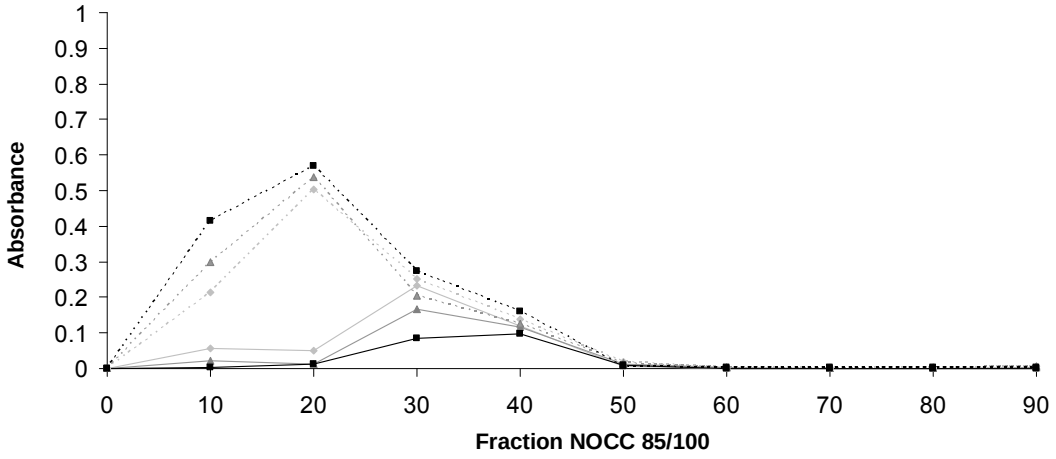


Figure C4 : Turbidité des solutions NOCC 85/100 / insuline en fonction de la fraction volumique en NOCC (ligne discontinue : t_0, ligne continue : $t = t_0+2h$)

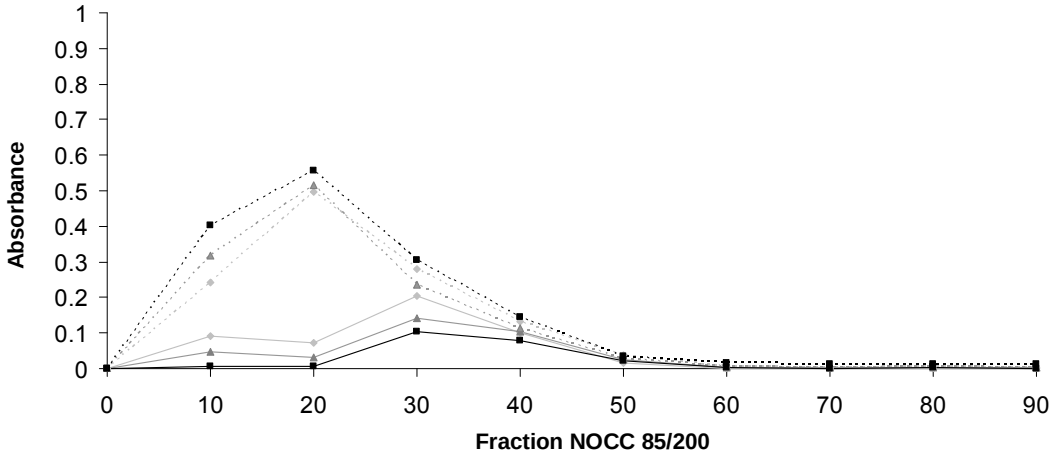


Figure C5 : Turbidité des solutions NOCC 85/200 / insuline en fonction de la fraction volumique en NOCC (ligne discontinue : t_0, ligne continue : $t = t_0+2h$)

Annexe D

Effet hypoglycémiant des nanoparticules après administrations intra-duodénale à des rats diabétiques

Cette annexe présente les diminutions de glycémie observées pour des administrations à 50, 75 et 100 UI/kg de nanoparticules non lyophilisées et lyophilisées à base de NOCC et dans différentes conditions de formation (fractions volumiques NOCC :insuline variables).

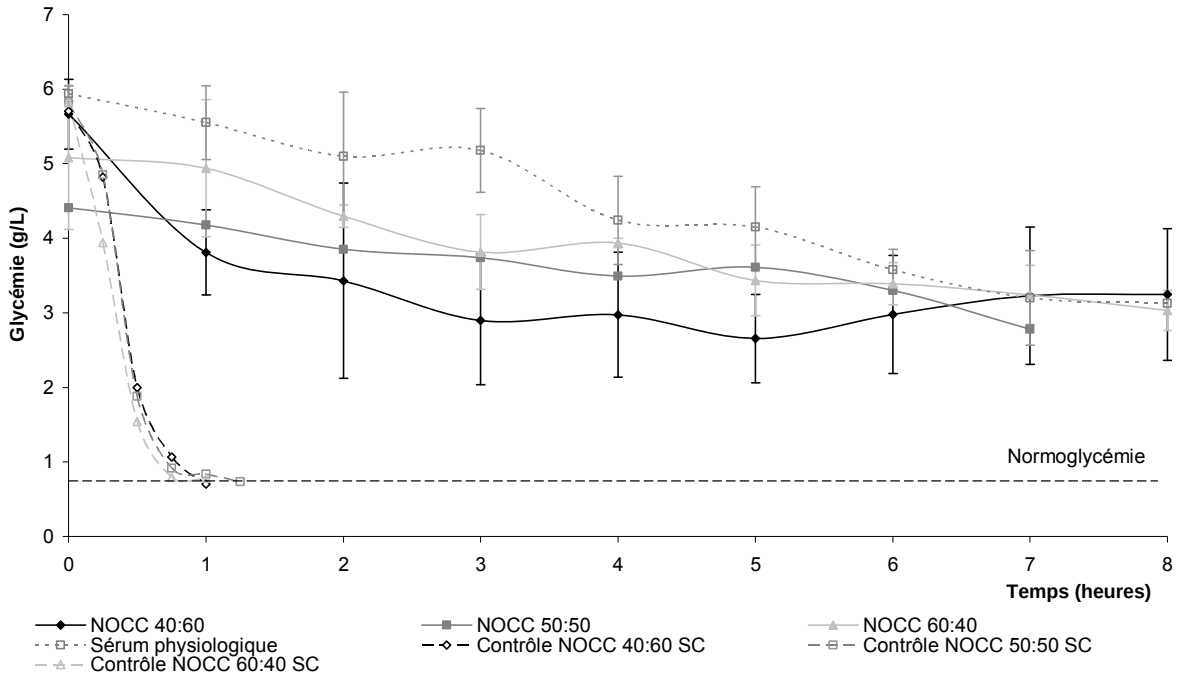


Figure D1 : Administration intra-duodénale à 50 UI/kg de nanoparticules NOCC 40:60 (n=3), NOCC 50:50 (n=1) et NOCC 60:40 (n=2) non lyophilisées en comparaison d'une injection sous-cutanée de nanoparticules et de sérum physiologique (n=2)

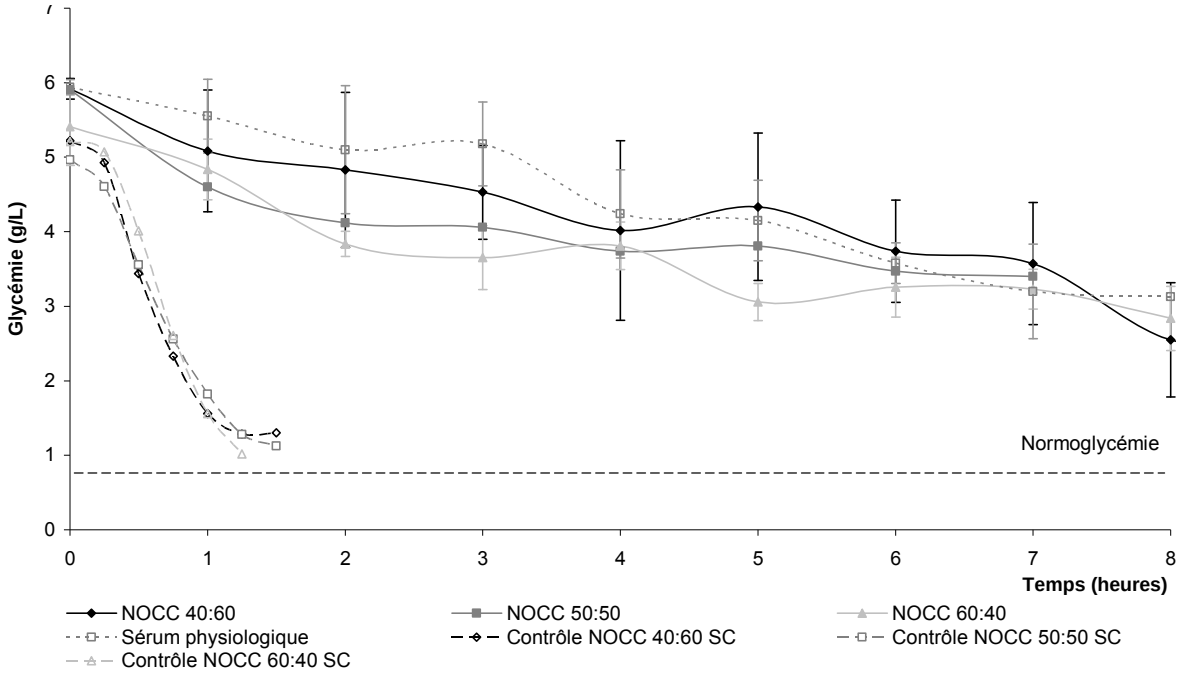


Figure D2 : Administration intra-duodénale à 50 UI/kg de nanoparticules NOCC 40:60 (n=3), NOCC 50:50 (n=1) et NOCC 60:40 (n=3) lyophilisées en comparaison d'une injection sous-cutanée de nanoparticules et de sérum physiologique (n=2)

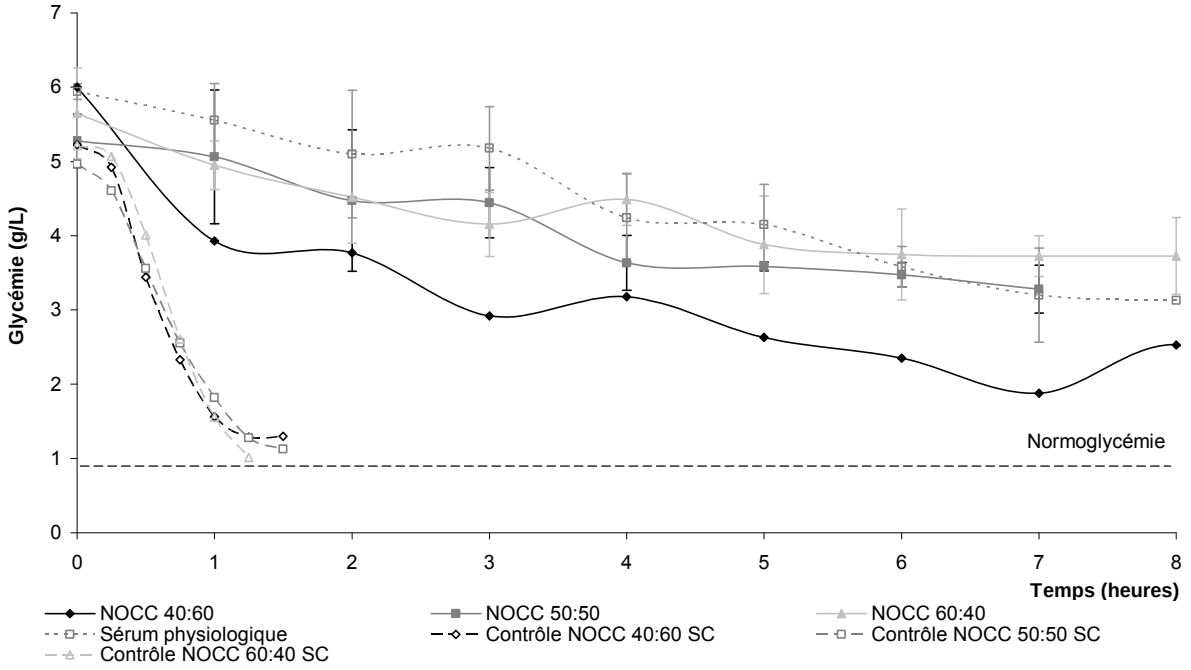


Figure D3 : Administration intra-duodénale à 75 UI/kg de nanoparticules NOCC 40:60 (n=1), NOCC 50:50 (n=3) et NOCC 60:40 (n=3) lyophilisées en comparaison d'une injection sous-cutanée de nanoparticules et de sérum physiologique (n=2)

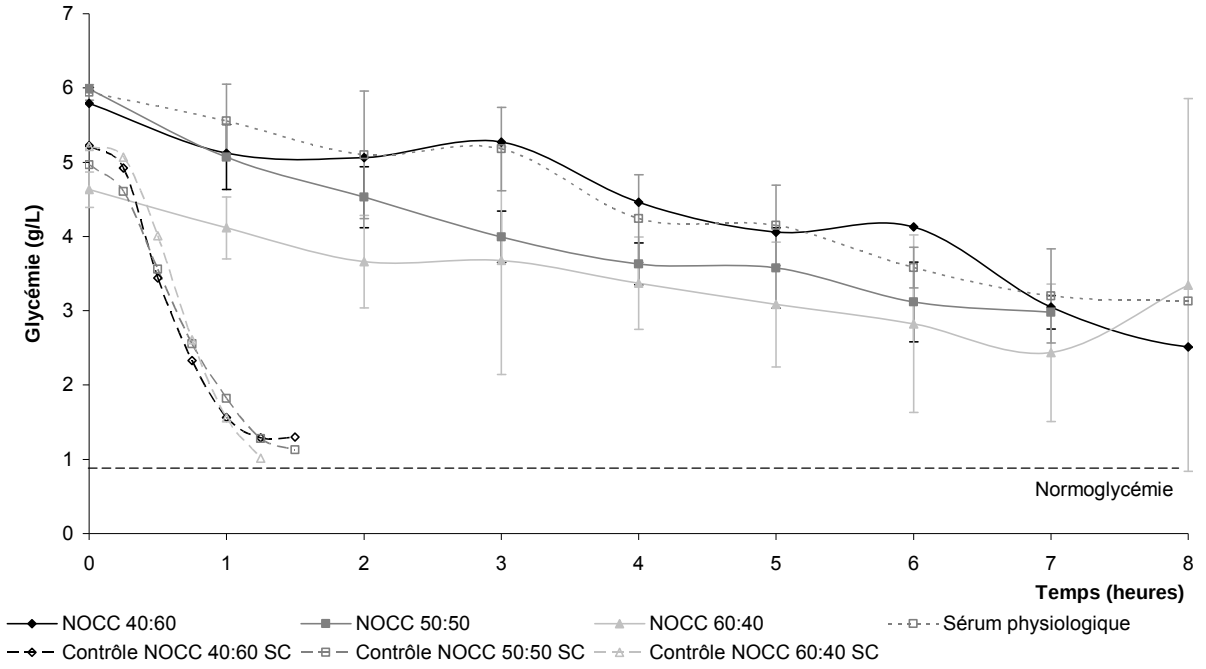


Figure D4 : Administration intra-duodénale à 100 UI/kg de nanoparticules NOCC 40:60 (n=1), NOCC 50:50 (n=2) et NOCC 60:40 (n=2) lyophilisées en comparaison d'une injection sous-cutanée de nanoparticules et de sérum physiologique (n=2)

Le diabète est une maladie chronique qui touche plus de 3 millions de personnes en France. Se traduisant par une perte du contrôle de la glycémie, son traitement actuel par injections pluri-quotidiennes d'insuline entraîne un inconfort des patients. D'autres voies d'administrations ont été développées, comme la voie orale qui constitue la voie d'administration la plus physiologique, la plus confortable et la mieux acceptée par le patient. Néanmoins, des contraintes physico-chimiques peuvent entraîner une perte de l'activité hypoglycémiante de l'insuline. Afin de la protéger et de permettre son administration orale, un vecteur pharmaceutique complexe a été élaboré par double encapsulation : un véhicule apportant une protection gastrique et des nanoparticules apportant une protection intestinale. L'insuline ainsi encapsulée au sein de ces nanoparticules est protégée du milieu intestinal et peut alors franchir la barrière intestinale pour rejoindre la circulation sanguine afin d'être libérée.

Ces nanoparticules sont obtenues par coacervation complexe avec le chitosane, polymère naturel bioassimilable. Néanmoins, celui-ci présente une solubilité limitée à pH physiologique rendant difficile sa complexation avec l'insuline. Deux dérivés du chitosane ont été utilisés : un dérivé obtenu par modifications chimiques, le N-,O-carboxyméthyl chitosane (NOCC) et un sel de chitosane, le chitosane chlorhydrate. Une caractérisation approfondie de ces deux dérivés hydrosolubles du chitosane permet d'envisager la complexation de l'insuline à pH physiologique. L'étude de la complexation est réalisée dans le cas de ces deux dérivés. L'obtention de diagrammes de turbidité permet de définir la zone de formation des nanoparticules. Celles-ci présentent une taille moyenne comprise entre 300 et 500 nm, une charge positive (+ 40 mV) et contiennent en moyenne 85 à 90 % d'insuline encapsulée. Des études *in vitro* ont permis de montrer leur stabilité en milieu intestinal. Leurs propriétés biologiques ont été vérifiées à l'aide de manipulations *in vivo* sur des rats diabétiques. Ces essais ont montré la conservation de l'activité biologique de l'insuline et la capacité des nanoparticules à induire une diminution de la glycémie pouvant conduire à l'obtention de la normoglycémie, 8 heures après leur administration.

Les nanoparticules obtenues à l'aide des deux dérivés hydrosolubles du chitosane protègent l'insuline (conservation de son activité biologique) du milieu intestinal et lui permettent de traverser la barrière intestinale. Ces résultats permettent la validation du concept d'encapsulation d'insuline par coacervation complexe. Les nanoparticules peuvent désormais faire partie intégrante du vecteur pharmaceutique complexe afin d'être administrées par voie orale.

Diabetes mellitus is a chronic disease which affects more than 3 millions people in France. Translated by a loss of glycaemia control, its current treated by daily insulin injections entailing discomfort of patients. Other administrations way have been developed and the oral route constitute the most physiological, comfortable and best accepted by patients. Nevertheless, physico-chemical constraints can lead to lose hypoglyceamiant activity of insulin. To avoid it, a pharmaceutical complex vector was developed by double encapsulation: a vehicle bringing a gastric protection and nanoparticles bringing an intestinal protection. By this way, encapsulated insulin in nanoparticles is protected from the intestinal environment and can then cross intestinal barrier to join the blood circulation to be released.

These nanoparticles were obtained by complex coacervation with chitosan, a natural and biocompatible polymer. Nevertheless, its low solubility at physiological pH makes its complexation with insulin difficult. Two different water-soluble chitosan derivatives were formed: one obtained by chemical modifications, N-, O-carboxymethyl chitosan (NOCC) and one chitosan salt, chitosan chlorhydrate. A detailed characterization of these two water-soluble derivatives allows insulin complexation at physiological pH. A complexation study made for these two compounds allows the definition of a complexation area where nanoparticles were formed. They had shown average size from 300 to 500 nm, positive charge (+40 mV) and encapsulation efficiency of 85-90 %. *In vitro* studies allowed to show nanoparticles stability as well as intestinal resistance. Their biological properties were verified by *in vivo* experiments on diabetic rats, showing the conservation of insulin biological activity and ability to induce glycaemia decrease going to normoglycaemia in 8 hours.

Nanoparticles obtained with two water-soluble chitosan derivatives, protect insulin (conservation of biological activity) from the intestinal environment and allow it to cross intestinal barrier. These results permit the validation of insulin encapsulation by complex coacervation concept. Hence nanoparticles can be included in the complex pharmaceutical vector to be administered by oral way.