

**République Algérienne Démocratique et Populaire**

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**



Université Blida -1- Saad DAHLEB  
Faculté des Sciences et de Technologie  
Département du Génie des Procédés

Dans le cadre de l'obtention d'un diplôme de

Master en Génie des Procédés

Option : Matériaux et Produits Organiques Industriels

**Sujet :**

**Contribution à la formulation de nanoparticules  
bioadhésives à base de biopolymères cationiques sensibles  
au pH pour la libération prolongée du Glimépiride :  
Etude comparative entre la gélatine et le chitosane**

*Réalisé par :*

- Mr ERROURKMA Hamza
- Mme HADERI Sarah

*Encadré par :*

- Pr. HADJ ZIANE. A

Soutenu le 17/12/2015 devant le Jury :

|                |              |                         |
|----------------|--------------|-------------------------|
| Mme LARIBI     | Présidente   | Maître de conférences A |
| Mme BENSACIA   | Examinatrice | Maître de conférences B |
| Mme HADJ ZIANE | Promotrice   | Professeur              |

# Remerciement

---

On aimerait adresser nos plus sincères remerciements,

A Madame Laribi et à Madame Bensacia de nous faire l'honneur d'être membres du jury.

Au Professeur A. Hadj-Ziane pour avoir encadré ce travail, pour la confiance dont elle nous a fait part ainsi que pour sa présence dans le jury.

Et à monsieur Nait-Bachir, Co promoteur, pour avoir dirigé nos travaux.

Je remercie potentiellement Mon Cher Professeur Moulay Saad, une personne qui ne cesse de m'impressionner et m'inspirer, je vous remercie mon cher professeur pour avoir été un élément prépondérant dans ma vie tel un phare dans une mer agitée.

Aux Laboratoires de Génie Chimie pour m'avoir offert la possibilité de vivre cette expérience si enrichissante, et tout particulièrement à Madame Bensacia, ingénieur du laboratoire de génie Chimique, pour ses remarques pertinentes ainsi que pour sa ponctualité. Encore Merci à Madame Laribi pour son assistance et pour son ouverture d'esprit, pour ses précieuses idées toutefois innovantes et sur le bon axe un aboutissement très précoce à son égard.

A Madame Mouhi Lilia du laboratoire du Génie de la Réaction USTHB, Madame Medjcan du laboratoire de nutrition faculté de biologie USTHB, Monsieur Bosta Penka Responsable du LCQ de l'industrie pharmaceutique El Kendy, Professeur Djadoun du laboratoire de cristallographie et cristallogénèse, pour leurs aide précieuse lors de la réalisation de la caractérisation.

A Mon cher ami, Docteur Larbi Yazid, Chirurgien viscéral, pour avoir contribué à ma formation, pour sa présence magique qui résout tous les soucis que l'on peut rencontrer avec la partie biologique et le système gastro intestinal. Merci Yazid pour avoir coloré ma planète.

A Madame Zahia et Ait Masbah, pour leur bonne humeur et le partage de leurs expériences, professionnelle mais pas seulement... Zahia, tes éclairs de génie sont toujours aussi appréciables !

A toute l'équipe du département de Chimie Industrielle pour leur accueil, leur sympathie, leur aide et leur bienveillance à mon égard sans oublier les Doctorants avec qui j'ai eu le plaisir de partager ces 9 mois.

Sur un plan plus personnel, je tiens à remercier chaleureusement mes amis de ma première promotion ; Oumaima, Saida, Djahida, Zahra, Radia, Meryem, Amina, Norah, Kenza, Wafia ainsi que tous les autres avec lesquels j'ai pu partager tant de choses durant ces longues années. J'espère que cette ultime étape de notre formation ne signera pas la fin de notre complicité.

Une motion particulière à mon meilleur ami Nazim, pour tous les moments inoubliables durant ces dernières années, pour son soutien moral et de la part de sa mère un grand merci « tata », Nazim rappelle-toi des moments passés à la montagne pour méditer ou pas, d'ailleurs...

# *Dédicace*

*Pour ma famille*

*A mes grands parents*

*A mes parents, ma mère qui a su me supporter tout au long de ce chemin, dans les bons et les mauvais moments.*

*Merci du fond du cœur et plein de bonheur pour mes frères et sœurs dans ce nouveau tournant de leur vie !*

*A ma tante Samia*

*Et tous mes amis en Algérie, en Europe et partout dans le monde, où que vous soyez, Nazim, Yazid, Ahmed<sup>2</sup>, France, Florence, Éric, Alexandre, George, Mathias, Cindy...*

*Que la paix soit avec vous*

*Hamza*

# *Dédicace*

*Je tiens en premier lieu à remercier le bon dieu tout puissant « Allah » qui nous a donné la force et le courage de mener à bien ce travail.*

*Je dédie ce travail à mes deux perles que j'aime énormément, mes parents chéris, je leurs souhaite tout le bonheur du monde et une longue vie près de vos chères et je leurs dis merci et 1000 mercis pour tous leurs sacrifices (conseils, patience, amour, éducation, ... etc.) Ce sont les meilleurs parents du monde ; je les aime.*

*A mon mari chéri qui m'a soutenue dès le début de mon parcours universitaire avec sa patience, sa confiance en moi et son amour.*

*A ma sœur Hadia et mon frère Mohamed que j'aime beaucoup et je leurs dis bonne chance.*

*A ma chère tante Akila pour son soutien, ses conseils et son amour.*

*A ma chère cousine Meriem pour sa patience et son aide et à mes cousins et cousines.*

*A ma meilleure amie que j'aime beaucoup Kawther pour son soutien, sa patience et son amitié.*

*A ma chère grand-mère que j'aime beaucoup je la remercie pour ses prières.*

*A mes TANTES et ONCLES sans exception.*

*A tous mes camarades qui m'ont permis de vivre mes meilleurs moments à l'université et qui m'ont soutenu quand j'en avais besoin : Amina, Oumaima, Zahra, Fella, Hamza, Yacine, Sabrina et Noura, MERCI beaucoup.*

*A moi-même aussi je dédie ce travail car je suis très fière de moi.*

*HADERI Sarah*

## **Résumé**

L'objectif de cette étude est porté sur l'encapsulation du glimépiride sous forme de nanoparticules avec deux polymères bioadhésifs : Le chitosane et la gélatine, afin de déterminer le meilleur vecteur pharmaceutique, qui présente à la fois un taux d'encapsulation élevé du principe actif avec une meilleure adhérence sur le mucus intestinal et qui montre une meilleure cinétique de dissolution et de diffusion du principe actif, en s'obstinant à améliorer l'efficacité et la biodisponibilité quant au glimépiride. Pour cela, on a fait usage à deux voies d'encapsulation : gélification ionotropique du chitosane et la désolvation en deux étapes de la gélatine. Ainsi, la caractérisation a été effectuée en employant plusieurs techniques tel que : FTIR, *in vitro*, *ex vivo*, ... etc.

## **ملخص**

يتركز الهدف من هذه الدراسة على الكبسلة من غليمبيريد في شكل الجسيمات النانوية مع اثنين من البوليمرات ذو الالتصاق البيولوجي : الشيتوزان والجيلاتين، لتحديد أفضل الناقل الصيدلاني، الذي يمثل على حد سواء على درجة عالية من التغليف للمادة الفعالة مع التصاق أفضل لمخاط الأمعاء ومما يدل على تحسين حركية حل وتوزيع المادة الفعالة، من خلال الإصرار على تحسين كفاءة و التوفر البيولوجي لغليمبيريد. لهذا، تم استخدام طريقتين التغليف: دبق ايونوتروبي للشيتوزان ونزع الكحول على مرحلتين للجيلاتين. وهكذا، تم إجراء توصيف باستخدام عدة تقنيات مثل: FTIR، في المختبر، خارج الحي، ... الخ

## **Abstract**

The purpose of this study is the encapsulation of the glimepiride in nanoparticles system with tow bioadhesif polymers: Chitosan and gelatin, so as to made the finest pharmaceutical vector which present at the same time a high rate of encapsulation of the active molecule, also, the top adherence on the intestinal mucus with the best kinetic of dissolution and the diffusion of active molecule. The goal is to ameliorate the biodisponibility and efficiency of the glimepiride. We used for that two different technics of encapsulation: ionotropic jellification, desolvation of gelatin in tow steeps. The characterization was realized using different technics such as: FTIR, *in vitro*, *ex vivo*.

# Sommaire

| Titre  | Page      |
|--|-----------|
| Liste des figures  |           |
| Liste des tableaux   |           |
| Abréviation  |           |
| <b>Introduction générale</b>                                       | <b>1</b>  |
| <b>Chapitre 1 : Les polymères bioadhésifs</b>                      | <b>3</b>  |
| 1. Polymères bioadhésifs   | 3         |
| 2. Polymères bioadhésifs de première génération                    | 3         |
| 2.1 Polymères anioniques   | 3         |
| 2.2 Polymères cationiques  | 4         |
| 2.3 Polymères non ioniques   | 5         |
| 3. Polymères bioadhésifs de seconde génération                     | 5         |
| 4. Polymères à libération modifiée                                 | 7         |
| 5. Modulation et évaluation de la mucoadhésion des nanosystèmes    | 8         |
| <b>Chapitre 2 : Chitine, chitosane et leurs dérivés</b>            | <b>11</b> |
| 1. Historique  | 11        |
| 2. Extraction de la chitine  | 11        |
| 2.1 Schéma général de production de la chitine et ses dérivés      | 11        |
| 2.2 Matériel animal  | 11        |
| 2.3 Prétraitement des carapaces                                    | 13        |
| 2.4 Déminéralisation   | 14        |
| 2.5 Déprotinisation  | 14        |
| 2.6 Décoloration   | 15        |
| 3. Contrôle qualité de la chitine                                  | 15        |
| 3.1 Degré de déminéralisation                                      | 15        |
| 3.2 Le degré de déprotinisation                                    | 16        |
| 4. Préparation du chitosane  | 17        |
| 4.1 Déacétylation de la chitine                                    | 17        |
| 4.2 Caractérisation de la chitine et/ou chitosane                  | 19        |
| 4.2.1 Le poids moléculaire   | 19        |
| 4.2.2 Degré de N-acétylation                                       | 20        |
| 4.2.3 Comportement du chitosane en milieu acide                    | 20        |
| 4.2.4 Spectroscopie infrarouge à transformation de Fourier (FTIR)  | 21        |
| <b>Chapitre 3 : Gélatine</b>                                       | <b>22</b> |
| 1. Propriétés  | 23        |
| 1.1 Physiques  | 23        |
| 1.2 Chimiques et biologiques                                       | 23        |
| 2. Extraction  | 24        |
| 3. Raffinement   | 25        |
| 4. Encapsulation   | 25        |
| 4.1 Encapsulation de BSA sur des nanoparticules de gélatine        | 25        |
| 4.2 Encapsulation de médicament anticancéreux (Paclitaxel) sur des | 25        |

# Sommaire

|  |    |
|--|----|
| nanoparticules de la gélatine  |    |
| 4.3 Encapsulation de médicament anti-VIH (Didanosine) sur des nanoparticules de gélatine           | 26 |
| 4.4 Encapsulation des antipaludiques (Phosphate de chloroquine) sur des nanoparticules de gélatine | 26 |
| 5. Usages médicaux   | 28 |

## **Chapitre 4 : Nanoencapsulation** **29**

|   |    |
|---|----|
| 1. Les différentes techniques d'encapsulation         | 30 |
| 1.1 La gélation ionotropique                          | 30 |
| 1.2 Le spray-dring                                    | 30 |
| 1.3 L'émulsion  | 32 |
| 1.3.1 L'émulsion simple (h/h ou h/e)                  | 33 |
| 1.3.2 L'émulsion double (e/h/e)                       | 34 |
| 1.4 La polymérisation interfaciale (polycondensation) | 35 |
| 1.5 La séparation de phase ou coacervation            | 37 |
| 2. Caractérisation des nanoparticules                 | 41 |
| 2.1 Granulométrie Laser                               | 41 |
| 2.2 Zêtamétrie  | 42 |
| 3. Le vecteur pharmaceutique                          | 42 |
| 3.1 Les contraintes chimiques                         | 43 |
| 3.2 Les contraintes physiques                         | 44 |

## **Chapitre 5 : Glimépiride** **48**

|  |    |
|--|----|
| 1. Renseignements pharmaceutiques sur le glimépiride                         | 49 |
| 1.1 Substance pharmaceutique   | 49 |
| 1.2 Propriétés physicochimiques  | 50 |
| 2. Mode d'action et pharmacologie clinique                                   | 50 |
| 2.1 Mode d'action  | 50 |
| 2.2 Pharmacodynamique  | 50 |
| 2.3 Pharmacocinétique  | 51 |
| 2.3.1 Absorption   | 51 |
| 2.3.2 Distribution   | 52 |
| 2.3.3 Métabolisme  | 53 |
| 2.3.4 Excrétion  | 53 |
| 3. Effets indésirables   | 53 |
| 3.1 Aperçu des effets indésirables du médicament                             | 53 |
| 3.2 Effets indésirables du médicament observés au cours des essais cliniques | 54 |

## **Chapitre 6 : Matériels et méthodes** **57**

|  |    |
|--|----|
| 1. Matériels   | 57 |
| 1.1 Le chitosane   | 57 |
| 1.2 La gélatine  | 58 |
| 1.3 Autres produits  | 58 |
| 2. Formulation des nanoparticules                              | 58 |
| 2.1 Formulation des nanoparticules à base de chitosane         | 58 |
| 2.1.1 Protocole expérimental                                   | 58 |
| 2.1.2 Organisation des essais sous forme de plan d'expériences | 58 |
| 2.2 Formulation des nanoparticules à base de gélatine          | 59 |
| 2.2.1 Protocole expérimental                                   | 59 |
| 2.2.2 Organisation des essais sous forme de plan d'expériences | 60 |
| 3. Caractérisation physicochimique des nanoparticules          | 60 |

## Sommaire

|   |    |
|---|----|
| 3.1 Détermination du taux d'encapsulation                           | 60 |
| 3.1.1 Courbe d'étalonnage du glimépiride                            | 61 |
| 3.1.2 Préparation des solutions                                     | 61 |
| 3.1.3 Lecture des absorbances des solutions de glimépiride          | 62 |
| 3.2 Détermination de la granulométrie                               | 62 |
| 4. Caractérisation pharmacologique et biologique des nanoparticules | 63 |
| 4.1 Etude de la cinétique de dissolution in vitro                   | 63 |
| 4.2 Evaluation de la bioadhésion ex vivo                            | 64 |

## **Chapitre 7 : Résultats et discussion** **65**

|  |    |
|--|----|
| 1. Formulation des nanoparticules de chitosane                 | 65 |
| 1.1 Effets des facteurs sur le taux d'encapsulation            | 65 |
| 1.2 Effets des facteurs sur le diamètre des nanoparticules     | 67 |
| 1.3 Etude statistique du plan d'expériences                    | 69 |
| 2. Formulation des nanoparticules de gélatine                  | 70 |
| 2.1 Effets des facteurs sur le taux d'encapsulation            | 71 |
| 2.2 Effets des facteurs sur le diamètre des nanoparticules     | 73 |
| 2.3 Etude statistique du plan d'expériences                    | 75 |
| 3. Courbe d'étalonnage du glimépiride dans le tampon phosphate | 76 |
| 4. Etude in vitro de la cinétique de dissolution               | 76 |
| 5. Evaluation de la bioadhésion ex vivo                        | 77 |

## **Conclusion générale** **78**

Références bibliographiques



# Liste des figures

| <b>Figure</b> | <b>Titre</b>  | <b>Page</b> |
|---------------|---|-------------|
| <b>1</b>      | Principales possibilités d'interaction de type ligand-récepteur.<br>(1) Liaison du conjugué avec les glycoprotéines du mucus (cercles ouverts) ou des membranes cellulaires ou des glycolipides (flèche noire) ; (2) liaison avec un ligand spécifique de la surface de certaines cellules (exp : cellules M) ; (3) reconnaissance par les mucines sécrétées à des sites spécifiques (exp : cellules cancéreuses) | <b>6</b>    |
| <b>2</b>      | Procédé industriel de fabrication de la chitine et de ses dérivés (France Chitine)  | <b>12</b>   |
| <b>3</b>      | La structure moléculaire de la chitine comme copolymère de glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine  | <b>13</b>   |
| <b>4</b>      | Structure chimique du chitosane   | <b>17</b>   |
| <b>5</b>      | Schéma des réactions chimiques de désacétylation et dépolymérisation – Sigma-Aldrich, Tutorial  | <b>17</b>   |
| <b>6</b>      | Dispersion des masses moléculaires  | <b>19</b>   |
| <b>7</b>      | Structures du chitosane en milieu acide(A) et en milieu neutre(B)   | <b>21</b>   |
| <b>8</b>      | Extraction de la gélatine.  | <b>25</b>   |
| <b>9</b>      | Différents types de particules permettant l'encapsulation d'un principe actif   | <b>29</b>   |
| <b>10</b>     | Schéma d'un appareil de spray-drying  | <b>31</b>   |
| <b>11</b>     | Microsphères obtenues par évaporation de solvant : émulsion simple (à gauche) et double (à droite)  | <b>33</b>   |
| <b>12</b>     | Microencapsulation par polymérisation interfaciale  | <b>35</b>   |
| <b>13</b>     | Schéma de la formation d'un coacervat   | <b>37</b>   |
| <b>14</b>     | Diagrammes de séparation de phase basés sur l'ajout de non-solvant (A), la température (B) et l'ajout de polymères incompatibles (C)  | <b>38</b>   |
| <b>15</b>     | Diagrammes de séparation de phase dans le cas d'un polyélectrolyte positif (Pe+) et d'un polyélectrolyte négatif (Pe-)  | <b>39</b>   |
| <b>16</b>     | Variations de pH et nature des enzymes présentes le long du tractus gastro-intestinal   | <b>43</b>   |

## Liste des figures

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| <b>17</b> | Contraintes physiques rencontrées le long du tractus gastro-intestinal   | <b>45</b> |
| <b>18</b> | Représentation schématique des trois voies de passage trans-épithélial à partir de                                 | <b>46</b> |
| <b>19</b> | Prévision de la survenue d'un diabète au moment le plus opportun   | <b>48</b> |
| <b>20</b> | Carte mondiale du diabète  | <b>48</b> |
| <b>21</b> | Granulomètre laser ANALYSETTE 22 NanoTec plus  | <b>63</b> |
| <b>22</b> | Appareil de dissolution Electrolab TDT- 08L  | <b>64</b> |
| <b>23</b> | Photographie de l'intestin de rat tapissé par les nanoparticules   | <b>64</b> |
| <b>24</b> | Influence des coefficients des facteurs sur le taux d'encapsulation  | <b>65</b> |
| <b>25</b> | Isoréponse représentant le taux d'encapsulation en fonction de la quantité de l'agent de durcissement et du ratio. | <b>67</b> |
| <b>26</b> | Influence des coefficients des facteurs sur le diamètre  | <b>67</b> |
| <b>27</b> | Isoréponse représentant le diamètre en fonction de la quantité de l'agent de durcissement et du ratio              | <b>69</b> |
| <b>28</b> | Histogramme des coefficients de corrélation et la prédictibilité du modèle   | <b>70</b> |
| <b>29</b> | Influence des coefficients des facteurs sur le taux d'encapsulation  | <b>71</b> |
| <b>30</b> | Isoréponse représentant le taux d'encapsulation en fonction de la quantité de l'agent de durcissement et du ratio. | <b>72</b> |
| <b>31</b> | Influence des coefficients des facteurs sur le diamètre  | <b>73</b> |
| <b>32</b> | Isoréponse représentant le diamètre en fonction de la quantité de l'agent de durcissement et du ratio              | <b>74</b> |
| <b>33</b> | Histogramme des coefficients de corrélation et la prédictibilité du modèle   | <b>75</b> |
| <b>34</b> | Courbe d'étalonnage du GLIM dans le tampon phosphate.  | <b>76</b> |
| <b>35</b> | Etude de la cinétique de dissolution in-vitro du Glimépiride à partir des nanoparticules.                          | <b>77</b> |

# Liste des tableaux

| <b>Tableau</b> | <b>Titre</b>  | <b>Page</b> |
|----------------|---|-------------|
| <b>1</b>       | Différentes techniques pour l'évaluation de la mucoadhésion des nanosystèmes et comparaison de leurs principales caractéristiques               | <b>10</b>   |
| <b>2</b>       | Composition globale des exosquelettes de crevette   | <b>13</b>   |
| <b>3</b>       | Les nanoparticules biodégradables pour la livraison des médicaments<br>Gélatine, chitosane  | <b>27</b>   |
| <b>4</b>       | Comparaison des différentes techniques d'encapsulation  | <b>41</b>   |
| <b>5</b>       | Facteurs anatomiques et physiologiques, du tractus gastro-intestinal de l'homme, influençant l'absorption et le métabolisme d'un principe actif | <b>44</b>   |
| <b>6</b>       | Toutes les molécules antidiabétiques présentées par classe  | <b>49</b>   |
| <b>7</b>       | Données cliniques   | <b>52</b>   |
| <b>8</b>       | Effets indésirables survenus chez > 1% des patients traités par AMARYL  | <b>54</b>   |
| <b>9</b>       | Méthode de préparation et de caractérisations du chitosane utilisé pour la nanoencapsulation  | <b>57</b>   |
| <b>10</b>      | Matrice des expériences du plan factoriel pour l'optimisation des nanoparticules de chitosane   | <b>59</b>   |
| <b>11</b>      | Matrice des expériences du plan factoriel pour l'optimisation des nanoparticules de gélatine  | <b>60</b>   |
| <b>12</b>      | Essais du plan d'expérience : matrice des facteurs et des réponses pris en considération dans le plan d'expériences                             | <b>65</b>   |
| <b>13</b>      | Les valeurs des différents coefficients du modèle   | <b>66</b>   |
| <b>14</b>      | Les valeurs des différents coefficients du modèle   | <b>68</b>   |
| <b>15</b>      | Essais du plan d'expérience : matrice des facteurs et des réponses pris en considération dans le plan d'expériences                             | <b>71</b>   |
| <b>16</b>      | Les valeurs des différents coefficients du modèle   | <b>72</b>   |
| <b>17</b>      | Les valeurs des différents coefficients du modèle   | <b>74</b>   |
| <b>18</b>      | Données de la courbe d'étalonnage du GLIM dans le tampon phosphate  | <b>76</b>   |

# Liste des abréviations

| <b>Abréviation</b>       | <b>Signification</b>  |
|--------------------------|---|
| <b>ADH :</b>             | Hormone anti-diurétique   |
| <b>ALT :</b>             | Alanine aminotransférase  |
| <b>BHE :</b>             | Barrière hémato-encéphalique                                    |
| <b>BSA :</b>             | Albumine sérique bovine   |
| <b>C<sub>max</sub> :</b> | Concentration maximale  |
| <b>CP :</b>              | Chloroquine phosphate   |
| <b>DNID :</b>            | Diabète non insulino-dépendant                                  |
| <b>E441 :</b>            | Gélatine  |
| <b>GAJ :</b>             | Glycémie à jeun   |
| <b>Hb A1C :</b>          | Hémoglobine glyquée ou glycosylée (sœur jumelle de la glycémie) |
| <b>HCl :</b>             | Acide hydrochlorhydrique  |
| <b>HEC :</b>             | Hydroxyéthyle cellulose   |
| <b>HPC :</b>             | Hydroxypropyle cellulose  |
| <b>HPMC :</b>            | Hydroxypropyl-Méthylcellulose                                   |
| <b>NPH :</b>             | Neutral protamine hagedorn                                      |
| <b>PA :</b>              | Principe actif  |
| <b>PBS :</b>             | Phosphate buffered saline (tampon phosphate salin)              |
| <b>PEG:</b>              | Polyéthylène glycol   |
| <b>pH:</b>               | Potential hydrogène   |
| <b>PLGA:</b>             | Acide poly-lactique-Co-glycolique                               |
| <b>PVP:</b>              | Polyvinyle pirrolidone  |
| <b>RGD:</b>              | Arginine-Glycine-Aspartique                                     |
| <b>TGI:</b>              | Tractus gastro-intestinal                                       |
| <b>VIH:</b>              | Virus de l'immunodéficience humaine                             |

**Partie**  
**théorique**

# **Introduction**

## **générale**

# Introduction générale

Qualifié par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) de « fléau du XXI<sup>e</sup> siècle », le diabète est une maladie chronique qui touche aujourd'hui plus de 280 millions de personnes dans le monde. Le terme « diabète » vient du grec *diabainein*, dérivé du préfixe *dia-*, « à travers » et du verbe *bainein*, « 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. 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.

Cette maladie étant incurable définitivement, néanmoins des traitements existent pour la rendre plus vivable, plusieurs médicaments anti diabétique sont disponibles sur le marché pharmaceutique, chaque molécule est définie par son mode d'administration, sa posologie et ses effets indésirables, conditionnent le choix cornélien des praticiens, entre autre le glimépiride. Utilisé en per os, la posologie du glimépiride varie d'un patient à un autre en fonction de l'équilibre glycémique définissant sa biodisponibilité.

Notre stratégie envisagée est de réaliser deux nanoencapsulation du Glimépiride, par le chitosane et la gélatine dans le cadre d'une étude comparative qui consiste à améliorer la biodisponibilité du glimépiride en limitant une déperdition par dégradation, suite à des processus de digestion, ou par élimination avec le bol alimentaire non absorbé. Cette vectorisation permet aussi d'optimiser le contact de la molécule avec la muqueuse intestinale et de potentialiser son absorption ainsi que son passage au niveau systémique. Dans d'autres situations, le ciblage peut être souhaité, sans augmentation de la fraction absorbée. Tel est le cas pour des pathologies comme le cancer colorectal, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ou les troubles digestifs localisés chez des personnes sensibles comme la femme enceinte [1]. Une libération ciblée du principe actif directement sur la muqueuse intestinale permet alors d'augmenter et de maintenir dans le temps une concentration locale efficace en principe actif (PA) au niveau du tissu malade, tout en évitant un passage dans le sang [2]. L'action pharmacologique est ainsi optimisée et les effets indésirables, réduits. L'observance du traitement est alors améliorée, tout comme l'efficacité thérapeutique. [3] De nombreux systèmes ont été mis en œuvre et testés en vue de vectoriser la libération du PA dans l'intestin : Des systèmes pH-dépendant [4 ; 5 ; 6], des systèmes enzyme-dépendant [7] des systèmes bioadhésif [8] et des systèmes activés par un stimulus externe [9].

# Introduction générale

Nous avons souhaité s'intéresser au ciblage intestinal en vue d'assurer une libération localisée du glimépiride. Le système devra permettre non seulement une libération modifiée afin de protéger la molécule des conditions extrêmes de l'estomac mais aussi de tapisser tout l'épithélium intestinal grâce aux mécanismes de bioadhésion.

Le présent travail s'articulera donc en deux parties.

Dans un premier temps, une revue bibliographique permettra de détailler les différents polymères bioadhésifs ayant fait l'objet de ce travail et qui seront répertoriés dans le premier chapitre. On définira dans un deuxième chapitre le chitosane et la gélatine dans le troisième chapitre, les deux biopolymères qu'on a choisie pour cette étude. On détaillera aussi dans le quatrième chapitre les différentes techniques d'encapsulation et de caractérisations de nanoparticules afin considérer leur comportement dans les milieux physiologiques du TGI, nous pouvons ainsi prédire l'impact de la formulation et les exigences requises pour une libération ciblée du glimépiride. La bioadhésion, les mécanismes mis en jeu dans ce phénomène et les paramètres influents seront évoqués. Tout comme divers tests, *in vitro* et *ex vivo* et, permettant d'évaluer le pouvoir bioadhésif d'une formule.

La partie expérimentale sera présentée de façon conventionnelle : les matériels et méthodes employés dans un le sixième chapitre, et dans le septième chapitre les résultats et leur discussion. Enfin, une conclusion générale, portant sur l'ensemble des travaux réalisés, et des perspectives permettront de ficeler le travail.



**Chapitre 1 :**  
**Les polymères bioadhésifs**

## 1. Polymères bioadhésifs

Plusieurs familles de polymères ont d'ores et déjà montré de bonnes propriétés mucoadhésives. Ils peuvent être d'origine naturelle ou synthétique. Adrews et ses collaborateurs ont répertorié ces polymères en trois grandes catégories [10] :

- a. les polymères qui, au contact de l'eau, développent des propriétés adhésives responsables de la bioadhésion,
- b. Les polymères qui adhèrent au tissu biologique grâce à des liaisons physiques (liaison électrostatique principalement mais aussi interaction hydrophobe ou liaison hydrogène),
- c. Les polymères se liant à des sites spécifiques.

Les deux premières catégories rassemblent les polymères bioadhésifs dits de première génération. Il s'agit de systèmes non spécifiques. La dernière catégorie constitue la seconde génération et permet d'améliorer la vectorisation de la forme pharmaceutique sur un tissu particulier.

## 2. Polymères bioadhésifs de première génération

Les polymères de première génération peuvent être subdivisés en trois groupes : les anioniques, les cationiques et les non ioniques [11]. Selon Ludwig, seuls les deux premiers groupes sont pertinents dans la bioadhésion [12].

### 2.1. Polymères anioniques

Les polymères anioniques sont les plus employés, du fait de leur forte bioadhésion et de leur faible toxicité. Parmi ceux-ci, on trouve les dérivés de polyacrylate tels que les carbomères et le polycarbophil, les premiers polymères identifiés en termes de mucoadhésion [13]. D'après les conclusions de Tamburic et Craig [13;14], suite à une étude par rhéologie et texturométrie, ce sont le haut poids moléculaire et le degré de réticulation important qui conditionnent la mucoadhésion [14]. Ch'ng et ses collaborateurs ont montré que les dérivés acryliques présentaient une adhésion maximale pour des valeurs de pH comprises entre 5 et 6. L'ionisation décuple alors leur capacité de gonflement en présence d'eau et permet l'ouverture des sites de liaisons ainsi qu'une meilleure accessibilité pour les chaînes de glycoprotéines du mucus. En revanche, ils ont constaté qu'à pH neutre, l'adhésion était minimale. D'autre part, lors de tests *in vivo*, ils ont observé un temps de transit plus allongé avec les polyacrylates, qu'avec les polyméthacrylates [15]. L'équipe de Grabovac a étudié plusieurs types de polyacrylates et a conclu que le Carbopol® 980 NF possédait une adhésion supérieure au Carbopol® 974P NF, au polycarbophil et au Carbopol® 971P NF. D'autres scientifiques ont montré que, outre des propriétés mucoadhésives, les carbomères pouvaient permettre d'obtenir une cinétique de diffusion du PA de type Super Cas II [16]. La vitesse de

pénétration du solvant dans la matrice est alors contrôlée par la relaxation des chaînes de polymères, ce qui modifie la libération du PA. Wu et ses collaborateurs ont, quant à eux, réalisé des gélules enrobées d'HP55® (HPMC Phtalate), contenant des nanoparticules de PLGA et d'Eudragit® RS (Poly(méthacrylate, éthylacrylate)), elles-mêmes renfermant de l'insuline. Ils ont vu, selon des méthodes *in vitro* et *in vivo*, que l'enrobage permettait de retarder la libération, du fait d'une insolubilité à pH acide et que les particules de PLGA et d'Eudragit® généraient une adhésion de la formule à la muqueuse intestinale [17].

Les hydrates de carbone, tels que la gomme guar, la gomme gellane, la pectine, le dextran, l'amylose ou les alginates, peuvent aussi être employés. Leur métabolisation par l'activité enzymatique des bactéries anaérobiques de la flore du colon sont d'un grand attrait dans la conception d'une formulation ciblant cette région de l'intestin [18]. Cette stratégie est de plus en plus étudiée pour lutter contre des pathologies telles que le cancer colorectal, les amibiases et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Cependant, l'inconvénient majeur des formulations constituées par ces macromolécules est l'impact du pH dans la lumière du TGI et du temps de résidence sur la libération de l'actif : la variabilité de ces paramètres d'un individu à l'autre et parfois même au sein d'un même individu peut modifier la cinétique de libération d'une administration à l'autre. Toutefois, ceci peut être contourné grâce à des modifications chimiques de la molécule. La réticulation est ainsi souvent utilisée afin de contrôler la libération [19].

## 2.2. Polymères cationiques

Le chitosane est le polymère bioadhésif cationique le plus souvent étudié [10]. Ce polysaccharide est obtenu par déacétylation de la chitine [20]. D'abord utilisé, entre autres, dans la cosmétique, l'agroalimentaire, le textile ou la papeterie, c'est maintenant l'industrie pharmaceutique qui s'y intéresse. Il montre des propriétés mucoadhésives intéressantes en établissant des liaisons ioniques entre ses groupements amines et des fonctions acides sialiques ou acide sulfonique du mucus ainsi que des liaisons hydrogène [21]. D'autre part, la linéarité des chaînes lui confère une flexibilité permettant un enchevêtrement dans le mucus. En neutralisant certains sites anioniques des jonctions serrées, ce polysaccharide permet aussi la promotion de l'absorption d'un PA par la voie paracellulaire [22]. Sa biocompatibilité, sa biodégradabilité et sa faible toxicité confirment le potentiel de cette macromolécule [23]. Kockisch et son équipe ont comparé la bioadhésivité de microsphères polymères réalisées à partir de Carbopol®, de polycarbophil, de chitosane et de Gantrez® (Poly(méthyle vinyle éther/anhydride maléique)), obtenues par émulsification et évaporation de solvant. Ils ont montré, *via* des tests dynamiques de mucoadhésion, que les particules de chitosane étaient particulièrement bien appropriées pour la cavité orale [24]. Huang et ses collaborateurs ont étudié des gélules de chitosane enrobées d'HPMC Phtalate en vue de délivrer de la rebamipide au niveau du colon. L'HPMC Phtalate a permis de protéger la formule du milieu stomacal. Le chitosane a ensuite retardé la libération du principe actif jusqu'au niveau du colon, où les microorganismes et l'acidification du pH résultant de leur activité métabolique, ont dégradé le polymère [25]. L'équipe de Charoenthai s'est intéressée à ce polymère au vu de sa bioadhésivité prolongeant le temps de résidence de la formule dans l'intestin mais aussi

compte tenu de sa capacité à promouvoir l'absorption. Le chitosane permet d'inhiber les enzymes protéolytiques et d'augmenter la perméabilité de la membrane biologique pour les peptides [26]. Ils ont aussi montré que le grade de bas poids moléculaire engendrait, avec l'alginate de sodium, un complexe polyélectrolytique plus fort. Cependant, la molécule se comporte comme un polyélectrolyte cationique hydrosoluble à pH acide [23]. Ceci est un inconvénient, lorsque l'intestin est ciblé, car la formulation se solubilise alors dans l'estomac. Toutefois, la molécule peut être chimiquement modifiée pour s'adapter aux fluctuations du pH jusqu'au tissu-cible [27]. Säkkinen et son équipe ont cependant tempéré l'engouement pour cette macromolécule en montrant que les bonnes propriétés mucoadhésives, observées *in vitro*, ne correspondaient pas forcément à ce qui se passait *in vivo* [28]. Ainsi, l'augmentation de la biodisponibilité du furosémide n'a pas été à la hauteur des espérances basées sur leur étude *in vitro*.

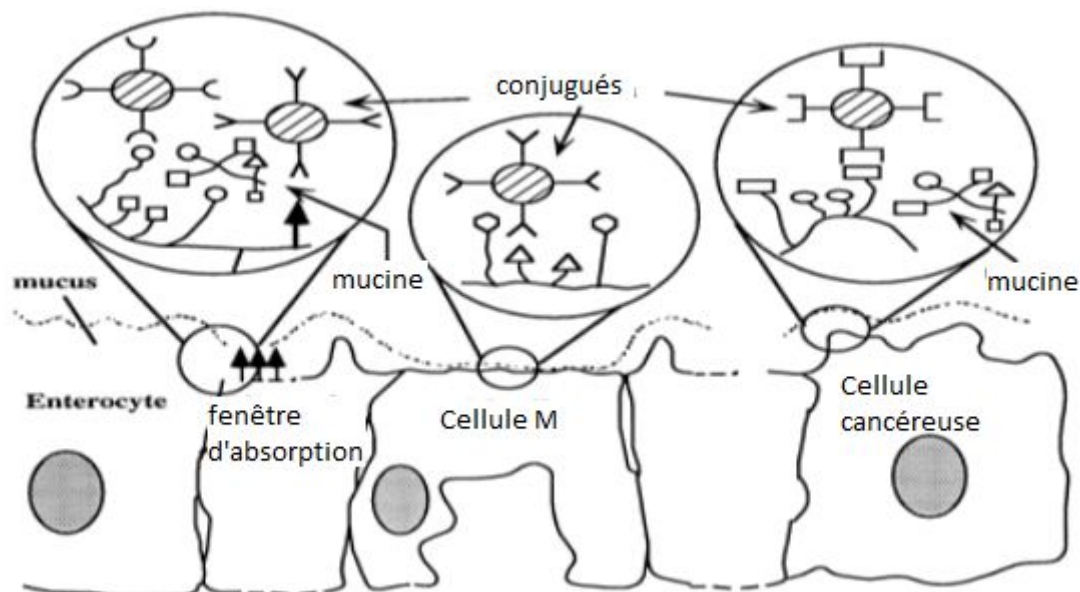
## 2.3. Polymères non ioniques

Grabovac et ses collaborateurs ont étudié 19 des polymères mucoadhésifs les plus publiés. Parmi ceux-ci, se trouvent l'hydroxypropyle cellulose ou HPC, l'hydroxyéthyle cellulose ou HEC, la polyvinylepyrrolidone ou PVP et le polyéthylène glycol ou PEG. Ceux-ci, à l'inverse des polymères anioniques ou cationiques, ne sont pas affectés par les électrolytes. A l'état non modifié et selon des tests réalisés avec un cylindre rotatif, c'est l'HPC précipité qui a montré l'adhésion la plus importante ( $15,2 \pm 0,4$  h) [11].

Deux grades de PVP sont commercialisés par la firme ISP pour leurs qualités bioadhésives : le Plasdone K® et le Plasdone C® plus adapté à la voie oculaire (ISP, 2005).

## 3. Polymères bioadhésifs de seconde génération

La seconde génération de polymères permet de pallier les difficultés à cibler la bioadhésion sur un site éloigné de la voie d'entrée. Dans la voie orale par exemple, le challenge est d'éviter une mucoadhésion trop précoce sur les muqueuses, en amont du site ciblé, et de permettre l'adhésion de la formule uniquement au niveau souhaité. Cette seconde génération s'appuie donc sur une reconnaissance spécifique entre un récepteur et son ligand [27]. Par ailleurs, certains polymères « cytoadhésifs » contribuent à s'affranchir du turnover du mucus [10]. Plusieurs stratégies de reconnaissance peuvent être mises en œuvre comme le montre le schéma de la Figure 1 [27].



**Figure 1** : Principales possibilités d'interaction de type ligand-récepteur. (1) Liaison du conjugué avec les glycoprotéines du mucus (cercles ouverts) ou des membranes cellulaires ou des glycolipides (flèche noire) ; (2) liaison avec un ligand spécifique de la surface de certaines cellules (exp : cellules M) ; (3) reconnaissance par les mucines sécrétées à des sites spécifiques (exp : cellules cancéreuses) [26]

Les lectines sont des protéines naturelles jouant un rôle dans les phénomènes de reconnaissance cellulaire. Ces molécules sont capables de se lier de façon réversible à des résidus d'hydrates de carbone présents sur une membrane cellulaire. Elles peuvent alors persister en surface ou être internalisées par endocytose [28 ; 29]. C'est notamment un des moyens employés par les bactéries pour infecter un organisme vivant. L'étape critique de ce phénomène est la traversée du mucus par la particule « cytoadhésive » jusqu'à la membrane cellulaire pour interagir avec celle-ci. Selon Wirth et ses collaborateurs, la dispersion, dans le mucus, d'une formulation contenant des lectines, pourrait permettre sa rétention, grâce à des liaisons réversibles. Le système pourrait ensuite être distribué jusqu'au niveau de la couche cellulaire où les lectines pourraient bioadhérer. Les particules piégées dans le mucus constitueraient alors un réservoir [30]. Des microparticules de chitosane et d'alginate de calcium conjuguées à des agglutinines de germe de blé ont été chargées de 5-fluorouracil par Glavas Dodov et son équipe [31]. Ils sont ainsi parvenus, par un procédé en une étape utilisant l'atomisation, à obtenir de nouvelles microparticules, composées d'un hydrogel, couplées à un ligand et permettant une vectorisation du PA jusqu'au site effectif pour le traitement, c'est-à-dire le colon. En revanche, la toxicité ou l'immunogénicité de nombreuses lectines ainsi que l'absence de données sur les effets que peuvent engendrer une administration répétée limitent encore leur utilisation [10]. D'autres stratégies s'inspirent des mécanismes de colonisation bactérienne. Bernkop-Schnürch et son équipe ont ainsi proposé un réseau de polyacrylate lié de façon covalente à du K99-fimbriae, une protéine d'attachement d'origine bactérienne [32]. Enfin, les thiomères, des macromolécules thiolées, dérivent de polymères hydrophiles tels que les polyacrylates, le chitosane ou la gomme gellane déacétylée. Ils permettent la formation de

liaisons disulfides avec des domaines glycoprotéiques riches en cystéine du mucus [33]. Grabovac et son équipe, dans leurs travaux comparatifs précédemment cités, ont constaté que les polymères ainsi modifiés exhibaient une mucoadhésion supérieure à leurs homologues non modifiés. Le chitosane thiolé à pH 6,5 a présenté une mucoadhésion 10 fois supérieure sous forme lyophilisée et 20 fois supérieure sous forme précipitée, comparée au chitosane non modifié [11]. Malheureusement, cette nouvelle stratégie est encore peu ou pas commercialisée et les polymères doivent en général être synthétisés au laboratoire.

## 4. Polymères à libération modifiée

Le ciblage intestinal nécessite d'avoir une formulation à libération décalée et/ou prolongée. Les scientifiques s'intéressent à cette stratégie depuis longtemps. Les différents systèmes mis au point pour cibler chaque partie du TGI ont été répertoriés par Pinto. La prolongation ou la modification de la libération peuvent reposer sur la variation physiologique des propriétés intrinsèques du tractus. L'intestin grêle peut ainsi être atteint spécifiquement en prenant en compte les variations de pH, outre les phénomènes d'adhésion [34]. L'équipe de Carelli a ainsi développé un comprimé matriciel à base d'Eudragit® L100 ou S100 et de polyoxyde d'éthylène en vue de libérer de la prednisolone au niveau du jéjunum et de l'iléon [35]. La gastro-résistance peut aussi contribuer à cibler l'intestin, dans sa partie proximale. Une équipe taïwanaise a employé l'Eudragit® L100-55 pour enrober des nanoparticules et conférer une gastro-résistance à la formulation [36]. D'autres ont fabriqué des nanoparticules de PLGA et d'Eudragit® RS, enrobées d'HP55®, un dérivé phtalate d'HPMC. La libération a pu ainsi être contrôlée selon deux principes :

1. l'HP55®, insoluble au pH acide de l'estomac a permis de retarder la seconde étape ;
2. La bioadhésion de la formule grâce aux polymères bioadhésifs [16].

L'équipe de Pithavala a utilisé un nouveau système baptisé Intelisite® afin de délivrer de la ranitidine dans la partie distale de l'intestin grêle ou le colon. La libération est déclenchée grâce à un signal magnétique externe [37]. Le colon, quant à lui peut être atteint selon des principes reposant sur des modifications chimiques, une dégradation des polymères, la variation de pH, le temps ou l'adhésion, entre autres [34]. Les polysaccharides peuvent être utilisés comme agent d'enrobage [38] ou sous forme matricielle. Ces macromolécules sont spécifiquement dégradées par la microflore du colon et permettent une libération spécifiquement au niveau du gros intestin. Cependant, certaines, parmi lesquelles l'inuline, la Revue bibliographique l'amylose, la gomme guar ou les pectines, doivent être chimiquement modifiées ou couplées à des polymères plus hydrophobes afin de renforcer leur hydrophobicité et limiter une libération prématurée du PA par simple solubilisation [39]. Mortazavi et Smart ont quant à eux étudié l'influence des mouvements d'eau dans les phénomènes de bioadhésion. Ils ont constaté que ces mouvements étaient un facteur significatif dans la mucoadhésion [40]. Ceci explique l'intérêt porté aux polymères hydrophiles et aux hydrogels. Un système divisé d'HPMC contenant de l'indométhacine a ainsi permis d'obtenir une libération prolongée sur huit heures, *via* une gélification du

système [41]. Morishita et ses collaborateurs ont, quant à eux, mis au point des microparticules polymères d'insuline, composées de PEG et de polyméthacrylate. Le système est réputé multifonctionnel et se convertit, *in situ*, en hydrogel. Il est pH-dépendant, et possède des propriétés d'inhibition de l'activité enzymatique mais aussi des caractéristiques mucoadhésives [42].

## 5. Modulation et évaluation de la mucoadhésion des nanosystèmes

La chimie de surface, la charge et la taille des nanosystèmes déterminent leur comportement mucoadhésif.

Ces propriétés sont accordables afin de maximiser ou minimiser les interactions avec les fluides de mucus présents à différentes muqueuses. Lorsque les systèmes muco-adhésifs sont nécessaires, ceci peut être réalisé simplement en utilisant des polymères muco-adhésifs comme matériaux formant une matrice, seuls ou en mélanges. Cependant, tous les polymères muco-adhésifs disponibles ne peuvent facilement être utilisés pour produire des nanoparticules ou, par exemple, d'autres systèmes non-polymériques peuvent être préférables (comme les nanosystèmes à base de lipides).

Dans ce dernier cas, la modification de **surface** peut être une alternative, que ce soit en fixant des polymères muco-adhésifs sur des nanosystèmes préformées (de manière covalente ou par simple adsorption) ou par conjugaison de polymères avec d'autres matériaux formant la matrice.

Un autre aspect important est **la charge** à la surface ; Les systèmes chargés positivement sont préférés afin de maximiser la muco-adhésion. Les nanoparticules à base de chitosane, en particulier, sont souvent considérés comme l'exemple typique de nanosystème très mucoadhésif. Aussi, les nanosystèmes hydrophobes peuvent posséder une haute capacité d'établir des interactions adhésives avec des surfaces hydrophobes de la mucine, à savoir par la promotion de liaison hydrophobe. En contraste avec les précédentes, les nanosystèmes de mucus-inerte, qui évitent l'interaction avec le mucus, peuvent également être souhaitables. Ainsi, les nanoparticules pénétrant le mucus peuvent être généralement obtenues en conférant une surface non chargée hydrophile. Le groupe de Justin Hanes de la Johns Hopkins University (Baltimore, MD, USA) a démontré ceci en modifiant la surface de différentes nanoparticules polymériques (100-500 nm) avec une couche dense de faible poids moléculaire de poly (éthylène glycol) (PEG; 2- 10 kg/mol) [44]. Par exemple, des expériences du suivi de multiples particules ont montré que les nanoparticules modifiés de poly éthylène glycol à 200 nm se diffusent dans le mucus cervico-vaginal à des taux proches de ceux prédits pour les nanosphères de même taille dans l'eau (jusqu'à environ un obstacle de un log), tandis que les non-poly éthylène glycolées ont été presque immobiles (taux de diffusion réduits d'au moins 3 log).

La nature hydrophile et non ionique de poly éthylène glycol permet d'éviter, respectivement, l'établissement de la liaison hydrophobe et ionique, alors que la courte chaîne du polymère diminue l'enchevêtrement muco-adhésif avec les fibres de mucine [45,46].

Ces observations pour les nanosystèmes denses et de courte chaîne de poly éthylène glycol modifié ont également été confirmées par d'autres groupes. Par exemple, lors d'un essai *in vivo* et après la délivrance vaginale à des souris, de denses nanoparticules de PEG modifié ont montré l'aptitude à distribuer facilement à travers tout le tractus cervicovaginal et de fournir la délivrance améliorée de médicaments à la muqueuse sous-jacente en raison de leur capacité à aborder la barrière de mucus dynamique et peut être hautement variable sur les conditions environnantes. Outre le pH, la présence éventuelle d'autres substances (par exemple, les électrolytes, les produits chimiques, des excipients pharmaceutiques) peut influencer sur la disposition des fibres de mucine et, par conséquent, le comportement mucoadhésif de nanoparticules. En outre, le simple établissement d'interactions adhésives de nanoparticules avec la mucine peut avoir un impact sur la structure et les propriétés viscoélastiques de mucus.

Différentes méthodes expérimentales peuvent être utilisées pour la caractérisation du potentiel muco-adhésif de nanosystèmes. Celles-ci peuvent être classées comme indirectes ou directes.

Les premières sont basées sur l'évaluation et l'équilibre d'interactions contributives et néfastes entre les nanosystèmes et les mucines ou d'autres composants de la muqueuse (tissu ou mucus), tandis que les secondes sont exécutées *in vivo* (animal ou humain) ou à proximité immédiate de la situation *in vivo* (les réglages *ex vivo*).

Un résumé des différentes méthodes directes et indirectes est présenté au tableau 1.



**Tableau 1** : Différentes techniques pour l'évaluation de la mucoadhésion des nanosystèmes et comparaison de leurs principales caractéristiques. [46]

| Méthodes pour la mesure de la mucoadhésion |  | Aperçu sur le mécanisme | Mesure dynamique ou en temps réel | Pertinence in vivo | Faisabilité | Coût  |
|--|--|-------------------------|-----------------------------------|--------------------|-------------|-------|
| <b>Indirectes</b>                          | Méthode de particules de mucine          | Bas                     | Non                               | Basse              | Haute       | Bas   |
|  | Méthodes micro gravimétriques            | Moyen                   | Oui                               | Basse              | Moyenne     | Moyen |
|  | Microscopie à force atomique             | Haut                    | Oui                               | Basse              | Basse       | Elevé |
|  | Techniques optiques                      | Moyen                   | Oui                               | Basse / Moyenne    | Moyenne     | Elevé |
|  | Diffusion/Méthodes de suivi de particule | Haut                    | Oui                               | Moyenne            | Haute       | Moyen |
| <b>Directes</b>                            | Méthodes de cytoadhésion                 | Moyen                   | Optionnel                         | Moyenne            | Moyenne     | Moyen |
|  | Méthodes ex vivo                         | Bas                     | Optionnel                         | Moyenne            | Moyenne     | Moyen |
|  | Administration in vivo/analyse ex vivo   | Bas                     | Non                               | Haute              | Moyenne     | Moyen |
|  | Imagerie in vivo                         | Bas                     | Oui                               | Haute              | Basse       | Elevé |

**Chapitre 2 :**  
**Chitine, Chitosane et leurs dérivés**

## 1. Historique

En 1811, BRACONNOT Henri directeur du jardin botanique de Nancy, a été le premier à isoler une fraction de la membrane de certains champignons, qu'il a appelé fongine. Cette découverte précède de trente ans l'isolement de la cellulose des plantes. Un peu plus tard, soit en 1823, ODIER renomme la fongine en chitine, terme dérivé du grec et signifiant tunique [51].

## 2. Extraction de la chitine

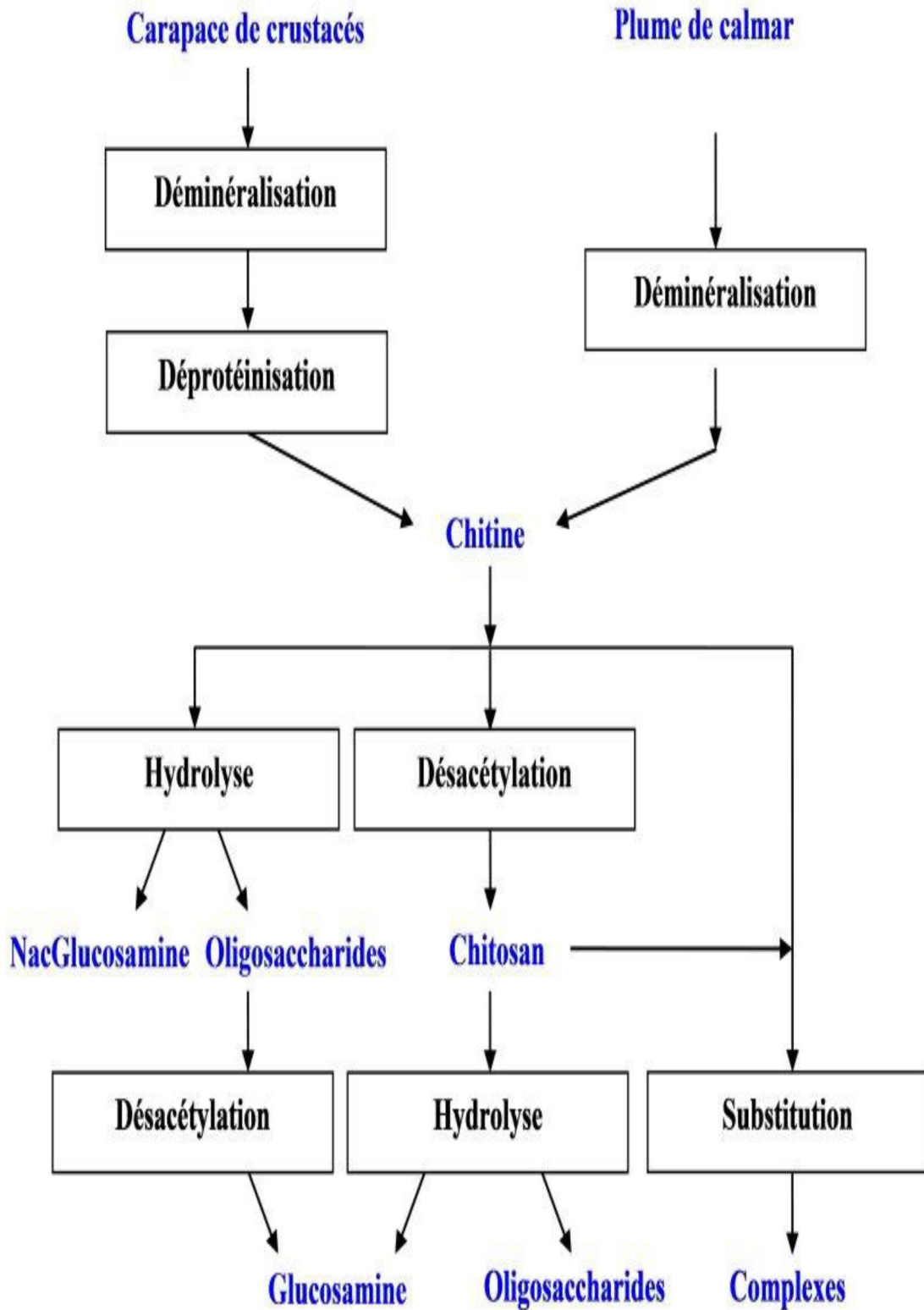
### 2.1. Schéma général de production de la chitine et ses dérivés

La production de chitine repose sur la purification de la matière première. L'attention est principalement portée sur l'élimination du carbonate de calcium et des protéines. L'extraction chimique consiste en un traitement acide pour la déminéralisation et un traitement alcalin pour la déprotéinisation. Les autres composés minoritaires sont supposés être entraînés au cours de ces deux réactions. La déminéralisation précède généralement la déprotéinisation car l'inverse aurait un impact sur le DP et le DA du polymère. Entre chaque étape, le produit est rincé abondamment à l'eau déminéralisée. La figure 2 schématise un exemple de production de chitine et de ses dérivés.

En amont, la préparation de la matière première est indispensable pour réduire les risques de dégradation de la chitine. Les modes opératoires sont propres à chaque entreprise, souvent basés sur le séchage pour éviter l'autolyse naturelle; activité des enzymes endogènes. France Chitine a fait le choix d'ensiler et de saler les carapaces de crevettes et de crabes pour les conserver. Elles sont ensuite rincées

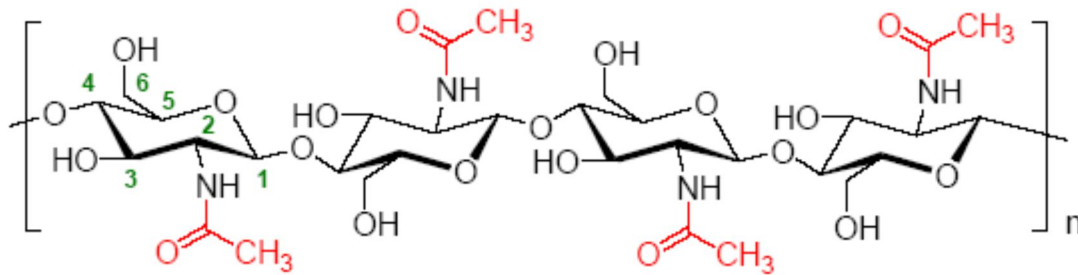
### 2.2. Matériel animal

La chitine est un polymère formé d'une répétition d'unités de N-acétyl-D- glucosamine comme nous le montre la figure 3, c'est le deuxième polymère le plus abondant après la cellulose. Elle est la composante majeure de la paroi cellulaire de beaucoup de champignons ainsi que dans des carapaces de crustacés tels que : homards, crevettes et crabes. Elle forme, également, le tégument externe rigide des sauterelles, des scarabées, des cafards ainsi que de nombreux autres insectes



**Figure 2:** Procédé industriel de fabrication de la chitine et de ses dérivés (France Chitine)

Dans de nombreux pays industrialisés, on constate une forte exploitation de ces ressources naturelles qui, contrairement aux produits dérivés du pétrole, la chitine est un produit renouvelable, non toxique, hypoallergique et surtout biodégradable et par conséquent non polluante [51].



**Figure 3 :** La structure moléculaire de la chitine comme copolymère de glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine [52].

### 2.3. Prétraitement des carapaces

Les carapaces de crevette ou des coproduits de crustacé doivent être lavé d'ambly (enlever un maximum de chair pour un produit mieux déprotéiné), bien broyées et tamisées, cela avant tout traitement chimique dont le but est de séparer la chitine des autres matières présentes dans les carapaces. Le tableau 2 synthétise et dresse la répartition de la composition de la matière première

**Tableau 2 :** Composition globale des exosquelettes de crevette. [53]

| Constituants | Protéines | Chitine   | Minéraux  | Lipides | Oses totaux | C/N |
|--------------|-----------|-----------|-----------|---------|-------------|-----|
| Gamme        | 30 à 50 % | 24 à 32 % | 19 à 28 % | /       | /           |     |
| Moyenne      | 40 %      | 28,2 %    | 24,7 %    | 3,6 %   | 2,7 %       | 4,3 |

Les compositions déterminées par des études similaires [53] montrent également une grande variabilité des proportions. Elles varient en fonction des espèces, de l'âge du genre et peuvent fluctuer en fonction des saisons et des conditions environnementales

**2.4. Déminéralisation**

Le traitement acide supprime les minéraux, qui passent en solution sous forme de sels, l'acide hydrochloridrique (HCl) est privilégié pour des raisons économiques.

La concentration minimale, pour mener cette étape, est déterminée par l'équation chimique (1) de la réaction entre l'élément minéral majoritaire, le carbonate de calcium, et le HCl. En principe, la déminéralisation est complète dès lors où les proportions sont stoechiométriques, mais dans les faits, les entreprises utilisent des solutions en excès.



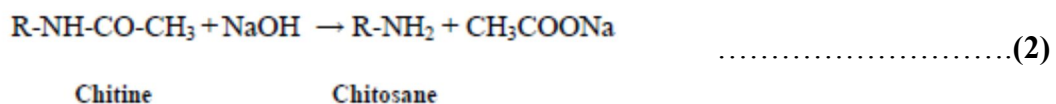
Les concentrations en HCl rencontrées sont comprises 0,5 et 11 N et le ratio substrat/solvant entre 1:10 et 1:40. La déminéralisation dure entre 15 min et 48 h, de la température ambiante à 50 °C [54]. La réaction avec le carbonate de sodium est achevée lorsque le dégagement de CO2 cesse.

**2.5. Déprotéinisation**

Cette étape implique des conditions drastiques pour séparer entre les protéines et la chitine.

Un traitement basique permet d'éliminer les protéines par solubilisation. Les réactifs employés pour cette étape sont des bases fortes comme l'hydroxyde de potassium (KOH). Le plus courant, pour des raisons d'économie et technique, est l'hydroxyde de sodium (NaOH). Les concentrations utilisées sont comprises entre 0,3 et 2,5 M, selon un ratio compris entre 1:10 et 1:40. La température est comprise entre 50 et 110 °C et la durée peut varier de 1 h à plus de 24 h [54]. Ces deux paramètres sont liés, ainsi la durée doit être augmentée si la température est baissée, et réciproquement.

La réaction est la suivante :



La réaction se passe sous une atmosphère inerte

L'augmentation de la concentration, de la durée et de la température de réaction, améliorent la déprotéinisation . Cependant, tout comme la déminéralisation, les conditions drastiques de la déprotéinisation modifient la structure native de la chitine. Par conséquent, le choix du couple temps-température est dicté par les caractéristiques de la chitine à obtenir. Les modifications que peuvent entraîner des conditions trop drastiques concernent la perte de poids moléculaire ou l'oxydation des extrémités réductrices. [55]

## 2.6. Décoloration

Cette étape est facultative, elle n'est pas nécessaire si le barème temps-température penche en faveur d'une longue durée. Cependant, il est très difficile d'obtenir un produit pur à cause des fortes interactions entre la chitine, les pigments et les protéines. Généralement, l'agent de blanchiment employé est le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), dont la concentration est comprise entre 0,1 et 33 %, il peut également être mélangé avec du HCl. La durée du traitement est souvent très courte, de l'ordre de quelques minutes [54]. En effet, tout comme les deux précédentes étapes, les conditions de décoloration induisent une altération de la structure de la chitine, qui se traduit par une réduction du poids moléculaire. Les autres agents de blanchiment sont l'hypochlorite de sodium (NaClO), le permanganate de potassium (KMnO<sub>4</sub>), l'acétone, l'éthyle-acétate et l'acide oxalique [54;55;56]. Du et al. (2009) utilisent le peroxyde d'hydrogène pour hydrolyser le chitosane, afin d'augmenter sa solubilité, et privilégient l'éthanol pour le blanchiment.

Le traitement chimique modifie le poids moléculaire et le degré d'acétylation de la structure originelle de la chitine, il détruit également la structure des protéines [56]. Pour réduire le risque d'altération du polymère lié à la déminéralisation et la déprotéinisation, il est conseillé de répéter plusieurs fois l'opération, pendant une courte durée et intercaler des phases de rinçage à l'eau distillée : 420 l d'eau par kilogramme de chitine sont consommés au cours de l'extraction chimique. [54]

## 3. Contrôle qualité de la chitine

### 3.1. Degré de déminéralisation

C'est un indicateur de la performance de la déminéralisation, il est défini par la formule suivante [57]:

$$\%DM = \frac{(A_0M_0) - (A_rM_r)}{A_0M_0} * 100 \dots\dots\dots(1)$$

%DM est le degré de déminéralisation, M<sub>0</sub> et M<sub>r</sub> sont les masses initiale et résiduelle du produit hydrolysé, A<sub>0</sub> et A<sub>r</sub> les pourcentages de cendres dans le produit initial et résiduel respectivement.

L'influence de la granulométrie sur la déminéralisation a été étudiée par Marquis-Duval (2008). Un traitement acide de 30 min a été effectué sur trois lots de Chitane®, cuticules de crevettes déprotéinisées par voie enzymatique. Trois catégories de tailles comprises entre 25 et 850 µm ont été comparées. Pour cette gamme de granulométrie, la déminéralisation atteint des teneurs en minéraux similaires, inférieures à 0,5 %. Cependant Levêque [58] montre l'influence de la taille lorsque les fragments sont supérieurs à 2 mm. Les deux études s'accordent sur l'importance de la surface de contact entre le substrat et l'enzyme.

Il faut prendre garde à la production de mousse, causée par le dégagement de CO<sub>2</sub>. Elle peut être limitée par l'ajout d'un agent anti-moussant (No et Hur 1998). La déminéralisation est suivie par une étape de rinçage car le produit doit atteindre la neutralité avant l'étape suivante de déprotéinisation.

La prolongation de la durée du traitement, une température et une solution acide trop élevée conduisent à l'hydrolyse des liaisons glycosidiques et par conséquent à la dépolymérisation de la chaîne carbonée de la chitine et du chitosane [59]. La désacétylation peut intervenir en parallèle en fonction de la température et de la concentration en acide. Selon Gizatulina et al. (2005) la dépolymérisation est correctement décrite par une cinétique du premier ordre, en fonction de la concentration en HCl et dont le taux maximal est obtenu par une concentration de 29,8 %.

### 3.2. Le degré de déprotéinisation

C'est un indicateur pour suivre l'efficacité de la réaction de déprotéinisation, il est défini par la formule [57] :

$$\%DP_{\text{Prot}} = \frac{(P_0M_0) - (P_rM_r)}{P_0M_0} * 100 \dots\dots\dots(2)$$

%DProt est le degré de déprotéinisation, M<sub>0</sub> et M<sub>r</sub> sont les masses initiale et résiduelle du produit hydrolysé, P<sub>0</sub> et P<sub>r</sub> sont les pourcentages de protéines dans le produit initial et résiduel respectivement.

Des travaux ont porté sur l'étude la cinétique de déprotéinisation à Tamb et NaOH 1M [60]. Une formalisation de la cinétique est proposée suivant un modèle du premier ordre,  $dP/dt = -kt$ , caractérisé par trois étapes distinctes. Chacune présente une constante  $k$  différente. La première étape s'attaquerait préférentiellement aux acides aminés basiques. Au cours de la seconde étape, l'élimination des acides aminés acides rattrape celle des acides aminés basiques. Les constantes  $k$  diminuent au fur et à mesure de la déprotéinisation. Percot et al. (2003a) se sont également intéressés à l'énergie d'activation ; Quantité d'énergie nécessaire pour lancer un processus chimique associée à la déprotéinisation. Elle diminue avec la durée du traitement. Ceci suggère que les composés protéiques résiduels sont plus difficiles d'accès ou protégés par des conformations chimiques. Par exemple il peut s'agir de lipoprotéines, dont les liaisons hydrophobes les protégeraient de l'hydrolyse.

Il existe peu d'études sur la nature et l'organisation des protéines dans les cuticules des crustacés [60]. Les compositions en acides aminés sont mesurées dans certains coproduits de crevettes, tels que *Parapenaeopsis stylifera* [60], *Penaeus vannamei*. La composition diffère d'un substrat à l'autre. Généralement, le glutamate et la glutamine, dosés ensemble, sont majoritaires. L'acide aspartique/l'asparagine, l'arginine, l'alanine, la leucine, la valine et la proline sont abondants. Tandis que le tryptophane, la tyrosine, la cystéine, l'histidine et la méthionine sont faiblement présents. Mura et al. (1994) comparent l'évolution de la composition en acide aminé entre l'étape juvénile et adulte de *Chirocephalus kerkyrensis* et



*C. diaphanus*, deux branchiopodes. Ils n'observent pas de modification sauf une augmentation d'arginine.

Des procédés alternatifs ont été expérimentés pour remplacer ou être combinés avec la déprotéinisation chimique. Un couplage avec une mise sous pression à 100 °C et l'utilisation d'un cuiseur a été proposé, ainsi que la sonication [62]. Kjartansson et al. (2006b) ont obtenu une réduction de la teneur en protéines résiduelles de 10,6 à 8,3 %, par 1 h de sonication, à partir de crevettes nordiques.

#### 4. Préparation du chitosane

Le chitosane est un biopolymère de la famille des polysaccharides dont la découverte a été attribuée à Rouget en 1859 [55]. C'est l'un des rares polyélectrolytes naturels cationiques. Il est obtenu par modification chimique de la chitine

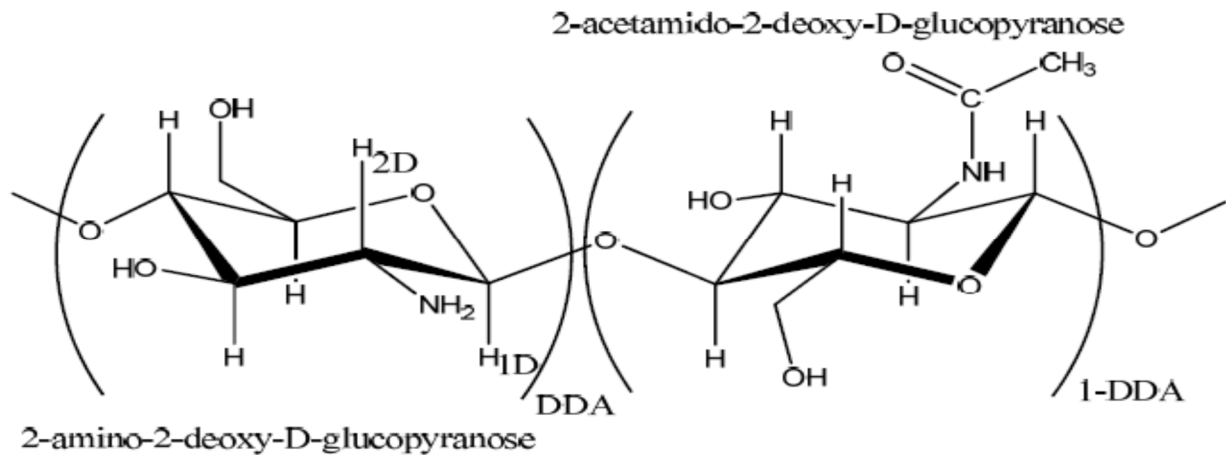


Figure 4. Structure chimique du chitosane

##### 4.1. Déacétylation de la chitine

Des traitements acides et basiques sévères catalysent la dépolymérisation et la désacétylation [60] et aboutissent au chitosane et aux oligosaccharides (Figure 5).

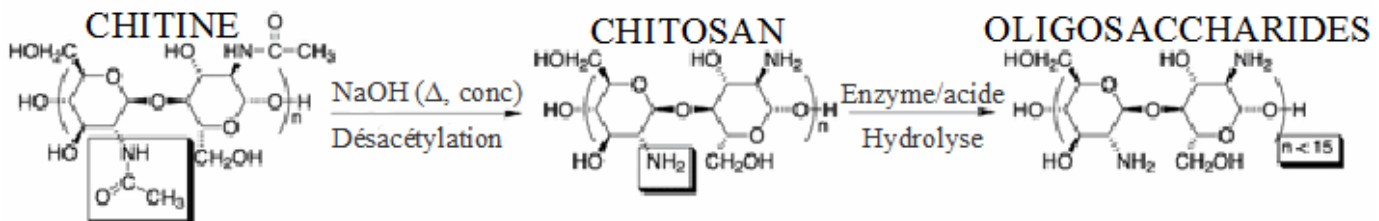


Figure 5: Schéma des réactions chimiques de désacétylation et dépolymérisation – Sigma-Aldrich, Tutorial

Le chitosane est obtenu par désacétylation de la chitine. Tout comme le procédé d'extraction de la chitine, de nombreuses combinaisons de conditions de désacétylation sont décrites dans la littérature. Généralement, la chitine est chauffée au-delà de 80 °C (jusqu'à 150 °C), dans une solution de NaOH (ou KOH) concentrée entre 40 et 60 %, selon un ratio w/v entre 1:5 et 1:45, pendant au moins 10 h [56]. Le degré d'acétylation obtenu est généralement compris entre 30 et 50 % [62].

Il est possible d'améliorer la désacétylation par une alternance de traitements alcalins et de rinçages à l'eau distillée, répétée successivement le temps suffisant pour obtenir le DA visé. La désacétylation est homogène ou hétérogène. Le chitosane est davantage soluble par désacétylation homogène car le DD est plus élevé ( $\approx 50\%$ ). Cependant la réaction dure plusieurs jours. Tandis que l'application de plusieurs étapes successives de désacétylation hétérogène permet d'atteindre un DD équivalent en quelques heures.

Galed et al (2005) ont étudié la désacétylation, par un traitement au NaOH 50 % (w) de 3 h à 110 °C, de trois crustacés *Paralomis granulosa*, *Lithodes antarcticus* et *Palinurus vulgaris*. Les cinétiques de désacétylation ont été formalisées par une équation du premier ordre et présentent des constantes de vitesses lentes, autour de 0,04 min<sup>-1</sup>. Au contraire, Shahidi et Abuzaytoun (2005) rapportent que la cinétique de désacétylation est rapide dans la première heure puis peine à abaisser le DA du chitosane. Après 5 h de réaction, le DD n'augmenterait plus alors que le poids moléculaire diminuerait. La taille des particules de chitine aurait également un impact sur le rendement de désacétylation. Enfin, il faut souligner que la désacétylation est sensible à l'oxydation. Le problème peut être contourné en réalisant la réaction sous un gaz inerte ou en abaissant la pression. L'ajout de NaBH<sub>4</sub>, un agent antioxydant, protège le polysaccharide de la réduction des groupements aldéhydes en alditoles [54].

L'une des techniques traditionnellement employée, la méthode de Broussignac, consiste à préparer un milieu anhydre composé de 50 % d'hydroxyde de potassium (KOH), 25 % d'éthanol à 96 % et 25 % de mono-éthylène glycol. Le mélange est chauffé à 90 °C avant d'ajouter la chitine peu à peu dans le réacteur. La température est alors élevée à une consigne qui dépend des adaptations à ce procédé, autour de 110 °C [62].

La dépolymérisation se traduit par hydrolyse des liaisons *O*-glycosidiques. Comme cela a été présenté précédemment, les traitements acides favorisent cette lyse [62]. En général, l'acide hydrochloridrique concentré est employé ou l'acide nitreux (HNO<sub>2</sub>) Cependant, il provoque la désamination de la glucosamine [54] et l'excès de HCl conduit à la destruction des oses. Einbu et Varüm (2007) comparent la dépolymérisation selon différentes concentrations en HCl, comprise entre 3 et 12 M, le taux maximal est atteint avec 6 M. L'énergie d'activation des liaisons *O*-glycosidique et *N*-glycosidique semblent similaires. Le pH aurait également un impact important sur la dépolymérisation tandis que la présence d'oxygène n'aurait pas d'effet. Les oligosaccharides peuvent ensuite être séparés sur colonne par fractionnement. D'autres méthodes existent, telles que la sonication ou les radiations gamma. Leur intérêt varie selon le type matière première.

4.2. Caractérisation de la chitine et/ou chitosane

4.2.1. Le poids moléculaire

Le poids moléculaire de la chitine est également un facteur important pour sa caractérisation [62]. La connaissance de tel paramètre est nécessaire pour les usages industriels. Il varie entre 1,03 et 2,5 MDa. [62]

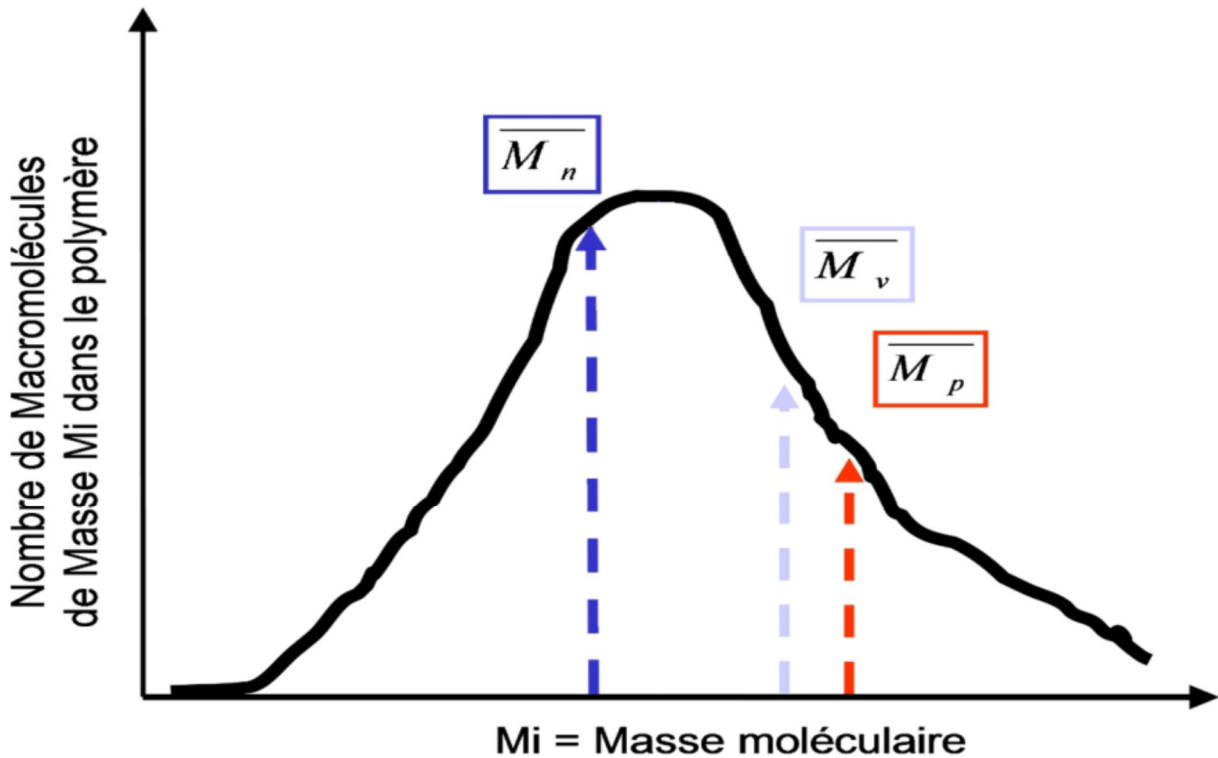


Figure 6: Dispersion des masses moléculaires

Le rapport  $I_p$  entre  $M_p$  et  $M_n$  est appelé indice de polymolécularité. Plus celui-ci est élevé, plus la distribution est élevée.

$$I_p = \frac{\overline{M}_p}{\overline{M}_n} \dots\dots\dots(3)$$

Par définition, la masse molaire  $M_n$  est liée au degré de polymérisation moyen en nombre,  $DP_n$ , selon la relation suivante :

$$M_n = \overline{DP}_n \times m_0 \dots\dots\dots(4)$$

Avec  $m_0$  la masse molaire d'une unité

Les deux grandeurs traduisent la longueur moyenne des polymères. En pratique, on a recours à des techniques telles que la chromatographie d'exclusion stérique pour estimer la masse molaire moyenne en nombre. Cependant, cette technique serait très difficile à mettre en œuvre pour la chitine. On détermine donc plutôt la masse molaire viscosimétrique, d'après les travaux de Staudinger (1881-1965) sur la viscosité des solutions de polymères. [63]

D'après l'équation de Mark-Houwink-Sakura (MHS), la viscosité intrinsèque est proportionnelle à  $M_v$  lorsque la concentration des polymères dissous tend vers zéro. Or, la viscosité intrinsèque peut être mesurée à l'aide d'un viscosimètre à capillaire.

$$[\eta] = KM_v^a \text{ (MHS)} \dots\dots\dots(5)$$

Les coefficients  $a$  et  $K$  de l'équation MHS dépendent du type de solvant, du polymère et de la température [63]. Le coefficient  $a$  est relatif à la conformation de la molécule. Le polymère tend à être linéaire lorsque  $a$  tend vers 1. À l'inverse quand  $a$  décroît, la molécule tend vers une forme de pelote compacte. De plus, la valeur de  $a$  confirme le caractère linéaire de la chitine.

#### 4.2.2. Degré de N-acétylation

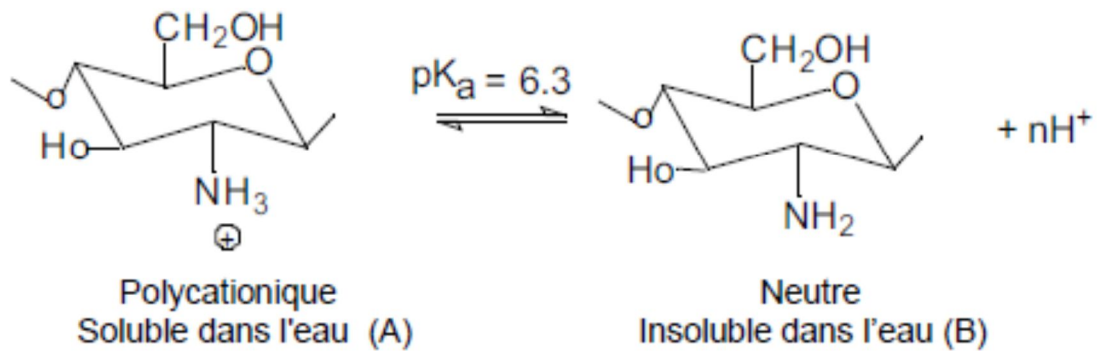
Le degré d'acétylation (DA) est un paramètre essentiel qui influence les propriétés des biopolymères chitineux. La détermination de DA est essentiel pour étudier la structure chimique, les propriétés des copolymères et la relation structure chimique- propriétés. Il est défini comme étant le nombre d'unités de glucopyranose de la chaîne de biopolymère ayant un groupement N-acétyle [54].

Les groupements amines au niveau de C-2 sont parfaitement acétylés. Généralement, 5 à 15% de désacétylation est provoqué par le traitement alcalin lors du processus d'extraction de la chitine. On parlera de chitine lorsque le degré d'acétylation est supérieur à 70% [56]

#### 4.2.3. Comportement du chitosane en milieu acide

Le chitosane est l'un des rares polyélectrolytes naturels cationiques et il est une base faible présentant un pKa voisin de 6,3. Il se dissout en milieu acide par protonation des fonctions amine présentes sur la macromolécule [64]. En dessous de ce pKa, les groupements amines sont protonés et font du chitosane un polyélectrolyte cationique, soluble dans l'eau acidifiée. Au-dessus du pKa, les groupements amines sont déprotonés et le chitosane est insoluble dans l'eau (Figure 7). Le pKa du chitosane dépend du degré de neutralisation des groupes  $NH_3^+$  et du DD .

En général, la valeur du pKa augmente quand le DD diminue [64].



**Figure 7** : structures du chitosane en milieu acide (A) et en milieu neutre (B) d'après [64]

#### 4.2.4. Spectroscopie infrarouge à transformation de Fourier FTIR

Cette technique simple à mettre en œuvre, est largement utilisée pour étudier la composition et la structure de la chitine, pour distinguer la forme  $\alpha$  de la forme  $\beta$  et parfois pour déterminer le degré d'acétylation [65]. Le principe de la spectroscopie infrarouge se base sur les émissions de vibrations entre deux atomes. Elles sont spécifiques à chaque environnement atomique. Ces vibrations sont identifiées selon leurs fréquences. Pour la chitine pure, ces fréquences ont été identifiées et commentées par de nombreuses études, dont l'une des premières est celle de Pearson et al. (1960). [66]

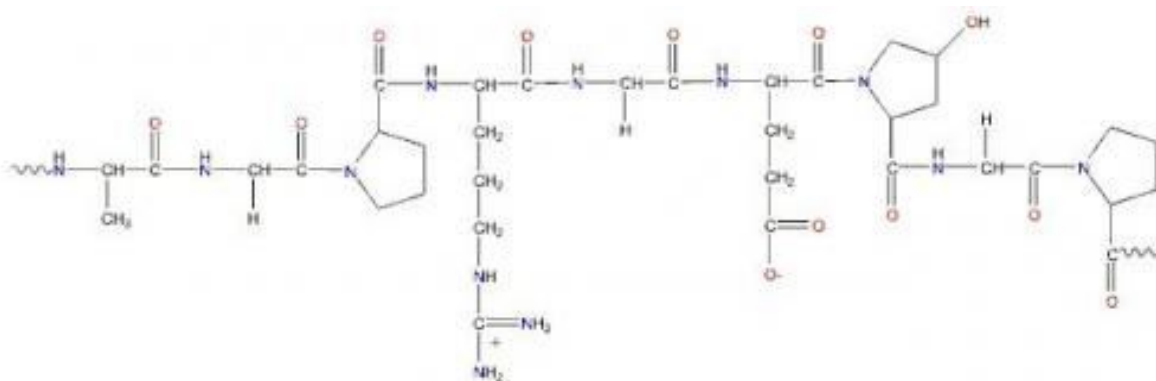
## **Chapitre 3 :**

### **Gélatine**

Au XIXe siècle, l'administration favorisa la recherche de nouveaux types d'aliments économiques. Le chimiste Jean-Pierre-Joseph d'Arcet s'enthousiasma particulièrement pour la gélatine. De nombreuses recherches furent faites à la suite, en particulier de 1841 à 1846 par Claude Bernard, sur les conseils de son maître Magendie, qui avait démontré la nécessité d'une source externe d'élément azoté. Ces expériences furent peu concluantes, mais c'est seulement au début du XXe siècle que la raison en fut comprise, c'est-à-dire l'absence dans la gélatine de tryptophane (non fabriqués par l'organisme). [67]

La gélatine est une substance solide translucide, transparente ou légèrement jaune, presque sans goût et sans odeur, obtenue par l'ébullition prolongée de tissus conjonctifs (peaux) ou d'os d'animaux (principalement porc, bœuf, poisson). Elle possède de nombreuses applications dans le domaine culinaire, la médecine, les industries agroalimentaire et pharmaceutique. [68]

En outre, la gélatine est considérée, en termes d'étiquetage, comme un ingrédient (norme européenne) [69] et non pas comme un additif, c'est pourquoi elle n'a pas de numéro E officiel. On peut néanmoins encore la trouver avec la dénomination E441, puisqu'elle reste considérée par certains pays hors Union européenne comme un additif gélifiant.



## 1. Propriétés

### 1.1 Physiques

La gélatine est un polypeptide linéaire soluble dans l'eau [70] obtenue par dissolution et hydrolyse partielle du collagène en milieu acide ou basique sous chauffage à partir d'os d'animaux (principalement porc, bœuf, poisson), la peau, des cartilages et autres tissus conjonctifs de différents animaux [71]. La gamme de poids moléculaire est très large et pourrait se situer entre 3 et 100 kg / mol. La gélatine est thermo-réversible ; elle fond lorsqu'elle est chauffée et se solidifie lorsqu'elle est refroidie. Mélangée à de l'eau, elle forme un gel colloïdal semi-solide. [72]

### 1.2 Chimiques et biologiques

Elle a été utilisée dans les industries alimentaires et pharmaceutiques pour la production de revêtements, de gels sensibles à la chaleur et des capsules. Elle est attrayante pour une utilisation dans la libération contrôlée en raison de son non-toxique, Biodégradable, bioactif et propriétés peu coûteux. Même si une unité de répétition ne peut être identifiée dans de la gélatine et de sa nature polymère pourrait être remis en question, cette protéine peut être considéré comme un polymère typique. [73]

En raison de son utilisation pharmaceutique abondante, nous l'avons inclus dans cette séquence d'acides aminés. Le procédé et la composition ont été étudiés au cours des années par les différents groupes. La gélatine affiche 18 acides aminés : la glycine (21 %), la proline (12 %), l'hydroxyproline (12 %), l'acide glutamique (10 %), l'alanine (9 %), l'arginine (8 %), l'acide aspartique (6 %), la lysine (4 %), la sérine (4 %), la leucine (3 %), la valine, la phénylalanine et la thréonine (2 %), l'isoleucine et l'hydroxylysine (1 %), la méthionine et l'histidine (< 1 %) et la tyrosine (< 0,5 %). Ces valeurs sont variables (surtout pour les constituants minoritaires) et dépendent de la source de matériaux bruts et de la technique de préparation. [74;75]

C'est un polyampholyte ayant à la fois des groupes cationiques et anioniques ainsi que avec un groupe hydrophile. Les propriétés mécaniques (comportement de gonflement) et les propriétés thermiques agissent de façon importante sur le degré de réticulation de la gélatine. Les nanoparticules de gélatine peuvent être préparés par désolvation / coacervation ou la méthode d'émulsion. [76]



La gélatine de type A est obtenue dans l'hydrolyse d'acide et affiche un point de 7-9 isoélectrique. A l'inverse, la gélatine de type B est obtenue en milieu basique et le point isoélectrique est de 4.5-5. La viscosité de la gélatine dépend du type, de la concentration, du pH, de la température et de la dureté ; La résistance du gel est mesurée en bloom, variant de faible (<150) à élever (> 220). Les interactions impliqueraient des liaisons hydrogène, de Van Der Waals et des liaisons peptidiques. La gélatine a également montré la capacité à former des films. La présence de la séquence arginine, la glycine, l'acide aspartique confère à ce matériau des propriétés d'adhérence cellulaire par les intégrines. La bonne biocompatibilité de la gélatine a ouvert la voie à la recherche dans la culture cellulaire et les applications d'ingénierie tissulaire. [77]

De même, en raison de sa bonne mucoadhésivité, il a été exploré pour le développement de matrices de distribution de médicaments et l'utilisation par différentes voies d'administration seuls ou en combinaison. [78]

En outre, des modifications chimiques ont été poursuivies pour améliorer la performance. Par exemple, Wang et al. ont synthétisés des microsphères aminées de la gélatine pour améliorer la rétention dans l'estomac par rapport à la protéine intacte. [79]

### 2. Extraction

Le collagène partiellement purifié est converti en gélatine par extraction à l'eau chaude à des températures et pH adaptés. Tous les processus industriels utilisent un pH neutre ou acide car un pH basique accélère la conversion mais favorise les processus de dégradation. La concentration en acide varie cependant selon les processus. L'extraction se déroule en plusieurs étapes et la température augmente généralement dans les dernières. Cette procédure assure une dégradation thermique minimale de la gélatine extraite. [80]

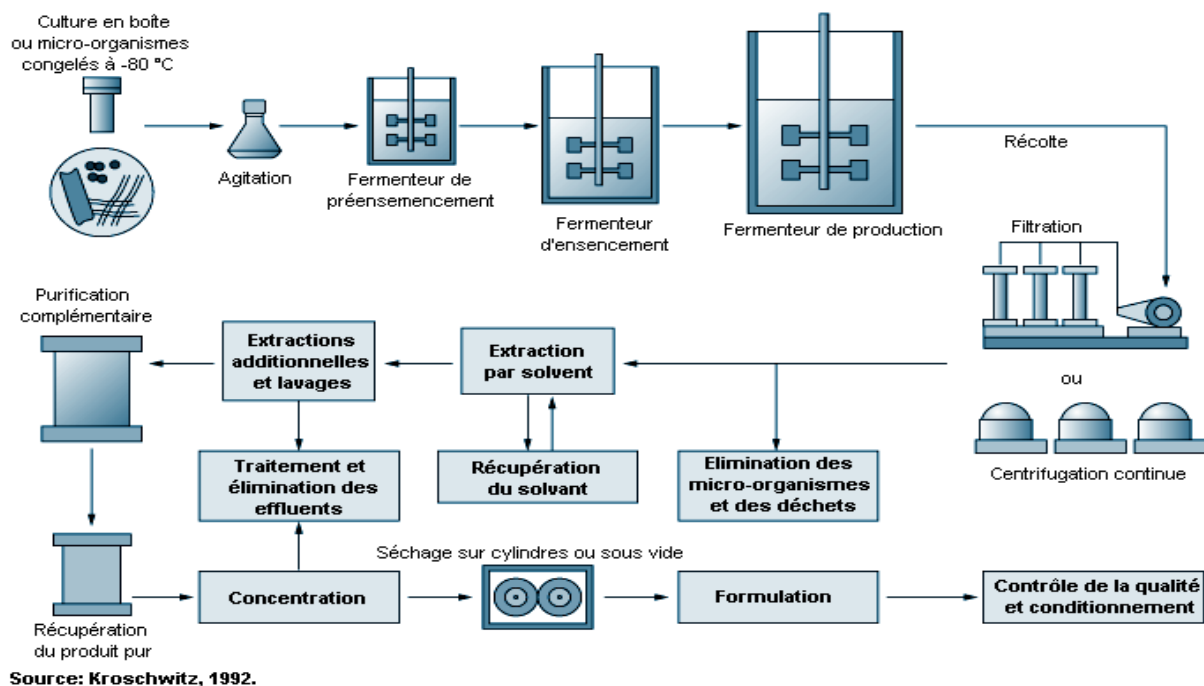


Figure 8 : extraction de la gélatine.

### 3. Raffinement

Cette étape comprend la filtration, la clarification, l'évaporation, la stérilisation, le séchage, le broyage et le tamisage de la gélatine obtenue. Ces opérations dépendent de la concentration et du type de gélatine. Pour minimiser la dégradation, la température est limitée tant que possible et les processus sont rapides. [81]

### 4. Encapsulation

#### 4.1. Encapsulation de BSA sur des nanoparticules de gélatine

Des nanoparticules de gélatine ont été utilisées pour encapsuler des BSA. Ces nanoparticules peuvent absorber 51-72% d'eau. La libération de BSA à partir de la matrice de gélatine nanoparticule fait suite à une diffusion contrôlée. [82]

#### 4.2. Encapsulation de médicament anticancéreux (paclitaxel) sur des nanoparticules de la gélatine

Des nanoparticules de paclitaxel chargé de gélatine ont été rapportées par la méthode de désolvation. Paclitaxel piégé était présent dans un état amorphe, qui a une plus grande solubilité dans l'eau par rapport aux l'état cristallin. Identique, la libération rapide du médicament à partir de nanoparticules a été observée dans

le PBS et l'urine avec -90% publié à 37 °C après 2 h. Les nanoparticules de paclitaxel chargé étaient efficaces contre les cellules cancéreuses de la vessie humaine transitoires. [83]

### **4.3. Encapsulation de médicament anti-VIH (didanosine) sur des nanoparticules de gélatine**

Le centre hydrophile de la didanosine est très lentement diffusée à la barrière hémato-encéphalique (BHE). Cette molécule a été encapsulée dans des nanoparticules de mannane revêtues de gélatine par la méthode de désolvation.

Le didanosine a été localisé à une plus grande concentration, respectivement, dans la lymphe, la rate, les ganglions et le cerveau, après administration de nanoparticules de mannane revêtues de gélatine par rapport à une injection dans le tampon PBS. [84]

### **4.4 L'encapsulation des antipaludiques (phosphate de chloroquine) sur des nanoparticules de gélatine**

La chloroquine, un médicament antipaludique fonctionne en tuant les différentes formes du parasite du paludisme qui infecte les cellules rouges du sang. L'effet toxique de phosphate de chloroquine (CP) se compose de maux de tête, somnolence, troubles visuels, nausées et vomissements. Réduire ces effets secondaires, cette molécule a été encapsulés sur la gélatine Nanoparticules. Cette nanomédecine livre efficacement CP via diffusion contrôlée de façon optimale à un pH physiologique. La libération de CP est inversement proportionnelle à la teneur en glutaraldéhyde nanoparticules. [85]

De nombreux agents d'encapsulation ont été encapsulés avec succès dans des nanoparticules de gélatine (voir tableau 3).

**Tableau 3 :** les nanoparticules biodégradables pour la livraison des médicaments Gélatine, Chitosane. [85]

| Polymère  | Encapsulant           | Efficacité de l'encapsulation | Méthode de synthèse              | Améliorations thérapeutiques  |
|-----------|-----------------------|-------------------------------|----------------------------------|---|
| Gélatine  | Paclitaxel            | 33–78%                        | Méthode de désolvation           | Activité biologique de le paclitaxel est retenue.                               |
|           | Didanosine            | 72.5%                         | Technique double désolvation     | Drogue lente libérer jusqu'à 24H.   |
|           | Chloroquine Phosphate | 15–19%                        | Méthode d'évaporation de solvant | Effet secondaire réduit   |
|           | insuline              | 72.8%                         | Méthode ionotropique de gélatine | Biodisponibilité augmentée  |
| Chitosane |                       | 39%                           | Evaporation de solvant           | libération lente jusqu'à 10 h   |
|           |                       | 73%                           | Méthode de gélification ionique  | c'était possible d'accomplir la concentration thérapeutique en tissus oculaires |
|           |                       | 35%                           | Méthode de gélification ionique  | absorption orale d'ammonium glycyrrhisinat a été augmentée                      |

### 5. Usages médicaux

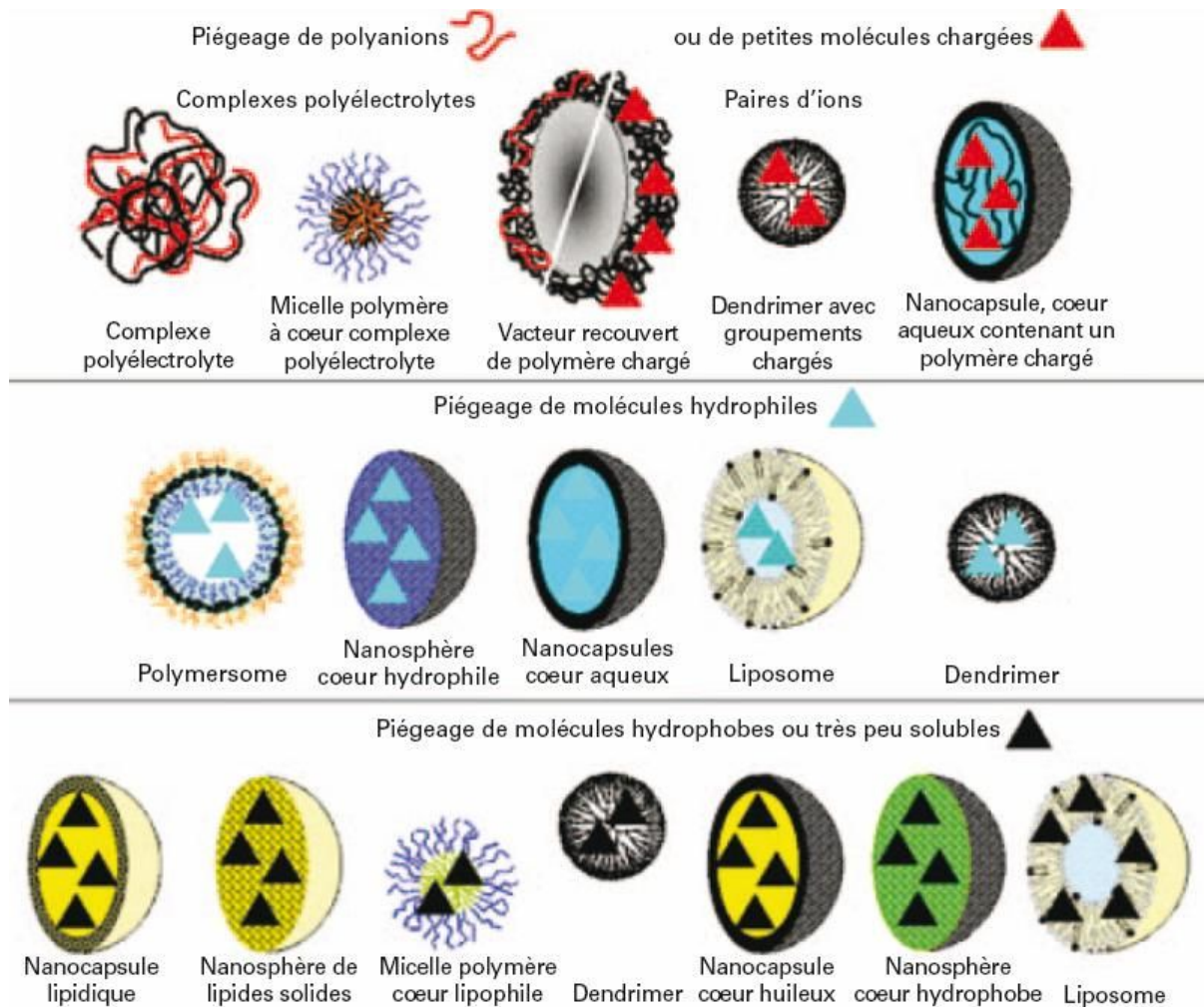
1- La gélatine est le principal constituant des substituts de tissus biologiques (substituts de vaisseaux sanguins, de plasma, etc.). Ce sont des matériaux de substitution utilisés en médecine ainsi que dans le domaine de la recherche scientifique pour simuler les tissus biologiques. [86]

2- Gélule de médicaments en gélatine : La gélatine est l'un des principaux constituants des gélules contenant des médicaments. Elle protège les principes actifs des effets néfastes de la lumière et de l'oxygène. Le bon dosage et le choix judicieux du type de gélatine permettent même d'influer sur la vitesse de libération du principe actif lors de l'administration de gélules. [87]

3- Certains produits cosmétiques contiennent un dérivé de la gélatine, le «collagène hydrolysé» connu pour ses effets anti-âge. [88]

**Chapitre 4 :**  
**Nanoencapsulation**

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 9** : Différents types de particules permettant l'encapsulation d'un principe actif [89]

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 9). Parmi ces techniques, les plus fréquemment utilisés sont les suivantes [89] :

## 1. Les différentes techniques d'encapsulation

### 1.1. 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. Des gouttelettes de très petite taille (échelle nanométrique) peuvent être formées en utilisant des vibrations ou un système de pulvérisation [90].

#### 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

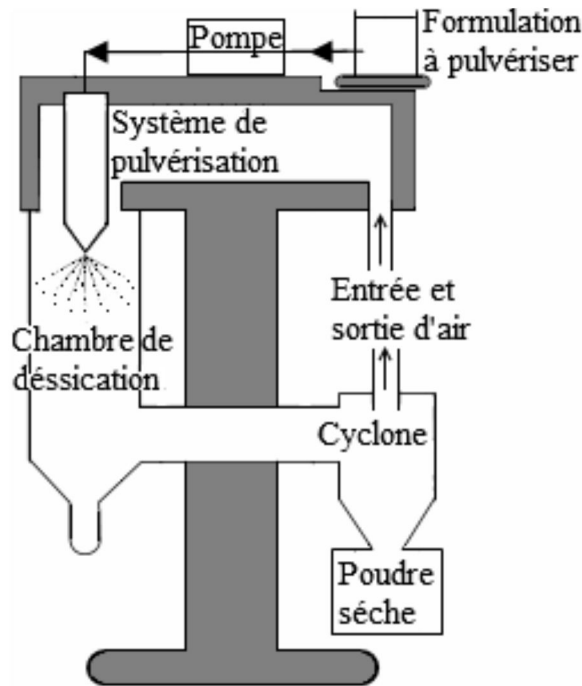
La gélation ionotropique pour la délivrance contrôlée de protéines, bien que permettant la complexation dans des conditions douces, présente un inconvénient majeur. En effet, la matrice et la membrane formées ne sont pas capables de contrôler la libération sur une longue période. Cependant, pour permettre 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 [91;92]. 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- $\alpha$ ).

### 1.2. 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 [93]. 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 [94].



**Figure 10** : Schéma d'un appareil de spray-drying

#### 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 [95].

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

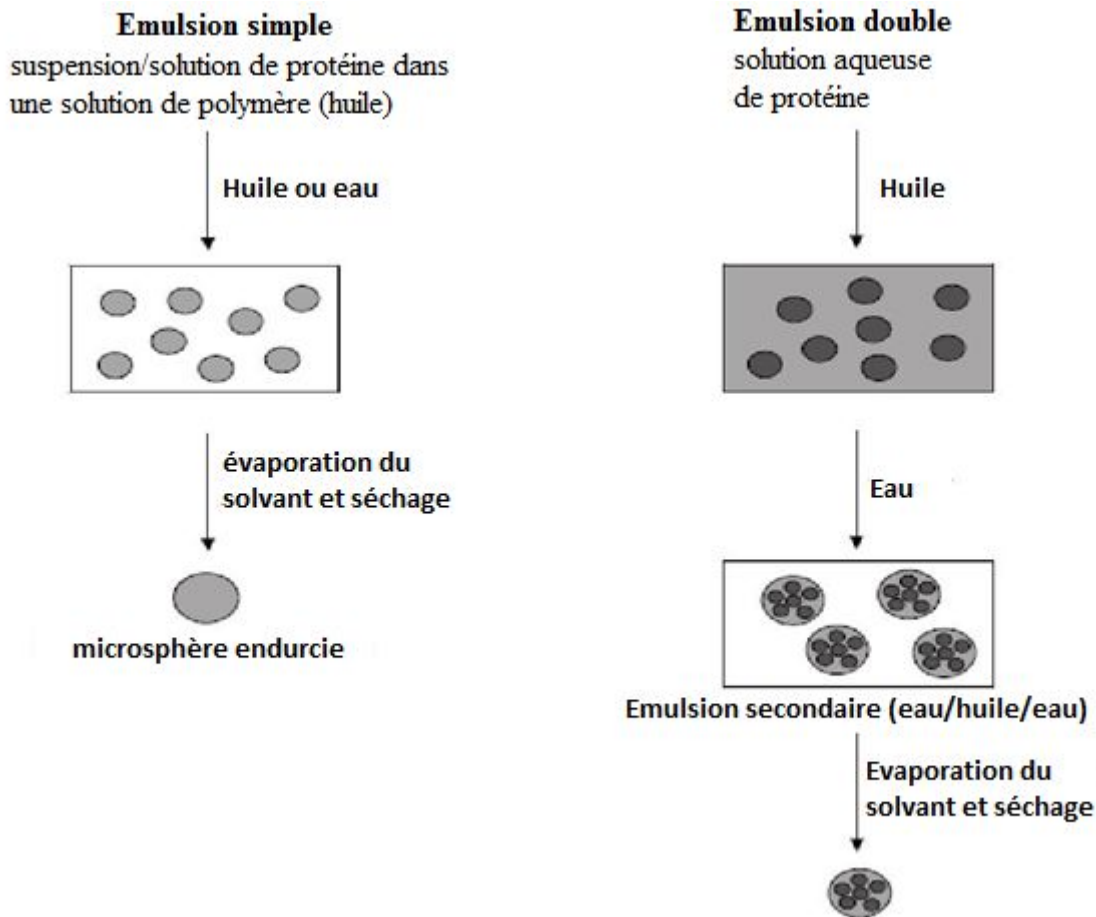
Néanmoins, cette technique demande une quantité de matière considérable car une

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 [96 ; 97]. 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.

### 1.3. 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 11).



**Figure 11 :** Microsphères obtenues par évaporation de solvant : émulsion simple (à gauche) et double (à droite)

### 1.3.1. 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 volatil 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.

### **1.3.2. 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.

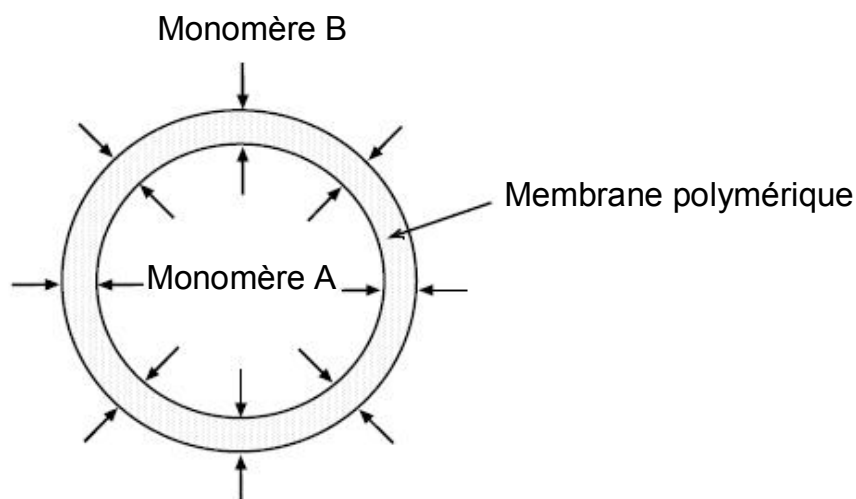
#### Limites

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.

#### 1.4. 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 12). Un exemple typique est la formation de microcapsules de polyamide (nylon) [98].



**Figure 12 :** Microencapsulation par polymérisation interfaciale (d'après [98])

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 [98]. Du chlorure de sébacoyl 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 téréphthaloyl 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 [99]. Le polymère composé d'un seul type de monomère peut être formé à l'interface (polymérisation interfaciale par addition) [98]. 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 [100]. 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 [99]. 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.

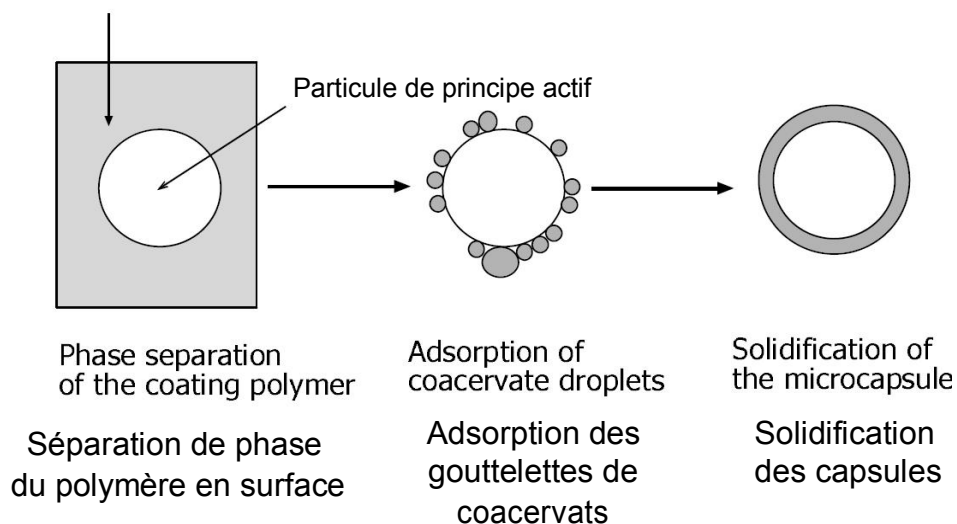
### 1.5. La séparation de phase ou coacervation

L'encapsulation par séparation de phase est un procédé comprenant 3 étapes :

- séparation de phase du polymère « de surface » pour former des gouttelettes de coacervats,
- adsorption des gouttelettes à la surface du principe actif
- solidification des capsules [101] (figure 13).

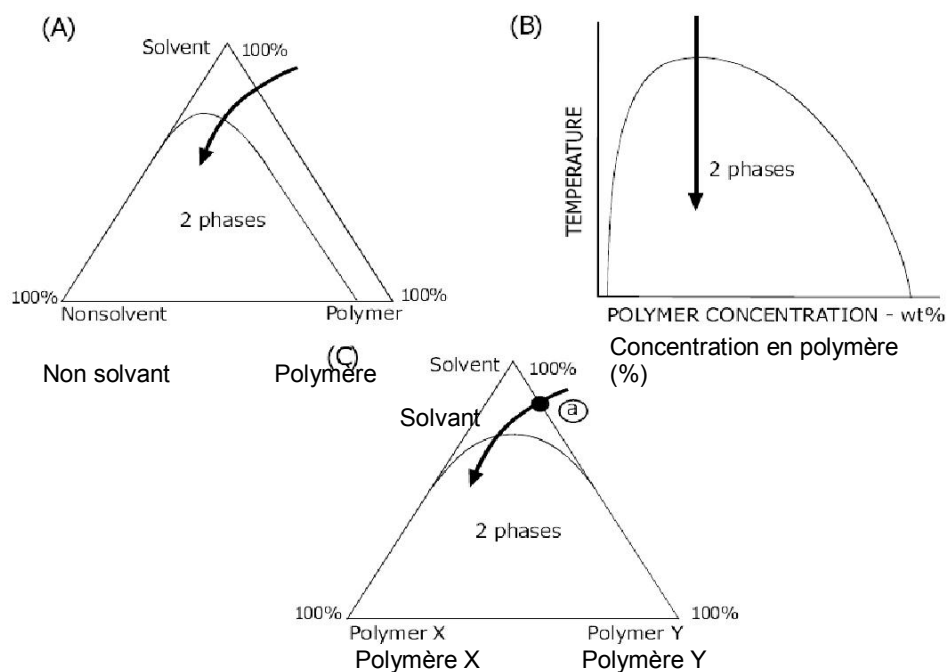
Induit par :

1. Non solvant
2. Changement de température
3. Sel / polymère incompatible
4. Interaction polymère / polymère



**Figure 13** : Schéma de la formation d'un coacervat [90]

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 [102]. 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 14).



**Figure 14 :** Diagrammes de séparation de phase basés sur l'ajout de non-solvant (A), la température (B) et l'ajout de polymères incompatibles (C) [103].

#### 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



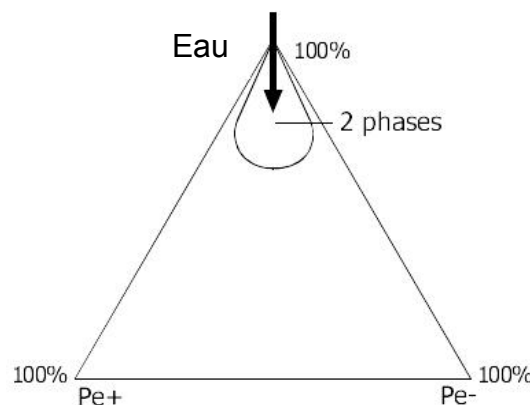
d'encapsulation plus importante. Dans le cas de la formation de particules nanométriques, ce procédé est plus couramment appelé nano-précipitation. Cette méthode permet également un contrôle efficace de la taille des particules avec une distribution de taille plus étroite, en variant simplement les paramètres des composés ajoutés comme la concentration en sel [104], la viscosité et la quantité de non-solvant ainsi que la masse molaire du polymère utilisé [105].

### 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 [106]. 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 [107].

### 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 15** : Diagrammes de séparation de phase dans le cas d'un polyélectrolyte positif (Pe+) et d'un polyélectrolyte négatif (Pe-) [103]

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 15.

### 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 [90]. La gamme de pH peut être étendue par addition d'un polymère hydrosoluble non-ionique, comme le polyéthylène glycol [108, 109].

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. [90]

Parmi les techniques d'encapsulation présentées ci-dessus, toutes présentent des avantages et des inconvénients résumés dans le tableau ci-dessous (tableau 4).

**Tableau 4 :** Comparaison des différentes techniques d'encapsulation

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

## 2. Caractérisation des nanoparticules

### 2.1. Granulométrie laser

Cette technique fonctionne de la façon suivante : les particules à analyser sont ajoutées dans une cuve remplie d'eau, où elles sont dispersées et désagglomérées à l'aide d'un système d'agitation, complété éventuellement d'un traitement aux ultrasons. Les particules circulent ensuite dans un circuit d'eau à l'intérieur de l'appareil, jusqu'à traverser une cellule en verre à travers laquelle passe un laser. Le laser frappe alors les particules pour être dévié. Des détecteurs placés de l'autre côté de la cellule récupèrent l'angle de déviation. Cet angle va permettre de calculer la taille des particules. En effet, plus la particule est petite et plus l'angle de diffraction sera grand. En revanche, un petit angle de diffraction sera mesuré lorsque le

laser rencontre des grosses particules. Pour estimer une taille de particule, le modèle de calcul se base sur le fait que les particules rencontrées sont sphériques. La taille calculée correspond donc à un diamètre moyen. Cette méthode de mesure, assez simple, possède une seule restriction : les particules à analyser doivent être optiquement distinctes du milieu d'analyse (eau). En effet, l'analyse étant basée sur la déviation du faisceau laser, si les particules dévient ce dernier de la même façon que le milieu dans lequel elles se trouvent, il n'y aura alors pas de distinction entre une mesure à vide et une mesure avec des particules. Le résultat est donné sous forme d'histogramme, avec un pourcentage correspondant à un diamètre de particule, dans la gamme de mesure de l'appareil.

Le résultat obtenu donne une répartition de taille soit en nombre, soit en volume. Le résultat en nombre attribue à chaque taille de particule la même importance, alors que celui en volume applique un coefficient multiplicateur pour chaque taille, proportionnel à son volume, pour donner plus d'importance aux particules de grande taille. Par exemple, dans le cas d'une mesure de 1000 particules de 1  $\mu\text{m}$  de diamètre et d'une seule particule de 10  $\mu\text{m}$ , le résultat en nombre donnera 99,9 % de particules de 1  $\mu\text{m}$  et 0,1 % de particules de 10  $\mu\text{m}$ , alors que le résultat en volume donnera 50 % de particules de 1  $\mu\text{m}$  et 50 % de particules de 10  $\mu\text{m}$ , car le volume d'une particule de 10  $\mu\text{m}$  équivaut au volume de 1000 particules de 1  $\mu\text{m}$ .

## 2.2. Zétamétrie

La charge de surface des adhésifs est mesurée avec un Zetasizer, utilisant la mesure du potentiel zêta. Ce dernier est déterminé par la mesure des vitesses de déplacement d'une particule soumise à un champ électrique : 2 électrodes sont situées de part et d'autre de la cellule de mesure. Une charge est appliquée à ces électrodes, tantôt positive et tantôt négative, chacune ayant une charge opposée à l'autre. Il se crée ainsi un champ électrique dans la cellule de mesure. Les particules vont alors migrer dans une direction ou dans l'autre suivant leur charge. C'est le principe de l'électrophorèse. Plus la charge de surface des particules est anionique et plus les particules vont se déplacer rapidement vers l'électrode positive et inversement. Ainsi, on détermine le potentiel zêta des particules. Cette mesure s'effectue en milieu aqueux très dilué (circuit et cellule de mesure remplis d'eau) et dépend fortement de la force ionique du milieu (pH, conductivité, concentration du produit).

## 3. Le vecteur pharmaceutique

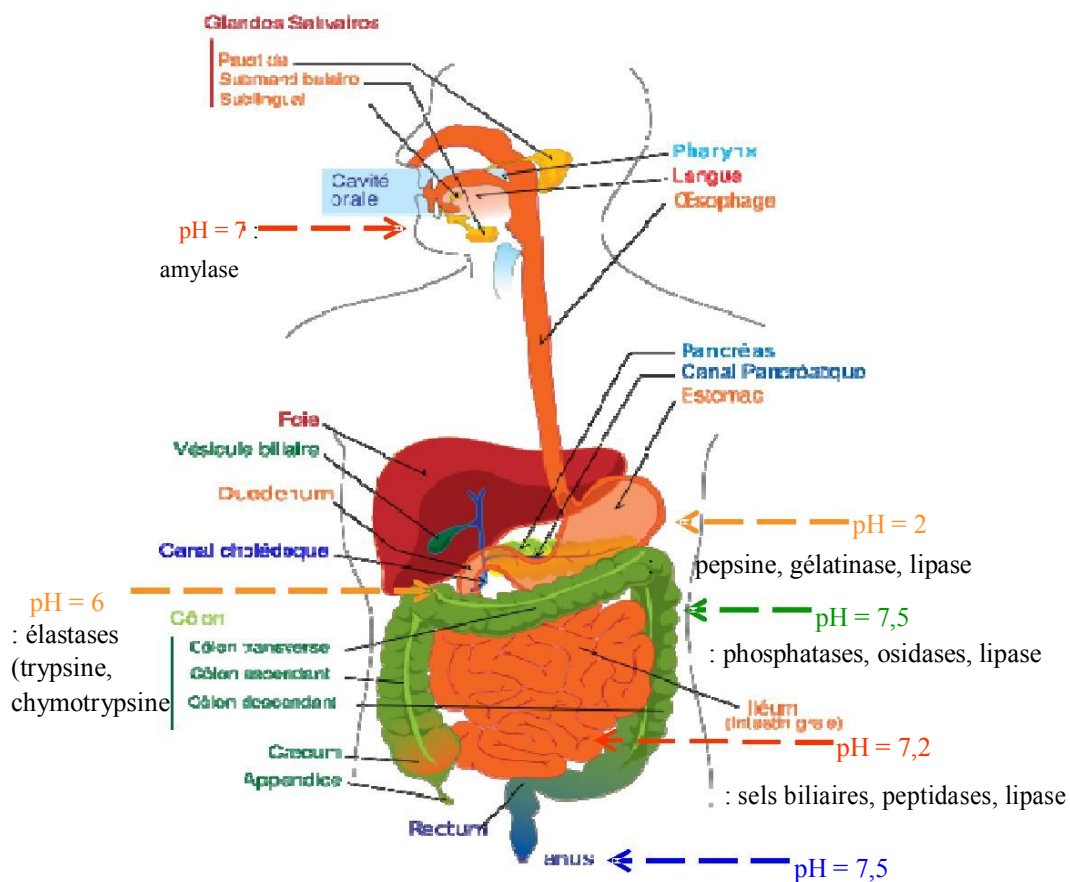
L'amélioration des procédés de vectorisation et la compréhension des phénomènes biologiques ont permis de développer différents vecteurs qui peuvent être utilisés en fonction des besoins. Il n'existe pas de vecteur universel, chaque problématique possède sa/ses propres

solutions.

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

### 3.1 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 plus, la présence de fortes variations de pH le long du TGI (figure 16) cause de sérieuses complications dans la vectorisation.



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

**Tableau 5 :** Facteurs anatomiques et physiologiques, du tractus gastro-intestinal de l'homme, influençant l'absorption et le métabolisme d'un principe actif [128]

| Section  | Longueur (m) | Surface exposée (m <sup>2</sup> ) | Temps de transit (h) | pH          |              | Enzyme et autres   |
|----------|--------------|-----------------------------------|----------------------|-------------|--------------|--|
|          |              |                                   |                      | Préprandial | Postprandial |  |
| Estomac  | 0,2          | 0,1                               | Variable             | 1,4-2,1     | Jusqu'à 6-7  | Pepsine, lipase, rennine, HCl.   |
| Duodénum | 0,3          | 0,1                               | 3±1                  | 5,5-6,5     | 4,9-6,0      | Bile, trypsine, chymotrypsine, amylase, maltase, lipase, nucléase, peptidases. |
| Jéjunum  | 3            | 60                                |                      | 6,1-7,1     | 6,1-7,1      | Erepsine, amylase, maltase, lactase, sucrase, peptidases.                      |
| Iléon    | 4            | 60                                |                      | 7-8         | 7-8          | Lipase, nucléase, nucléotidase, entérokinase, peptidases.                      |
| Caecum   | 1,5          | 0,05                              |                      | 1-60        | 6-7          | 6-7  |
| Colon    |              | 0,25                              | ~8                   |             | ~8           | -  |

### 3.2 Les contraintes physiques

La deuxième barrière à l'administration orale 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<sup>2</sup>), 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/hydrophobe du PA joue un rôle dans son passage vers la circulation sanguine, par diffusion à travers les membranes lipidiques.

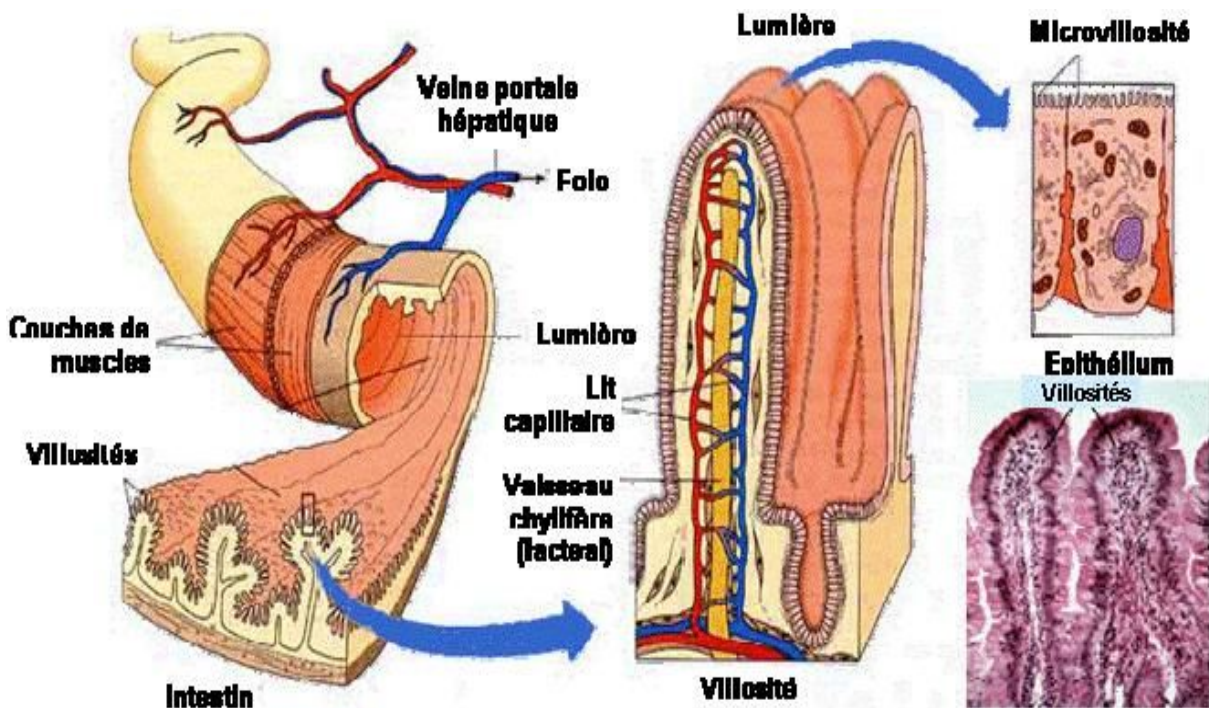


Figure 17 : Contraintes physiques rencontrées le long du tractus gastro-intestinal

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).

#### Absorption par les entérocytes

##### Voie paracellulaire

- objets < 50 nm et 100-300 nm
- hydrophiles
- positivement chargés

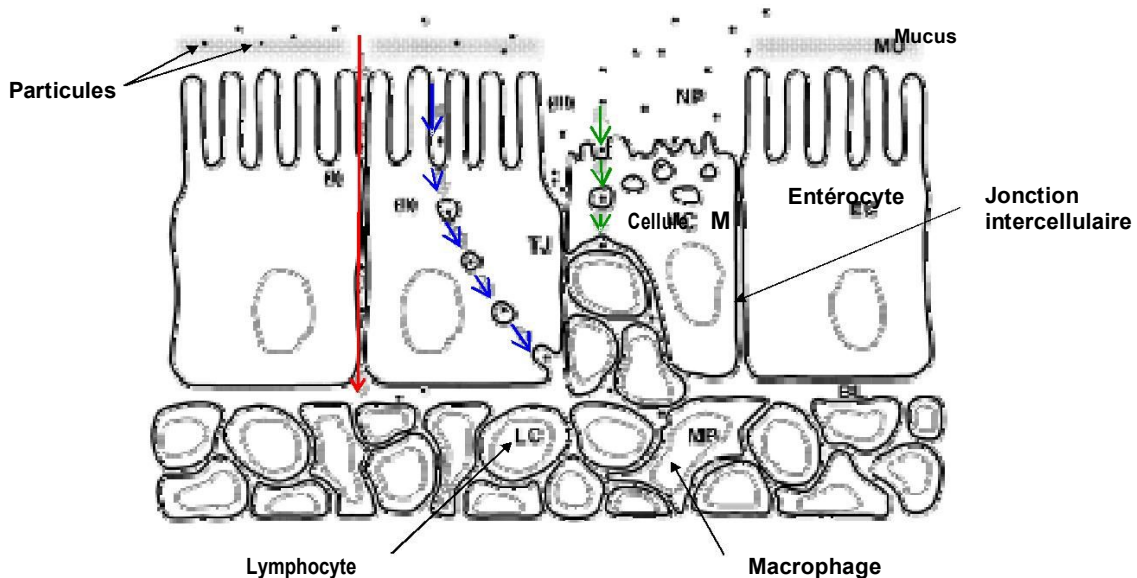
##### Voie transcellulaire

- objets > 300 nm
- hydrophobes

#### Absorption par les plaques de Peyer

##### Voie lymphatique

- via les cellules M
- objets > 1  $\mu\text{m}$



**Figure 18** : Représentation schématique des trois voies de passage trans-épithélial à partir de [110]

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 [111 ; 112]. 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 [113] 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.

Des nanoparticules à base de polymères naturels biodégradables et bioassimilables sont utilisés 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.

Les besoins ayant été identifiés, 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 le principe actif (Glimépiride) 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.

Le vecteur doit conserver son intégrité lors du passage de la bouche (pH neutre), de l'estomac (pH acide) et une protection intestinale.

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 le Glimépiride.

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.

**Chapitre 5 :**  
**Glimépéride**

Le terme diabète peut désigner un groupe de maladies très hétérogènes qui n'ont comme seul point commun que la présence d'une augmentation de la production d'urine, nécessairement accompagnée par une soif excessive [114].

Le diabète sucré est un dysfonctionnement du système de régulation de la glycémie, qui peut avoir des causes diverses (sécrétion d'insuline, réponse à l'insuline, cellules du pancréas, etc.) et présente plusieurs formes, qui ont toutes en commun des urines abondantes (polyurie). Le mot « diabète » vient du grec ancien dia-baïno, qui signifie « passer au travers » [115].

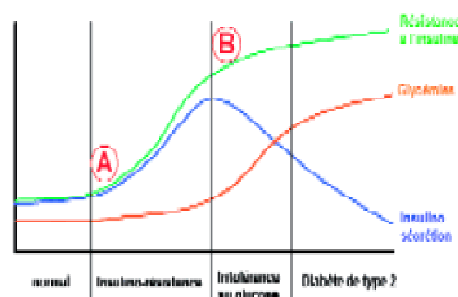


Figure 19 : Préviation de la survenue d'un diabète au moment le plus opportun

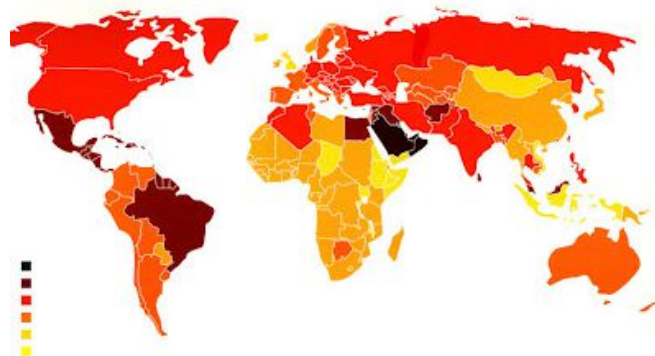


Figure 20 : Carte mondiale du diabète

L'épidémie de diabète mondiale prend des proportions pandémiques. On assiste actuellement à une explosion des coûts de contrôle et de traitement de la maladie et de ses complications, tandis que les pertes de productivité affectent l'économie mondiale. Les méthodes actuelles de surveillance n'aident pas les diabétiques à contrôler efficacement la maladie [116].

### L'épidémie mondiale du diabète

- 300 millions de malades dans le monde. Ce chiffre devrait doubler d'ici 2030[117].
- Coût mondial du diabète : 232 milliards de dollars [118].
- 5ème cause majeure de décès aux États-Unis et 4ème cause de décès dans le monde [119].

## Traitement du diabète

**Tableau 6 :** Toutes les molécules antidiabétiques présentées par classe

|                |                                     |   |  |
|----------------|-------------------------------------|---|--|
| <b>Insulin</b> | <b>Sensitizers</b>                  | <b>Biguanides</b>   | Metformin <sup>#</sup> Buformin <sup>†</sup> Phenformin <sup>‡</sup>   |
|                |                                     | <b>TZDs/"glitazones" (PPAR)</b>   | Pioglitazone, Rivoglitazone <sup>†</sup> RosiglitazoneTroglitazone <sup>‡</sup>  |
|                |                                     | <b>Dual PPAR agonists</b>   | Aleglitazar <sup>†</sup> Muraglitazar <sup>§</sup> Tesaglitazar <sup>§</sup>   |
|                | <b>Secretagogues</b>                | <b>K+ ATP</b>   | <b>Sulfonylureas</b><br><i>1st generation:</i> Acetohexamide, Carbutamide, Chlorpropamide, Metahexamide, Tolbutamide, Tolazamide.<br><i>2nd generation:</i> Glibenclamide (Glyburide) <sup>#</sup> Glibornuride, Glipizide, Gliquidone, Glisoxepide, Glycropyramide, Glimepiride, Gliclazide |
|                |                                     | <b>Meglitinides/"glinides"</b>  | Nateglinide Repaglinide Mitiglinide  |
|                |                                     | <b>GLP-1 agonists</b>   | Exenatide Liraglutide Taspoglutide <sup>†</sup> Albiglutide <sup>†</sup> Lixisenatide  |
|                | <b>DPP-4 inhibitors</b>             | Alogliptin Gemigliptin Linagliptin Saxagliptin Sitagliptin Vildagliptin   |  |
|                | <b>Analogs/other insulins</b>       | <i>fast-acting</i> (Insulin lispro Insulin aspart Insulin glulisine) <i>short-acting</i> (Regular insulin)<br><i>long-acting</i> (Insulin glargine Insulin detemirNPH insulin) <i>ultra-long-acting</i> (Insulin degludec <sup>†</sup> )<br><i>inhalable</i> Exubera <sup>‡</sup> |  |
| <b>Other</b>   | <b>Alpha-glucosidase inhibitors</b> | Acarbose, Miglitol, Voglibose   |  |
|                | <b>Amylin analog</b>                | Pramlintide   |  |
|                | <b>SGLT2 inhibitors</b>             | CanagliflozinDapagliflozin, Empagliflozin <sup>†</sup> Remogliflozin <sup>§</sup> Sergliflozin <sup>§</sup> Tofogliflozin <sup>†</sup>  |  |
|                | <b>Other</b>                        | Benfluorex <sup>‡</sup> Tolrestat <sup>‡</sup>  |  |

## 1 RENSEIGNEMENTS PHARMACEUTIQUES SUR LE GLIMEPIRIDE

Le Glimépiride est un antidiabétique sulfonyleurée. Il est commercialisé comme Amaryl par Sanofi-Aventis et LAVIDA par le laboratoire Saldal[120].

### 1.1 Substance pharmaceutique

Nom commerciale : amaryl

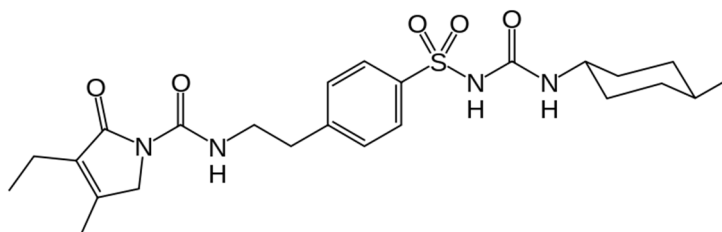
Dénomination commune : glimépiride

Nom chimique : 3-ethyl-4-methyl-N-(4-[N-((1*r*,4*r*)-4-methylcyclohexylcarbamoyl)sulfamoyl]phenethyl)-2-oxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrole-1-carboxamide

Formule moléculaire et masse moléculaire : C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S

Masse molaire : 490,62M

Formule développée :



### 1.2 Propriétés physicochimiques :

Le glimépiride est une poudre cristalline, blanche à blanc jaunâtre, inodore ou presque inodore.

Le glimépiride est pratiquement insoluble dans l'eau 19.5 mg/l.

Valeur pKa :  $6,2 \pm 0,1$  à 37 °C

Point de fusion : 207 °C

## 2 MODE D'ACTION ET PHARMACOLOGIE CLINIQUE

### 2.1 Mode d'action

AMARYL (glimépiride) exerce ses effets hypoglycémifiants principalement en stimulant la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  actives du pancréas. D'autres effets extrapancréatiques peuvent également jouer un rôle dans le mode d'action du glimépiride. Ces effets sont étayés à la fois par des études précliniques et cliniques qui ont prouvé que l'administration de glimépiride peut accroître la sensibilité des tissus périphériques à l'insuline. Ces données concordent avec les 18 résultats d'un essai de longue durée ayant porté sur AMARYL et réalisé avec contrôle placebo après répartition aléatoire des patients. On a en effet constaté qu'AMARYL avait amélioré l'insulinémie et le taux de peptide C postprandiaux, de même que la maîtrise générale de la glycémie sans augmentation notable de l'insulinémie ni du taux de peptide C à jeun. On n'a toutefois pas entièrement élucidé le mécanisme par lequel le glimépiride abaisse la glycémie dans le cadre d'un traitement de longue durée.

### 2.2 Pharmacodynamique

L'administration à des sujets sains d'une dose unique de glimépiride par voie orale aussi faible que 0,5 – 0,6 mg provoque un léger abaissement de la glycémie. Le temps nécessaire à l'obtention de l'effet maximal (c.-à-d. pour atteindre le niveau de glycémie le plus bas [Tmin]) est d'environ 2 à 3 heures. Chez des patients souffrant d'un diabète de type 2 (appelé auparavant diabète non insulino-dépendant ou DNID), le glimépiride administré par voie orale (à raison d'une dose quotidienne unique de 1, de 2, de 4 ou de 8 mg) a permis d'abaisser la glycémie à jeun et la glycémie postprandiale après 2 heures plus efficacement qu'un placebo après 14 jours de traitement. L'effet hypoglycémifiant a persisté durant 24 heures dans tous les groupes de doses.

À l'issue d'études de plus grande envergure portant sur la détermination des doses, on a établi que la glycémie et le taux d'hémoglobine glycosylée (HbA1c) étaient proportionnels à la dose pour l'éventail posologique d'AMARYL allant de 1 à 4 mg, 1 fois par jour. Certains patients, surtout ceux présentant une glycémie à jeun (GAJ) plus élevée au départ, peuvent bénéficier de l'administration de doses d'AMARYL pouvant aller jusqu'à 8 mg, 1 f.p.j. Le

fait d'administrer AMARYL en une seule prise ou en deux prises quotidiennes n'a pas entraîné de différence au chapitre de l'abaissement de la glycémie ni du taux d'HbA1c.

Dans le cadre de 2 essais comparatifs avec placebo d'une durée de 14 semaines réalisés auprès de 720 sujets, on a observé chez les patients traités par une dose d'AMARYL de 8 mg, 1 f.p.j., une baisse moyenne nette du taux d'HbA1c en unités absolues de 2,0 % (0,02) par rapport aux patients recevant un placebo. L'âge, le sexe, le poids et la race n'ont eu aucune incidence sur l'efficacité.

Une étude comparative avec placebo et répartition aléatoire, d'une durée de 22 semaines, a été réalisée sur AMARYL auprès de sujets souffrant d'un diabète de type 2 qui ne répondaient pas à un régime alimentaire. Le traitement par AMARYL a permis d'améliorer l'insulinémie et le taux de peptide C postprandiaux, et 75 % des patients sont parvenus à équilibrer leur glycémie et leur taux d'HbA1c de façon durable. Les résultats de 3 essais de longue durée montrent qu'AMARYL, administré en traitement de longue durée d'un an (n = 986), est efficace pour maîtriser la glycémie chez des patients diabétiques de type 2 répondant au traitement par une sulfonilurée. Pendant la phase de prolongation d'essais de longue durée à laquelle ont pris part des patients préalablement traités par AMARYL (n = 445), on n'a observé aucune détérioration importante de la glycémie à jeun (GAJ) ou du taux d'HbA1c après 2,5 ans de traitement par AMARYL.

On a également réalisé une étude dans le but de comparer l'efficacité d'un traitement associant AMARYL et la metformine à celle de chacun de ces agents utilisés en monothérapie chez des diabétiques de type 2. Les résultats de cette étude montrent que l'association de glimépiride et de metformine est plus efficace que chacune des monothérapies en ce qui a trait à l'amélioration du taux d'HbA1c, de la glycémie à jeun et de la glycémie postprandiale.

On a en outre comparé le traitement d'association par AMARYL et l'insuline (insuline isophane

[NPH] : 70 % et insuline ordinaire : 30 %) à un traitement associant un placebo à de l'insuline chez des patients présentant un échec thérapeutique secondaire et dont le poids corporel était >130 % du poids idéal. Le protocole de l'étude prévoyait d'abord l'administration de 5 à 10 unités d'insuline avec le repas principal du soir, la dose étant ensuite augmentée hebdomadairement pour atteindre des cibles glycémiques à jeun préétablies. Les patients des deux groupes de cette étude à double insu ont obtenu des réductions similaires de la glycémie à jeun (GAJ), mais le groupe traité par l'association d'AMARYL et d'insuline a bénéficié d'un effet d'épargne insulinique de sorte qu'il a reçu 38 % moins d'insuline.

Le traitement par AMARYL est efficace pour équilibrer la glycémie et n'entraîne pas d'altération du bilan lipidique chez les patients qui souffrent d'un diabète de type 2.

## **2.3 Pharmacocinétique**

### **2.3.1 Absorption**

À la suite de son administration par voie orale, le glimépiride est absorbé en totalité (100 %) dans l'appareil gastro-intestinal. Des études sur l'administration de doses uniques par voie orale à des sujets sains et de doses répétées par voie orale à des sujets souffrant d'un diabète de type 2 ont permis de démontrer que le glimépiride était absorbé de façon significative dans l'heure suivant son administration, les concentrations maximales (C<sub>max</sub>) étant atteintes en 2 ou 3 heures. La prise du glimépiride à l'heure des repas s'est accompagnée d'une légère prolongation (12 %) du T<sub>max</sub> moyen (temps requis pour atteindre la C<sub>max</sub>), et d'une diminution peu marquée de la C<sub>max</sub> et de l'ASC (aire sous la courbe) (8 et 9%, respectivement). Après l'administration orale de glimépiride à des volontaires sains, on a

observé une variation intraindividuelle de la  $C_{max}$ , de l'ASC et de la clairance totale (CL/f) de 23 %, 17 % et 15 %, respectivement, la variabilité interindividuelle de ces mêmes paramètres étant respectivement de 25 %, 29 % et 24%.

Le tableau ci-dessous indique les paramètres pharmacocinétiques du glimépiride obtenus dans une étude de proportionnalité des doses, en mode croisé, prévoyant l'administration d'une dose unique (1, 2, 4 ou 8 mg) à des sujets sains, et dans une étude de proportionnalité des doses, en mode parallèle, portant sur l'administration d'une dose unique et de doses multiples (4 et 8 mg) à des sujets souffrant d'un diabète de type 2.

**Tableau 7** : données cliniques

|                   |      | Volontaires                               | Patients souffrant d'un diabète de type 2             |  |
|-------------------|------|---|---|--|
|                   |      | Dose unique<br>Moyenne $\pm$ É.-T.<br>(n) | Dose unique<br>(Jour 1)<br>Moyenne $\pm$ É.-T.<br>(n) | Doses multiples<br>(Jour 10)<br>Moyenne $\pm$ É.-T.<br>(n) |
| $C_{max}$ (ng/mL) | 1 mg | 103 $\pm$ 34 (12)                         | -   | -  |
|                   | 2 mg | 177 $\pm$ 44 (12)                         | -   | -  |
|                   | 4 mg | 308 $\pm$ 69 (12)                         | 352 $\pm$ 222 (12)                                    | 309 $\pm$ 134 (12)   |
|                   | 8 mg | 551 $\pm$ 152 (12)                        | 591 $\pm$ 232 (14)                                    | 578 $\pm$ 265 (11)   |
| $T_{max}$ (h)     | 1 mg | 2,3 $\pm$ 0,5 (12)                        | -   | -  |
|                   | 2 mg | 2,4 $\pm$ 0,5 (12)                        | -   | -  |
|                   | 4 mg | 2,1 $\pm$ 0,6 (12)                        | 2,08 $\pm$ 0,51 (12)                                  | 2,22 $\pm$ 1,21 (12)                                       |
|                   | 8 mg | 2,8 $\pm$ 1,2 (12)                        | 2,80 $\pm$ 1,46 (14)                                  | 3,46 $\pm$ 2,82 (11)                                       |
| CL/f (mL/min)     | 1 mg | 55,3 $\pm$ 16,3 (12)                      | -   | -  |
|                   | 2 mg | 53,5 $\pm$ 15,5 (12)                      | -   | -  |
|                   | 4 mg | 53,6 $\pm$ 10,6 (12)                      | 54,2 $\pm$ 41,1 (12)                                  | 63,4 $\pm$ 53,5 (12)                                       |
|                   | 8 mg | 56,5 $\pm$ 21,1 (12)                      | 43,6 $\pm$ 13,0 (14)                                  | 41,0 $\pm$ 11,2 (11)                                       |
| Vd/f (L)          | 1 mg | 10,6 $\pm$ 1,8 (12)                       | -   | -  |
|                   | 2 mg | 12,6 $\pm$ 2,9 (12)                       | -   | -  |
|                   | 4 mg | 15,7 $\pm$ 5,4 (12)                       | 20,8 $\pm$ 11,3 (12)                                  | 40,2 $\pm$ 22,3 (12)                                       |
|                   | 8 mg | 20,9 $\pm$ 6,9 (12)                       | 18,9 $\pm$ 14,1 (14)                                  | 33,8 $\pm$ 12,6 (11)                                       |
| $t_{1/2}$ (h)     | 1 mg | 1,2 $\pm$ 0,5 (12)                        | -   | -  |
|                   | 2 mg | 1,3 $\pm$ 0,4 (12)                        | -   | -  |
|                   | 4 mg | 1,5 $\pm$ 0,5 (12)                        | 5,30 $\pm$ 2,54 (12)                                  | 8,82 $\pm$ 4,36 (12)                                       |
|                   | 8 mg | 1,5 $\pm$ 0,4 (12)                        | 4,69 $\pm$ 2,61 (14)                                  | 9,63 $\pm$ 2,63 (11)                                       |

(n) = nombre de sujets

Vd/f = volume de distribution calculé après l'administration par voie orale

Ces données indiquent que le glimépiride ne s'accumule pas dans le sérum et que la pharmacocinétique du médicament reste la même qu'il soit administré à des sujets sains ou à des malades souffrant d'un diabète de type 2. La clairance à la suite de l'administration par voie orale du glimépiride est restée constante pour la gamme posologique de 1 à 8 mg, ce qui témoigne de la pharmacocinétique linéaire du médicament.

### 2.3.2 Distribution

On a établi le volume de distribution (Vd) du glimépiride à 8,8 L (113 mL/kg) et sa clairance totale (CL) à 47,8 mL/min à la suite de son administration par voie intraveineuse à des sujets sains. Le glimépiride se lie aux protéines plasmatiques dans une proportion supérieure à 99,5 %.

### 2.3.3 Métabolisme

Le glimépiride est complètement métabolisé par oxydation après son administration par voie intraveineuse ou orale. Les principaux métabolites sont un dérivé cyclohexyl-hydroxy-méthyle (M1) et un dérivé carboxy (M2). Le cytochrome P450C9 intervient dans la biotransformation du glimépiride en son métabolite M1. Le métabolite M1 est ensuite dégradé en métabolite M2 sous l'action d'une ou de plusieurs enzymes cytosoliques. Le métabolite M1, mais pas le métabolite M2, possède environ 1/3 de l'activité pharmacologique de la molécule mère chez un modèle expérimental animal; cependant, on ignore si l'effet hypoglycémiant du métabolite M1 est significatif sur le plan clinique chez l'humain.

### 2.3.4 Excrétion

À la suite de l'administration par voie orale d'une dose unique de glimépiride marquée au <sup>14</sup>C, on a récupéré environ 60 % de la radioactivité totale dans l'urine au bout de 7 jours, le métabolite M1 (prédominant) et le métabolite M2 représentant de 80 % à 90 % de la dose récupérée dans l'urine. Environ 40 % de la radioactivité totale s'est retrouvée dans les fèces, les métabolites M1 et M2 (prédominant) représentant environ 70 % de la proportion récupérée dans les fèces. On n'a pas observé d'excrétion biliaire notable du glimépiride ni de son métabolite M1 après administration par voie intraveineuse.

## 3 EFFETS INDÉSIRABLES

### 3.1 Aperçu des effets indésirables du médicament

Le profil d'innocuité d'AMARYL (glimépiride) a été évalué lors d'essais cliniques, ainsi qu'au cours d'une période de surveillance postcommercialisation. Dans le cadre des essais comparatifs, 2 013 patients ont été exposés à AMARYL aux États-Unis, 1 489 en Europe, et 783 au Japon.

Plus de 1 800 de ces patients ont été traités pendant au moins 1 an.

La fréquence globale d'hypoglycémie chez les patients traités par AMARYL (glimépiride) s'est établie à 14 % environ au cours d'essais comparatifs avec placebo, la fréquence des réactions hypoglycémiques ayant varié entre 2,1 % et 3,1 % lors de 2 essais de longue durée très rigoureux et des réactions hypoglycémiques ayant été rapportées chez 22 % et 51 % des patients respectivement lors d'essais cliniques dont le protocole prévoyait l'administration concomitante d'AMARYL et de metformine ou d'insuline.

Les effets indésirables survenus le plus souvent lors des essais comparatifs avec placebo réalisés aux États-Unis ont été les suivants : étourdissements (1,7 %), asthénie (1,6 %), céphalées (1,5 %) et nausées (1,1 %).

Les effets indésirables graves suivants ont été signalés avec AMARYL :

Hypoglycémie grave pouvant être prolongée, voire potentiellement fatale.

Atteinte de la fonction hépatique (p. ex., avec cholestase et ictère), ainsi qu'hépatite pouvant évoluer en une insuffisance hépatique potentiellement fatale.

Réactions cutanées graves avec dyspnée et hypotension, évoluant parfois vers un état de choc.

Une agranulocytose ou une pancytopenie peuvent apparaître. En outre, des cas graves de thrombocytopénie avec une numération plaquettaire inférieure à 10 000/ $\mu$ L et des cas de purpura thrombocytopénique ont été signalés.



### 3.2 Effets indésirables du médicament observés au cours des essais cliniques

Puisque les essais cliniques sont menés dans des conditions très particulières, les taux des effets indésirables au médicament qui y sont observés peuvent ne pas refléter les taux observés en pratique et ne doivent pas être comparés aux taux observés dans le cadre des essais cliniques portant sur un autre médicament. Les renseignements sur les effets indésirables d'un médicament qui sont tirés d'essais cliniques s'avèrent utiles pour la détermination des manifestations indésirables liées aux médicaments et pour l'estimation des taux.

La fréquence globale d'hypoglycémie chez les patients traités par AMARYL (glimépiride) au cours d'essais comparatifs s'est établie à 14 % environ comparativement à 2% pour le placebo.

Dans 2 essais de longue durée (2 à 2,5 ans) très rigoureux, la fréquence des réactions hypoglycémiques a varié entre 2,1 % et 3,1 %. Au cours des essais cliniques dont le protocole prévoyait l'administration concomitante d'AMARYL et de metformine ou d'insuline, on a rapporté des réactions hypoglycémiques chez 22 % et 51 % des patients respectivement.

Le tableau ci-dessous présente les effets indésirables (autres que l'hypoglycémie) ayant un lien de causalité possible ou probable avec le médicament expérimental, survenus chez plus de 1% des patients traités par AMARYL au cours des essais cliniques comparatifs avec placebo réalisés aux États-Unis.

**Tableau 8 :** Effets indésirables survenus chez > 1% des patients traités par AMARYL

|                 | AMARYL                                    |     | Placebo                                   |     |
|-----------------|---|-----|---|-----|
|                 | N <sup>bre</sup> de patients<br>(n = 746) | (%) | N <sup>bre</sup> de patients<br>(n = 294) | (%) |
| Étourdissements | 13  | 1,7 | 1   | 0,3 |
| Asthénie        | 12  | 1,6 | 3   | 1,0 |
| Céphalées       | 11  | 1,5 | 4   | 1,4 |
| Nausées         | 8   | 1,1 | 0   | 0,0 |

#### ➤ Système endocrinien/métabolisme :

L'administration de sulfonylurées peut s'accompagner de porphyrie hépatique ou de réactions rappelant la réponse au disulfirame ; ces réactions n'ont toutefois pas été rapportées avec

AMARYL (glimépiride) jusqu'à maintenant. On a signalé des cas d'hyponatrémie à la suite de l'administration du glimépiride et d'autres sulfonylurées, le plus souvent chez des patients qui suivaient d'autres traitements médicamenteux ou qui souffraient de maladies reconnues pour causer une hyponatrémie ou pour augmenter la sécrétion de l'hormone antidiurétique (ADH).

Aucun cas de syndrome de sécrétion inappropriée d'ADH (SIADH) n'a été signalé avec AMARYL, mais on a observé ce dérèglement à la suite de l'administration d'autres sulfonylurées ce qui suggère que ces composés peuvent accroître l'action périphérique (antidiurétique) de l'ADH ou en augmenter la sécrétion, ou exercer ces deux effets à la fois.

#### ➤ Appareil digestif :

Des troubles gastro-intestinaux comme les nausées ou la plénitude gastrique peuvent parfois se produire. On a également rapporté des vomissements, des douleurs gastro-intestinales et de la diarrhée. Cependant, la fréquence de ces réactions a été similaire à celle observée dans le groupe placebo. On a signalé dans de rares cas une hausse des taux des

enzymes hépatiques. Les sulfonylurées, incluant AMARYL (glimépiride), peuvent aussi, dans des cas isolés, entraîner un dysfonctionnement hépatique (s'accompagnant p. ex. d'une cholestase et d'un ictère), ainsi qu'une hépatite pouvant évoluer vers une insuffisance hépatique potentiellement fatale.

➤ **Peau et annexes cutanées :**

Des réactions cutanées allergiques ou pseudoallergiques telles que prurit, éruptions cutanées, érythème, urticaire, vascularite et éruptions morbilliformes ou maculopapuleuses ont été signalées chez moins de 1 % des patients. Ces réactions bénignes peuvent parfois évoluer en réactions graves, avec dyspnée et hypotension, pouvant aller jusqu'au choc. Elles peuvent aussi être passagères et disparaître en dépit de la poursuite du traitement par AMARYL. Par contre, si ces réactions cutanées persistent, on doit cesser l'administration du médicament. Par ailleurs, même si aucun cas de porphyrie cutanée tardive n'a été rapporté avec AMARYL, on en a déjà signalé avec des sulfonylurées.

➤ **Autres effets indésirables :**

L'emploi d'AMARYL peut s'accompagner de troubles visuels, plus particulièrement de vue brouillée ou de troubles de l'accommodation, ou de ces 2 effets à la fois. Ces effets relèveraient des fluctuations de la glycémie et seraient plus marqués au début du traitement. Ces troubles affectent également les diabétiques non traités et le traitement peut en fait les atténuer. La fréquence de vue brouillée relevée au cours des essais cliniques comparatifs avec placebo a été de 3,4 % dans le groupe placebo et de 1,7 % dans le groupe traité par AMARYL.

➤ **Effets indésirables peu courants du médicament observés au cours des essais cliniques (< 1 %)**

Les effets cliniques indésirables survenus à une fréquence inférieure à 1 % chez les patients traités par AMARYL dans le cadre des essais réalisés aux États-Unis sont présentés ci-dessous par système ou appareil.

- **Organisme entier :** douleurs abdominales, anomalies des résultats de laboratoire et douleurs aux membres
- **Appareil cardiovasculaire :** palpitations et vasodilatation
- **Appareil digestif :** diarrhée, augmentation de l'appétit, dyspepsie, anorexie et douleurs gastrointestinales
- **Métabolisme et nutrition :** réactions hypoglycémiques et hyperglycémie
- **Système nerveux :** tremblements, insomnie, transpiration profuse, nervosité, sécheresse de la bouche, bouffées vasomotrices et paresthésie
- **Peau et annexes cutanées :** prurit et urticaire
- **Organes des sens :** vue brouillée
- **Appareil génito-urinaire :** pollakiurie et nycturie

❖ **Résultats hématologiques et biologiques anormaux**

Hausse des concentrations sériques d'alanine-aminotransférase (ALT) :

Dans des essais sur AMARYL contrôlés par placebo, 1,9 % des sujets traités par AMARYL et 0,8 % des sujets ayant reçu un placebo ont eu une hausse des concentrations sériques d'ALT dépassant deux fois la limite supérieure de l'intervalle normal de référence.

❖ **Effets indésirables du médicament signalés après la commercialisation du produit**

Les effets indésirables suivants, non observés au cours des essais cliniques, ont été signalés au cours de la période de surveillance postcommercialisation :

- **Appareil circulatoire** : Des modifications du tableau hématologique sont possibles. De rares cas ( $\geq 1/10\ 000$  et  $< 1/1\ 000$ ) de thrombocytopénie et des cas isolés ( $< 1/10\ 000$ ) de leucopénie, d'anémie hémolytique, d'érythrocytopénie, de granulocytopénie, d'agranulocytose ou de pancytopénie peuvent survenir. Des cas graves de thrombocytopénie avec une numération plaquettaire inférieure à  $10\ 000/\mu\text{L}$  et des cas de purpura thrombopénique ont été rapportés.
- **Peau** : Des cas isolés ( $< 1/10\ 000$ ) de vascularite ou d'hypersensibilité à la lumière peuvent survenir.
- **Autres** : Des cas isolés ( $< 1/10\ 000$ ) de baisse de la concentration sérique de sodium peuvent survenir.

# **Partie**

# **expérimentale**

**Chapitre 6 :**  
**Matériels et méthodes**

L'objectif de cette partie du travail consiste à préparer des nanocapsules chargées en GLIM par deux procédés différents le premier est le procédé de gélotion du chitosane par l'acétate de sodium et le deuxième procédé est la désolvation en deux étapes de la gélatine.

Ces deux procédés ont été optimisés par un plan d'expériences.

## 1. Matériels

### 1.1. Le Chitosane

Le Chitosane utilisé est issu d'extraction par la méthode chimique à partir des carapaces de crevettes, les 3 étapes de ce procédé chimique ainsi qu'une quatrième étape consistant à la caractérisation physicochimique du chitosane obtenu sont données dans le tableau suivant :

**Tableau 9** : méthode de préparation et de caractérisations du chitosane utilisé pour la nanoencapsulation.

| Opérations  | Protocole utilisé                      | Référence bibliographique       | Caractéristiques du chitosane utilisé pour la nanoencapsulation |
|---|--|---------------------------------|---|
| <b><u>Etape 1 : Prétraitement des carapaces</u></b>                     |  |                                 |   |
| lavage, séchage, broyage et tamisage. (Mukherjee, 2002) [121]           |  |                                 |   |
| <b><u>Etape 2 : Extraction de la chitine</u></b>                        |  |                                 |   |
| <b>Déminéralisation</b>   | En utilisant l'acide chlorhydrique     | (No et al., 1995) [122]         | /   |
| <b>Déprotéinisation</b>   | Avec soude + chauffage                 | (Benhabiles et al., 2012) [123] | /   |
| <b>Décoloration</b>   | Avec acétone + hypochlorite de sodium. | (No et al., 1995). [122]        | /   |
| <b><u>Etape 3 : Préparation du chitosane</u></b>                        |  |                                 |   |
| <b>Déacytilation</b>  | Soude concentré + chauffage            | Kurita et al. (2003). [124]     | /   |
| <b><u>Etape 4 : Détermination des caractéristiques du chitosane</u></b> |  |                                 |   |
| <b>Taux de protéines</b>  | La méthode Kjeldahl                    | (AOAC, 1990). [125]             | <b>0.62 %</b>   |

|                                    |   |  |                   |
|------------------------------------|---|--|-------------------|
| <b>Taux de la matière minérale</b> | Teste des cendres                                     | (AOAC, 1995) [126]   | <b>0.07 %</b>     |
| <b>Degré de déacytilation</b>      | Spectroscopie infrarouge à transformation de fourrier | (Sabnis and Block 1997) et (Baxter, Dillon, Taylor, & Roberts, 1992) [127] [128] | <b>87 %</b>       |
| <b>Poids moléculaire</b>           | Granulométrie laser                                   | (Kabaoui et al. 2015) [129]  | <b>11 Daltons</b> |

### 1.2. La Gélatine

La gélatine utilisée est d'origine bovine (type B) avec un pH isoélectrique de 3 à 3.2.

### 1.3. Autres produits

Le formaldéhyde, le citrate de sodium, l'acétone, l'acide acétique, la soude, l'acide chlorhydrique, l'éthanol, l'hypochlorite de sodium ainsi que l'eau distillé sont tous de grade analytique.

## 2. Formulation des nanoparticules

### 2.1. Formulation des nanoparticules à base de chitosane

#### 2.1.1. Protocole expérimental

Une solution de chitosane est préparé dans de l'acide acétique a 2%, le GLIM est directement ajouté dans cette solution sous forte agitation. Après homogénéisation 100 ml d'une solution de citrate de sodium est ajouté, l'agitation est maintenu durant une heure ensuite les nanoparticules sont récupéré par centrifugation a 10000 RPM durant 15 minutes, l'opération de lavage est effectué 3 fois, ensuite les nanoparticules sont séchées sous vide.

#### 2.1.2. Organisations des essais sous forme de plan d'expériences

- ❖ Facteurs pris en considération dans le plan d'expérience :
  - F1 : le ratio Chitosane : Glimépiride.
  - F2 : la quantité de l'agent de réticulation (l'acétate de sodium)

- ❖ Réponses prise en considération dans le plan d'expérience :
  - R1 : Le taux d'encapsulation de GLIM.
  - R2 : Le diamètre des nanoparticules

Les essais du plan d'expériences sont présentés dans le tableau 10

**Tableau 10 :** matrice des expériences du plan factoriel pour l'optimisation des nanoparticules de chitosane.

| Essais | F1 | F2 | Ratio<br>Chitosane/Glimépiride | Quantité de l'acétate de<br>sodium (100 ml) |
|--------|----|----|--------------------------------|---|
| 1      | +1 | +1 | 1 : 3                          | 3%  |
| 2      | -1 | +1 | 1 : 1                          | 3%  |
| 3      | +1 | -1 | 1 : 3                          | 2%  |
| 4      | -1 | -1 | 1 : 1                          | 2%  |
| 5      | 0  | 0  | 1 : 2                          | 2.5%  |

## 2.2. Formulation des nanoparticules à base de gélatine

### 2.2.1. Protocole expérimental

Une solution de GLIM solubilisé dans de l'acétone est émulsionnée dans une solution de gélatine à 40°C (cette température représente la température de dénaturation de la gélatine) [130]. L'émulsion est agitée à 500 RPM pendant 5 min. Une eau tiède (40°C) est graduellement additionnée pour diluer la concentration colloïdale jusqu'à une valeur inférieure à 30% [131].

Le pH du mélange est ajusté à 3 (l'intervalle du pH isoélectrique de la gélatine) par addition goutte à goutte d'une solution d'acide acétique (10%v/v). Le mélange est ensuite refroidit jusqu'à 5°C tout en maintenant l'agitation.

On ajoute les produits suivants :

1- du formaldéhyde qui représente l'agent durcisseur, on agite puis on laisse reposer durant divers temps de durcissement [132].

2- Pour ajuster le pH de la solution à 9, de l'hydroxyde de sodium à (20%w/v) est ajouté afin d'inhiber les agrégations



Ensuite les nanoparticules sont récupérées par centrifugation à 10000 RPM durant 15 minutes, l'opération de lavage est effectuée 3 fois, ensuite les nanoparticules sont séchées sous vide [133].

### 2.2.2. Organisations des essais sous forme de plan d'expériences

Facteurs pris en considération dans le plan d'expérience :

- le ratio Gélatine : Glimépiride .
- la quantité de l'agent de durcissement (le formaldéhyde).

Réponses prise en considération dans le plan d'expérience :

- Le taux d'encapsulation de GLIM.
- Le diamètre le plus homogène (population des nanoparticules ayant le même diamètre).

Les essais du plan d'expériences sont présentés dans le tableau 11

**Tableau 11 :** matrice des expériences du plan factoriel pour l'optimisation des nanoparticules de gélatine.

| Essais | F1 | F2 | Ratio<br>Gélatine/Glimépiride | Quantité du<br>formaldéhyde |
|--------|----|----|-------------------------------|-----------------------------|
| 1      | +1 | +1 | 1 :3                          | 0.4 ml                      |
| 2      | -1 | +1 | 1 :1                          | 0.4 ml                      |
| 3      | +1 | -1 | 1 :3                          | 0.2 ml                      |
| 4      | -1 | -1 | 1 :1                          | 0.2 ml                      |
| 5      | 0  | 0  | 1 :2                          | 0.3 ml                      |

## 3. Caractérisation physicochimique des nanoparticules

### 3.1 Détermination du taux d'encapsulation

La teneur en GLIM est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-VIS «Agilent 8453 UV-Vis spectrophotometer» en mesurant l'absorbance à 228 nm après une convenable dilution [134]. Les résultats des taux d'encapsulation sont présentés dans les tableaux 12 et 13.

### 3.1.1 Courbe d'étalonnage du glimépiride

Elle permet de mesurer la concentration du principe actif GLIM dans l'étude *in vitro*. Les résultats sont exprimés dans la figure 34.

### 3.1.2 Préparation des solutions

La solution mère (solution de 10 µg de glimépiride dans 1 ml d'eau): dans une fiole jaugée de 100 ml on met 100 mg de glimépiride on complète avec du méthanol jusqu'au trait de jauge, après homogénéisation de la solution sous ultrason pendant 5 min, à l'aide d'une éprouvette on prélève 10 ml de cette solution qu'on met dans une fiole jaugée de 1 l on complète avec la solution de tampon phosphate jusqu'au trait de jauge, on met la fiole sous agitation magnétique pendant 10 min puis sous ultrason pendant 5 min [135,136,137].

La solution tampon phosphate pH 7.4 : (selon la pharmacopée britannique) dans une fiole jaugée de 200 ml on met 50 ml de solution de «  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  » 0,2 M et 39.1ml de solution de «  $\text{NaOH}$  » 0,2M, puis on complète avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

La solution de «  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  » 0,2 M : on met 27.22g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dans une fiole jaugée de 1l puis on complète avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

La solution de «  $\text{NaOH}$  » 0,2M : on met 8g d'  $\text{NaOH}$  dans une fiole jaugée de 1l puis on complète avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Les dilutions de la solution mère avec la solution tampon phosphate pH 7.4:

- (solution de 8 µg de glimépiride dans 1ml d'eau) : on met 80ml de la solution mère dans une fiole jaugée de 100 ml puis on complète avec la solution tampon phosphate jusqu'au trait de jauge.

- (solution de 6 µg de glimépiride dans 1ml d'eau) : on met 60ml de la solution mère dans une fiole jaugée de 100 ml puis on complète avec la solution tampon phosphate jusqu'au trait de jauge.

- (solution de 4 µg de glimépiride dans 1ml d'eau) : on met 40ml de la solution mère dans une fiole jaugée de 100 ml puis on complète avec la solution tampon phosphate jusqu'au trait de jauge.

- (solution de 2 µg de glimépiride dans 1ml d'eau) : on met 20ml de la solution mère dans une fiole jaugée de 100 ml puis on complète avec la solution tampon phosphate jusqu'au trait de jauge.

### 3.1.3 Lecture des absorbances des solutions de glimépiride

On mesure les absorbances des solutions de glimépiride (2, 4, 6, 8 et 10  $\mu\text{g/ml}$ ) à 228 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-VIS «Agilent 8453 UV-Vis spectrophotometer» [138].



**Figure 20** : Agilent 8453 UV-Vis spectrophotometer.

### 3.2 Détermination de la granulométrie

La distribution granulométrique des nanocapsules est déterminée à l'aide d'un Granulomètre laser ANALYSETTE 22 NanoTec plus (figure 21) [139]. L'échantillon est dispersé dans de l'eau puis il est introduit dans le bain de l'appareil petit à petit jusqu'à ce que la concentration des nanoparticules dans la cellule devienne significative, puis on fait la lecture [140]. Les résultats des taux d'encapsulation sont présentés dans les tableaux 12 et 13.



**Figure 21** : Granulomètre laser ANALYSETTE 22 NanoTec plus.

#### **4. Caractérisation pharmacologique et biologique des nanoparticules**

##### **4.1 Etude de la cinétique de dissolution *in vitro***

La cinétique de dissolution est effectuée à l'aide d'un dissolutest «Electrolab TDT-08L dissolution apparatus» (figure 22), en utilisant le système de palette (paddle).

Les conditions opératoires sont  $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ , 50 RPM, 2h dans l'HCl pH= 1.2 puis 6h dans le tampon phosphate pH=6,1 [141].

L'équivalent de 45mg en GLIM en microcapsule est mis dans le vase du dissolutest. Un prélèvement de 5ml est effectué chaque heure pendant 6h, le prélèvement est filtré à l'aide d'un filtre à seringue millipore de  $0.45\mu\text{m}$  puis son absorbance est mesurée à 228nm après une dilution adéquate.

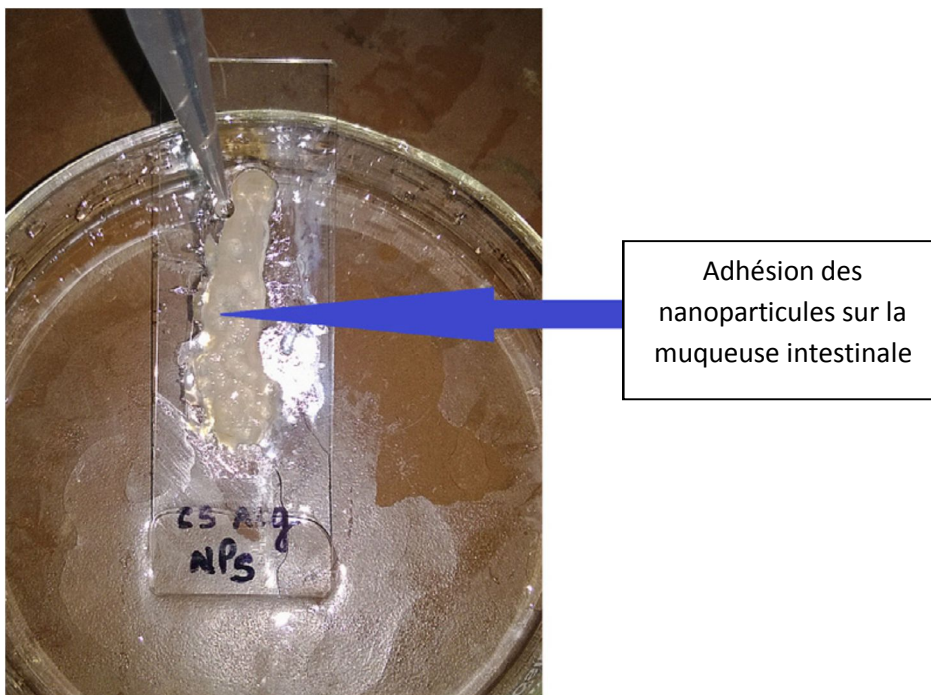
Les résultats de la cinétique de dissolution sont illustrés dans les figures 24 et 25.



**Figure 22** : appareil de dissolution Electrolab TDT- 08L.

#### 4.2. Évaluation de la bioadhésion *ex vivo*

La bioadhésion des nanoparticules est déterminée par la méthode *ex vivo* décrite par Rao and Buri [142], 10 cm d'intestin de rat est sectionné et lavé avec une eau saline isotonique (NaCl 0.9%). Les nanoparticules sont placées à la surface de la muqueuse intestinale ensuite le système est incubé à 37°C à une humidité relative de 80% durant 120 min. Après incubation, les pièces de l'intestin sont rincées avec un tampon phosphate par un débit de 20 ml/min durant 2 minutes à l'aide d'une pompe péristaltique.



**Figure 23** : photographie de l'intestin de rat tapissé par les nanoparticules.

**Chapitre 7 :**  
**Résultats et discussion**

Dans ce chapitre nous allons donner les résultats des plans d'expériences effectués précédemment dans le chapitre 6, l'efficacité du plan d'expériences est prouvée et l'optimum a été analysé par les différentes méthodes.

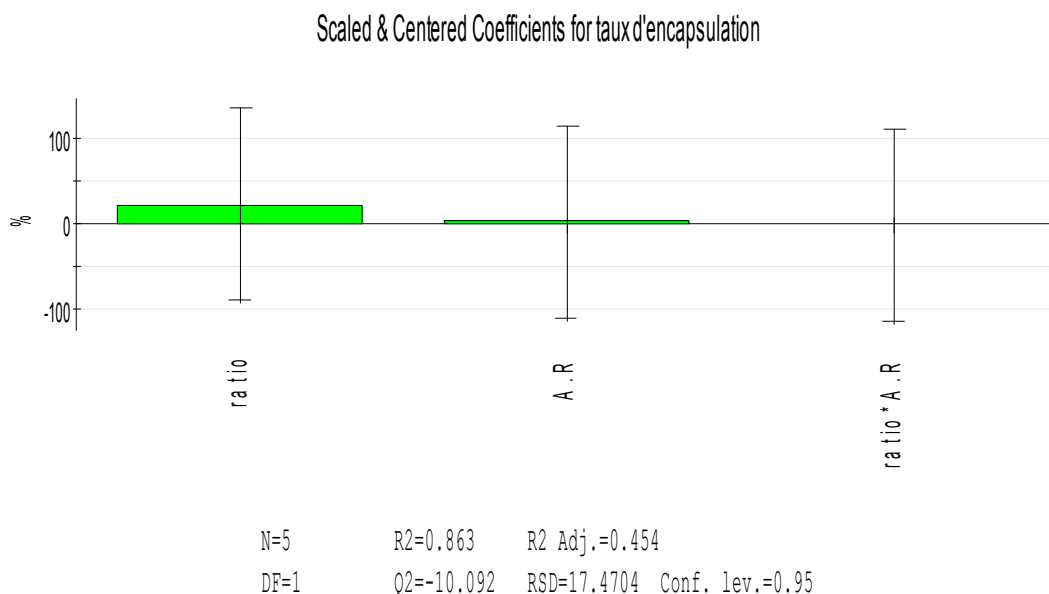
## 1. Formulation des nanoparticules de chitosane

Après avoir effectué des essais de formulations, les réponses prises en considération dans le plan d'expériences ont été introduites sur le logiciel MODDE6, la matrice résultante est représentée dans le tableau 12.

**Tableau 12** : Essais du plan d'expérience : matrice des facteurs et des réponses pris en considération dans le plan d'expériences

| Essais | F1 | F2 | R1 : taux d'encapsulation | R2: diamètre des nanoparticules |
|--------|----|----|---------------------------|---------------------------------|
| 1      | +1 | +1 | 67.1%                     | 61nm                            |
| 2      | -1 | +1 | 31.1%                     | 39 nm                           |
| 3      | +1 | -1 | 62.6%                     | 69 nm                           |
| 4      | -1 | -1 | 23.4%                     | 42 nm                           |
| 5      | 0  | 0  | 42.8%                     | 53 nm                           |

### 1.1. Effets des facteurs sur le taux d'encapsulation



**Figure 24** : Influence des coefficients des facteurs sur le taux d'encapsulation

La figure 24 représente l'influence du ratio chitosane/glimepiride, et la quantité de l'agent de durcissement sur le taux d'encapsulation. Nous observons une influence positive du ratio et de la quantité de l'agent de durcissement qui est de 21.76 et 2.94 respectivement, et une influence presque nulle de l'interaction.

Les valeurs des différents coefficients du modèle sont données dans le tableau 13.

Les coefficients du Ratio et de l'Agent de durcissement signifient une influence positive de l'augmentation du taux d'encapsulation.

**Tableau 13** : Les valeurs des différents coefficients du modèle

| <b>taux d'encapsulation</b> | <b>Coeff. SC</b> | <b>Std. Err.</b> | <b>P</b> | <b>Conf. int(±)</b> |
|-----------------------------|------------------|------------------|----------|---------------------|
| Constant                    | 43.544           | 7.813            | 0.113025 | 99.2736             |
| ratio                       | 21.7675          | 8.7352           | 0.242948 | 110.991             |
| A.R                         | 2.9475           | 8.7352           | 0.792824 | 110.991             |
| ratio*A.R                   | -0.312497        | 8.7352           | 0.977235 | 110.991             |

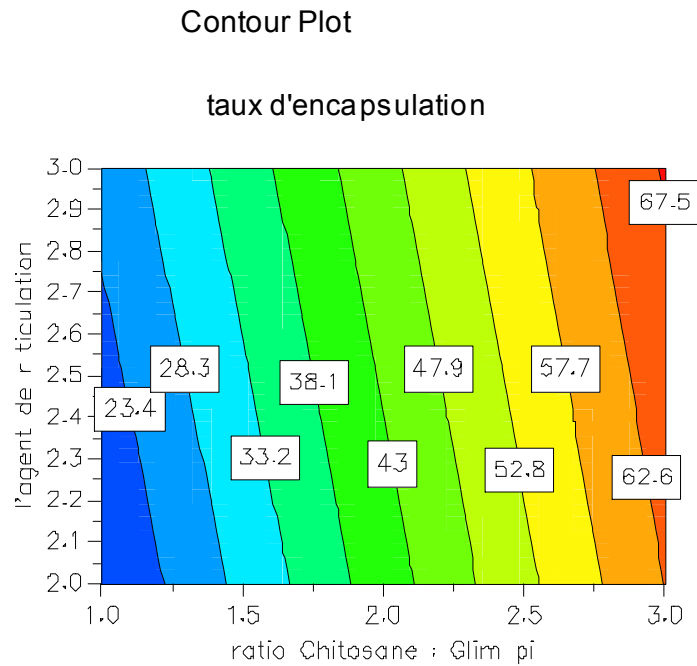
|        |           |         |              |         |
|--------|-----------|---------|--------------|---------|
| N = 5  | Q2 =      | -10.092 | Cond. no. =  | 1.1180  |
| DF = 1 | R2 =      | 0.863   | Y-miss =     | 0       |
|        | R2 Adj. = | 0.454   | RSD =        | 17.4704 |
|        |           |         | Conf. lev. = | 0.95    |

❖ **Modèle mathématique :**

$$\text{Taux d'encapsulation} = 43.544 + 21.7675 * \text{ratio} + 2.9475 * \text{A.R} - 0.312497 * \text{ratio} * \text{A.R}$$

$$Y = a_0 + a_1 x_1 + a_2 x_2 + a_1 a_2 x_1 x_2$$

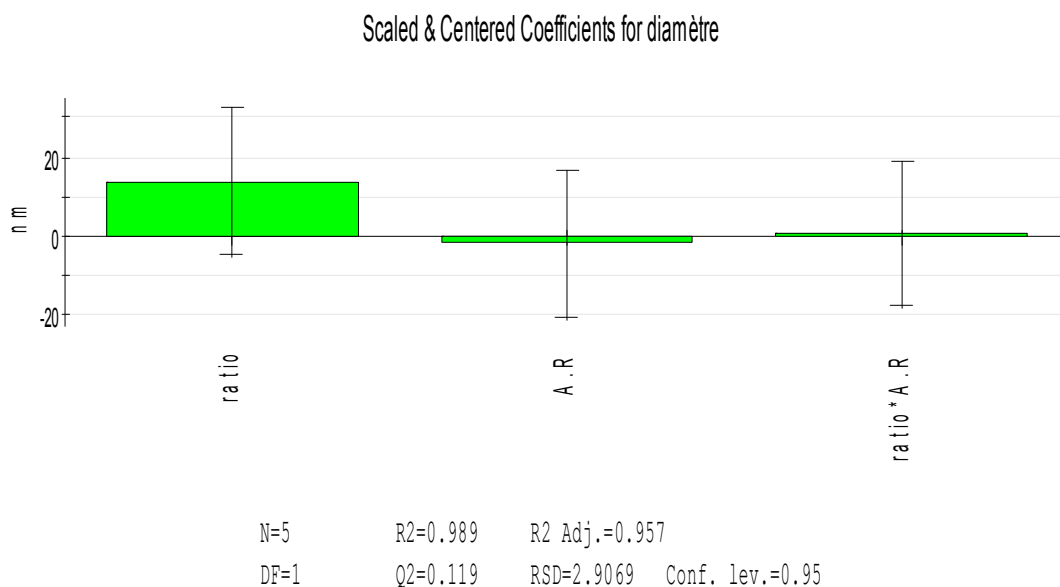




**Figure 25 :** Isoréponse représentant le taux d’encapsulation en fonction de la quantité de l’agent de durcissement et du ratio.

Plus le ratio est grand (la quantité du chitosane est plus importante que celle du glimépiride) et plus la quantité de l’agent de durcissement est grande, le taux d’encapsulation est plus important.

**1.2. Effets des facteurs sur le diamètre des nanoparticules**



**Figure 26 :** Influence des coefficients des facteurs sur le diamètre

La figure 26 représente l'influence du ratio et de la quantité de l'agent de durcissement sur le diamètre. Nous observons une influence positive du ratio et de l'interaction. Par conséquent, on a une influence négative de la quantité de l'agent de durcissement.

L'explication est confirmée dans l'isoréponse du diamètre Figure 27.

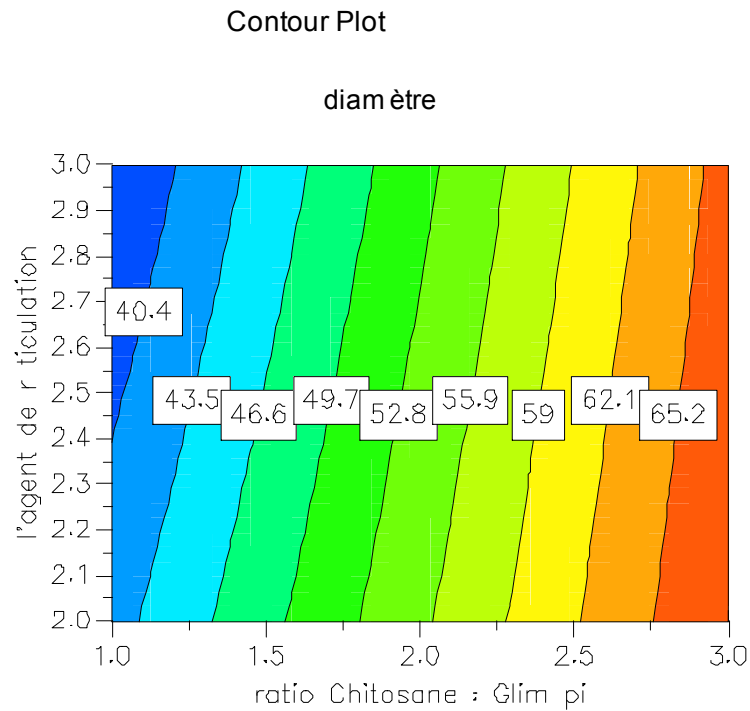
**Tableau 14** : Les valeurs des différents coefficients du modèle

| Diamètre  | Coeff. SC | Std. Err. | P         | Conf. int(±) |
|-----------|-----------|-----------|-----------|--------------|
| Constant  | 53.6      | 1.3       | 0.0154374 | 16.5181      |
| ratio     | 13.75     | 1.45345   | 0.067045  | 18.4678      |
| A.R       | -1.75     | 1.45345   | 0.441233  | 18.4678      |
| ratio*A.R | 0.750003  | 1.45345   | 0.696728  | 18.4678      |

|        |           |       |              |        |
|--------|-----------|-------|--------------|--------|
| N = 5  | Q2 =      | 0.119 | Cond. no. =  | 1.1180 |
| DF = 1 | R2 =      | 0.989 | Y-miss =     | 0      |
|        | R2 Adj. = | 0.957 | RSD =        | 2.9069 |
|        |           |       | Conf. lev. = | 0.95   |

❖ **Modèle mathématique :**

$$\text{Diamètre} = 53.6 + 13.75 * \text{ratio} - 1.75 * \text{A.R} + 0.750003 * \text{ratio} * \text{A.R}$$

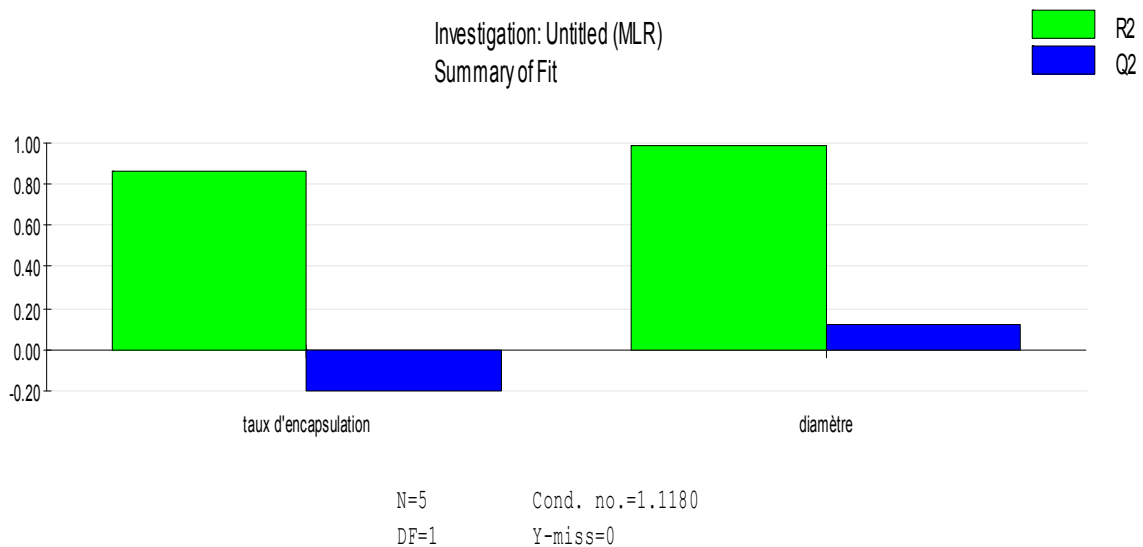


**Figure 27 :** Isoréponse représentant le diamètre en fonction de la quantité de l’agent de durcissement et du ratio

Plus le ratio est grande et plus la quantité de l’agent de durcissement est petit, le diamètre est plus important.

### 1.3. Étude statistique du plan d’expériences

Après la réalisation d’un plan expérimental, il faut analyser les résultats obtenus, L’analyse des réponses a été faite en se basant en premier lieu sur le coefficient de corrélation  $R^2$  , il faut qu’il soit le plus élevé possible (supérieur à 0,5).



**Figure 28 :** Histogramme des coefficients de corrélation et la prédictibilité du modèle

Nous observons que les coefficients de corrélation, pour les deux réponses, sont proches de 1, les coefficients de prédiction restent assez faibles. Nous pouvons déduire que le modèle obtenu a une bonne corrélation avec les résultats expérimentaux. Ceci dit, il est difficile de prédire des résultats en dehors de l'intervalle des facteurs imposés.

❖ **Conclusion**

D'après les résultats on constate que l'essai optimum est l'essai 1 avec un taux d'encapsulation de 67,2%.

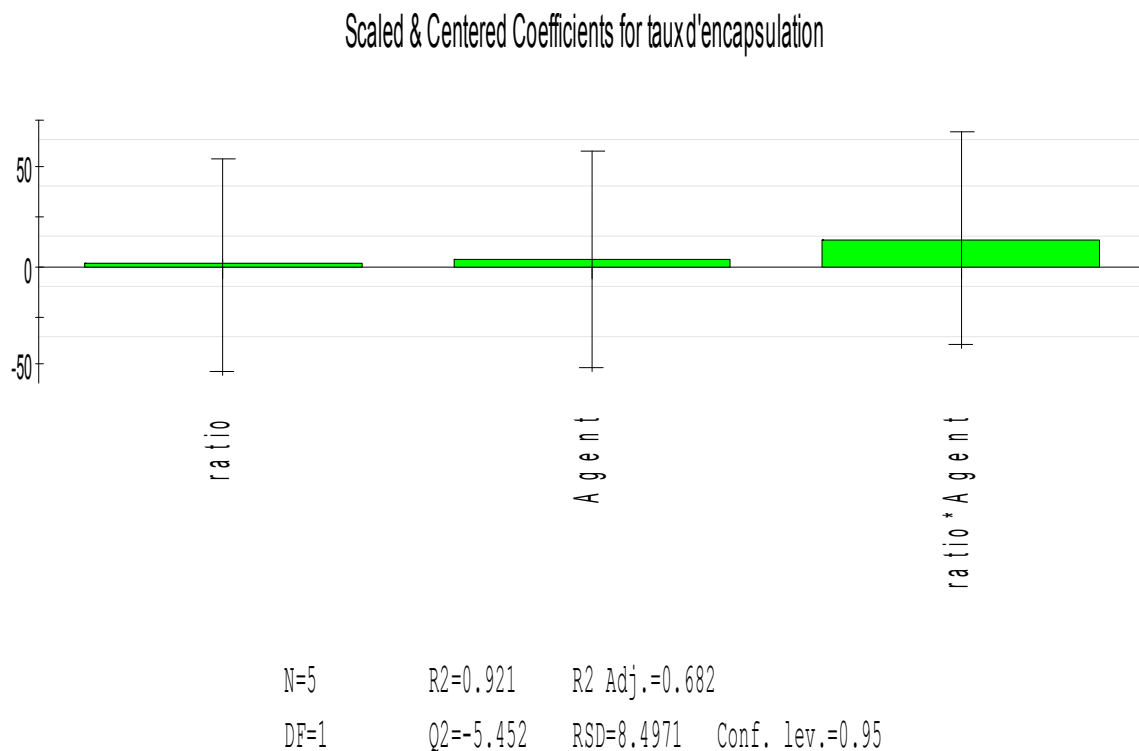
**2. Formulation des nanoparticules de Gélatine**

Après avoir effectué des essais de formulations, les réponses prises en considération dans le plan d'expériences ont été introduites sur le logiciel MODDE6, la matrice résultante est représentée dans le tableau 15.

**Tableau 15** : Essais du plan d'expérience : matrice des facteurs et des réponses pris en considération dans le plan d'expériences

| Essais | F1 | F2 | R1 : taux d'encapsulation | R2: diamètre des nanoparticules |
|--------|----|----|---------------------------|---------------------------------|
| 1      | +1 | +1 | 97,4%                     | 87 nm                           |
| 2      | -1 | +1 | 67,2%                     | 39 nm                           |
| 3      | +1 | -1 | 62,1%                     | 76 nm                           |
| 4      | -1 | -1 | 88%                       | 34 nm                           |
| 5      | 0  | 0  | 69,2%                     | 45 nm                           |

## 2.1. Effets des facteurs sur le taux d'encapsulation



**Figure 29:** Influence des coefficients des facteurs sur le taux d'encapsulation

La figure 29 représente l'influence du ratio Gélatine/Glimépiride, et la quantité de l'agent de durcissement sur le taux d'encapsulation.

Nous observons une influence positive du ratio, de la quantité de l'agent de durcissement et de l'interaction.

Les valeurs des différents coefficients du modèle sont données dans le tableau 16.

Les coefficients du Ratio et de l'Agent de durcissement signifient une influence positive de l'augmentation du taux d'encapsulation.

**Tableau 16 :** Les valeurs des différents coefficients du modèle

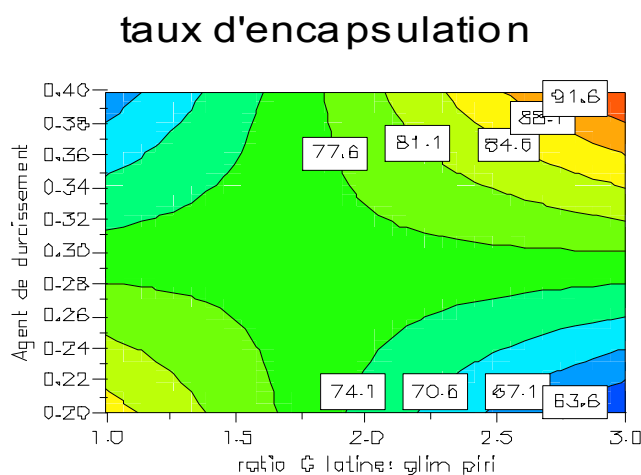
| taux d'encapsulation | Coeff. SC | Std. Err. | P         | Conf. int(±) |
|----------------------|-----------|-----------|-----------|--------------|
| Constant             | 76.6      | 3.8       | 0.0315558 | 48.2836      |
| ratio                | 1.00001   | 4.24853   | 0.852833  | 53.9827      |
| Agent                | 3.5       | 4.24853   | 0.561309  | 53.9827      |
| ratio*Agent          | 14        | 4.24853   | 0.18757   | 53.9827      |

|        |           |        |              |        |
|--------|-----------|--------|--------------|--------|
| N = 5  | Q2 =      | -5.452 | Cond. no. =  | 1.1180 |
| DF = 1 | R2 =      | 0.921  | Y-miss =     | 0      |
|        | R2 Adj. = | 0.682  | RSD =        | 8.4971 |
|        |           |        | Conf. lev. = | 0.95   |

❖ **Modèle mathématique :**

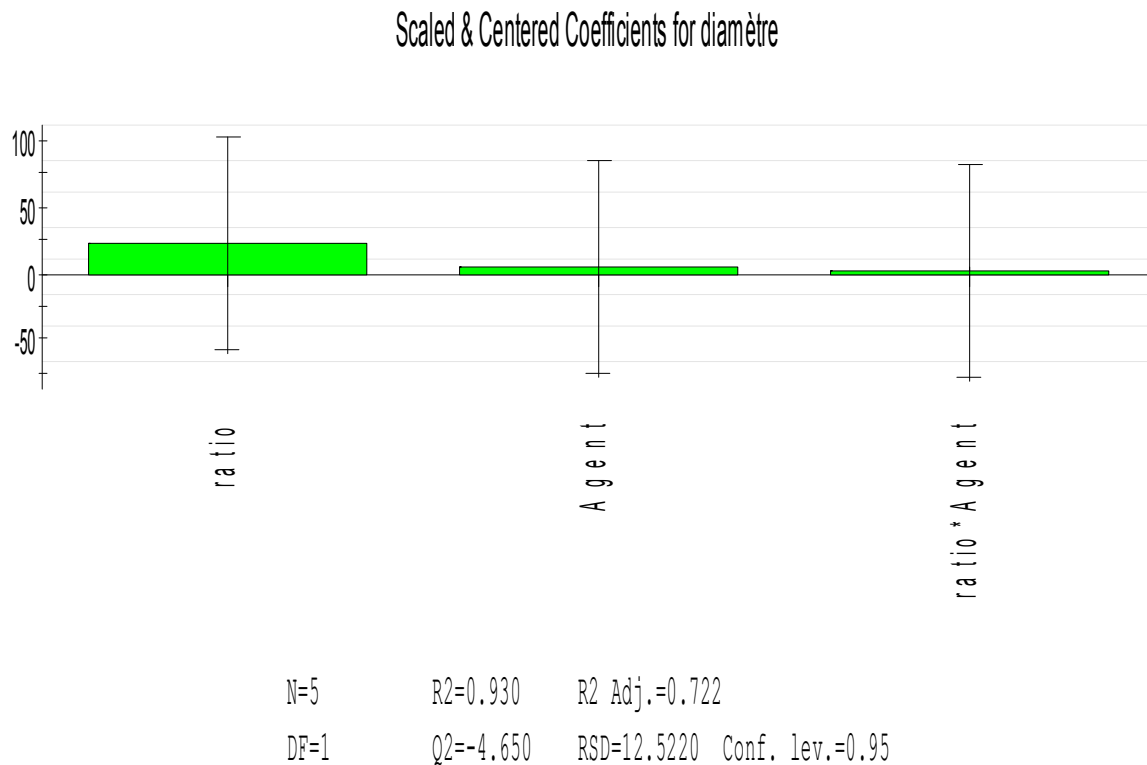
$$\text{Taux d'encapsulation} = 76.6 + 1.00001 * \text{ratio} + 3.5 * \text{A.R} + 14 * \text{ratio} * \text{A.R}$$



**Figure 30 :** Isoréponse représentant le taux d'encapsulation en fonction de la quantité de l'agent de durcissement et du ratio.

Plus le ratio est grand (la quantité du gélatine est plus importante que celle du glimépiride) et plus la quantité de l'agent de durcissement est grande, le taux d'encapsulation est plus important.

## 2.2. Effets des facteurs sur le diamètre des nanoparticules



**Figure 31** : Influence des coefficients des facteurs sur le diamètre

La figure 31 représente l'influence du ratio et de la quantité de l'agent de durcissement sur le diamètre. Nous observons une influence positive du ratio, de la quantité de l'agent de durcissement et de l'interaction.

L'explication est confirmée dans l'isoréponse du diamètre Figure 32.

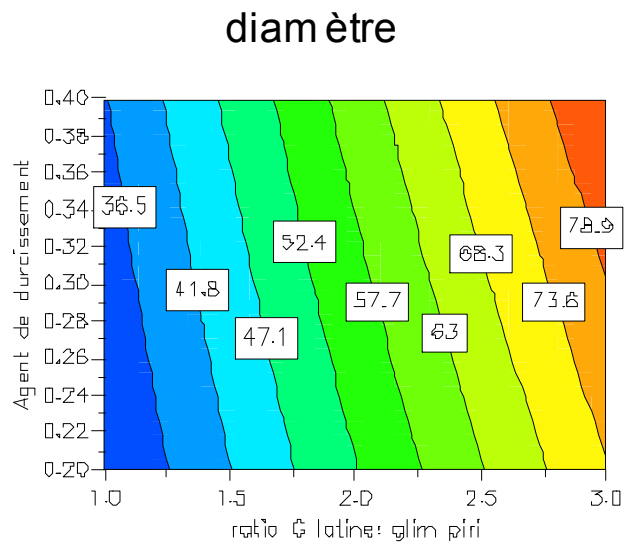
**Tableau 17 :** Les valeurs des différents coefficients du modèle

| diamètre    | Coeff. SC | Std. Err. | P         | Conf. int(±) |
|-------------|-----------|-----------|-----------|--------------|
| Constant    | 56.2      | 5.6       | 0.0632267 | 71.1548      |
| ratio       | 22.5      | 6.26099   | 0.172779  | 79.5534      |
| Agent       | 4.00001   | 6.26099   | 0.638071  | 79.5534      |
| ratio*Agent | 1.5       | 6.26099   | 0.850301  | 79.5535      |

|        |           |        |              |         |
|--------|-----------|--------|--------------|---------|
| N = 5  | Q2 =      | -4.650 | Cond. no. =  | 1.1180  |
| DF = 1 | R2 =      | 0.930  | Y-miss =     | 0       |
|        | R2 Adj. = | 0.722  | RSD =        | 12.5220 |
|        |           |        | Conf. lev. = | 0.95    |

❖ **Modèle mathématique :**

$$\text{Diamètre} = 56.2 + 22.5 * \text{ratio} + 4.00001 * \text{A.R} + 1.5 * \text{ratio} * \text{A.R}$$



**Figure 32 :** Isoréponse représentant le diamètre en fonction de la quantité de l’agent de durcissement et du ratio

Plus le ratio et la quantité de l’agent de durcissement sont grands, le diamètre est plus important.



2.3. Étude statistique du plan d'expériences

Après la réalisation d'un plan expérimental, il faut analyser les résultats obtenus, L'analyse des réponses a été faite en se basant en premier lieu sur le coefficient de corrélation  $R^2$  , il faut qu'il soit le plus élevé possible (supérieur à 0,5).

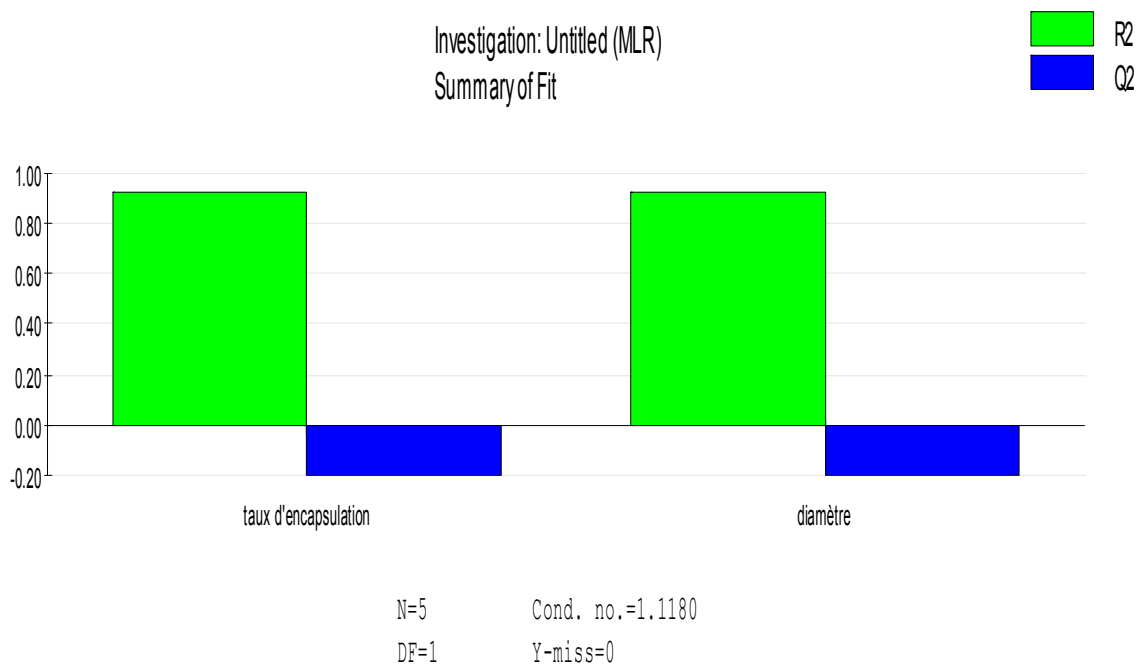


Figure 33 : Histogramme des coefficients de corrélation et la prédictibilité du modèle

Nous observons que les coefficients de corrélation, pour les deux réponses, sont proches de 1, les coefficients de prédiction restent assez faibles, des valeurs négatives. Nous pouvons déduire que le modèle obtenu a une bonne corrélation avec les résultats expérimentaux. Ceci dit, il est impossible de prédire des résultats en dehors de l'intervalle des facteurs imposés.

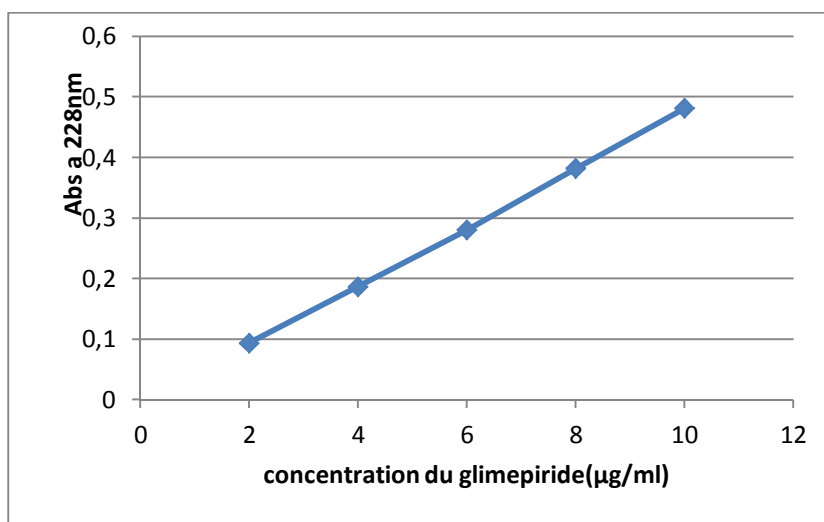
Conclusion

D'après les résultats on constate que l'essai optimum est l'essai 1 avec un taux d'encapsulation de 97,4%.

## 3. Courbe d'étalonnage du Glimépiride dans le tampon phosphate

**Tableau 18** : Données de la courbe d'étalonnage du GLIM dans le tampon phosphate

| N° solution | Concentration [GLIM] ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Absorbance à 228 nm |
|-------------|---|---------------------|
| 1           | 2   | 0.094302            |
| 2           | 4   | 0.186881            |
| 3           | 6   | 0.280840            |
| 4           | 8   | 0.382070            |
| 5           | 10  | 0.481560            |

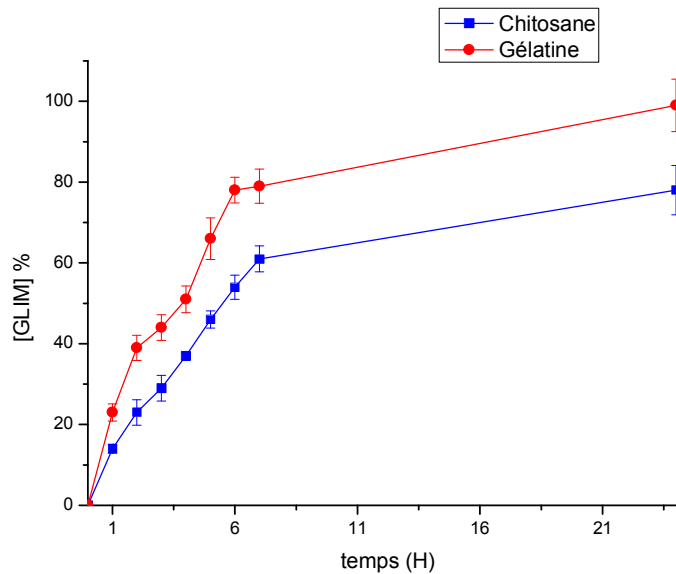


**Figure 34** : Courbe d'étalonnage du GLIM dans le tampon phosphate.

La linéarité de la courbe d'étalonnage est vérifiée (figure 34), c'est une droite qui passe par l'origine.

## 4. Etude *in vitro* de la cinétique de dissolution

Les résultats de la cinétique de dissolution sont illustrés dans la figure 35.



**Figure 35 :** Etude de la cinétique de dissolution in-vitro du Glimépiride à partir des nanoparticules.

La figure montre une très bonne dissolution à un pH acide (simulation de l'estomac) durant les deux premières heures, ensuite à pH 6.2 (simulation de l'intestin) la dissolution devient moins importante mais avec un rythme bien régulier, on remarque que le principe actif se diffuse plus efficacement à travers les nanoparticules de gélatine pour aboutir après 24h à un taux de 99,3 pour la gélatine et 76,2 pour le chitosane. Cette cinétique de dissolution est justifiée car la libération s'est faite à un pH voisin au pH isoélectrique de la protéine d'où l'obtention d'une perméabilité précoce des nanoparticules.

### 5. Évaluation de la bioadhésion *ex vivo*

La bioadhésion des nanoparticules déterminé par la méthode *ex vivo* a montré une bioadhésion de 94% pour le chitosane et de 86% pour la gélatine. Les résultats permettent de concrétiser l'intérêt de la libération prolongé et surtout de s'assurer que les nanoparticules ne seront pas évacués avant le passage des 24h après administration.

# **Conclusion**

## **générale**

## Conclusion générale

Ce travail a uniquement porté sur le développement du système particulière avec des propriétés requises, ayant pour but de contenir et de protéger le glimépiride afin de le libérer sur le bon site, ce qui améliore à la fois l'efficacité, la biodisponibilité et des économies sur les matières premières ; engendrant une meilleure prescription à de faible dose aux sujets. Les matières enrobantes, qui sont dans notre cas la gélatine et le chitosane, sont très abondantes dans la nature.

Afin de répondre à ces critères, 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. Dans cette ébauche, notre chitosane a été obtenu d'une extraction de chitine à partir des carapaces de crevettes fraîches, suivie par une déacétylation par la méthode chimique. Bien sûr, le chitosane est caractérisé avant son utilisation par : Analyse FTIR, Méthode Kjeldahl, Test de cendre ainsi que la granulométrie laser. Quant à la gélatine, on l'a utilisée comme matière prête, d'origine bovine (type B) avec un pH isoélectrique de 3 à 3,2.

Par deux matériaux et deux méthodes différentes, on est parvenu à encapsuler le glimépiride par gélification ionotropique du chitosane et dissolution en deux étapes de la gélatine, cela après une étude d'optimisation, en élaborant un plan factoriel à deux niveaux. Les résultats ont montré un meilleur taux d'encapsulation pour le chitosane soit 67,1% avec un diamètre de nanoparticules égal à 61nm, comparé à l'essai optimum obtenu avec la gélatine 97,4% avec une taille de nanoparticules à 87nm. On déduit que la gélatine est le matériau adéquat pour l'encapsulation du glimépiride avec un taux très élevé.

De plus, une étude *in vitro* a été réalisée afin de mettre en lumière la cinétique de dissolution du glimépiride à partir des nanoparticules. On remarque presque la même allure avec les deux matériaux mais avec une meilleure efficacité de diffusion du glimépiride avec la gélatine qui culmine après 24 heures à un taux de 99,3% tant dis qu'avec le chitosane pas plus de 76,2%, cela s'explique par le fait que la libération s'est produite à un pH proche au pH isoélectrique de la gélatine d'où une libération prématurée est prédite.

Une bonne cinétique de libération seule n'est pas suffisante pour dire que la gélatine est le matériau de choix pour l'encapsulation de notre principe actif. Des analyses de bioadhésion *ex vivo* ont montré une bonne adhésion au niveau de la muqueuse intestinale vis-

## Conclusion générale

à-vis du chitosane, soit 94% et que 84% pour la gélatine. Cela s'explique du fait que les nanoparticules à base de gélatine contiennent non seulement des charges positives en majorité et des charges négatives en minorité, distribuées de façon aléatoire le long des chaînes de la gélatine. Quant au chitosane, les nanoparticules sont cependant chargées positivement à la surface (polycation), ce qui leurs confèrent une meilleure adhérence avec l'épithélium intestinal, qui est chargé négativement.

D'après les analyses *in vitro* et *ex vivo*, on déduit que la gélatine, bien qu'elle encapsule bien et permet une meilleure diffusion du glimépiride, elle ne certifie pas un bon ciblage, pas aussi bien que le chitosane, malgré un faible taux d'encapsulation et une diffusion moins rapide néanmoins il adhère bien sur le bon site.

A la fin et pour répondre à notre problématique, une bonne efficacité peut être obtenue, une bonne biodisponibilité aussi, en employant le chitosane. D'autres études plus poussées sur l'optimisation du taux d'encapsulation afin de permettre une diffusion améliorée est à envisager à l'avenir.

**Références**

**bibliographiques**

## Références bibliographiques

- 1:** Mahadevan U., 2007. Gastrointestinal medications in pregnancy. *Best Pract. Res. Cl. Ga.*, vol. 21, 5, 849-877.
- 2:** Wehrlé P., 2007. *Pharmacie galénique : formulation et technologie pharmaceutique*. Paris : Maloine, 359 p.
- 3:** Pinto J.F., 2010. Site-specific drug delivery systems within the gastro-intestinal tract: From the mouth to the colon. *Int. J. Pharm.*, 395, 44-52.
- 4:** Morishita M., Goto T., Nakamura K., Lowman A.M., Takayama K., Peppas N.A., 2006. Novel oral insulin delivery systems based on complexation polymer hydrogels: Single and multiple administration studies in type 1 and 2 diabetic rats. *J. Contr. Rel.*, 110, 587-594.
- 5:** Lin Y.-H., Sonaje K., Lin K.M., Juang J.-H., Mi F.-L., Yang H.-W., Sung H.-W., 2008. Multi-ion-crosslinked nanoparticles with pH-responsive characteristics for oral delivery of protein drugs. *J. Contr. Rel.*, 132, 141-149.
- 6:** Makhlof A., Tozuka Y., Takeuchi H., 2009. pH-Sensitive nanospheres for colon-specific drug delivery in experimentally induced colitis rat model. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 72, 1-8.
- 7:** Shalaby W.S.W., Blevins W.E., Park K., 1992. Use of ultrasound imaging and fluoroscopic imaging to study gastric retention of enzyme-digestible hydrogels. *Biomaterials*, 13, 289-296.
- 8:** Dodou D., Breedveld P., Wieringa P.A., 2005. Mucoadhesives in the gastrointestinal tract: revisiting the literature for novel applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 60, 1-16.
- 9:** Clear N.J., Milton A., Humphrey M., Henry B.T., Wulff M., Nichols D.J., Anziano R.J., Wilding I., 2001. Evaluation of the Intelisite capsule to deliver theophylline and frusemide tablets to the small intestine and colon. *Eur. J Pharm. Sci.*, 13, 375-384.
- 10:** Andrews G.P., Laverty T.P., Jones D.S., 2009. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 71, 505-518.
- 11:** Grabovac V., Guggi D., Bernkop-Schnürch A., 2005. Comparison of the mucoadhesive properties of various polymers. *Adv. Drug Del. Rev.*, 57, 1713-1723.
- 12:** Ludwig A., 2005. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Adv. Drug Del. Rev.*, 57, 1595-1639.
- 13:** Tamburic S., Craig D.Q.M., 1997. A comparison of different in vitro methods for measuring mucoadhesive performance. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 44, 159-167.
- 14:** Ch'ng H.S., Park H., Kelly P., Robinson J.R., 1985. Bioadhesive polymers as platforms for oral controlled drug delivery: II. Synthesis and evaluation of some swelling, water-insoluble bioadhesive polymers. *J. Pharm. Sci.*, 74, 399-405.



## Références bibliographiques

- 15:** Llabot J.M., Manzo R.H., Allemandi D.A., 2004. Drug release from carbomer: Carbomer sodium salt matrices with potential use as mucoadhesive drug delivery system. *Int. J. Pharm.*, 276, 59-66.
- 16:** Wu, Z. M., Zhou, L., Guo, X. D., Jiang, W., Ling, L., Qian, Y., Luo, K. Q., Zhang, L. J., 2012. HP55-coated capsule containing PLGA/RS nanoparticles for oral delivery of insulin. *Int. J. Pharm.*, 425, 1-8.
- 17:** Shukla R.K., Tiwari A., 2012. Carbohydrate polymers: Applications and recent advances in delivering drugs to the colon. *Carbohydr. Polym.*, vol. 88, 2, 399-416.
- 18:** Wang L., Khor E., Lim L.-Y., 2001. Chitosan-Alginate-CaCl<sub>2</sub> System for Membrane Coat Application. *J. Pharm. Sci.*, vol. 90, 8, 1134-1142.
- 19:** Asane G.S., Rao Y.M., Bhatt J.H., Shaikh K.S., 2011. Optimization, Characterisation and Pharmacokinetic Studies of Mucoadhesive Oral Multiple Unit Systems of Ornidazole. *Sci. Pharm.*, 79, 181-196.
- 20:** Lehr C.-M., Bouwstra J.A., Boddé H.E., Juginger H.E., 1992. A surface energy analysis of mucoadhesion: contact angle measurements on polycarbophil and pig intestinal mucosa in physiologically relevant fluids. *Pharm. Res.*, 9, 70-75.
- 21:** Pillai C.K.S., Paul W., Sharma C.P., 2009. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Prog. Polym. Sci.*, 34, 641-678.
- 22:** Kockisch S., Rees G.D., Young S.A., Tsibouklis J., Smart J.D., 2003. Polymeric Microspheres for Drug Delivery to the Oral Cavity: An *In Vitro* Evaluation of Mucoadhesive Potential. *J. Pharm. Sci.*, vol. 92, 8, 1614-1623.
- 23:** Huang B.-B., Li G.-F., Luo J.-H., Duan L., Nobuaki K., Akira Y., 2008. Permeabilities of rebamipide *via* rat intestinal membranes and its colon specific delivery using chitosan capsule as a carrier. *World J. Gastroenterol.*, vol. 14, 31, 4928-4937.
- 24:** Charoenthai N., Kleinebudde P., Puttipipatkachorn S., 2007. Use of Chitosan-Alginate as Alternative Pelletization Aid to Microcrystalline Cellulose in Extrusion/Spheronization. *J. Pharm. Sci.*, vol. 96, 9, 2469-2484.
- 25:** Sashiwa H., Aiba S.-I., 2004. Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials. *Prog. Polym. Sci.*, 29, 887-908.

## Références bibliographiques

- 26:** Falson-Rieg F., Faivre V., Pirot F., 2004. Nouvelles formes médicamenteuses. Paris : Tec & Doc Cachan : Ed. Médicales internationales, 1-24.
- 27:** Ponchel G., Irache J.-M., 1998. Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract. *Adv. Drug Del. Rev.*, 34, 191-219.
- 28:** Woodley J.F., 2000. Lectins for gastrointestinal targeting – 15 years on. *J. Drug Target.* 7, 325-333.
- 29:** Lehr C.-M., 2000. Lectin-mediated drug delivery: The second generation of bioadhesives. *J. Contr. Rel.*, 65, 19-29.
- 30:** Wirth M., Gerhardt K., Wurm C., Gabor F., 2002. Lectin-mediated drug delivery: influence of mucin on cytoadhesion of plant lectins *in vitro*. *J. Contr. Rel.*, 79, 183-191.
- 31:** Glavas Dodov M., Calis S., crcarevska M.S., Geskovski N., Petrovska V., Goracinova K., 2009. Wheat germ agglutinin-conjugated chitosan-Ca-alginate microparticles for local colon delivery of 5-FU: Development and *in vitro* characterization. *Int. J. Pharm.*, 381, 166-175.
- 32:** Bernkop-Schnürch A., Gabor F., Szostak M.P., Lubitz W., 1995. An adhesive drug delivery system based on K99-fimbriae. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 3, 293-299.
- 33:** Bernkop-Schnürch A., 2005. Thiomers: a new generation of mucoadhesive polymers. *Adv. Drug Del. Rev.*, 57, 1569-1582.
- 34:** Pinto J.F., 2010. Site-specific drug delivery systems within the gastro-intestinal tract: From the mouth to the colon. *Int. J. Pharm.*, 395, 44-52.
- 35:** Carelli V., di Colo G., Nannipieri E., Poli B., Serafini M.F. 2002. Polyoxyethylenepoly(methacrylic acid-co-methyl methacrylate) compounds for site-specific peroral delivery. *Int. J. Pharm.*, 202, 103-112.
- 36:** Nguyen H.-N., Wey S.-P., Juang J.-H., Sonaje K., Ho Y.-C., Chuang E.-Y., Hsu C.-W., Yen T.-C., Lin K.-J., Sung H.-W., 2011. The glucose-lowering potential of exendin-4 orally delivered via a pH-sensitive nanoparticle vehicle and effects on subsequent insulin secretion *in vivo*. *Biomaterials*, 32, 2673-2682.
- 37:** Pithavala Y.K., Heizer W.D., Parr A.F., O'Connell-Semmes R.L., Brouwer K.L.R., 1998. Use of Intelisite® capsule to study ranitidine absorption from various sites within the human intestinal tract. *Pharm. Res.*, 15, 1869-1875.

## Références bibliographiques

- 38:** Lin W.-C., Yu D.-G., Yang M.-C., 2005. pH-Sensitive polyelectrolyte complex gel microspheres composed of chitosan/sodium tripolyphosphate/dextran sulfate: swelling kinetics and drug delivery properties. *Colloid Surface B*, 44, 143-151.
- 39 :** Vandamme T.F., Lenourry A., Charrueau C., Chaumeil J., 2002. The use of polysaccharides to target drugs to the colon. *Carbohydr. Pol.*, 48, 219-231.
- 40:** Mortazavi S.A., Smart J.D., 1993. An investigation into the role of water movement and mucus gel dehydration in mucoadhesion. *J. Contr. Rel.*, 25, 197-203.
- 41:** Bodmeier R., Paeratakul O., 1991. A novel multiple-unit sustained release indomethacin-hydroxypropyl methylcellulose delivery system prepared by ionotropic gelation of sodium alginate at elevated temperatures. *Carbohydr. Polym.*, 16, 399-408.
- 42:** Morishita M., Goto T., Nakamura K., Lowman A.M., Takayama K., Peppas N.A., 2006. Novel oral insulin delivery systems based on complexation polymer hydrogels: Single and multiple administration studies in type 1 and 2 diabetic rats. *J. Contr. Rel.*, 110, 587-594.
- 43:** Lai SK, Wang YY, Hanes J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery
- 44:** Lai SK, O'Hanlon DE, Harrold S, Man ST, Wang YY, Cone R, Hanes J. Rapid transport of large polymeric nanoparticles in fresh undiluted human mucus. *Proc Natl Acad Sci U S A*
- 45:** Yang M, Lai SK, Wang YY, Zhong W, Happe C, Zhang M, Fu J, Hanes J. Biodegradable nanoparticles composed entirely of safe materials that rapidly penetrate human mucus. *Angew Chem Int Ed Engl* 2011;50:2597–600.
- 46:** Sosnik A, das Neves J, Sarmiento B. Mucoadhesive polymers in the design of nano-drug delivery systems for administration by non-parenteral routes: A review. *Progress in Polymer Science* 39 (2014) 2030–2075
- 47:** Lai SK, Wang YY, Hanes J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery
- 48:** Lai SK, O'Hanlon DE, Harrold S, Man ST, Wang YY, Cone R, Hanes J. Rapid transport of large polymeric nanoparticles in fresh undiluted human mucus. *Proc Natl Acad Sci U S A*
- 49:** Yang M, Lai SK, Wang YY, Zhong W, Happe C, Zhang M, Fu J, Hanes J. Biodegradable nanoparticles composed entirely of safe materials that rapidly penetrate human mucus. *Angew Chem Int Ed Engl* 2011;50:2597–600.

## Références bibliographiques

- 50:** das Neves J, Bahia MF, Amiji MM, Sarmento B. Mucoadhesive nanomedicines: characterization and modulation of mucoadhesion at the nanoscale. *Expert Opin Drug Deliv* 2011;8:1085–104.
- 51:** Beaulieu C., 2007. Les effets multiples du chitosane. *Phytothérapie* Vol.5, (1), 38-45.
- 52:** Onar N. and Sariisik M., 2000. Using and properties biofibers based on chitin and chitosan on medical applications: [www.ft.vslib.cz/indoczech-conference/conference\\_proceedings/fulltext/turkey\\_05](http://www.ft.vslib.cz/indoczech-conference/conference_proceedings/fulltext/turkey_05).
- 53:** Shahidi F., Janak K. V. A. and Jeon Y-J., 1999. Food applications of chitin and chitosans. *Tends in Food Sci. and Techno.* Vol.10, (2), 37-51.
- 54:** Tolaimate A, Desbrieres J, Rhazi M, Alagui A, Vincendon M, Vottero P: On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin. *Polymer*, 2000, 41(7):2463-2469
- 55 :** Crini G, Badot PM, Guibal E: Chitine et Chitosane. Du polymère à l'application: Presses universitaires de Franche-Comté; 2009.
- 56:** Synowiecki J, Al-Khateeb NA: Production, Properties, and Some New Applications of Chitin and Its Derivatives. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2003, 43(2):145-171
- 57:** Rao MS, Nyein KA, Trung TS, Stevens WF: Optimum parameters for production of chitin and chitosan from squilla (*S. empusa*). *J Appl Polym Sci*, 2007, 103(6):3694-3700
- 58 :** Marquis-Duval F-O: Isolation et Valorisation des Constituants de la Carapace de Crevettes nordique. Québec: Université de Laval; 2008.
- 59:** Lavall RL, Assis OBG, Campana SP: beta-Chitin from the pens of *Loligo* sp.: Extraction and characterization. *Bioresour Technol*, 2007, 98(13):2465-2472.
- 60:** Percot A, Viton C, Domard A: Characterization of shrimp shell deproteinization. *Biomacromolecules*, 2003 (a), 4(5):1380-1385.
- 61 :** Kjartansson GT, Zivanovic S, Kristbergsson K, Weiss J: Sonication-Assisted Extraction of Chitin from North Atlantic Shrimps (*Pandalus borealis*). *J Agric Food Chem*, 2006(b), 54(16):5894-5902.
- 62:** Kurita K: Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans. *Mar Biotechnol*, 2006, 8(3):203-226.
- 63:** Flory PJ, Fox TG: Molecular configuration and thermodynamic parameters from intrinsic viscosities. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics*, 1996, 34(2):207-209.

## Références bibliographiques

- 64:** Sorlier P, Denuziere A, Viton C, Domard A: Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan. *Biomacromolecules*, 2001, 2(3):765-772.
- 65:** Einbu A, Varum KM: Depolymerization and de-N-acetylation of chitin oligomers in hydrochloric acid. *Biomacromolecules*, 2007, 8(1):309-314.
- 66:** Pawlak A, Mucha M: Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends. *Thermochimica Acta*, 2003, 396(1-2):153-166.
- 67 :** Baraba Scotti, Le collage à la gélatine : entre collage et tradition.41-42.
- 68 :** R. Coppenhiem, Pachitaxelloaded gelatin nanoparticles for intravesical bladder cancer therapy, *Int.J.harm.*8(1981)217.
- 69:** Food additives approved by the EU, European Food Information Council [PDF]
- 70:** Pouradier J. Structure of gelatin.*Chem Ind* 1995 ;74 :75-84.
- 71:** Djngny VB, Wang Z, Xu S. Glat: a valuable protein for food and pharmaceutical industries: review. *Grit Rev Food Sci Nutr* 2001; 42:481-92.
- 72:** MF Zanbaux et al. Preparation and characterization of protein C-loaded PLA nanoparticles, *J.Control, Release* 60(2-3)(1999)179-188.
- 73:** Idson B, Brawell E. Gelatin.*ADV Food Res* 1957 ;7 :235-338.
- 74:** Neuman RE. The amino acid composition of gelatins, collagens ans elastins from different sources.*Arch Biochem* 1957,24 :289-89.
- 75:** KS Soppimath et al. Biodegradable nanoparticles for drug delivery devices, *J.Control.Release* 60(2-3)(1999)179-188.
- 76:** Dang JM, Leong KW. Natural polymers for gene delivery and tissue engineering. *Adv drug deliv Rev* 2006; 58:487-99.
- 77 :** Ikada Y, Tabata Y. Protein release from gelatin matrices. *Adv drug deliv Rev* 1998; 31:287-301.
- 78 :** Wang J, Tabata Y, Morimoto K. Aminated gelatin microspheres asa nasal delivery system for peptide drugs: evaluation of in vitrorelease and in vivo insulin absorption in rats. *J Controlled Release* 2006; 113:31-7

## Références bibliographiques

- 79 :** Wang J, Tauchi Y, Deguchi Y, Morimoto K, Tabata Y, Ikada Y. Positively charged gelatin microspheres as gastric mucoadhesive drug delivery system for eradication of H.pylori. *Drug Deliv* 2000;7:237-43.
- 80 :** Valenta C. The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:1692-712.
- 81 :** Z. Lu et al. Paclitaxel-loaded gelatin nanoparticles for intravesical bladder cancer therapy. *Clin Cancer Res* 10(2004)76-77.
- 82 :** CC Jan Zillies. Evaluating gelatin nanoparticles as a carrier system for double stranded oligonucleotides. *J.Pharm.Pharmaceu.Sci.*74 (2004).
- 83 :** A Kaur, S Jain, AK Tiwary. Mannan-coated gelatin nanoparticles for sustained and targeted delivery of didanosine: in vitro and in vivo evaluation. *Acta Pharma*, 58(1)(2008) 61-74.
- 84 :** AK Bajpaj, J Choubey. Design of gelatin nanoparticles as swelling controlled delivery system for chloroquine phosphate. *J Mater Med* 17(4)(2006) 345-358.
- 85 :** Grobber AH, Steele PJ, Somerville RA, Taylor DM. Inactivation of the bovine spongiform encephalopathy (BSE) agent by the acid and alkali processes used in the manufacture of bone gelatin, biotechnology and applied biochemistry. 2004,39,329-338.
- 86 :** Dr Roland Heynke. Gelatin Production and prion theory, general information about gelatin and mad cow disease including references to various studies (2008) 17-18.
- 87 :** Salamat-Miller N, Chittchang M, Johnston TP. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:1666-91.
- 88 :** 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.
- 89 :** Yeo, Y., Baek, N., and Park, K., *Microencapsulation methods for delivery of protein drugs*. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2001. **6**(4): p. 213-230.
- 90 :** 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.

## Références bibliographiques

- 91 :** Yang, H., James, R., and Wright, J., *Calcium alginate*, in *Cell Encapsulation Technology and Therapeutics*, R.P.L. W. M. Kuhlreiber, and W. L. Chick, Editor. 1999, Birkhauser: Boston, USA. p. 79-89.
- 92:** 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.
- 93:** 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.
- 94:** 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.
- 95:** Giunchedi P., Conte U., *Spray-Drying as a Preparation Method of Microparticulate Drug-Delivery Systems - an Overview*. *Stp Pharma Sciences*, 1995. **5**(4): p. 276-290.
- 96:** Takenaka H., Kawashima Y., 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.
- 97:** Bodmeie, R., Chen H.G., *Preparation of Biodegradable Polylactide Microparticles using a Spray-Drying Technique*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1988. **40**(11): p. 754-757.
- 98:** 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.
- 99:** Mathiowitz E., Kreitz M.R., *Microencapsulation*, in *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*, E. Mathiowitz, Editor. 1999, Jone Wiley & Sons, Inc.: New York, USA. p. 493-546.
- 100:** 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.
- 101:** Watnasirichaikul S. *et al.*, *Preparation of Biodegradable Insulin Nanocapsules from Biocompatible Microemulsions*. *Pharmaceutical Research*, 2000. **17**(6): p. 684-689.
- 102 :** Ka, H.S., 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.
- 103:** 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.

## Références bibliographiques

- 104:** Andrianov A.K., Chen J.P., Payne L.G., *Preparation of hydrogel microspheres by coacervation of aqueous polyphosphazene solutions*. Biomaterials, 1998. **19**(1-3): 109-115.
- 105:** Thomasin C., Gander B., 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).
- 106:** 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.
- 107:** 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.
- 108:** 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.
- 109:** 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.
- 110 :** 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.
- 111 :** Oppenheim R.C., *Solid colloidal drug delivery systems: Nanoparticles*. International Journal of Pharmaceutics, 1981. **8**(3): p. 217-234.
- 112:** Alonso M.J., *Nanoparticulate drug carrier technology*, in *Microparticulate Systems For the Delivery of Proteins and Vaccines*, C.C.a.H. Bernstein, Editor. 1996, Marcel Dekker: New York. p. 203-242.
- 113:** Linnankoski J. *et al.*, *Paracellular porosity and pore size of the human intestinal epithelium in tissue and cell culture models*. Journ of Pharma Sci, 2010. **99**(4): p. 2166-2175.
- 114:** Eberhart MS, Ogden C, Engelgau M, Cadwell B, Hedley AA, Saydah SH. Prevalence of overweight and obesity among adults with with diagnosed diabetes. United states 1988-1994 and 1999-2002 (archives) Morbidity and mortality weekly report, vol.53, n°45, Novembre 2004, p1066-8.
- 115:** Whincup PH, Kaye SJ, Owen CG *et al.* Birth weight and risk of type 2 diabetes, a systemic review (archives) JAMA 2008 ;300 :2886-2897.
- 116:** Sleep duration as a risk factor for the development of type 2 diabetes or impaired glucose tolerance: analyses of the Quebec Family Study. Sleep Med, 28 Mars 2009.



## Références bibliographiques

- 117:** AFSSAPS-HAS. Traitement médicamenteux du diabète de type 2: Recommandations de bonne pratique. Novembre 2006.
- 118:** Boulé NG, Haddad E, Kenny GP et Als. Effects of exercise on glycemic control and body mass in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of controlled clinical trials, JAMA, 2007;286:1218-27
- 119:** Chiasson JL, Josse RG, Gomis R, Hanefeld M, Karasik A, Laakso M, *et al.* Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial. Lancet. 2002;359:2072-7
- 120:** Pr AMARYL® (glimépiride) Comprimés à 1 mg, à 2 mg et à 4 mg Norme du fabricant Hypoglycémiant oral (sulfonylurée) sanofi-aventis Canada Inc. Date de révision : 2150, boul. Saint-Elzéar Ouest 21 janvier 2013 Laval (Québec) H7L 4A8 No de contrôle de la préparation : 159440 Version s-a 3.0 datée du 21 janvier 2013
- 121:** Mukherjee, D. P. (2002). Method for producing chitin or chitosan. United State Patent, 6,310,188.
- 122:** No, H. K., & Meyers, S. P. (1995). Preparation and characterization of chitin and chitosan: a review. Journal of Aquatic Food Product Technology, 4, 27e52.
- 123:** M.S. Benhabiles, R. Salah, H. Lounici, N. Drouiche, M.F.A. Goosen, N. Mameri (2012). Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste Food Hydrocolloids 29 (2012) 48e56
- 124:** Kurita, K., Tomita, K., Tada, T., Ishii, S., Nishimura, S. I., & Shimoda, K. (2003). Squid chitin as a potential alternative chitin source: deacetylation behavior and characteristic. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 31, 485e491.
- 125:** A.O.A.C. (1990). In E. Horritz (Ed.), Official methods of analysis (15th ed.). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists, method#930.15 p69, method #942.05 p70, method #962.09 p80.
- 126:** Official methods of analysis 1995. Arlington, VA, USA: AOAC, Secs. 930.15e942.05.
- Pangestuti, R., & Kim, S. K. (2010). Neuroprotective properties of chitosan and its derivatives. Marine Drugs, 8, 2117e2128.
- 127:** Sabnis, S., & Block, L. H. (1997). Improved infrared spectroscopic method for the analysis of degree of N-acetylation of chitosan. Polymer Bulletin, 39, 67e71.
- 128:** Baxter, A., Dillon, M., Taylor, K. D. A., & Roberts, G. A. F. (1992). Improved method for IR determination of the degree of N-acetylation of chitosan. International Journal of Biological Macromolecules, 14, 166e169.
- 129:** Kabaoui. (2015) journal of the American chemical society JACS 11 (2015).

## Références bibliographiques

- 130:** Zhi-Qiang Zhang a, Cheol-Ho Pan b, Donghwa Chung a, Tannic acid cross-linked gelatin–gum arabic coacervate microspheres for sustained release of allyl isothiocyanate: Characterization and in vitro release study *Food Research International* 44 (2011) 1000–1007
- 131:** Inclusion complex using molecular mechanic calculations and <sup>1</sup>H-nuclear magnetic resonance *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41 (2006) 1428–1432
- 132:** NOBLE YOSHIDA A~D CURT THIES The Effect of Neutral Salts on Gelatin-Gum Arabic Complexes 1 *JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE* 24, 29-40 (1967)
- 133:** Dayton, Ohio 45409 The Reaction of Gelatin/Gum Arabic Coacervate Gels with Glutaraldehyde CURT THIES *Polymer Research Section, Materials Research, The National Cash Register Company.*
- 134:** Yi Lv, Xiaoming Zhang\*, Haiyang Zhang, Shabbar Abbas, Eric Karangwa The study of pH-dependent complexation between gelatin and gum arabic by morphology evolution and conformational transition *Food Hydrocolloids* 30 (2013) 323e332
- 135:** Uekama K. Recent aspects of pharmaceutical application of cyclodextrins. *J Incl Phenom Macro* 2002;44(1–4):3–7.
- 136:** K.Uekama, Pharmaceutical application of cyclodextrins as multifunctional drug carriers, *Yakugaku Zasshi* 2004;124:909–35.
- 137:** K.Uekama, Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation, *Chem Pharm Bull* 2004;52(8):900–15.
- 138:** D.Yong-Zhong, X.Jia-Guo, W. Ling, Y.Hong, H.Fu-Qiang, Preparation and characteristics of hydroxypropyl-b-cyclodextrin polymeric nanocapsules loading nimodipine, *Macromolecular Nanotechnology, Short communication, European Polymer Journal* 45 (2009) 1397–1402.
- 139:** Yadong Yang a, Mohammad Anvari a, Cheol-Ho Pan b, Donghwa Chung a, Characterisation of interactions between fish gelatin and gum Arabic in aqueous solutions *Food Chemistry* 135 (2012) 555–561
- 140:** Chih-Pong Changa, Ting-Kai Leung b, Shang-Ming Lin c, Che-Chang Hsud Release properties on gelatin-gum arabic microcapsules containing camphor oil with added polystyrene *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 50 (2006) 136–140
- 141:** T. Manoj Kumar, W. Paul, C.P. Sharma, M.A. Kuriachan, *Trends in Biomaterials& Artificial Organs* 18 (2) (2005) 198–202.
- 142:** K.V. Ranga Rao, P. Buri, *International Journal of Pharmaceutics* 52 (1989) 265.