

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

**UNIVERSITÉ BLIDA 1**  
**Faculté de Technologie**  
**Département de Génie des Procédés**



# Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de  
**MASTER EN GENIE DES PROCEDES**  
**Spécialité : Pharmacie Industrielle**

**Amélioration de la biodisponibilité de la  
*curcumine* par formulation de nanosuspensions :  
*Evaluation des activités biologiques et thérapeutiques***

Présenté par :

**Bouchehou Zahra**

**Mourachedi Youssaïra**

Dirigé par :

Pr. Amel HADJ-ZIANE

Année universitaire 2020/2021

## *Avant-propos*

*Au terme de ce modeste travail, nous remercions en premier lieu Allah de nous avoir donné la force et le courage de le mener à terme.*

*En second lieu nous tenons à exprimer notre gratitude et nos remerciements les plus sincères à nos Chers parents qui ont contribué par leurs aides, encouragements, conseils, disponibilité, patience et surtout leur confiance et sacrifices tout le long du chemin.*

*Nous tenons à exprimer nos vifs reconnaissances et remerciements à notre chère promotrice Pr A. HADJ ZIANE, Professeur à l'université de Blida 1, d'avoir accepté de nous encadrer dans notre projet de fin d'études ainsi que pour son soutien, ses encouragements et ses remarques pertinentes qui ont enrichi notre savoir.*

*A tous les membres de jury ; Pour l'honneur que vous nous faites de siéger dans notre jury,*

*A Madame D. BOUDJIT, la responsable des laboratoires de la faculté de Technologie pour son aide précieuse et sa collaboration permanente.*

*A Monsieur D. MOURACHEDI pour son aide précieuse.*

*A Monsieur N. ABDOUN cadre au niveau du groupe SAIDAL*

*On tient à remercier aussi tout le personnel du groupe CRD SAIDAL, GUE DE CONSTANTINE et spécifiquement ;*

*Mme S. OUAREK responsable du laboratoire microbiologie*

*Mme N. MEKKAOUI responsable du laboratoire analytique*

*Mme K. AZINE, responsable du laboratoire pharmacologie*

*Nous tenons à adresser nos reconnaissances également aux enseignants du département de génie des procédés et aux ingénieurs de laboratoire et travailleurs, ainsi qu'aux doctorantes du laboratoire de génie chimique*

*Nos vifs remerciements vont à tous ceux et celles qui ont participé et aidé de près ou de loin à la réalisation de ce travail, chacun par son nom.*

## *Dédicaces*

*Avec beaucoup de chaleur,  
Je dédie ce travail à l'âme de mon très cher père **Abdelaziz** qui a guidé mes premiers pas vers la science et le savoir et qui m'a inculqué le sens de la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie.  
Je t'aime papa , Allah yarhimek;*

*A la plus belle personne de ma vie, la lumière de mon chemin qui n'a jamais cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, et qui a toujours été présente à mes côtés pour me consoler quand il fallait.  
A toi maman je t'aime;*

*A mes trois chères au coeur,  
Mes sœurs Abir , Shahd et mon frères Ahmed Omar ;*

*A Youssaira mon binôme et ma chère amie, avec qui j'ai partagé ce travail et qui m'a soutenue et encouragée pendant tous les moments difficiles vécus ;*

*A toute ma grande famille, mes tantes , mes oncles, mes cousins et cousines  
Et en particulier mes chères tantes Hakima, Nadjiba et Madjda;  
Et mes adorables cousines Amina, Yassmine et Ahlem ;*

*A mes collègues de promotion ;*

*Tous ceux qui m'aiment et que j'aime trouveront l'expression de ma profonde gratitude ;*

*A vous tous merci.*

**ZAHRA**

## **Dédicace**

*Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à tout ceux qui me sont chers ;*

*A mes très chers parents ;*

*Ma maman **FAIZA** et mon père **DJAMEL***

*Qui n'ont jamais cessé de formuler des prières à mon égard, de me soutenir, et de m'encourager pour que je puisse atteindre mes objectifs*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et mes sincères remerciements*

*Que ce travail traduit ma gratitude, ma reconnaissance et mon affection*

*Je vous remercie d'avoir été toujours à mes côtés*

*Je vous aime très fort,*

*A mon grand frère **Abderrahmane** et sa fiancée, Et à Mon petit frère **Mohamed Chouaïb** ;*

*Vous comptez énormément pour moi, je vous aime mes frérots et je vous souhaite tout le succès et le bonheur du monde,*

*A **Zahra** mon binôme et mon amie pendant le cursus universitaire,*

*A toutes mes amies en particulier **Ihcène** et **Imène**,*

*A toute ma famille,*

*A l'âme de mes grands-parents et de mon oncle,*

*A mes collègues de la promotion pharmacie industrielle,*

*Merci à vous tous*

**YOUSRA**

**ملخص:** الهدف من هذا العمل هو المساهمة في تحسين التوافر الحيوي للكرمين؛ مادة فعالة تستخدم في المجال الصيدلاني لأنشطتها البيولوجية والعلاجية القوية. الاستراتيجية المعتمدة هي صياغة معلقات نانوية. تم تقليل متوسط حجم الكركمين من 53 ميكرومتر إلى 119.1 نانومتر بالاعتماد على تقنية (nanoedge) و باستخدام نسب محددة للصبغ العربي و ليسيثين الصويا كعوامل استقرار. تم تأكيد الحجم النانومتري بواسطة تقنيات (DRX,MEB,DLS). تم تقييم ثبات التعليق النانوي عن طريق قياس إمكانات زيتا لمدة 8 أيام. أظهر مسحوق النانو المجفف بالتجميد تحسناً في قابلية الذوبان والأنشطة البيولوجية مقارنة بحجمه الميكرومترى الأولي. أظهرت اختبارات الذوبان في المختبر تحسناً ملحوظاً في قابلية الذوبان وبالتالي التوافر الحيوي للكرمين الخام.

**الكلمات المفتاحية:** الكركمين، المعلق النانوي، الجسيمات النانوية، التوافر البيولوجي، الذوبانية، مضادات الأكسدة، مضادات للجراثيم، مضادات الالتهاب، اختبار الذوبان.

**Résumé :** L'objectif de ce travail est la contribution à l'amélioration de la biodisponibilité de la curcumine , un principe actif utilisé dans le domaine pharmaceutique pour ses fortes activités biologiques et thérapeutiques. La stratégie adoptée est la formulation de nanosuspensions. La curcumine de taille moyenne de l'ordre de 53  $\mu\text{m}$  ,a été réduite à 119.1 nm en utilisant le procédé Nano-edge avec des proportions optimales en gomme arabique, lécithine de soja et curcumine. Cette taille nanométrique a été confirmée par DRX, MEB et DLS. La stabilité de la nanosuspension a été évaluée par mesure du potentiel zêta pendant une durée de 8 jours. La poudre lyophilisée de taille nanométrique a montré une amélioration de la solubilité, des activités biologiques par rapport à sa taille micrométrique initiale. Les tests de dissolution in vitro ont prouvé une amélioration remarquable de la solubilité et donc de la biodisponibilité.

**Mots clés :** curcumine, nanosuspension, nanoparticule, biodisponibilité, solubilité, antioxydante, antibactérienne, anti-inflammatoire, test de dissolution in vitro.

**Abstract:** The objective of this work is to contribute to the improvement of the bioavailability of curcumin; an active principle used in the pharmaceutical field for its strong biological and therapeutic activities. The adopted strategy is the formulation of nanosuspensions. The average size curcumin in the order of 53  $\mu\text{m}$  was reduced to 119.1 nm using the Nano-edge process with optimal proportions of Arabic gum, soy lecithin and curcumin. This nanometric size has been confirmed by DRX, SEM and DLS. The stability of the nanosuspension was evaluated by measuring the zeta potential for a period of 8 days. The freeze-dried nanoscale powder showed an improvement in solubility, biological activities compared to its initial micrometer size. In vitro dissolution tests have shown a remarkable improvement in solubility and bioavailability.

**Key words:** curcumin, nanosuspension, nanoparticle, bioavailability, solubility, antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory, in vitro dissolution test.

# SOMMAIRE

<b>AVANT-PROPOS</b>	
<b>DEDICACES</b>	
<b>RESUME</b>	
<b>TABLE DES MATIERE</b>	
<b>LISTES DES FIGURES</b>	
<b>LISTES DES TABLEAUX</b>	
<b>LISTES DES ABREVIATIONS</b>	
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>01</b>
<b>Partie N°01 Recherche bibliographique</b>	
<b>CHAPITRE I La curcumine .....</b>	<b>03</b>
I.1 Présentation de la curcumine .....	03
I.2 Origine de la curcumine .....	03
I.3 Isolement et synthèse de la curcumine.....	07
I.4 Propriétés physico-chimiques de la curcumine.....	08
I.5 Les activités pharmacologiques de la curcumine.....	09
I.6. Propriétés pharmacocinétiques.....	10
I.7 Formulations améliorant la biodisponibilité de la curcumine.....	11
<b>CHAPITRE II La nanotechnologie.....</b>	<b>14</b>
II.1 Introduction .....	15
II.2 Définition des nanoparticules.....	15
II.3 Historique des nanoparticules .....	16
II.4 Utilisations des nanoparticules .....	17
II.5 Les nanoparticules en pharmacie.....	18
II.6 Intérêt des nanoparticules.....	18
II.7 Les types des nanoparticules .....	22
<b>CHAPITRE III Les nanosuspensions.....</b>	<b>24</b>
III.1 Introduction.....	24
III.2 Définition des nanosuspensions .....	24
III.3 Propriétés des nanosuspensions .....	24
III.4 Caractéristiques des nanosuspensions .....	27
III.5 Comparaison des nanosuspensions par rapport aux autres formulations destinées à améliorer la solubilité .....	27

III.6 Méthodes de fabrication des nanosuspensions.....	28
III.7 Modification des propriétés de surface.....	31
III.8 Influence de la taille nanométrique des particules.....	32
III.9 Phénomènes impliqués dans la croissance des particules dans les nanosuspensions .....	32
III.10 Stabilisants des nanosuspensions .....	34
III.11 Techniques d'analyse des nanosuspensions .....	36
III.12 Comportement in vitro & in vivo des nanosuspensions .....	37
III.13 Applications thérapeutiques et propriétés biologiques .....	38
<b>Partie N°02 Partie expérimentale</b>	
<b>CHAPITRE IV Matériels et méthodes .....</b>	<b>40</b>
IV.1 Introduction .....	40
IV.2 Matière première de la formulation .....	40
IV.3 Matière première de la caractérisation .....	43
IV.4 Matériel et équipement .....	47
IV.5 Caractérisation de la matière première ; la curcumine (PA) .....	48
IV.6 Micronisation de la curcumine .....	51
IV.7 Lyophilisation de la nanosuspension .....	53
IV.8 Caractérisation de la nanosuspension .....	53
IV.9 Activités biologiques .....	54
IV.10 Etude de dissolution in vitro.....	62
IV.11 Formulation galénique.....	62
<b>CHAPITRE V Résultats et discussions .....</b>	<b>65</b>
V.1 Introduction .....	65
V.2 Caractérisation de la curcumine.....	65
V.3 Micronisation de la curcumine.....	69
V.4 Lyophilisation de la nanosuspension.....	71
V.5 Caractérisation de la nanosuspension.....	71
V.6 Activités biologiques.....	79
V.7 Résultat de l'étude de dissolution in vitro.....	87
<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>92</b>
<b>ANNEXES</b>	
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	

## LISTES DES FIGURES

<b>Figure I.1:</b> Structure chimique de la curcumine .....	3
<b>Figure I.2 :</b> Photo de Plans de <i>Curcuma longa</i> .....	5
<b>Figure I.3:</b> Structures chimiques des principaux composés présents dans la poudre de <i>Curcuma longa</i> .....	6
<b>Figure I.4 :</b> Schéma général de la méthode Pabon .....	7
<b>Figure I.5 :</b> Schéma de synthèse de curcumine selon Pavolini .....	8
<b>Figure I.6 :</b> structure chimique de la pipérine et de la curcumine.....	11
<b>Figure I.7 :</b> Pourcentage de curcumine excrétée dans les selles.....	14
<b>Figure I.8 :</b> Solubilité de la nanocurcumine (a) et de la curcumine (b) dans l'eau.....	14
<b>Figure III.1 :</b> Effet de la taille des particules sur la surface de contact .....	25
<b>Figure III.2 :</b> pression de dissolution selon la forme et le diamètre des particules .....	26
<b>Figure III.3 :</b> Différents types d'impact mécanique mis en jeu pendant le broyage .....	29
<b>Figure III.4:</b> Schéma d'un homogénéisateur à haute pression .....	29
<b>Figure III.5 :</b> Principe de fabrication d'une nanosuspension par la technique Bottom up .....	30
<b>Figure III.6 :</b> schéma du procédé « Nanoedge » .....	31
<b>Figure III.7 :</b> Effets des forces de Van Der Waals sur les nanoparticules avec transformation en agglomérats irréversibles .....	33
<b>Figure III.8 :</b> Phénomène de mûrissement d'Ostwald .....	34
<b>Figure III.9:</b> Polymères attachés à la surface des particules colloïdales pour former des couches répulsives .....	35
<b>Figure IV.1 :</b> Structure chimique de la curcumine .....	40



<b>Figure IV.2 :</b> la curcumine utilisée .....	41
<b>Figures IV.3 :</b> schéma représentant les étapes de la formulation de la nanosuspension ...	52
<b>Figure IV.4:</b> Réaction de réduction du radical libre DPPH•.....	55
<b>Figure IV.5 :</b> Aspect microscopique de la souche <i>Escherichia coli</i> .....	58
<b>Figure IV.6 :</b> Aspect microscopique de la souche <i>Bacillus subtilis</i> .....	59
<b>Figure IV.7 :</b> Dilution de la Cur brute et la poudre lyophilisée de la NS de Cur dans le DMSO.....	60
<b>Figure IV.8 :</b> Disques imprégné et déposé sur le milieu de culture.....	61
<b>Figure IV.9 :</b> échantillons prêt pour incubation.....	61
<b>Figure V.1 :</b> Spectre IR de la curcumine.....	66
<b>Figure V.2 :</b> Spectre UV de la curcumine.....	66
<b>Figure V.3 :</b> Diffractogramme de la Cur brute.....	67
<b>Figures V.4 :</b> MEB de la curcumine brute à différentes prises.....	68
<b>Figure V.5 :</b> Particules de la curcumine retenue au tamis.....	69
<b>Figure V.6 :</b> La solubilité de la curcumine dans les différents solvants.....	70
<b>Figure V.7 :</b> Nanosuspension de curcumine avec lécithine de soja et gomme arabique commestabilisants.....	70
<b>Figure V.8 :</b> Poudre de la NS de curcumine lyophilisée et broyée.....	71
<b>Figure V.9 :</b> Courbe de la distribution de taille de la nanosuspension.....	72
<b>Figures V.10 :</b> Suivie de la stabilité de la nanosuspension pendant 14 jours.....	73
<b>Figure V.11 :</b> superposition des diffractogramme de la Cur brute et de la NS de Cur lyophilisé.....	75
<b>Figures V.12 :</b> MEB de la poudre lyophilisé de la NS de Cur.....	76

<b>Figure V.13 :</b> superposition des spectres FTIR de la curcumine native et la NS de curcumine.....	77
<b>Figure V.14 :</b> Solubilité de la poudre lyophilisée de la NS de Cur (a) et la poudre de Cur native (b) dans l'eau.....	79
<b>Figures V.15 :</b> échantillons avant incubation et après incubation.....	80
<b>Figure V.16 :</b> Pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations de la Cur brute.....	81
<b>Figure V.17 :</b> Pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations de la NS de Cur.....	81
<b>Figure V.18 :</b> Histogramme des valeurs des concentrations inhibitrices IC <sub>50</sub> de la Cur brute et de la NS de Cur.....	82
<b>Figure V.19 :</b> Histogramme présentant les pourcentages d'inhibition de la Cur brute, la NS de Cur et le Diclofenac.....	84
<b>Figures V.20 :</b> Zone d'inhibition de la Cur brute contre <i>Escherchia coli</i> et <i>Bacillus suptilis</i> respectivement.....	86
<b>Figures V.21 :</b> Zone d'inhibition de la NS de Cur contre <i>Escherchia coli</i> et <i>Bacillus subtilis</i> respectivement.....	86
<b>Figure V.22 :</b> Zoom sur la zone d'inhibition de NS de Cur contre <i>Bacillus subtilis</i> .....	86
<b>Figures V.23 :</b> Résultats de dissolution de la Cur native et de la poudre lyophiliser de la NS respectivement.....	88
<b>Figure V.24 :</b> Courbe d'étalonnage de la Cur dans le tampon phosphate pH7.....	88
<b>Figure V.25 :</b> Courbe d'étalonnage de la NS de Cur dans le tampon phosphate pH7.....	89
<b>Figure V.26 :</b> Profils de dissolution de la Cur et de la Ns de Cur brute.....	91

## LISTES DES TABLEAUX

<b>Tableau II.1:</b> Les problèmes avec les principes actifs "libres" et leurs implications.....	19
<b>Tableau III.1:</b> Comparaison des différentes formulations potentielles pour les principes actifs peu hydrosolubles.....	28
<b>Tableau III.2 :</b> Résumé des différentes techniques de « Bottom Up ».....	30
<b>Tableau III.3 :</b> Revue des systèmes de stabilisants des nanosuspensions cités dans la littérature.....	36
<b>Tableau IV.1 :</b> les propriétés physico-chimiques de la curcumine.....	41
<b>Tableau IV.2 :</b> les propriétés physico-chimiques des excipients.....	42
<b>Tableau IV.3. :</b> propriétés physico-chimiques de l'acétate d'éthyle.....	43
<b>Tableau IV.4:</b> propriétés physico-chimiques du tween 80.....	44
<b>Tableau IV.5 :</b> propriétés physico-chimique du DPPH.....	45
<b>Tableau IV.6:</b> propriétés physico-chimiques du tampon phosphate pH 7.....	45
<b>Tableau IV.7:</b> Propriétés physico-chimiques de la BSA.....	46
<b>Tableau IV.8:</b> Description des différents équipements de la fabrication.....	47
<b>Tableau IV.9:</b> Description des différents équipements de la caractérisation .....	48
<b>Tableau V.1 :</b> la solubilité de la curcumine dans les différents solvants.....	65
<b>Tableau V.2 :</b> Suivi de la stabilité des différentes NS en fonction du temps.....	69
<b>Tableau V.3 :</b> Taille des particules de la NS de Cur avec le temps.....	71
<b>Tableau V.4 :</b> Potentiel zêta de la NS de curcumine .....	72
<b>Tableau V.5 :</b> Taille, indice de polydispersité et potentiel zêta de la poudre de la NS lyophilisé.....	74

<b>Tableau V.6 :</b> Effet inhibiteur de la dénaturation de BSA par la Cur, la NS de Cur et le Diclofenac.....	83
<b>Tableau V.7 :</b> Résultat de l'activité antibactérienne de la Cur brute et la Ns de Cur.....	85
<b>Tableau V.8 :</b> valeurs des concentrations de la Cur et de la Ns de Cur brute.....	90
<b>Tableau V.9 :</b> Les pourcentages de dissolution de la Cur et de la Ns de Cur brute.....	90

## LISTES DES ABREVIATIONS

**PA** : principe actif

**NS** : nanosuspension

**Cur** : curcumine

**DLS** : diffusion dynamique de la lumière

**UV-Vis** : La spectroscopie Ultraviolet-Visible.

**FTIR** : La Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier.

**MEB** : Microscopie électronique à balayage

**DRX** : diffraction aux rayons X

**BB** : Broyage à boulet

**HHP** : homogénéisation à haute pression

**NP** : nanopréciptitation

**PBS** : tampon phosphate salin

**BSA** : Albumine de sérum bovin

**DMSO** : diméthylsulfoxyde

**DMC**: dichlorométhane

**RPM**: Rounds per minute

**PDI** : indice de polydispersité

**DPPH** : 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl

**IC<sub>50</sub>** : concentration d'inhibition à 50%

**Abs** : absorbances

**CRD** : centre de recherche et de développement

**I%** : pourcentage d'inhibition

# *Introduction générale*

## INTRODUCTION GENERALE

Depuis l'antiquité, les plantes furent utilisées pour leurs vertus thérapeutiques multiples aussi bien dans la médecine orientale qu'occidentale. Néanmoins, ces dernières décennies, on assiste à un regain d'intérêt des consommateurs pour les produits naturels et de nombreux industriels mettent en avant les effets de principes actifs issus de matières premières végétales, En effet, de très nombreux exemples de principes actifs phytochimiques ont été mis en évidence tel que la curcumine, une phytomolécule prometteuse dans le domaine pharmaceutique pour son profil d'innocuité supérieure et son coût accessible à toutes les tranches de la population .[1, 2]

La Curcumine [1,7-bis(4-hydroxy-3-méthoxyphényl) -1,6-heptadiène-3,5-dione], un composé polyphénolique hydrophobe dérivé du rhizome de l'herbe *Curcuma longa* (Famille : *Zingiberaceae*), reconnue pour son activité antiinflammatoire pour soulager et contrôler localement l'inflammation dans les articulations et autres pathologies [3] ; en plus de cette activité, la curcumine est réputée pour présenter un large spectre d'activités biologiques et pharmacologiques, antioxydantes, antimicrobiennes et antitumorales.[4-7]

Malheureusement, son utilisation comme médicament est entravée par une solubilité aqueuse extrêmement faible (11 ng/mL au pH physiologique) [8], et une biodisponibilité et absorption limitées par le tractus gastro-intestinal. Les doses orales n'entraînent que des traces apparaissant dans le sang, la majeure partie de la dose étant excrétée dans les selles (élimination in vivo rapide). [9]

Diverses approches ont été avancées pour améliorer la solubilité, le faible niveau plasmatique et tissulaire, le métabolisme et la dégradation de la curcumine [10]. Parmi ces approches les nanotechnologies ont émergé pour s'attaquer à ces problèmes, en raison des avantages prometteuses importantes.[11]

C'est dans ce contexte précis que s'inscrit notre problématique qui consiste en la formulation de nanosuspensions ,afin d'améliorer la solubilité de la curcumine et donc de sa disponibilité. Les nanosuspensions représentent le meilleur système d'administration de médicaments nanoparticulaires. C'est une des approches qui permettent l'administration

orale de curcumine dans un milieu en phase aqueuse et qui exploitent de manière significative le potentiel de cette molécule prometteuse [12]. Elles peuvent être préparées par deux méthodes à savoir, « technologie ascendante » et « technologie descendante », et stabilisés par des composés appropriés.[8]

L'amélioration de la solubilité est assurée par l'augmentation de la surface après réduction de la taille des particules, l'augmentation de la solubilité à saturation, et l'augmentation du temps disponible pour la dissolution en raison des caractéristiques d'adhérence inhérentes des nanoparticules à la paroi gastro-intestinale [13]. Le recours à des excipients naturels tels que la gomme arabique et la lécithine de soja en combinaison constitue l'originalité de notre présent travail.

Afin d'organiser notre mémoire, nous l'avons structuré en deux parties ; une partie bibliographique constitué de 3 chapitres comportant des notions théoriques : le premier donne une description de la curcumine, le deuxième des généralités sur la nanotechnologie et son importance dans le domaine pharmaceutique et le troisième sur les nanosuspensions. La partie expérimentale est répartie en deux chapitres , décrivant le matériel et les méthodes ainsi que les résultats et leur discussions.

Enfin, ce manuscrit s'achève par une conclusion générale dans laquelle sont résumés les résultats clés, auxquelles cette étude a pu aboutir

A la fin, des perspectives et recommandations ont été proposées pour trouver la forme galénique adéquate pour l'administration de la curcumine pour le traitement des maladies articulaires, telles que l'arthrose. Ceci constitue un axe de recherche très motivant et une innovation dans le domaine pharmaceutique.



*Partie N°01*

---

*Recherche bibliographique*

# *CHAPITRE I*

---

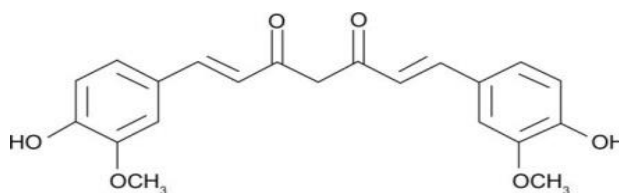
*La curcumine*

## CHAPITRE I. La curcumine

### I.1. Présentation de la curcumine

La curcumine est au centre des études scientifiques, car elle a été identifiée comme la principale responsable des propriétés bienfaitrices de *Curcuma Longa*. Cette molécule fait partie d'un groupe moléculaire contenu dans le curcuma, appelé « curcuminoïdes ». [14]

Sa structure chimique a été identifiée en 1910 par Lampe et Milobedzka.[15]



**Figure I.1:** Structure chimique de la curcumine

Son nom chimique est (1E, 6E)-1,7-bis(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)-1,6-heptadiène-3,5-dione. C'est à partir des années 70 que la curcumine anime la curiosité de la communauté scientifique et industrielle. Une multitude de recherches et de publications au 21<sup>ème</sup> siècle ont démontré les effets thérapeutiques de cette molécule.[16]

### I.2. Origine de la curcumine

#### I.2.1. Etymologie

Le terme « *Curcuma* » est d'origine Irano-Indienne. Il dérive du sanscrit *kartouma* qui a donné *kurkum* en persan ancien, *kourkoum* en arabe, *curcuma* en latin et "*turmeric*" en anglais. C'est d'ailleurs la langue anglaise qui a conservé l'origine de son appellation en latin médiéval, *tera merita* (terre mérite) qui désignait la racine. [17]

#### I.2.2. Historique

Le Curcuma, encore appelé "Safran des Indes", est une plante vivace médicinale inscrite aux Pharmacopées française et européenne[18] qui a fait l'objet d'échanges commerciaux depuis bien longtemps qu'on ne peut déterminer avec certitude son origine. On pense cependant qu'il vient du Sud ou du Sud-Est de l'Asie, peut-être plus

spécifiquement de l'Inde, d'où il se serait répandu et utilisé dans toute l'Asie, de même qu'au Proche et au Moyen-Orient et en Afrique, il y a des milliers d'années. [19]

Cette plante est décrite et utilisée depuis au moins 4000 ans dans la médecine traditionnelle Indienne où elle se nommait Haridra ou Haldi en ancien Sanskrit. Elle était, et est toujours, une des pièces centrales de la médecine Ayurvédique, considérée comme symbole de prospérité et de bonne santé. [18]

Elle a aussi une longue tradition dans la médecine Chinoise [18] puisque le plus vieux traités de cette dernière, le PEN-TSAO de Sheng Nung écrit vers 2600 av J.-C., le mentionnait dans le traitement des douleurs rhumatoïdes. [19]

Le rhizome, séché puis réduit en poudre était utilisé pour le traitement des voies respiratoires (asthme, allergie, hyperactivité bronchique, problèmes pulmonaires), pour des troubles hépatiques et de vésicule biliaire (jaunisse), pour ses propriétés carminatives, les douleurs abdominales, l'anorexie, les infections et les rhumatismes.

Il était absorbé par voie orale ou posé en cataplasmes pour soulager la douleur des entorses, l'œdème de plaies récentes ou de piqûres d'insectes, et pour traiter les problèmes de la peau.[20]

Nicolas Lémery, médecin et chimiste Français, estime cette *terra merita* « apéritive, détersive, pour exciter l'urine, pour la jaunisse, pour la néphrétique » dans le dictionnaire ou traité universel des drogues simples de 1716. [17]

Outre ses propriétés médicinales, on l'utilisait (et on l'utilise toujours) à la fois pour son odeur, sa couleur jaune-orangée comme colorant alimentaire et textile, et sa flaveur en tant qu'épice alimentaire au goût légèrement âpre et amer, poivré et aromatique.Des propriétés de conservation des aliments lui ont été également attribuées.[21]

### I.2.3.Classification systématique

Le genre *Curcuma*, selon la classification APG III (*Angiosperms Phylogeny Group*) appartient à :

- La classe des monocotylédones
- L'ordre des scitaminales ou zingibérales
- La famille des *Zingiberaceae*.

On dénombre près de 80 espèces dans ce genre [22]. Parmi, *Curcuma longa* Linné est de loin le plus utilisé et par conséquent le plus étudié.[17]

#### I.2.4. Le *Curcuma longa* L

Le *Curcuma longa* est une plante herbacée rhizomateuse, vivace et stérile et qui se dissémine par division de son rhizome[23]. Il a acquis une importance particulière pour l'Homme lorsqu'on a découvert que le rhizome réduit en poudre permettait de conserver la fraîcheur, la sapidité et la valeur nutritive des aliments auxquels il était ajouté, ceci bien avant l'époque des conservateurs synthétiques. Malgré son utilisation ancestrale en Inde et en Chine, on ne s'est intéressé aux effets thérapeutiques du curcuma que depuis quelques décennies, avec la vogue des aliments aux propriétés hypocholestérolémiantes et antioxydantes. [24, 25]

La plante de *curcuma longa* L atteignant un mètre, pérenne par son rhizome est constitué :

- Du rhizome : elle possède de nombreux rhizomes dont un principal mesurant environ 5 cm x 2,5 cm, de couleur gris-jaune à l'extérieur et orange sombre à l'intérieur.
- Des feuilles : sont larges (7 à 25 cm), naissent à partir du rhizome et sont uniformément vertes.
- De fleurs : se regroupant en inflorescences coniques sous forme d'épis et sont protégées par de grandes bractées. Elles sont verdâtres ou blanches avec un sommet rose et longues de 6 cm environ.



**Figure I.2** : Photo de Plans de *Curcuma longa*

### I.2.4.1. Composition chimique

La poudre de curcuma issue du rhizome séché est constituée chimiquement de plusieurs fractions ; un volatile et une autre non volatile.

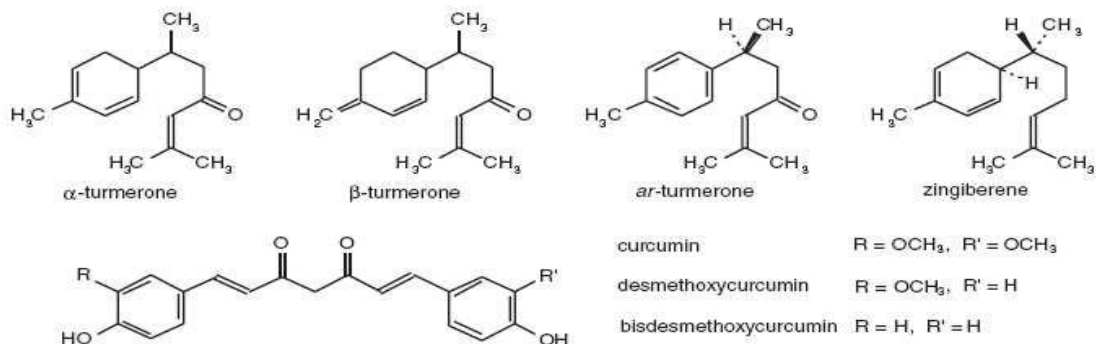
#### a. Les huiles essentielles volatiles

La fraction volatile représente environ 6 à 7% de l'ensemble. Elle est obtenue par distillation. De couleur jaune, elle est composée d'huiles essentielles volatiles, dont les principaux composés chimiques sont essentiellement des monoterpènes et des sesquiterpènes.[26]

#### b. La fraction non volatile

##### 1. Les curcuminoïdes

La fraction non volatile est constituée de principes pigmentaires, les curcuminoïdes (environ 5 à 8%) sont riches en molécules phénoliques dont 50 à 60% sont représentés par le mélange de curcumine (diféruoylméthane) à hauteur de 70-76%, de monodéméthoxycurcumine (16%) et de bisdéméthoxycurcumine (8%) (**figure I.3**). [27] [28]



**Figure I.3:** Structures chimiques des principaux composés présents dans la poudre de *Curcuma longa* [29]

Les curcuminoïdes constituent la fraction active de l'extrait de curcuma. Ils sont insolubles dans l'eau et doivent être extraits à l'aide de solvants.[30]

## 2. Les autres composants

Le rhizome de curcuma est riche en amidon (45 à 55%) et autres glucides (presque 70% en tout). Il contient aussi des protéines, 6.3% dont la turmerine, peptides hydrosolubles [26], des lipides à hauteur de 5% environ et 3.5% de minéraux.[27]

### **I.3. Extraction et synthèse de la curcumine**

#### I.3.1. Isolement de la curcumine

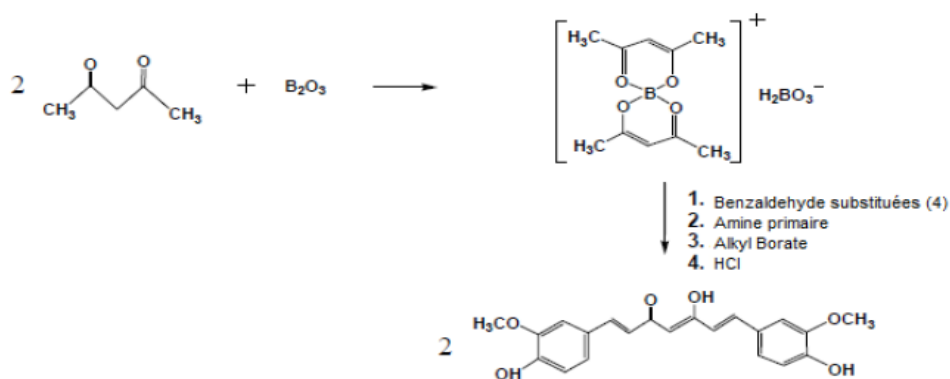
Il existe différentes manières d'isoler la curcumine du curcuma. Les curcuminoïdes ne sont pas solubles dans l'eau donc l'extraction doit être faite à l'aide d'autres solvants. Le meilleur rendement d'extraction a été obtenu avec l'acétone.[31]

Quelle que soit la technique employée, la seule manière d'obtenir une curcumine pure est de l'isoler à l'aide d'une méthode chromatographique préparatoire par colonne chromatographique sur gel de silice.[32]

#### I.3.2. Synthèse de la curcumine

##### a. Méthode de Pabon (1964) :

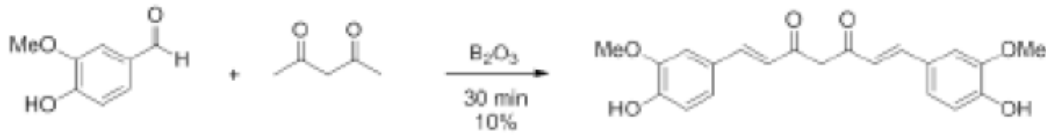
Pabon a synthétisé de la curcumine en utilisant de l'acétylacétone et des aldéhydes aromatiques substitués en présence de trioxyde de bore ( $B_2O_3$ ).[33, 34]



**Figure I.4 :** Schéma général de la méthode Pabon

b. Méthode de Pavolini (1950) :

Pavolini a utilisé un équivalent d'acétylacétone avec deux équivalents de vanilline, le tout en présence du trioxyde de bore (B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>).[33, 34]



**Figure I.5 :** Schéma de synthèse de curcumine selon Pavolini

#### **I.4. Propriétés physico-chimiques de la curcumine**

##### I.4.1. Solubilité et coefficient de partage

La curcumine est un composé d'apparence hydrophile par la nature des substituants polaires sur les noyaux aromatiques mais en dépit de ceux-ci, elle n'est pas soluble dans les solutions aqueuses et est au contraire facilement soluble dans les solvants organiques.[35]

Un solvant très utilisé pour les évaluations biologiques de la curcumine est le diméthylsulfoxyde ou DMSO. Le DMSO n'est pas utilisé pur, mais en faible concentration en mélange avec l'eau (1% maximum).[36]

##### I.4.2. Stabilité

La curcumine est un composé particulièrement sensible, Il existe deux grands types de dégradations *in vitro* de la curcumine qui compliquent son usage dans l'industrie pharmaceutique. Celles provoquées par son oxydation et les modifications structurales en découlant qui sont catégorisées en processus photochimiques et chimiques.

La curcumine est stable à pH acide (estomac), mais pas à pH neutre ou alcalin. Dans des conditions physiologiques *in vitro* (tampon phosphate 0,1 M ; pH 7,2), elle est dégradée à plus de 90 % en 30 minutes en féruloylméthane, en acide férulique et en vanilline par des mécanismes qui ont été étudiés par Arrieta *et al.*[37] Tonnesen *et al.*[38] et Balasu-bramanian[39]



La curcumine est également photosensible et les produits de dégradation (vanilline ,acide ferulique) se décolorent lors d'une exposition à la lumière naturelle [40]. Toutefois, cette dégradation est considérablement limitée lorsque la curcumine est en présence de lipides, de liposomes, d'albumines, de cyclodextrine, de tensioactifs et de nombreux autres systèmes macromoléculaires.[41]

### **I.5. Les activités pharmacologiques de la curcumine**

La curcumine possède de nombreuses fonctions chimiques accompagnées d'une structure la rendant particulièrement adaptable à plusieurs cibles moléculaires.

Ceci lui procure une importance dans le domaine de la santé car elle présente une large gamme d'activités pharmacologiques y compris des activités anti-inflammatoires, anticancéreuses, antioxydantes, cicatrisantes, antimicrobiennes, antiparasitaires, anti-pyrétique, analgésique[42], anti-virales [27] , anti-venin.[19], action Inhibitrice de l'agrégation plaquettaire [28], des effets Sur la glycémie [43], sur le métabolisme lipidique, sur la fertilité et sur le système cardiovasculaire [27].

Le mécanisme d'action est complexe et probablement multifactoriel. [44]

#### **I.5.1 Activité anti-inflammatoire**

La curcumine jouit d'une riche histoire en tant qu'anti-inflammatoire en médecine traditionnelle. Elle peut supprimer l'inflammation aiguë et chronique en abaissant les niveaux d'histamine et éventuellement en augmentant la production de la cortisone naturelle par les glandes surrénales.

Du point de vue clinique, la curcumine a montré ses effets anti inflammatoires chez l'Homme par voie orale (doses de 375 à 1 200 mg/jour) en situation post opératoire, dans la prise en charge de la polyarthrite rhumatoïde ou d'affection ophtalmologiques [45].

#### **I.5.2 Activité antioxydante**

Les propriétés anti-oxydantes et anti-radicalaires de la curcumine proviennent de leur capacité à intervenir dans le mécanisme d'oxydo-réduction, lors des échanges d'électrons.

Aussi, la curcumine agit comme un piègeur de radicaux libres. Elle protège l'hémoglobine de l'oxydation in vitro. La curcumine peut inhiber significativement la génération des espèces réactives de l'oxygène (ERO), comme les anions superoxydes, le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La curcumine peut aussi diminuer la production d'ERO in vivo.[46]

### I.5.3 Activité Anti bactérienne

Chattopadhyay rapporte que la fraction huileuse de *Curcuma longa* et la curcumine suppriment la croissance de plusieurs bactéries comme *Streptococcus*, *Staphilococcus*, *Lactobacillus*...etc. L'extrait aqueux aurait des effets antibactériens, et la curcumine pourrait prévenir la croissance d'*Helicobacter pylori*, in vitro. [27]

Wessler a conclu un très fort pouvoir antibactérien de la curcumine face aux germes gram négatif *Neisseria gognorrhoeae*. [47]

Une modeste activité a été mesurée pour *S. aureus* et *E. feacalis*. Et quelques signes positifs face à des mycobactéries non tuberculeuses, telles que *M. smegmatis*, *M. terrae*, *M. simiae*, *M. kansasii*, *M. szulgai*. [48]

## **I.6. Propriétés pharmacocinétiques**

Des essais cliniques de phase I ont montré que la biodisponibilité de la curcumine est mauvaise. Même à des fortes doses (12 g/jour). La concentration plasmatique n'est que limitée chez les patients. Les principales raisons qui contribuent à la faible concentration plasmatique et au bas niveau de curcumine dans les tissus après administration par voie orale semblent être une mauvaise absorption, une métabolisation rapide, et une élimination rapide.[23]

Les paragraphes suivants résument les quatre processus pharmacocinétiques pour la voie d'administration orale.

### I.6.1. Absorption

En effet, la biodisponibilité de la curcumine par voie orale est faible : elle est peu absorbée par le tractus digestif et une grande partie de la dose administrée (environ 40 à 75

%) est excrétée dans les excréments, 35 % environ sous forme inchangée, 65 % sous forme de métabolites, majoritairement inactifs.[49]

### I.6.2. Distribution

Les doses orales de curcumine requises pour obtenir des concentrations suffisantes à l'activité pharmacologique en dehors du tractus gastro-intestinal ne semblent pas atteignables chez l'Homme avec l'administration de gélules de poudre.[50]

### I.6.3. Elimination

De par sa faible absorption, la curcumine administrée par voie orale chez l'animal ou l'Homme est majoritairement excrétée dans les excréments sous forme inchangée. L'excrétion urinaire a lieu sous forme de glucurono- et sulfo-conjugés.[51]

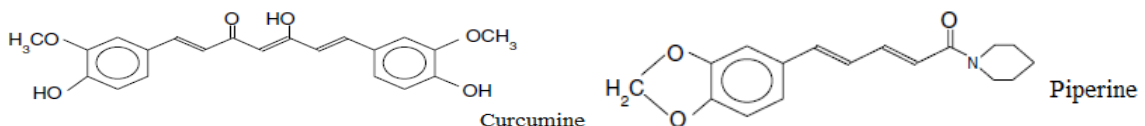
## **I.7. Formulations améliorant la biodisponibilité de la curcumine**

La curcumine administrée sans aucune modification ou couplage se voit très vite dégradée. En effet, lorsqu'elle est absorbée seule par voie orale, on la retrouve à près de 75% dans les selles. Par contre, la sécrétion urinaire reste très faible (moins de 0.1% de la dose).

C'est donc en co-administration avec d'autres principes actifs ou en usant de stratégies de vectorisation galéniques qu'elle est le plus souvent testée.

### a. Curcuma-pipérine

La pipérine est extraite de la plante *Piper nigrum* L. ou poivre noir.



**Figure I.6 :** structure chimique de la pipérine et de la curcumine

De par sa forte ressemblance structurale, la pipérine possède des propriétés communes avec la curcumine : Activité antioxydante, activité antitumorale, activité antipyrétique

L'administration concomitante de pipérine et curcumine augmente la biodisponibilité de cette dernière de 20 fois.

Par ailleurs, la pipérine augmente la perméabilité intestinale de par son activité pro-inflammatoire sur la muqueuse intestinale, cela permet une meilleure absorption de la curcumine.

En co-administrant la pipérine et la curcumine à des volontaires sains, en 1998, Shoba *et al.* ont évalué les paramètres pharmacocinétiques de la curcumine. [49]

Il ressort qu'à la dose de 2 g de curcumine administrée par voie orale avec 20 mg de pipérine, la biodisponibilité de la curcumine fut augmentée de 2000 % au regard de la même dose de curcumine administrée seule. [52]

#### b. Curcumine-huile essentielle

La lipophilie de l'huile essentielle de curcumine augmente sa biodisponibilité de 7 fois. Il faut néanmoins des dosages élevés en curcumine (au moins 300mg) pour avoir une efficacité. [53]

#### c. Curcumine-phospholipides

Vu que la curcumine est liposoluble, son association avec des phospholipides améliore son absorption par l'organisme. Sa biodisponibilité est multipliée par 19. Ces phospholipides sont généralement des lécithines de soja ou de colza potentiellement allergisantes.

#### d. Curcumine-cyclodextrine

La cyclodextrine est un agent hydrophile qui encapsule la curcumine et agit comme une coque de protection, lui conférant une bonne compatibilité dans les milieux aqueux. Elle est obtenue à partir de l'amidon de pomme de terre ou de maïs.

e. Curcumine-fibre végétale

Les fibres de fenugrec, solubles dans l'eau, contrebalancent le penchant hydrophobique de la curcumine. [54]

f. Curcumine-Quercétine

La quercétine est un composé antioxydant puissant.<sup>3</sup> Cruz-Correa et al. ont co-administré la curcumine (480 mg) et la quercétine (20 mg) par voie orale trois fois par jour pendant 6 mois à 5 patients atteints de polypose adénopathique familiale. La taille des polypes des 5 patients a été diminuée de 50,9 % et leur nombre de 60 %. [52]

g. Curcumine-Epigallocatechine-3-gallate (EGCG)

La curcumine fait l'objet d'une étude en co-administration avec l'épigallocatechine-3-gallate (EGCG) en 2013. Ce composé naturel est extrait du thé vert. Cette association a conduit à réduire significativement la prolifération *in vitro* de cellules de leiomyosarcome utérin par un rétablissement des voies apoptotiques.[55]

h. Les nano curcumines

Les systèmes de délivrance à partir de nanoparticules conviennent particulièrement aux agents hydrophobes tels que la curcumine.

La synthèse, la caractérisation physicochimique d'un polymère d'une taille inférieure à 100 nm, baptisé "nanocurcumine", ont été décrites par Bisht *et al.*, 2007. La nanocurcumine devient complètement soluble dans l'eau.[23]

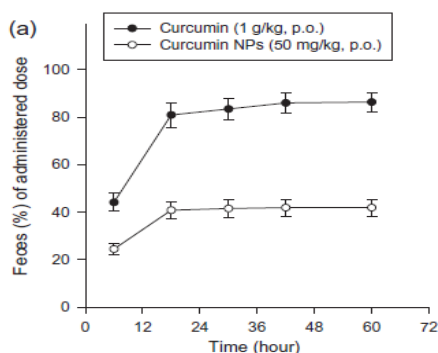
Anand *et al.*, ont préparé la curcumine en nanoparticules biodégradables à base de poly(lactide-coglycolide) stabilisées par du PEG-5000. Cette formulation permet *in vitro* une meilleure capture cellulaire, induit une plus forte apoptose chez les cellules tumorales testées.

Ces résultats suggèrent que la curcumine nanoparticulaire pourrait être un meilleur agent antitumoral, anti-invasif et anti-angiogénique que la curcumine.[56]

L'étude faite par Yin-Meng Tsai et ses collaborateurs a optimisé la nano-formulation de la curcumine avec de l'acide polylactique-co-glycolique (PLGA) pour prolonger son temps de rétention dans l'organisme et améliorer sa biodisponibilité.

Ces nanoparticules sont très fragiles et se conservent à 4°C pour garder leurs propriétés. Chez le rat, après absorption orale de curcumine simple et de NPCs, on a observé une augmentation significative de la concentration sanguine en curcumine. Le calcul de la biodisponibilité est de 0.21% pour la curcumine normale et de 4.71% pour la nano formulation soit 22 fois supérieur.

La curcumine sous forme de nanoparticules est moins excrétée dans les selles que la curcumine en poudre (**figure I.7**).



**Figure I.7** : Pourcentage de curcumine excrétée dans les selles[57]

De cette étude, on peut en déduire que l'absorption de la curcumine est plus importante sous forme de nanoparticules.[57]

Récemment, des nanoparticules de la curcumine ont été préparées par formulation en milieu liquide, sans ajouter de tensio-actif, par dispersion libre dans l'eau avec un co-solvant, puis évaporation. Des nanoparticules de curcumine se forment, avec une distribution granulométrique étroite de l'ordre de 2 à 40 nm. (**Figure I.8**). Les activités antibactériennes et antifongiques de cette nano-curcumine ont été évaluées *in vitro* montrant une amélioration par rapport la curcumine.



**Figure I.8 :** Solubilité de la curcumine (a) et de la nanocurcumine (b) dans l'eau.[58]

Les résultats ont démontré aussi que la solubilité dans l'eau et l'activité antimicrobienne de la curcumine sont nettement améliorées par la réduction de la taille des nanoparticules.[58]

# *CHAPITRE II*

---

*La nanotechnologie*



## **Chapitre II. La nanotechnologie**

### **II.1. Introduction :**

Les nanotechnologies vont influencer énormément nos vies dans les années qui suivent. Le transfert des matières dans les nanodimensions modifie leurs propriétés physiques, ce qui est utilisé dans l'industrie pharmaceutique pour développer de nouvelles formulations innovatrices pour les médicaments peu solubles – les nanoparticules. Les premiers exemples pour ce type de formes pharmaceutiques sont déjà sur le marché.

Depuis ces 10 dernières années, le nombre de principes actifs peu solubles augmente de plus en plus. D'après certaines études, environ 40% des médicaments en cours de développement ont des problèmes de solubilité. De plus, les nouvelles méthodes de haut « screening » amènent à la découverte d'encore plus de nouvelles molécules à faible hydrosolubilité. Par conséquent, une mauvaise solubilité dans l'eau signifie une mauvaise biodisponibilité.

### **II.2. Définition des nanoparticules**

La nanotechnologie est la science qui étudie les matériaux à l'échelle du nanomètre, et c'est aussi l'étude de la manipulation de la matière à l'échelle atomique et moléculaire.

Une nanoparticule est le composant le plus fondamental dans la fabrication d'une nanostructure. Elle est beaucoup plus petite que les objets de la vie quotidienne qui suivent les lois du mouvement de Newton, mais plus grande qu'un atome ou une simple molécule qui sont gouvernés par les lois de la mécanique quantique. [59]

En général, la taille d'une nanoparticule est comprise entre 1 et 100nm. Néanmoins, la définition et l'étude d'une nanoparticule dépendent beaucoup de son application spécifique.

Par la suite, nous allons considérer en tant que nanoparticule toute particule de taille comprise entre 1 et 100nm (dans les 3 dimensions), dont des phénomènes uniques lui permettent de nouvelles applications.[60]

### **II.3. Historique des nanoparticules :**

A partir des années 60, les progrès théoriques et expérimentaux dans les domaines de la physique, la chimie, et les biosciences, ont permis le développement des nanotechnologies [2]. Plus précisément, les nanoparticules à usage pharmaceutique sont en fait issues des recherches effectuées dans le domaine des médicaments à libération contrôlée.

Un des pionniers de la nanotechnologie était le Professeur Peter Paul Speiser, de l'Institut Fédéral de Technologie à Zurich. A la fin des années 60, son équipe était responsable du développement des premières nanoparticules pharmaceutiques, à utiliser dans les vaccins et pour la vectorisation du médicament permettaient d'obtenir une réponse plus forte au vaccin, donc une meilleure immunisation.

Dans les années 1977 et 1978, Richard Oppenheim et Jennifer Marty ont développé des nanoparticules à base d'albumine et gélatine en appliquant la méthode de coacervation.

En 1979, les premières nanoparticules biodégradables étaient fabriquées par Patrick Couvreur, un chercheur de Bruxelles.

Dans cette même période, aux Etats-Unis, des chercheurs de la John Hopkins University travaillaient sur un autre type de nanoparticules et ont obtenus des particules de taille entre 300 et 1000nm.

Le début des années 80 est marqué par des recherches sur l'effet du polymère utilisé sur la nanoparticule obtenue. Ce type de nanoparticules fût synthétisé pour la première fois en 1981 par Robert Gurny aux Etats-Unis.

C'est au début des années 80 que la communauté scientifique a montré les grands avantages de l'utilisation des nanoparticules dans les médicaments anti-cancéreux. Dans beaucoup d'études, une meilleure efficacité, ainsi qu'une toxicité diminuée étaient observées.

Plus tard, leurs bénéfices étaient aussi prouvés dans l'amélioration de la biodisponibilité des anti-infectieux et des médicaments de thérapie génique.

Dans les années 90, des chercheurs en Russie ont prouvé que des nanoparticules polymériques, contenant différents principes actifs et enrobées en polysorbate 80 (Tween®

80) pouvaient traverser la barrière hémato-encéphalique – ceci est un développement important dans le traitement de tumeurs cérébrales.

Les premiers médicaments issus des nanotechnologies apparaissent sur le marché dans les années 2000. Le premier produit commercialisé était l'Abraxane™ en 2005. [61]

Aujourd'hui, il y a plus de 60 médicaments actuellement sur le marché, et des centaines qui sont dans les dernières étapes de développement (études cliniques).

#### **II.4. Utilisations des nanoparticules :**

Lorsque l'on pense aux nanoparticules et leurs applications potentielles, on tend à imaginer des technologies très sophistiquées. Or, même si cela peut paraître surprenant pour certains, la majorité des utilisations actuelles des nanoparticules n'a rien de particulièrement « spectaculaire ». Un bon exemple est le noir de carbone ; il s'agit d'une poudre amorphe, constituée de nanoparticules de taille entre 20 et 50 nm.

Les produits alimentaires représentent, aussi, une source d'application des nanoparticules. Des nanoparticules en silicone amorphes (connues sous le code E551) sont utilisées en tant qu'agents antiagglomérants pour les poudres et épaississants dans les pâtes.

Une autre application majeure des nanoparticules est le domaine des cosmétiques, plus particulièrement, les produits solaires. Ces produits contiennent des nanoparticules d'oxyde de zinc et de dioxyde de titane, parce qu'ils ne sont pas colorés, et reflètent/diffractent la lumière UV plus efficacement que les particules de plus grande taille, améliorant ainsi la protection de la peau aux rayons UV. La petite taille de particules permet d'obtenir un produit transparent, d'où l'intérêt porté par les consommateurs.

Les aimants liquides, aussi appelés ferroliquides qui sont des suspensions ultrastables constituées de petites nanoparticules magnétiques dans un liquide sont un autre exemple de nanoparticules.

Celles-ci ne sont que quelques-unes des applications actuelles des nanoparticules dans le monde.

## **II.5. Les nanoparticules en pharmacie**

Une étude réalisée en 2012 sur l'état mondial des produits pharmaceutiques issus des nanotechnologies a identifié 67 nanodispositifs et 33 nanopharmaceutiques actuellement sur le marché. Au total, 25 dispositifs et 122 médicaments en cours de développement faisaient l'objet de 789 études cliniques. [62]

## **II.6. Intérêts des nanoparticules**

De nombreuses propriétés pharmacologiques et pharmacocinétiques des principes actifs dits « libres » peuvent être améliorées en modifiant la forme galénique du médicament. Les nanoparticules ont la capacité, en fonction de leur design, de changer la pharmacocinétique du médicament (que cela soit l'administration, la distribution, la métabolisation ou l'élimination dans l'organisme), améliorer sa solubilité ou fonctionner en tant que réservoirs de principe actif (dans le cas des formes à libération prolongée). [63]

Le tableau **II.1** résume les problèmes pouvant être rencontrés avec un principe actif « libre » et l'amélioration possible apportée par une forme nanoparticulaire.

**Tableau II.1:** Les problèmes avec les principes actifs "libres" et leurs implications

<b>Problème</b>	<b>Implication</b>	<b>Effet de la nanoparticule</b>
<b>Mauvaise solubilité</b>	Risque de précipitation du principe actif	Une nanocapsule, nanoparticule micellaire ou liposomale peut offrir des milieux hydrophiles et hydrophobes, ce qui augmenterait la solubilité du principe actif
<b>Destruction des tissus et organes sains</b>	L'extravasation des médicaments cytotoxiques peut endommager les tissus sains et résulter en leur nécrose	Libération régulée par la nanoparticule, ce qui réduit ou élimine son extravasation dans les tissus sains
<b>Dégradation rapide in-vivo</b>	La molécule de principe actif est modifiée ou dégradée dans l'organisme : perte de l'activité pharmacologique	La nanoparticule protège le PA de la métabolisation. Des doses plus faibles du PA doivent être administrées
<b>Clairance trop élevée</b>	Le principe actif est éliminé trop rapidement par le foie ou les reins, nécessitant des administrations fréquentes ou des doses élevées	La mise en forme nanoparticulaire modifie la pharmacocinétique, ce qui peut ralentir la clairance
<b>Mauvaise biodistribution</b>	Les médicaments à distribution large peuvent agir au niveau des organes sains, limitant ainsi la dose du médicament pouvant être administrée	La forme nanoparticulaire permet de réduire le volume de distribution et diminue les effets indésirables dans les tissus non ciblés
<b>Peu de sélectivité pour les tissus ciblés</b>	La distribution du médicament dans les tissus normaux peut donner des effets indésirables, résultant en une restriction de la quantité de médicament pouvant être administrée. Des concentrations faibles du PA dans les tissus ciblés peuvent donner un effet thérapeutique suboptimal	Les nanoparticules peuvent permettre la vectorisation, ou ciblage, du médicament dans les tissus malades. De plus, des ligands peuvent être rajoutés sur leur surface pour augmenter encore plus leur spécificité

### II.6.1. Augmentation de la solubilité

Plus de 40% des molécules identifiées par des programmes de « screening » combiné aujourd'hui ont une mauvaise solubilité dans l'eau. La mise en forme galénique est difficile à réaliser en utilisant les méthodes conventionnelles, et la formulation est associée à de nombreux problèmes de performance, tels que :

- Mauvaise biodisponibilité ;
- Difficultés de commercialiser la molécule, même si elle remplit les critères de sécurité et efficacité, car la mise en forme pharmaceutique n'est pas réalisable ;
- Variations de la biodisponibilité en fonction de la prise alimentaire (avant/après repas) ;
- Pas de proportionnalité dose/effet ;
- Dosage suboptimal ;
- Utilisation d'excipients « forts », tels que grandes quantités de co-solvants ;
- Précipitation incontrôlable ;
- Non compliance de la part du patient (car le schéma thérapeutique est inadapté)

Mettre ces molécules hydrophobes sous forme de nanoparticules permet d'obtenir des nanodispersions aqueuses stables ayant une durée de vie acceptable. Ces dispersions peuvent ensuite être traitées et utilisées pour fabriquer des formes médicamenteuses solides.

L'avantage des nanoparticules est que, plus leur taille est petite, plus la surface de contact augmente. L'augmentation de la surface de contact, et par conséquent l'augmentation des interactions de surface, augmente la vitesse de dissolution. Néanmoins, il faut penser à utiliser des stabilisants, ou tensioactifs, pour réguler la tension de surface des nanoparticules et éviter leur agrégation en particules de plus grande taille.

L'activité pharmacologique d'une substance est dépendante de sa capacité à se dissoudre et interagir avec sa cible biologique. La mauvaise biodisponibilité des principes actifs hydrophobes qui n'est pas liée à une mauvaise perméabilité membranaire peut être attribuée à la cinétique de dissolution de la molécule.

L'augmentation de la surface des particules va avoir un effet important sur la biodisponibilité orale de la molécule. Une bonne dissolution maximise la quantité de principe actif libre d'être absorbée. [64]

#### II.6.2. Diminution de la toxicité par extravasation

Un problème rencontré souvent avec les médicaments cytotoxiques est une extravasation non voulue du principe actif dans les tissus sous-cutanés à l'endroit d'administration lors de l'injection.

Lorsque le principe actif est porté par une nanoparticule, sa libération est régulée par la particule. Ceci peut significativement réduire ou complètement éliminer l'extravasation accidentelle, puisque les nanoparticules ne peuvent pas traverser.

#### II.6.3. Protection de la dégradation

Un autre problème potentiel peut être la métabolisation du principe actif libre dans l'organisme. Soit par addition ou suppression des groupements fonctionnels, soit par dégradation complète, la molécule peut perdre la majorité, voire toutes ses propriétés pharmacologiques. A cause de cette dégradation, il est souvent nécessaire d'administrer des doses assez élevées du médicament pour obtenir l'effet thérapeutique souhaité.

Le rôle de la nanoparticule dans ces cas est de protéger le principe actif des attaques enzymatiques, chimiques ou immunitaires. Ceci permet de diminuer le dosage du médicament, car il n'y a plus besoin de compenser la partie du médicament qui serait métabolisée.

#### II.6.4. Réduction de l'élimination

L'élimination trop rapide du principe actif de l'organisme peut présenter un obstacle majeur dans le développement d'un médicament. Une clairance rénale élevée va nécessiter une augmentation de la dose ou du nombre de prises journalières.

Comme dans le cas des principes actifs facilement métabolisés, la nanoparticule peut encapsuler le principe actif, ce qui va ralentir son élimination.[65]

### II.6.5. Vectorisation du médicament

Idéalement, pour qu'un médicament soit efficace, il doit, dans un premier temps, pouvoir pénétrer les barrières physiologiques et atteindre le tissu ou organe malade dans la même quantité administrée au départ et sans perdre son activité pharmacologique. Ensuite, une fois que la cible est atteinte, le médicament doit agir uniquement au niveau des cellules malades, sans avoir un effet sur les cellules saines. Ce principe est connu sous le nom de vectorisation, ou ciblage, du médicament.

Dans le cas de nanoparticules, pour qu'elles puissent effectivement transporter le principe actif jusqu'au tissu ciblé, elles doivent pouvoir rester dans la circulation pendant longtemps sans être éliminées. En général, les nanoparticules « standard » (dont la surface n'a pas été modifiée) sont captées par le système réticuloendothélial (le foie et la rate) en fonction de leur taille et surface.

- La taille : Elle doit être suffisamment grande pour éviter leur extravasation dans les capillaires sanguins, mais aussi suffisamment petite pour éviter la capture par les macrophages du système réticuloendothélial.
- La surface : Elle doit idéalement être hydrophile, pour éviter la capture par les macrophages. Ceci peut être réalisé en enrobant la nanoparticule par un polymère hydrophile par exemple comme le PEG. [63]

### II.7. Les types des nanoparticules

Le succès de ces dernières années et le potentiel des nanoparticules en ont fait un véritable centre d'intérêt pour les chercheurs académiques et industriels. Les nombreuses découvertes récentes ont conduit au développement de systèmes nanoparticulaires plus complexes. En plus des liposomes et des conjugaisons polymériques, les formes les plus investiguées sont les nanoparticules polymériques, les micelles, les nanocapsules, les dendrimères, les nanoparticules virales, les nanoparticules à base d'albumine, à base de polysaccharides, les nanoparticules métalliques les nanotubes en carbone et les « quantum dots ». Ces nanoparticules ont montré un potentiel thérapeutique dans pratiquement tous les domaines de la médecine, comme l'oncologie, la cardiologie,



l'immunologie, la neurologie, l'ophtalmologie, la pneumologie, l'orthopédie et l'odontologie.

#### II.7.1. Les nanocristaux

Les nanocristaux constituent un groupe de nanopharmaceutiques assez unique, vu qu'ils sont composés de 100% de la substance active. Ce sont des nanoparticules à caractère cristallin. Il n'y a pas de matrice, comme dans le cas des nanoparticules polymériques. La dispersion des nanocristaux dans un liquide permet d'obtenir des nanosuspensions, une forme qui est très utilisée pour augmenter la solubilité de certaines molécules insolubles dans l'eau. En général, les particules dispersées doivent être stabilisées, en utilisant des surfactants ou des stabilisants polymériques. [66]

#### II.7.2. Autres types

- ✓ Les liposomes en tant que nanopharmaceutiques [60]
- ✓ Nanoformulations à base de lipides (non - liposomales) [60]
- ✓ Protéines et polypeptides PEGyles [60]
- ✓ Nanoformulations à base de polymères [60]
- ✓ Conjugaisons nanopharmaceutiques protéine – médicament [60]
- ✓ Nanoformulations à base de surfactants [60]
- ✓ Virosomes [60]
- ✓ Les micelles [60]
- ✓ Les dendrimères [67]
- ✓ Les nanoparticules à base d'albumine, de polysaccharides [68]
- ✓ Les nanoparticules métalliques [69]
- ✓ Les nanotubes en carbone [70]
- ✓ Les « quantum dots » [71]

# *CHAPITRE III*

---

*Les nanosuspensions*

## Chapitre III. Les nanosuspensions

### III.1. Introduction :

La solubilité aqueuse d'un principe actif est un facteur essentiel à l'efficacité d'un médicament, quel que soit sa voie d'administration. C'est aussi un défi pour l'industrie pharmaceutique, car presque la moitié (>40%) des principes actifs sont faiblement solubles en milieu aqueux.[72]

La réduction de la taille des particules d'un principe actif permet d'augmenter sa surface de contact et par conséquent sa vitesse de dissolution [73]. Les nanosuspensions constituent une solution idéale pour la formulation des principes actifs faiblement solubles. Elles permettent d'obtenir une dissolution plus rapide et une meilleure biodisponibilité.[74]

### III.2. Définition des nanosuspensions :

Les nanosuspensions sont des dispersions colloïdales de fines particules sub-microniques, de tailles comprises entre 10 nm et 1 µm, stabilisées par un ou plusieurs surfactants [75]. Dans les nanosuspensions, le principe actif se trouve en grande partie à l'état solide, mais une certaine fraction est également solubilisée dans la phase liquide (solution saturée) [76]. Le milieu de dispersion peut être l'eau, une solution aqueuse ou un milieu non aqueux.[77]

### III.3. Propriétés des nanosuspensions :

#### III.3.1. Augmentation de la vitesse de dissolution par l'accroissement de surface :

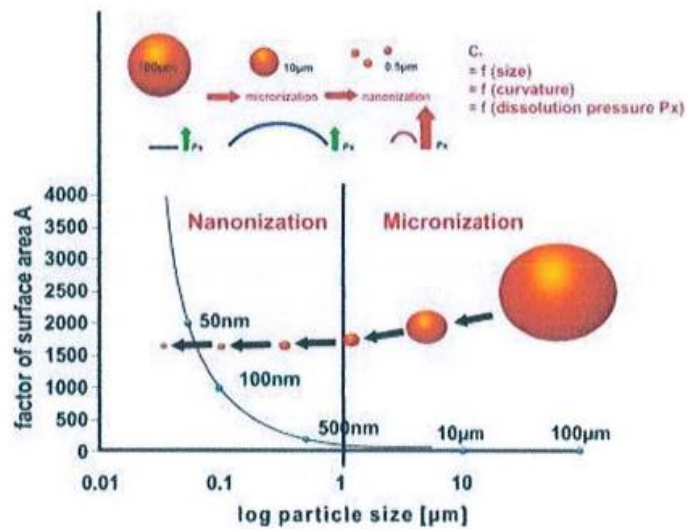
La diminution de taille des particules conduit à une augmentation de la surface de contact (Figure III.1), et comme démontré par l'équation de Noyes-Whitney, ceci augmente la vitesse de dissolution [78]; cet effet est très important lorsque la taille descend au rang nanométrique.

L'équation de Noyes-Whitney :

$$\frac{dm}{dt} = A \frac{D}{d} (C_s - C_b) \quad \text{(III.1)}$$

Où :

- $\frac{dm}{dt}$  : taux de dissolution
- m : masse de la matière dissoute
- t : temps
- A: surface de l'interface entre le solvant et la substance à dissoudre
- D : coefficient de diffusion, qui est une caractéristique intrinsèque de la substance
- d : épaisseur de la couche de solvant à la surface de la substance à dissoudre
- $C_s$ : concentration de la substance à la surface
- $C_b$ : concentration de la substance au sein du solvant



**Figure III.1** : Effet de la taille des particules sur la surface de contact. [79]

### III.3.2. Augmentation de la solubilité à saturation :

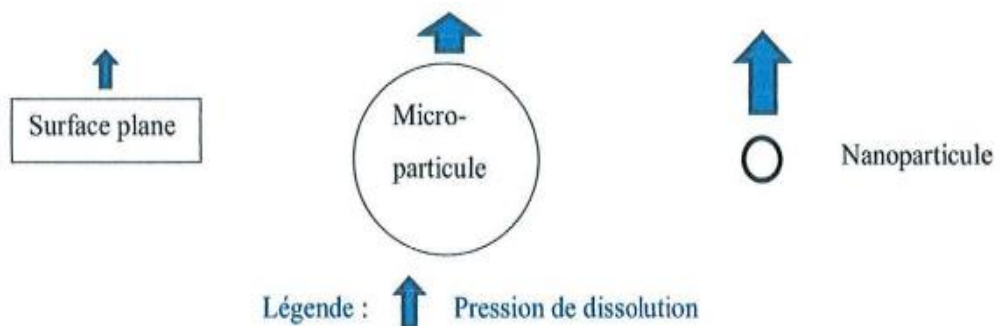
La solubilité à saturation ( $C_s$ ) est considérée comme une constante dépendant du composé, du milieu de dissolution et de la température du milieu. Toutefois, la taille des particules n'intervient sur ce paramètre que quand elle descend en dessous de la taille critique de 1 – 2  $\mu\text{m}$ . Les nanocristaux ont une solubilité à saturation augmentée, comme théorisé par l'équation d'Ostwald-Freundlich.[80]

$$\text{Log } (C_s/C_a) = \frac{28V}{2,303 RT} \rho r \quad (\text{III.2})$$

Où :

- $C_s$  : concentration à saturation
- $C_a$  : solubilité des particules constituants
- $V$  : volume molaire de la substance
- $R$  : constante de gaz
- $T$  : température absolue
- $\rho$  : densité du solide
- $r$  : radius (diamètre)

Le transfert de molécules entre la phase solide (nanoparticules) et la phase liquide (milieu de dispersion) a le même principe que dans le transfert depuis la phase liquide vers la phase gazeuse : d'après l'équation de Kelvin, la pression de vapeur d'une goutte de liquide dans la phase gazeuse augmente avec la croissance de la courbure de surface donc avec une diminution de taille particulaire. Dans ces conditions, la pression de vapeur est équivalente à la pression de dissolution. Dans le cas d'une solution saturée, il y a équilibre entre la dissolution et la recristallisation, et cet équilibre pourrait être déplacé s'il y a augmentation de la pression de dissolution (figure III.2), donc par conséquent une solubilité à saturation plus importante.[77]



**Figure III.2** : pression de dissolution selon la forme et le diamètre des particules[77]

L'augmentation de la solubilité à saturation a deux avantages :

1. Amélioration de la vitesse de dissolution selon la formule de Noyes et Whitney, car le rapport de  $dc/dt$  est proportionnel au gradient de concentration  $(C_s - C_x)/h$ , dans lequel  $C_x$  est la concentration du milieu et  $h$  est la distance de diffusion.

2. Le gradient de concentration entre le sang et le tube digestif augmente en raison de l'accroissement de Cs, donc l'absorption via la diffusion passive est facilitée.[77]

#### **III.4. Caractéristiques des nanosuspensions :**

Les paramètres principaux qui caractérisent les nanosuspensions sont :

- a. La taille des particules et leur distribution (indice de polydispersité) [81]
- b. La charge de surface qui est une indication de la stabilité des nanosuspensions en solution aqueuse. Cette charge est exprimée par le potentiel zêta (mV). Pour une suspension stable, un potentiel zêta minimum de  $\pm 30$  mV est nécessaire.[73]
- c. L'état de cristallisation
- d. La solubilité et la vitesse de dissolution pour évaluer l'intérêt des nanosuspensions en comparaison avec la formulation traditionnelle.

#### **III.5. Comparaison des nanosuspensions par rapport aux autres formulations destinées à améliorer la solubilité :**

Le choix des approches visant à améliorer la solubilité des composés peu hydrosolubles est fonction de plusieurs aspects comme par exemple : la voie d'administration, la forme galénique, les caractéristiques physico-chimiques des composés ... Un résumé est présenté dans le tableau **III.1**.

Les nanosuspensions sont utilisables pour les médicaments ni hydrosolubles ni liposolubles qui possèdent une énergie réticulaire élevée. La conséquence est une tendance à la réduction de dissolution des cristaux quel que soit le solvant. Ils réussissent à contourner cet obstacle et à maintenir les principes actifs à l'état cristallin avec une taille petite (diamètre entre 200- 400 nm) pour satisfaire aux besoins pharmaceutiques. [82]

La technique de nanosuspension a comme avantages : avoir une charge en masse par unité de volume élevée, et aussi la réduction de la quantité de solvants organiques nécessaires par rapport pour solubiliser le composé. [83]

**Tableau III.1:** Comparaison des différentes formulations potentielles pour les principes actifs peu hydrosolubles.[84]

Formulation	Potentiel de charge en PA	Adaptés aux PAs thermolabiles	Convient aux PA à points de fusion élevé	Formulation liquide (L)ou solide(S)	Voie d'administration	Complexité de la technologie
Nanonisation	Haut	Oui	Oui	L+S	Orale + IV	Complexe
Micronisation	Haut	Oui	Oui	L+S	Orale	Simple
Incorporation dans cyclodextrine	Bas	Oui	Oui	L+S	Orale +IV (limité)	
Formation de sels	Haut	Oui	Oui	S	Orale	Simple
Ajustement du Ph	Bas	Oui	Oui	L	Orale +IV	Simple
Co-cristaux	Haut	Oui	Oui	S	-	Moyen
Formulations lipidiques	Bas	Limité	Limité	L+S	-	Simple

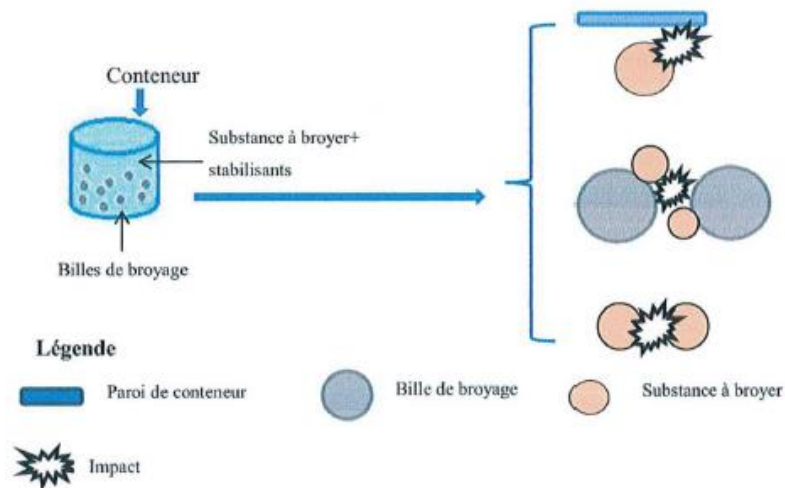
### **III.6. Méthodes de fabrication des nanosuspensions**

#### III.6.1. Approche « Top Down » :

Cette approche consiste à réduire la taille des grosses particules par divers moyens en vue d'obtenir des nanoparticules.

##### III.6.1.1. Méthodes par broyage

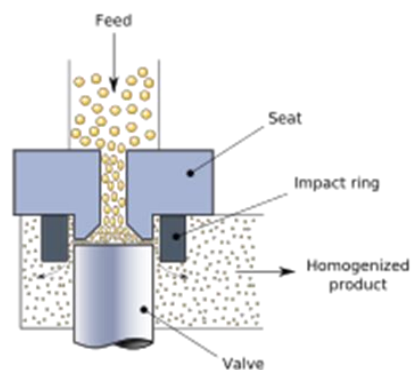
Le principe du broyage est plutôt simple : les boulets broyeurs, le milieu de dispersion (l'eau), le principe actif et au moins un stabilisant sont chargés dans la chambre de broyage. Les forces de cisaillement et les chocs générés par le mouvement des boulets broyeurs conduisent à la réduction de taille des particules, ces boulets broyeurs sont constituées de céramique dont le dioxyde de zirconium stabilisé par du cérium ou de l'yttrium, de l'acier inoxydable ou du verre.[84] (cf. **figure III.3**).



**Figure III.3 :** Différents types d'impact mécanique mis en jeu pendant le broyage

### III.6.1.2. Méthode par homogénéisation à haute pression

L'homogénéisation à haute pression est un procédé mécanique qui consiste à forcer le passage d'un produit fluide à travers une ouverture très petite sous l'influence de pressions très élevées (supérieures à 100 MPa). Le liquide est ainsi soumis à un cisaillement très important, ce qui induit la formation de particules très fines. [60]



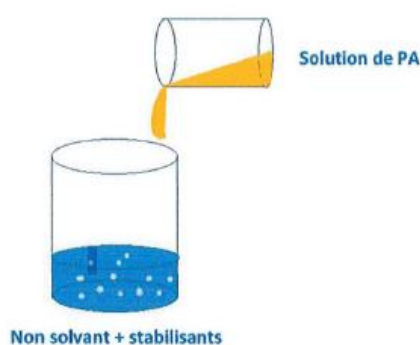
**Figure III.4:** Schéma d'un homogénéisateur à haute pression

### III.6.2. Approche « Bottom up »

Une des méthodes conventionnelles de fabrication de nanosuspension est appelée « Bottom up technology » : le principe actif est d'abord dissout dans un solvant organique et ensuite cette solution est mélangée avec un non-solvant aqueux miscible. La solubilité du



médicament est faible dans le mélange eau-solvant organique, donc la précipitation a lieu en générant des fins cristaux ou des particules solides amorphes. Cette croissance est très rapide en raison de la valeur élevée de la solubilité à saturation, ce qui amène à une nucléation rapide[85]; l'apparition des particules solides amorphes est favorisée par la sursaturation quand la solubilité de l'état amorphe est dépassée. Cette préparation doit être couplée avec un processus de haute force de cisaillement pour ensuite réduire la taille des précipités de manière homogène.[86]



**Figure III.5 :** Principe de fabrication d'une nanosuspension par la technique Bottom up

Le tableau III.2 récapitule les techniques citées dans la littérature.

**Tableau III.2 :** Résumé des différentes techniques de « Bottom Up »

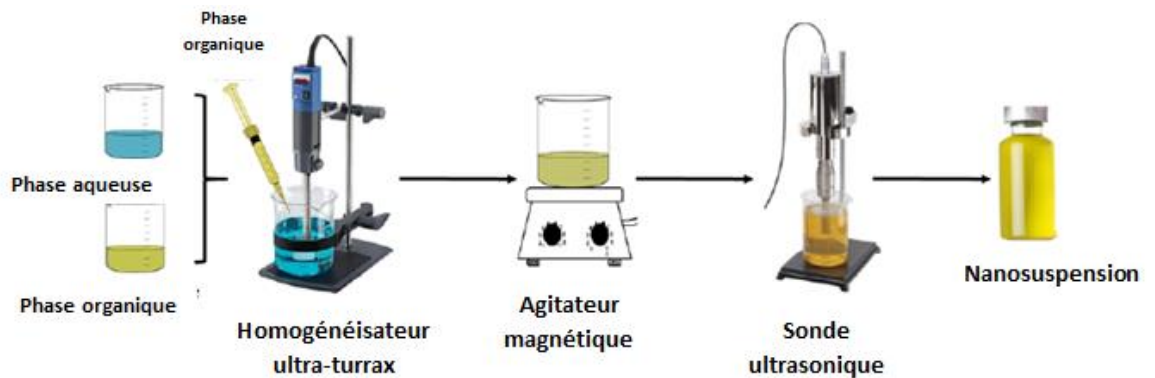
Méthode de préparation	Description
Fusion à chaleur	Refroidissement rapide d'un fondu de mélange
Evaporation du solvant	Evaporation du solvant qui contient le PA et les stabilisants
Hydrosol	Précipitation à partir d'un solvant organique par addition d'eau
Gaz anti-solvant recristallisation	Saturation de la solution de PA avec un fluide supercritique
Expansion rapide de solution supercritique	Diminution rapide de la pression du fluide supercritique dans lequel le PA est dissout
Cristallisation contrôlée pendant lyophilisation	Lyophilisation du mélange de PA, d'eau et de solvant organique à une température relativement élevée

Le procédé utilisé dans notre travail est le procédé « **Nanoedge** » :

- Le procédé « Nanoedge » :

La première étape de ce procédé consiste en la microprécipitation après avoir dissout le principe actif dans un solvant organique miscible à l'eau pour former une solution, puis cette solution est mélangée avec un second solvant pour former une pré-suspension. Ce solvant est éliminé complètement en incluant l'étape d'évaporation. [87]

Finalement une énergie est fournie par les méthodes qui provoquent des forces de cisaillement, comme la sonication et l'homogénéisation. La suspension produite peut être administrée directement après une stérilisation appropriée. [88]



**Figure III.6** : schéma du procédé « Nanoedge »

### **III.7. Modification des propriétés de surface**

La biodistribution des nanosuspensions peut être améliorée en modifiant leur propriété de surface. Il est possible de créer certaines propriétés de surface en produisant des nanosuspensions avec des tensioactifs ou des polymères spécifiques [polysorbate, poloxamer...]. Le contrôle de la modification peut être effectué par des mesures physiques comme la mesure de la charge de surface (potentiel zêta), l'analyse des interactions hydrophobes par chromatographie (HIC)[73] ou l'analyse de l'adsorption des protéines plasmatiques sur les nanosuspensions.

Par ailleurs, les propriétés de surface des nanosuspensions peuvent influencer considérablement l'adsorption des protéines plasmatiques à leur surface. En effet, la clairance de ces nanoparticules par les cellules du système de phagocytes mononucléés

(SPM) peut augmenter significativement avec l'augmentation de l'hydrophobicité de la surface.[89]

### **III.8. Influence de la taille nanométrique des particules**

La distribution des particules colloïdales administrées par les différentes voies est fonction de leur taille. Les nanoparticules de petites tailles sont capturées par les cellules du système de phagocytes mononucléés du foie, de la rate et de la moelle osseuse.[90] Dans le cas de particules de taille supérieure à 150 nm, la clairance hépatique par les cellules de Kupffer est prédominante (60 - 90 % dans les 5 à 10 min). Deux à 20 % s'accumulent dans la rate, des proportions variables dans les poumons et jusqu'à 1 % dans la moelle osseuse.[91]

Une étude réalisée chez le lapin a montré l'influence de la taille des nanosuspensions d'oridonin formulées avec le poloxamer 188 comme tensioactif sur la pharmacocinétique. Après administration intraveineuse, les nanosuspensions de 103 nm ont des propriétés pharmacocinétiques et une biodistribution similaires à celles obtenues avec l'oridonin en solution. De plus, ces nanosuspensions montrent une cinétique de dissolution rapide *in vitro* (99,9 % de dissolution en 10 min). En revanche, les nanosuspensions de 897 nm ont une biodistribution différente de celle des nanosuspensions de 103 nm, ainsi qu'une dissolution lente *in vitro* (85 % de dissolution en 2 h).[92] Donc, la taille des particules est un paramètre qui peut affecter significativement la distribution tissulaire des nanosuspensions.

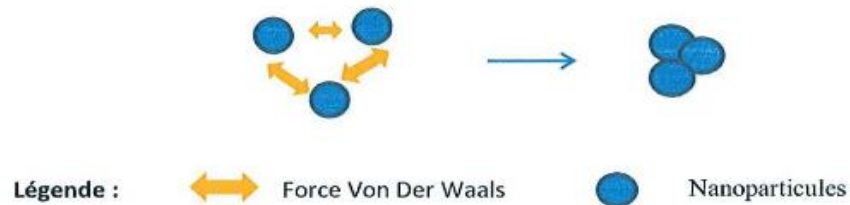
### **III.9. Phénomènes impliqués dans la croissance des particules dans les nanosuspensions**

Suite à l'augmentation de la surface de contact par réduction de taille particulaire, les nanocristaux génèrent un gain de tension interfaciale et l'énergie libre du système augmente fortement, ce qui est la source de l'instabilité du système.[93]

#### **III.9.1. Agglomération irréversible**

Les forces d'interactions strictement interparticulaires rencontrées sont principalement des forces moléculaires parmi lesquelles se trouvent les forces d'attractions de Van Der Waals qui agissent à courte distance. Les forces de Van Der Waals qui sont des

liaisons non covalentes existent toujours quelle que soit la nature du matériau. A l'échelle nanométrique elles entrent en jeu et la force attractive croit rapidement quand les particules s'approchent en résultant une agglomération irréversible.[94]



**Figure III.7 :** Effets des forces de Van Der Waals sur les nanoparticules avec transformation en agglomérats irréversibles

### III.9.2. Phénomène de mûrissement d'Ostwald

Le phénomène de mûrissement d'Ostwald est un processus dans lequel les particules plus grosses grandissent par la consommation des particules plus petites due à l'effet Kelvin (cf. figure III.8). Ce phénomène est plus important lorsque la taille des particules est inférieure à 0.5  $\mu\text{m}$ .

La force motrice de ce phénomène est la différence des solubilités entre les particules polydispersées, et la solubilité d'une particule qui est inversement proportionnelle à sa taille, comme décrite par la loi de Gibbs-Thomson :

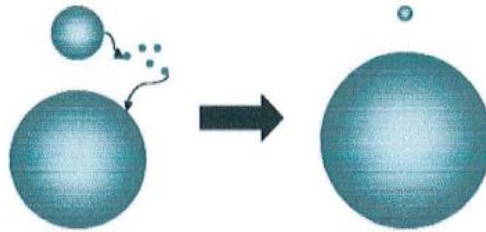
$$C_s(r) - C_\infty = C_\infty \cdot \exp(a/r) - 1 \approx C_\infty \cdot a/r \quad (\text{III.3})$$

Et  $a = 2 \cdot \sigma \cdot V_m / vRT$

- $C_s(r)$  : solubilité d'une particule de rayon  $r$
- $C_\infty$  : solubilité d'une particule de rayon  $r = \infty$
- $\sigma$  : tension entre la particule et la solution
- $V_m$  : volume molaire de particule
- $v$  : nombre de produits que la particule génère lors de sa dissolution
- $R$  : constante des gaz parfaits
- $T$  : température absolue

La vitesse de mûrissement dépend de la distribution de taille, de la cinétique de croissance des cristaux et des propriétés de transport de la phase liquide.

Pour diminuer l'effet de ce phénomène, 2 pistes sont relativement simples et efficaces à mettre en œuvre : réduire la distribution de taille des nanocristaux et éviter les changements brusques de température qui provoquent la variation de solubilité (par exemple, les conditions de stockage).[82]



**Figure III.8 :** Phénomène de mûrissement d'Ostwald

### **III.10. Stabilisants des nanosuspensions :**

Un des plus grands challenges lors de la fabrication de nanosuspension est donc la stabilité pour les raisons évoquées précédemment. Par conséquent les stabilisateurs ont un rôle important dans la formulation des nanosuspensions pour garantir leur stabilité physique en fournissant une barrière stérique et/ou ionique. Le type et la quantité des stabilisants ont un grand impact à la fois sur la stabilité physique et le comportement in vivo des nanosuspensions.

#### **III.10.1. Stabilisants ioniques :**

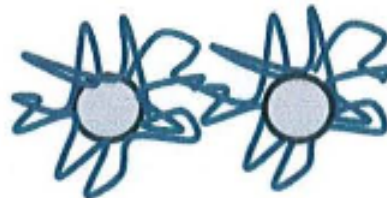
Les stabilisants ioniques s'adsorbent sur la surface des particules en suspension et génèrent une interaction électrostatique répulsive entre la double couche électrique à l'interface des particules solides et du milieu. La stabilité de la nanosuspension dépend également d'autres facteurs, comme par exemple, la densité et la distribution de taille des particules, le pH et la force ionique du milieu ... [95]

#### **III.10.2. Stabilisants stériques :**

Les polymères possédant une masse molaire  $> 10000$  D et les chaînes permettant d'envisager une distance interparticulaire compatible avec l'attraction de Van der Waals

peuvent générer une répulsion qui leur confient la possibilité de stabiliser un système colloïdal par effet stérique.

Un effet de stabilisation des particules colloïdales est obtenu par greffage de macromolécules à la surface des pallicules en formant des couches à leur surface (cf. figure III.9). [96]



**Figure III.9:** Polymères attachés à la surface des particules colloïdales pour former des couches répulsives.

Un effet synergique peut avoir lieu entre les deux types de stabilisants. L'ajout d'un polymère neutre permet une meilleure couverture de la surface particulaire par un stabilisant ionique.[97]

### III.10.3. Revue des stabilisants des nanosuspensions :

Malgré une longue liste théorique de stabilisants, les articles de recherche et les brevets indiquent un groupe plus restreint de stabilisants utilisables dans la fabrication des nanosuspensions (cf. Tableau III.3). De plus, à notre connaissance il n'existe pas encore d'investigation pour bien comprendre la faisabilité de production des nanosuspensions (choix des stabilisants) en fonction des caractéristiques du principe actif .[98]

**Tableau III.3 :** Revue des systèmes de stabilisants des nanosuspensions cités dans la littérature.

Systèmes de stabilisants (% m/m au médicament)	Médicament (% m/v ou m/m dans la suspension)	BB /HHP /NP	Littérature références
1. Systèmes à un seule stabilisant			
1.1. Surfactant			
Cremophor® EL (100%)	13-Dicyclohexyl urée (1%)	BB	[99]
Lécithine (20%/40%/ 167%)	RM KP 22 (3%)	HHP	[100]
Poloxamer 188 (10%-100%)	Oméprazole (1%-10%)	HHP	[101]
Povidon 30 (100%,25%, 10%)		BB	[98]
Vitamine E TPGS (5%)	Molécules modèles de Novartis	BB	[102]
Sodium lauryl sulfate (5%)	Spironolactone (10%)	HHP	[103]
Tween® 80 (30%)	RMKP 22 (1%)	HHP	[104]
1.2. Polymères			
Hydroxypropylcellulose (60 kDa; 16.7%)	PA de test (1 .8%/6.1%/11.5%)	BB	[105]
Hydroxypropylméthylcellulose (Methocel E5 0,5%)	Indométhacine ( 5 %, 0, 5%)	HHP	[106]

### **III.11. Techniques d'analyse des nanosuspensions**

Afin d'évaluer la performance des procédés de fabrication des nanosuspension, il est important de mesurer la taille des particules produites et d'analyser leurs propriétés physico-chimiques. Différentes techniques sont utilisées pour caractériser les propriétés des particules résultantes.

#### **III.11.1. Diffusion dynamique de la lumière**

Cette technique a pour avantage principal d'être rapide et de ne pas nécessiter de calibration. De plus, elle est non-destructive en sens que l'échantillon peut être récupéré après analyse. Cependant elle ne peut évaluer que des tailles comprises entre 1 nm-10 µm,

au-delà de cette gamme les valeurs ne sont plus fiables [107] et l'échantillon doit souvent être dilué afin d'éviter les artefacts.

### III.11.2. Microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage (MEB) est l'une des méthodes d'observation et d'analyse les plus utilisées dans tous les domaines de recherche. Cette nouvelle technologie a permis, du fait de sa profondeur de champ, l'observation du relief d'échantillons massifs. Elle a une résolution qui se situe entre 0,4 et 20 nm.

Contrairement à la DLS qui est une méthode indirecte basée sur des modèles mathématiques, la MEB permet de visualiser directement la taille et la morphologie des particules individuelles.[108]

### III.11.3. Calorimétrie différentielle à balayage

La calorimétrie différentielle à balayage est une technique d'analyse thermique. Elle mesure les différences des échanges de chaleur entre un échantillon à analyser et une référence[109, 110]

## **III.12. Comportement in vitro & in vivo des nanosuspensions**

Plus récemment les articles décrivant le comportement et les corrélations in vivo/ in vitro des nanosuspensions sont de plus en plus nombreux. Les résultats montrent le potentiel de ce type de formulation au niveau pharmacocinétique, pharmacodynamique et notamment un effet de ciblage pour les composés initialement peu hydrosolubles.

L'hypothèse de l'augmentation de vitesse de la dissolution des principes actifs peu hydrosolubles par augmentation de la surface d'exposition selon la théorie de Noyes-Whitney a été confirmée par des études cinétiques de dissolution in vitro.[111] [112, 113]

La nanosuspension permet d'augmenter la biodisponibilité des médicaments de classe II selon les théories évoquées précédemment. Les essais in vivo ont confirmé cette amélioration de biodisponibilité des principes actifs peu hydrosolubles via la nanonisation.[114, 115]



Dans l'étude de traitement de l'hypertension par le 1,3-dicyclohexyluréa chez les rats, les nanoparticules ont considérablement augmenté l'exposition du principe actif par voie orale.

L'autre avantage des nanomédicaments repose sur la diminution de l'interférence du repas. Ceci est particulièrement important pour les principes actifs à marge thérapeutique étroite.

### **III.13. Applications thérapeutiques et propriétés biologiques**

#### **III.13.1. Administration par voie orale**

Lorsqu'un principe actif est administré par voie orale, la biodisponibilité et finalement l'efficacité dépendent de sa solubilité et de son absorption par l'appareil gastro-intestinal.

Ainsi, la faible solubilité in vitro de certains principes actifs représente une étape limitant leur utilisation en thérapeutique. Cependant, l'administration des nanosuspensions par voie orale permet de résoudre le problème de la solubilité à cause de leur adhésion sur les surfaces biologiques à savoir l'épithélium de la paroi intestinale.[73]

La "bioadhérence" des nanosuspensions peut être améliorée par l'utilisation de polymère mucoadhésif dans la formulation[116]. Cette adhérence contribue non seulement à améliorer la biodisponibilité mais également au ciblage des parasites qui subsistent dans le tractus gastro-intestinal.

#### **III.13.2. Voie d'administration intraveineuse**

Les infections comme la tuberculose, la listériose, la leishmaniose et la toxoplasmose sont causées par des parasites qui résident dans les macrophages du système de phagocytes mononucléés. Les particules colloïdale (nanosuspensions, nanoparticules,...) sont rapidement capturées par ces cellules, ce qui permet de concentrer le principe actif à proximité des parasites.

Cependant, certains parasites (par exemple : la trypanosomiase et la toxoplasmose) peuvent se localiser dans le cerveau qui n'est pas un organe du SPM. Dans ce cas, la formulation des nanosuspensions permet de cibler cet organe. [117]

*Partie N°02*

---

*Partie expérimentale*

# *CHAPITRE IV*

---

## *Matériels et méthodes*

## Chapitre IV. Matériels et méthodes

### IV.1. Introduction

Dans ce chapitre nous présenterons en premier lieu le matériel, les matières et les méthodes de caractérisation de la matière première « curcumine », objet de notre étude.

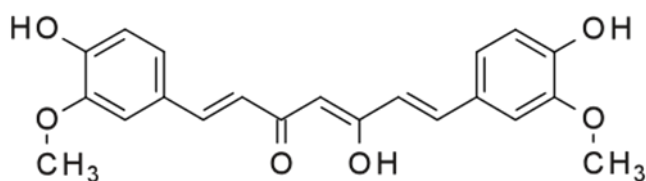
En second lieu nous décrivons le procédé de formulation de la nanosuspension de curcumine et les différentes études de caractérisations physico-chimiques, biologiques et biopharmaceutique de notre formulation.

Notre travail a été réalisé dans le laboratoire de Génie Chimique au département de Génie Des Procédés et en parallèle dans certains laboratoires du centre de recherches et développement de Sidal.

### IV.2. Matière première de la formulation

#### IV.2.1. Principe actif (la curcumine)

Le principe actif utilisé lors de la formulation de la nanosuspension est la curcumine, le principal composant de la plante *curcuma longa*. Et comme mentionné précédemment dans la partie bibliographique, cette molécule présente plusieurs effets thérapeutiques. [16]



**Figure IV.1** : Structure chimique de la curcumine

La curcumine qui a fait l'objet de cette étude a été fournie gracieusement par un laboratoire de fabrication des compléments alimentaires (commercialisés sous le nom de arthrofit<sup>+</sup>) situé à Sétif (Figure IV.2).

La figure ci-dessous montre l'aspect de la curcumine utilisée comme matière première.



**Figure IV.2** : la curcumine utilisée

Le tableau ci-dessus présente les caractéristiques physico-chimiques de la curcumine :

**Tableau IV.1** : les propriétés physico-chimiques de la curcumine

<b>Nomenclature</b>	(1E,6E)-1,7-bis (4-hydroxy- 3-methoxyphenyl) -1,6-heptadiene-3,5-dione
<b>Formule brute</b>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>
<b>Etat physique</b>	Solide
<b>Apparence</b>	Poudre jaune orangé
<b>Odeur</b>	Inodore
<b>Solubilité</b>	Insoluble dans l'eau, totalement soluble dans le DMSO
<b>Stabilité chimique</b>	Stable dans les conditions normales
<b>Masse molaire</b>	368.3799 g/mol
<b>Masse volumique</b>	12.72 g/cm <sup>2</sup>
<b>Point de fusion</b>	183°C
<b>Point d'ébullition</b>	591,4 °C

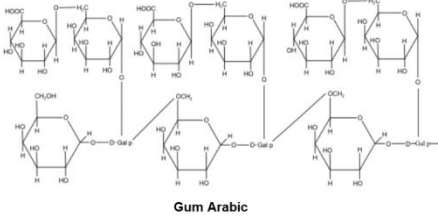
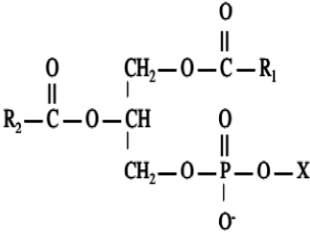
#### IV.2.2. Les excipients

Pour préparer notre nanosuspension de curcumine, nous avons utilisé une combinaison de deux stabilisants naturels comme excipients (la gomme arabique et la

lécithine de soja). La fonction principale de ces stabilisants est de mouiller les particules de la curcumine complètement, et pour empêcher la maturation et l'agglomération causées par le phénomène de mûrissement d'Ostwald de notre nanosuspension formulée. Le but étant de produire une formulation physiquement stable en fournissant une barrière stérique.[118]

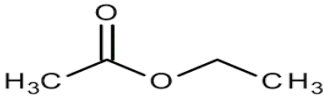
Le tableau IV.2 résume les propriétés physico-chimiques de chaque stabilisant :

**Tableau IV.2 : les propriétés physico-chimiques des excipients**

	<b>La gomme arabique</b>	<b>La lécithine de soja</b>
<b>La structure chimique</b>	 <p style="text-align: center;">Gum Arabic</p>	
<b>Etat physique</b>	Solide (poudre)	Produit très visqueux
<b>Couleur</b>	Blanc	Brun
<b>Odeur</b>	Inodore	Caractéristique
<b>Point d'éclair</b>	> 250 °C	> 100 °C
<b>Point d'ébullition</b>		> 200 °C
<b>T° de décomposition</b>	> 90 °C	
<b>Densité</b>	1.4 g/cm <sup>3</sup>	1 g/cm <sup>3</sup>
<b>Solubilité dans l'eau</b>	500 g/l à 20 °C	Soluble
<b>Valeur de saponification</b>		196
<b>La concentration(%) quand est utilisé comme stabilisant</b>	5-10%	0.25-10%

#### IV.2.3. Le solvant utilisé dans la formulation

**Tableau IV.3.** : Propriétés physico-chimiques de l'acétate d'éthyle

<b>Nom chimique et synonymes</b>	<b>Acétate d'éthyle, acétate éthylique, éthanoate d'éthyle, éther acétique</b>
<b>Formule chimique</b>	$C_4H_8O_2$
<b>Structure chimique</b>	
<b>Masse molaire</b>	88.1 g/mol
<b>Description</b>	Liquide transparent, incolore et volatil avec une agréable odeur fruitée, parfumée et légèrement acéteuse, et un goût agréable lorsqu'il est dilué. L'acétate d'éthyle est inflammable.
<b>Point d'ébullition</b>	76-78°C
<b>Solubilité</b>	Soluble 1 dans 10 d'eau à 25°C ; l'acétate d'éthyle est plus soluble dans l'eau à des températures plus basses qu'à des températures plus élevées. Miscible avec l'acétone, le chloroforme, le dichlorométhane, l'éthanol (95%) et l'éther, et avec la plupart des autres liquides organiques.
<b>Catégorie fonctionnelle</b>	Agent aromatisant; solvant.
<b>Rôle dans la formulation</b>	Solvant de la curcumine Diminution de la polarité de l'eau

### IV.3. Matière première de la caractérisation

#### IV.3.1. Les solvants

Des tests de solubilité dans différents solvants dont l'acétate d'éthyle, le diméthylsulfoxyde, le dichlorométhane, le méthanol et l'éthanol ont été utilisés afin de choisir le solvant qui sera la phase organique de la dispersion. Les caractéristiques de



l'acétate d'éthyle sont déjà affichés dans le tableau IV.3 et pour les autres solvants dans l'annexe 1.

#### IV.3.2. Le tween 80 (polysorbate80)

Ce réactif a été utilisé dans le cadre du criblage des stabilisants utilisés dans la formulation. Le tableau IV.4 Résume les propriétés physico-chimiques du tween 80 :

**Tableau IV.4 :** propriétés physico-chimique du tween 80

<b>Formule chimique</b>	C <sub>64</sub> H <sub>124</sub> O <sub>26</sub>
<b>Etat physique</b>	liquide (visqueuse)
<b>Couleur</b>	jaune clair
<b>Odeur</b>	Inodore
<b>Ph</b>	Neutre
<b>Point initial d'ébullition</b>	>100 °C
<b>Point d'éclaire</b>	>113 °C
<b>Pression de vapeur</b>	<1,33 hPa
<b>Densité</b>	1,06 – 1,09 g/cm <sup>3</sup> à 25 °C
<b>Solubilité dans l'eau</b>	Soluble
<b>Viscosité</b>	425 mPa s à 25 °C
<b>HLB</b>	15
<b>Valeur de saponification</b>	45-55
<b>La concentration(%) lors qu'il est utilisé comme stabilisant</b>	1-15%

#### IV.3.2. 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle (DPPH)

Le DPPH a été utilisé pour évaluer l'activité anti-oxydante. Le tableau ci-dessous regroupe ses principales caractéristiques :

**Tableau IV.5 : propriétés physico-chimique du DPPH**

<b>Formule chimique</b>	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>
<b>État physique</b>	Solide en poudre
<b>Masse molaire</b>	394,3178 ± 0,018 g/mol
<b>Couleur</b>	Noir
<b>Point de fusion</b>	130°C
<b>Température de décomposition</b>	135 ° C
<b>Solubilité</b>	Soluble dans le méthanol

#### IV.3.3. Tampon phosphate salin pH7

Afin de simuler le milieu biologique de solubilisation de la curcumine, les tests de solubilité in vitro et donc de biodisponibilité ont été réalisés dans un milieu tampon phosphate afin de se rapprocher de la réalité. Les principales caractéristiques de ce milieu sont illustrés ci-dessous :

**Tableau IV.6: Propriétés physico-chimiques du tampon phosphate pH 7**

<b>Nom chimique et synonyme</b>	<b>tampon phosphate salin, tampon phosphate, pH 7, PBS</b>
<b>Description</b>	Liquide incolore contenant du chlorure de sodium, du phosphate disodique, du phosphate monopotassique et un peu de chlorure de potassium. En général, la concentration de ces sels est celle du corps humain.
<b>pH</b>	7
<b>Solubilité</b>	Miscible à l'eau et la plupart des solvants organiques.
<b>Catégorie fonctionnelle</b>	soluté physiologique, solvant, solution de rinçage, diluant.
<b>Rôle</b>	Utilisé pour le test de dissolution in vitro.

#### IV.3.4. Albumine de sérum bovin (BSA)

La BSA a été utilisée pour évaluer l'activité anti-inflammatoire. Le tableau ci-dessous regroupe ses principales caractéristiques :

**Tableau IV.7:** Propriétés physico-chimiques de la BSA

<b>Nature</b>	Protéine
<b>Etat physique</b>	Solide
<b>Aspect</b>	Blanc, Orange
<b>Nombres d'acides aminés</b>	583
<b>Masse moléculaire</b>	66,430 kDa
<b>Point isoélectrique dans l'eau</b>	4,7 à 25 °C
<b>Coefficient d'extinction molaire</b>	0,677 mL.mg <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup>
<b>Hydro solubilité</b>	Soluble

#### IV.4. Matériel et équipement

Les équipements utilisés dans notre partie pratique se trouvent au niveau des laboratoires du département de Génie des Procédés de l'université de Blida. Ce sont principalement :

- ✓ Matériel pour la première étape de la formulation de la nanosuspension.
- ✓ Equipements lourds pour la caractérisation et la contrôle de nos différents produits.

##### IV.4.1. Matériels de Préparation de la nanosuspension

**Tableau IV.8:** Description des différents équipements de la fabrication

<b>Appareillage</b>	<b>Marque</b>	<b>Utilité</b>
<b>Balance électronique</b>	KERN ALS 220-4N	La pesé des matières premières
<b>Agitateur magnétique</b>	VELP scientifica	La dissolution de la matière première
<b>Homogénéisateur</b>	IKA®T25 digital ULTRA TURRAX®	L'Homogénéisation et la dispersion de la phase organique dans la phase aqueuse
<b>Evaporateur rotatif</b>	HAHN SHIN HS- 2005V-N	L'évaporation du solvant
<b>Sonde ultrasonique</b>	SONICS Vibra Cell™	Diminution de la taille.
<b>Lyophilisateur</b>	CHAIST alpha 2-4 LSC	Lyophilisation de la NS.

##### IV.4.2. Equipement de caractérisation et contrôle

Le tableau IV.9 résume les différents équipements de la caractérisation :

**Tableau IV.9:** Description des différents équipements de la caractérisation

<b>Appareillage</b>	<b>Marque</b>	<b>Utilité</b>
<b>DLS</b>	HORIBA SCIENTIFIC NANO PARTICA , nano particle analyzer SZ-100	La mesure de la taille des particules nanométriques et le potentiel zêta
<b>UV-visible</b>	HITACHI , U-5100 spectrophotometer	L'analyse quantitative du produit
<b>FTIR</b>	SHIMADZU FTIR-8900	L'analyse qualitative du produit
<b>MEB</b>	Fei Quanta 650	L'observation de la morphologie du produit
<b>DRX</b>	Rigaku smartlab	Caractérisation des matériaux cristallisés
<b>Dissolutest</b>	Erweka	Le test de dissolution in vitro
<b>Tamis superposé</b>	Retsch AS-200	L'analyse granulométrique des particules micrométriques

#### **IV.5. Caractérisation de la matière première ; la curcumine (PA)**

La caractérisation de la curcumine a pour but de faire une comparaison entre cette curcumine à l'état initial et celle à l'état final après la formulation de la nanosuspension.

##### **IV.5.1. Test de solubilité**

On s'intéresse à la détermination qualitative de la solubilité. Pour cela, on prépare une série de tubes à essai, dont chaque tube contient 10 mg de curcumine et 10 ml de solvant. Ce test est effectué dans l'eau, l'éthanol, méthanol, acétate d'éthyle, DMSO et le DMC. Les tests ont été réalisés en même temps et dans les mêmes conditions opératoires.

#### IV.5.2. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier est une technique d'analyse basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet via la détection de certaines vibrations de déterminer les fonctions chimiques présentes dans le matériau. Lorsque l'énergie apportée par le faisceau lumineux est voisine de l'énergie de vibration de la molécule, cette dernière va absorber le rayonnement et on enregistrera une diminution de l'intensité réfléchi ou transmise. Le domaine IR entre 4000 et 400  $\text{cm}^{-1}$  correspond au domaine d'énergie de vibrations des molécules.

L'appareillage utilisé dans notre étude est un spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier de type SHIMADZU FTIR-8900. Les mesures ont été réalisées dans une gamme de nombres d'onde de 4000 à 400  $\text{cm}^{-1}$ .

Les échantillons sont confectionnés sous forme de pastilles circulaires constituées de 2 mg de produit réparties dans 100 mg de bromure de potassium (KBr) utilisé comme support.

#### IV.5.3. La spectroscopie UV-Visible

L'équipement utilisé pour la spectroscopie ultraviolet-visible est un spectrophotomètre du type HITACHI, U-5100 constitué par un système optique, susceptible de fournir un rayonnement monochromatique dans la région 200-800 nm, et par un dispositif approprié à la mesure de l'absorbance. Il mesure l'intensité de la lumière (I) passant à travers un échantillon et la compare à l'intensité de la lumière avant ce passage ( $I_0$ ). Le rapport  $I / I_0$  est appelé transmittance, et est habituellement exprimé comme un pourcentage.

L'absorbance, A, est exprimée à partir de la transmittance :

$$A = -\log(T) \quad (\text{IV.1})$$

En analyse qualitative, par comparaison de notre spectre obtenu avec un spectre de référence, la curcumine a été solubilisé dans le DMSO, dans lequel on a préparé une concentration de 0.02mg/ml.

#### IV.5.4. Microscopie Electronique à balayage

Afin d'observer la morphologie des grains de curcumine dans les deux états (curcumine comme matière première et curcumine comme nanosuspension, nous avons eu recours au MEB juste pour pouvoir détecté les éventuelles différences pouvant exister entre les deux états

La morphologie de la Cur brute et de la NS de Cur lyophilisée a été déterminée par microscope électronique à balayage (MEB) afin d'examiner la structure de surface des particules. Pour enregistrer les images MEB, un microscope FEI QUANTA 650 a été utilisé.

Les échantillons ont été placés sur un support en aluminium à température ambiante puis ont été couvert par un disque en carbone en dessus, ensuite observées au MEB.

#### IV.5.5. Diffraction aux rayons X

De même et dans le but d'identifier l'organisation des grains de curcumine dans le réseau, nous avons recouru à la technique de diffraction par rayons X afin d'observer les deux états et les nouvelles modifications suite à la formulation de la nanosuspension.

L'analyse DRX est effectuée essentiellement par la méthode des poudres, une technique facile à réaliser, rapide et non destructive avec laquelle on peut avoir des renseignements sur le produit, et on peut identifier le matériau par l'intermédiaire des distances inter réticulaire  $d_{hkl}$  et de l'intensité des raies de diffraction correspondantes.[119]

Une quantité de quelques grammes de poudre de Cur brute et de la poudre lyophilisée de NS de Cur est placé sur une plaquette en une surface la plus régulière possible, la plaquette est positionnée au centre goniomètre de tel manière que le faisceau diffracté soit focalisé sur le détecteur, la surface irradiée comprend des milliers de grains qui nous donnent des informations fiables sur la structure de poly-cristal.

#### IV.5.6. Taille et charge des particules

##### a. Tailles des particules

Afin de séparer les grains de curcumine par tranches de tailles de particules, nous avons procédé en premier lieu à un tamisage de la curcumine avec un tamiseur électrique de type RETSCH AS 200.

Pour l'analyse granulométrique on superpose un certain nombre de tamis dont la dimension des mailles décroît du tamis supérieur au tamis inférieur, puis on couvre le tamis supérieur avec un couvercle après avoir placé notre poudre de curcumine.

On laisse agiter pendant un certain temps au bout duquel les particules se répartissent sur les différents tamis selon leur granulométrie.

#### b. Charge des particules

Pour déterminer le potentiel zêta (ZP), la poudre de la curcumine a été diluée dans l'eau distillée. Les mesures ont été effectuées sur un Zétasizer (HORIBA, SZ100) avec une cuvette de 1 ml munie d'un système d'électrodes pour provoquer le déplacement électrophorétique des cristaux. Chaque mesure a été effectuée trois fois. Un logiciel interne approprié permet de convertir le signal en valeurs.

### **IV.6. Micronisation de la curcumine**

#### IV.6.1. Criblage des stabilisants

Divers stabilisants comme la gomme arabique, le tween 80 et la lécithine de soja ont été sélectionnés. La concentration des stabilisants a été fixée en se basant sur les proportions indiquées dans « The Handbook Of Pharmaceutical Excipients ». Ces derniers ont été dissous dans l'eau distillée (phase antisolvant) compte tenu de leur solubilité et les NS ont été formulées suivant le procédé de fabrication. La taille et la charge des particules ont été mesurées. Parmi les différents stabilisants criblés, celui conférant une stabilité maximale à la NS a été sélectionné.

#### IV.6.2. Choix du solvant

Les solvants organiques miscibles à l'eau ont été testés. Le choix du solvant a pris compte de deux facteurs : la toxicité et la solubilité de la curcumine dans ce dernier.

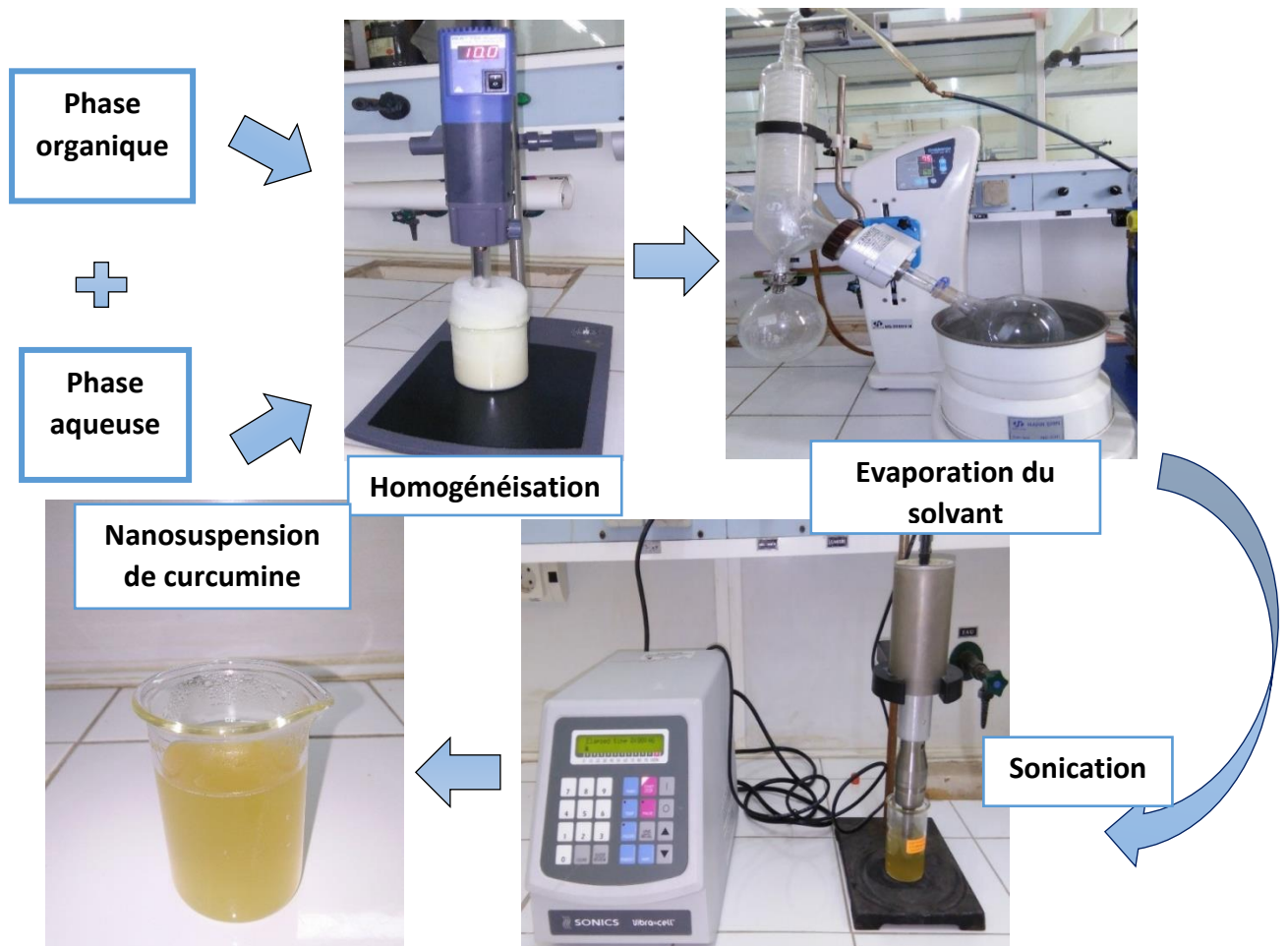
#### IV.6.3. Préparation de la nanosuspension

Pour la mise en œuvre de notre nanosuspension nous avons adopté le procédé



« nanoedge »[88] ; 100mg de lécithine et 150mg de gomme arabique ont été dissoutes dans 100 ml d'eau distillé jusqu'à dissolution complète, ce mélange a été par la suite homogénéisé pendant 5 mn à 10000 RPM ; ainsi la phase anti-solvant est formée, en parallèle la phase solvant est préparée en ajoutant 50 mg de curcumine a 5 ml d'acétate d'éthyle.

Ensuite la phase solvant a été lentement introduite dans la phase antisolvant en utilisant une pro pipette graduée, à un débit de 1ml /min. Ces deux phases ont été par la suite homogénéisées à une vitesse de 10 000 tr/min pendant 15 min. Ensuite, le mélange a été placé dans l'évaporateur rotatif à 77°C et 70 RPM pour éliminer le solvant organique. Après l'évaporation complète du solvant, l'échantillon a été immédiatement transférés dans un bécher et soumis à une sonication la phase dans laquelle les nanoparticules commencent à se former par sonde ultrasonique à 30 W pendant 30 min.



**Figures IV.3** : Schéma représentant les étapes de la formulation de la nanosuspension

#### **IV.7. Lyophilisation de la nanosuspension**

En industrie pharmaceutique, la lyophilisation est utilisée pour sécher des produits pharmaceutiques liquides [120, 121], tels que les nanosuspensions et les solutions. La lyophilisation est une technique de dessiccation par sublimation des solutions ou suspensions qui sont préalablement solidifiées par congélation.

Les nanosuspensions préparées avec la curcumine et de la gomme arabique et la lécithine de soja ont été lyophilisées dans un lyophilisateur appelé CHAIST alpha 2-4 LSC.

Le Mannitol (5%) a été utilisé comme cryoprotecteur pour protéger la nanosuspension contre l'agrégation des particules.

La poudre récupérée est stockée à 4°C à l'abri de la lumière, caractérisée et utilisée ultérieurement dans les différents tests.

#### **IV.8. Caractérisation de la nanosuspension**

##### **IV.8.1. Taille des particules indice de polydispersité et potentiel zêta**

Les mesures comprenant la taille moyenne des particules, l'indice de polydispersité (PDI) et le potentiel zêta de la nanosuspension de curcumine ont été déterminés par la méthode de diffraction Dynamique de la lumière (DLS) à l'aide de l'équipement HORIBA Scientific nano partica NANO PARTICLE ANALYZER SZ-100.

Une cuvette en verre a été remplie par la NS de curcumine. Des valeurs moyennes  $\pm$  écart type ont été utilisées après avoir effectué trois mesures par échantillon.

Le potentiel zêta est le potentiel électrique d'une particule en suspension. C'est un paramètre très utile pour l'évaluation de la stabilité physique des dispersions colloïdales. La charge de surface génère un potentiel autour de la particule, qui est le plus élevé autour de la surface et se désintègre avec la distance dans le milieu.

L'angle de diffusion a été transféré à 90° et la température a été fixée à 25°C. La taille des particules, l'indice de polydispersité et le potentiel zêta ont été examinés en triple pour une meilleure reproductibilité.

#### IV.8.2. Etude de stabilité de la nanosuspension à court terme

La NS de curcumine a été conditionnée dans des récipients en verre pour évaluer sa stabilité en l'incubant à température ambiante pendant 8 jours (les jours 0, 1, 2, 3 et 8). La taille moyenne des particules et le PDI ont été pris comme indicateurs primaires de la stabilité de la formulation.

#### IV.8.3. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

Le principe de la spectroscopie infrarouge est décrit dans le paragraphe (IV.6.2). Cette analyse a été effectuée sur la poudre de NS de Cur lyophilisée pour savoir est ce qu'il y a eu un changement au niveau des groupements fonctionnels après la modification de la curcumine par notre procédé de formulation « Nanoedge ».

#### IV.8.4. Comparaison de la solubilité de la Cur et de la NS de Cur

C'est le test le plus important dans cette partie et qui va confirmer si la solubilité de la curcumine s'est améliorée suite à la formulation de la nanosuspension. Les mêmes quantités de la Cur brute et la poudre lyophilisée de la NS ont été prises dans 20 ml d'eau distillée afin d'effectuer ce test.

### IV.9. Activités biologiques

Cette partie est consacrée à l'étude de l'activité antioxydante, anti-inflammatoire et antibactérienne la curcumine. En effet, ces activités sont déjà confirmées pour la matière première, et donc le but de cette étape de l'étude est de voir l'effet de la taille nanométrique sur ces activités

#### IV.9.1. Activité antioxydante

Pour évaluer l'effet antioxydant de de la Cur-brute et la Ns de Cur, nous avons procédé au test de piégeage par le radical libre DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl). Dans cette optique, la méthode par le DPPH est choisie car elle est reconnue comme étant simple, rapide et efficace en raison de la grande stabilité du radical DPPH.[122]

Par des dilutions en cascade la Cur-brute et la Ns de Cur à tester, ainsi que la substance de référence (acide ascorbique), une gamme de concentrations a été préparée. Pour chacune les densités optiques ont été mesurées à 517 nm. Les valeurs obtenues

permettent de tracer des courbes à partir desquelles nous pouvons déterminer le % de DPPH restant et la valeur de l'IC<sub>50</sub>.

L'activité antioxydante est déterminée par la diminution de l'absorbance d'une solution méthanolique de DPPH, à 517 nm, en fonction des concentrations de l'antioxydant ajouté ; cette diminution est due à sa réduction à une forme non radicalaire DPPH-H, par les antioxydants (AH) donneurs d'hydrogènes présents dans la molécule ou par une autre espèce radicalaire comme le montre l'équation suivante.[123, 124].

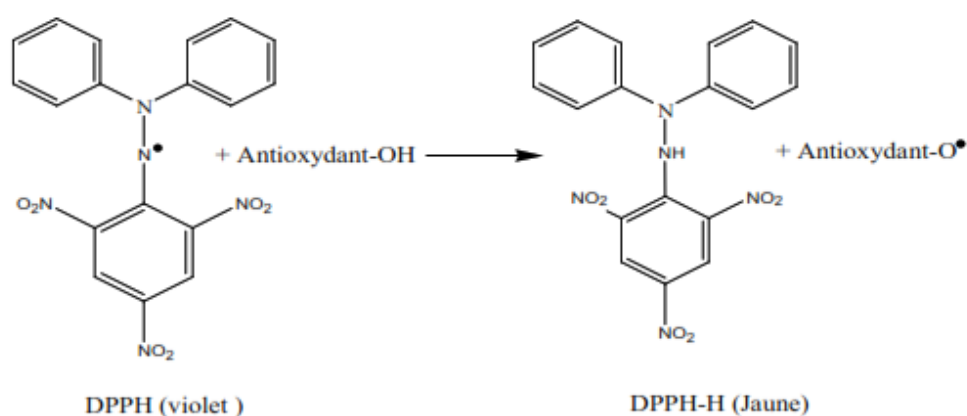


#### IV.9.1.1. Le test de piégeage du radical DPPH

##### ➤ Principe

Le test DPPH (diphénylpicrylhydrazyl) est une méthode largement utilisée dans l'analyse de l'activité antioxydante.

En effet, le DPPH se caractérise par sa capacité à produire des radicaux libres stables. Cette stabilité est due à la délocalisation des électrons libres au sein de la molécule. La présence de ces radicaux DPPH• donne lieu à une coloration violette foncée de la solution. La réduction des radicaux DPPH• par un agent antioxydant entraîne une décoloration de la solution[125].Le changement de couleur peut être suivi par spectrophotométrie à 517nm et de cette façon le potentiel antioxydant d'une substance ou un extrait de plante peut être déterminée.[126]



**Figure IV.4:** Réaction de réduction du radical libre DPPH•

#### IV.9.1.2. Détermination des IC50

La capacité antioxydante de nos différents composés est déterminée à partir des IC<sub>50</sub>, paramètres couramment utilisés pour mesurer l'activité antioxydante. L'IC<sub>50</sub> a été définie comme la quantité d'antioxydant nécessaire de diminuer la concentration de radicaux DPPH initiale de 50% (IC<sub>50</sub>). Une valeur faible d'IC<sub>50</sub> correspond à une activité antioxydante plus élevée de composé.[127]

##### ➤ Mode opératoire

Test de piégeage du radical libre DPPH : Le test antioxydant a été réalisé avec la méthode au DPPH [128]. 1 ml de chaque solution méthanolique de la Cur-brute et la NS de Cur à différentes concentrations (3,3.5,4,4.5,5mg/ml) sont ajoutés à 3 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,04mg/ml). Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 1ml de méthanol avec 3 ml de la solution méthanolique de DPPH. La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 517nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (I%).

$$I\% = \frac{(\text{Abs contrôle} - \text{Abs test})}{\text{Abs contrôle}} \times 100 \quad (\text{IV.3})$$

Les valeurs de l'IC<sub>50</sub> ont été déterminées graphiquement par la régression linéaire.

#### IV.9.2. Activité anti-inflammatoire

Afin d'évaluer l'activité antiinflammatoire de la Cur brute et de la NS de Cur, nous avons effectué une étude comparative par la méthode de dénaturation thermique des protéines décrite par Williams et al [129], avec quelques modifications. Le diclofénac est utilisé comme anti-inflammatoire de référence.

##### ➤ Principe de la méthode de dénaturation des BSA :

Les structures spatiales des protéines (conformation) sont sensibles à l'environnement (chaleur, pH, force ionique, solvants etc.) et changent alors de façon irréversible de forme : dénaturation. L'Albumine Bovine est une protéine de réserve globulaire, soluble dans l'eau. Elle est sensible à l'élévation de la température (coagulation thermique). La formation de ponts disulfures inter ou intramoléculaires au cours du chauffage par échanges irréversibles et la polymérisation désordonnées qui en résultent

conduisent à une diminution de sa solubilité. Lors des syndromes inflammatoires, une hypoalbuminémie est aperçue, ce qui suppose sa dénaturation au cours de l'inflammation[130].

➤ Mode opératoire :

L'étude de l'activité anti-inflammatoire a été réalisée in vitro et les analyses réalisées par UV-Vis, en utilisant « le Sérum de l'Albumine Bovine » (BSA).

- Préparation des échantillons :

On prépare une solution mère de chaque échantillon de la Cur brute et de la poudre lyophilisée NS de Cur diluée dans le méthanol. A partir des solutions mères, on prépare trois concentrations différentes de chaque échantillon. De la même manière, on prépare la solution mère et les solutions filles du diclofénac sodique.

- Préparation de la solution de BSA :

La solution du sérum de l'albumine saline est préparée en introduisant une quantité appropriée du BSA dans de l'eau distillée.

- Préparation de la gamme

Dans des tubes à essai, on introduit un volume connu de chaque concentration de nos deux échantillons et de la solution de référence avec un volume connu de la solution BSA et d'une solution tampon de phosphate saline. Les mélanges ont été incubés, à température de 37°C pendant 15 min puis à 70°C pendant 5 min. A l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis, on procède à la lecture des différentes solutions. La lecture est effectuée à la longueur d'onde 660 nm. L'estimation de l'activité anti-inflammatoire est exprimée par la valeur du pourcentage d'inhibition (%I) calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\% I = 100 \times \frac{(Abs_0 - Abs_1)}{Abs_0} \quad \text{(IV.4)}$$

Avec :

$Abs_0$  : Absorbance de la solution BSA.

$Abs_1$  : Absorbance de la solution des échantillons ou de Diclofenac sodique.

### IV.9.3. Activité antibactérienne

Les analyses microbiologiques ont été réalisées au niveau du Laboratoire de microbiologie du CRD Saidal, selon la méthode de diffusion des disques. Le principe de l'activité antimicrobienne consiste à réaliser une culture microbienne sur un milieu de culture, en présence de disques imbibés de la Cur-brute et la Ns de cur . Si ces derniers ont une activité antimicrobienne, on observera une zone d'inhibition autour du disque due à la diffusion des échantillons.

#### IV.9.3.1. Les souches utilisées

##### a. *Escherichia coli*

*Escherichia coli* : ce sont des gastro-entérites dues à des souches entéro-pathogènes d'*Escherichia coli* (*E.coli*) qui est un hôte normal du tube digestif, mais qui devient pathogène dans certaines conditions. Ces germes provoquent des troubles graves (diarrhée violente, nausées, vomissements), 12 heures après l'ingestion du repas chez le jeune qui peut en succomber. Chez l'adulte, des céphalées sont en plus observées. Les aliments dangereux sont les produits laitiers manipulés ainsi que les viandes. Les colibacillooses proviennent principalement de la mauvaise hygiène des mains.[131]

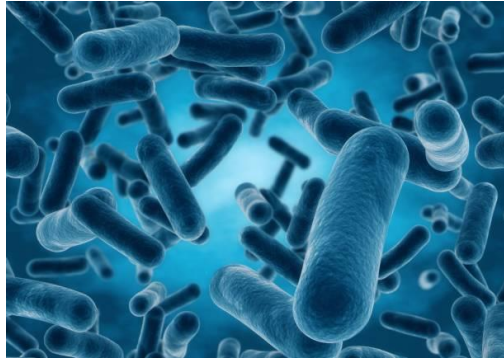


**Figure IV.5 :** Aspect microscopique de la souche *Escherichia coli*.

##### b. *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis*, bactérie ubiquitaire à Gram positif, catalase positive, aérobie pouvant se développer en anaérobiose, mobile par des flagelles peritriches, formant des spores très résistantes dont l'élimination efficace nécessite des conditions particulières. Malgré le fait qu'il s'agisse d'une bactérie à faible potentiel pathogène, elle peut donner lieu à de redoutables infections dans certains cas ou encore être à l'origine d'une intoxication alimentaire d'où l'importance de l'application des recommandations en matière d'hygiène

et stérilisation afin d'éviter ces risques. C'est une bactérie modèle très étudiée dont le génome, entièrement séquencé, est facilement transformable au laboratoire. Sa culture aisée et sa maniabilité ont permis son exploitation dans divers domaines ce qui lui confère une valeur économique et scientifique très importante. Les applications de *B. subtilis* concernent plusieurs domaines notamment le domaine médical, agro-alimentaire, écologique. Elle occupe également une place importante dans l'industrie des détergents et du tannage.[132]



**Figure IV.6 :** Aspect microscopique de la souche *Bacillus subtilis*

#### IV.9.3.2. Mode opératoire

##### a. Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture jeune de 18h, on réalise des suspensions en prélevant 3 à 5 colonies bien isolées et identiques qu'on introduit dans 05 ml d'eau physiologique stérile. Après agitation au vortex pendant quelques secondes, on fait une lecture de la transmittance avec le spectrophotomètre à une longueur d'onde de 620 nm et qui doit être entre (22%-32%), ce qui correspond à une concentration de 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> germes /ml.

**NB :** si la valeur obtenue de la première lecture pour les bactéries n'est pas comprise dans les intervalles voulus, les concentrations doivent être ajustées en ajoutant soit l'eau physiologique ou les colonies, et l'inoculum doit être utilisé dans les 15 minutes qui suivent sa préparation.

##### b. Examen de l'échantillon :

- ✓ Préparation de la 1<sup>ère</sup> couche du milieu :



On fait fondre le milieu gélosé Muller-Hinton dans un bain–marie à 95°C et on verse aseptiquement une première couche dans les boîtes de Pétri à raison de 15ml par boîte avec 03 répétitions par souches puis on laisse refroidir et on solidifie sur la paillasse.

✓ Préparation de la 2<sup>ème</sup> couche du milieu :

De même, on fait fondre le milieu gélosé Muller-Hinton dans un bain–marie à 95°C, on baisse la température jusqu'à 45°C et on remplit des flacons en verres stériles avec 50ml de ce dernier, on ensemence les milieux de culture avec 200µl de chaque suspension et on agite manuellement les flacons puis on transvase rapidement 4ml de chaque milieu inoculé en 2ème couche sur la surface des boîtes contenant déjà la 1ère couche de gélose et on étale rapidement en faisant pivoter la boîte sur elle-même pour avoir une surface uniforme puis on laisse se solidifier sur la paillasse.

c. Préparation des dilutions

Nous avons établi pour cette étude une gamme de dilutions pour la curcumine brute et la poudre de curcumine lyophilisée en partant d'une concentration de solution mère de 50 mg /25ml de DMSO à des concentrations de solution filles allant de 0.1mg/ml à 2 mg/ml.

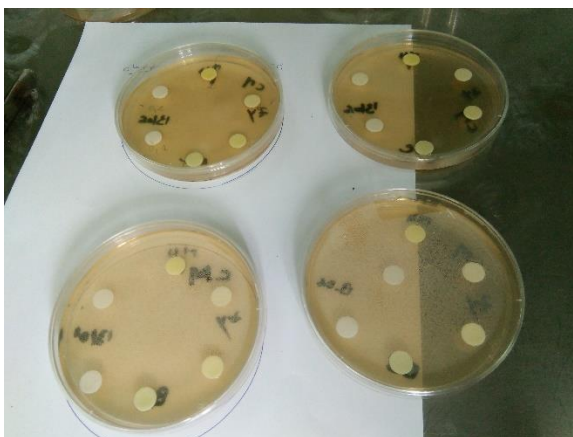


**Figure IV.7 :** Dilution de la Cur brute et la poudre lyophilisée de la NS de Cur dans le DMSO

d. Dépôts des disques :

A l'aide d'une pince stérile, on prélève un disque stérile de 9 mm, on l'imbibe avec

la Cur-brute et la NS de Cur, en le mettant seulement en contact avec le bout du disque celui-ci va absorber progressivement jusqu'à imprégnation totale du disque comme illustré sur la figure ci-dessous :

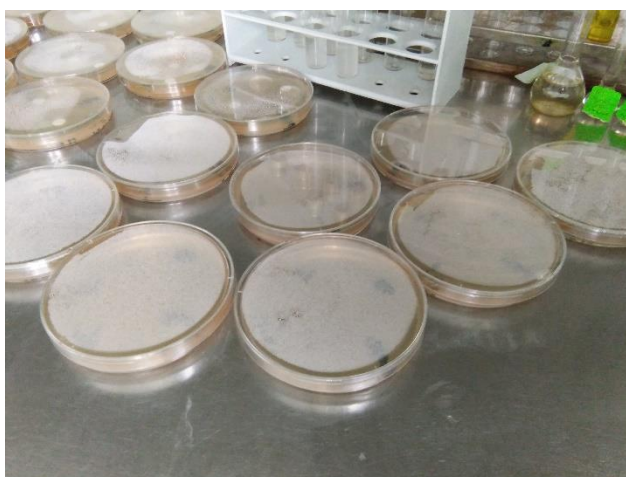


**Figure IV.8 :** Disques imprégné et déposé sur le milieu de culture

e. Expression des résultats :

L'évaluation qualitative de la Cur-brute et la NS de Cur est exprimée par la mesure des diamètres des zones d'inhibition obtenues après incubation pendant 24 h à 37°C à l'aide d'une règle.

**NB :** On a préparé deux boîtes de pétrie pour chaque échantillon et chaque bactérie.



**Figure IV.9 :** échantillons prêt pour incubation

#### **IV.10. Etude de dissolution in vitro**

Ce test a été réalisé afin de déterminer le profil de dissolution de la Cur brute et de la poudre lyophilisée de NS de Cur dans des conditions opératoires bien définies afin de faire une comparaison. Il permet notamment l'estimation de la libération du PA de sa forme galénique dans l'intestin en utilisant un dissolu-test de type USP (ERWEKA) à palettes tournantes, muni de 08 vases d'une capacité d'un litre qui permettent d'effectuer des analyses de dosage pour chaque échantillon, dans lesquels le milieu de dissolution est incorporé. Les vases sont plongés dans un bac rempli d'eau muni d'une résistance permettant de chauffer l'eau à la température désirée (37°C : température du corps). Les palettes tournantes permettant une agitation continue du milieu de dissolution et la dispersion de l'échantillon à analyser.

40 mg de Cur brute et de la NS de Cur a été utilisée pour le test de dissolution avec 500 mL de tampon phosphate salin (pH 7) à 37 ° C qui simule le fluide intestinal sous 100 tr / min. Des aliquotes de solution (5 ml) ont été collectées à des intervalles de temps (15, 25, 40, 55, 85 et 120 min) puis filtrés à travers un Filtre seringue de 0,45 µm et un volume égal de tampon blanc (5 ml) a été ajouté pour maintenir le même volume de milieu de dissolution. Le dosage des échantillons prélevés et filtrés a été effectué par méthode spectrophotométrique UV/Visible à une longueur d'onde de 426 nm pour la Cur et 212 nm pour la NS de Cur.

#### **IV.11. Forme galénique**

Afin de trouver une administration adéquate pour notre curcumine, nous avons introduits la poudre de NS de Cur lyophilisée dans des sachets unidoses. La propriété uniformité de masse a été prise en considération.

# *CHAPITRE V*

---

## *Résultats et discussions*

## Chapitre V. Résultats et discussions

### V.1. Introduction

Dans ce chapitre seront présentés les principaux résultats expérimentaux obtenus avec les interprétations. Ils seront structurés comme suit :

- ✓ Caractérisation de la matière première « curcumine »,
- ✓ Formulation de la nanosuspension de curcumine,
- ✓ Études physico-chimiques, biologiques et biodisponibilité in vitro.

### V.2. Caractérisation de la curcumine

#### V.2.1. Tests de solubilité :

Le problème majeur de la curcumine est son insolubilité dans l'eau et donc sa biodisponibilité très limitée. Pour réaliser nos différentes expériences, il fallait sélectionner le bon solvant pour notre matière première.

Le tableau ci-dessous illustre les résultats du test de solubilité effectué à 22°C :

**Tableau V.1** : la solubilité de la curcumine dans les différents solvants

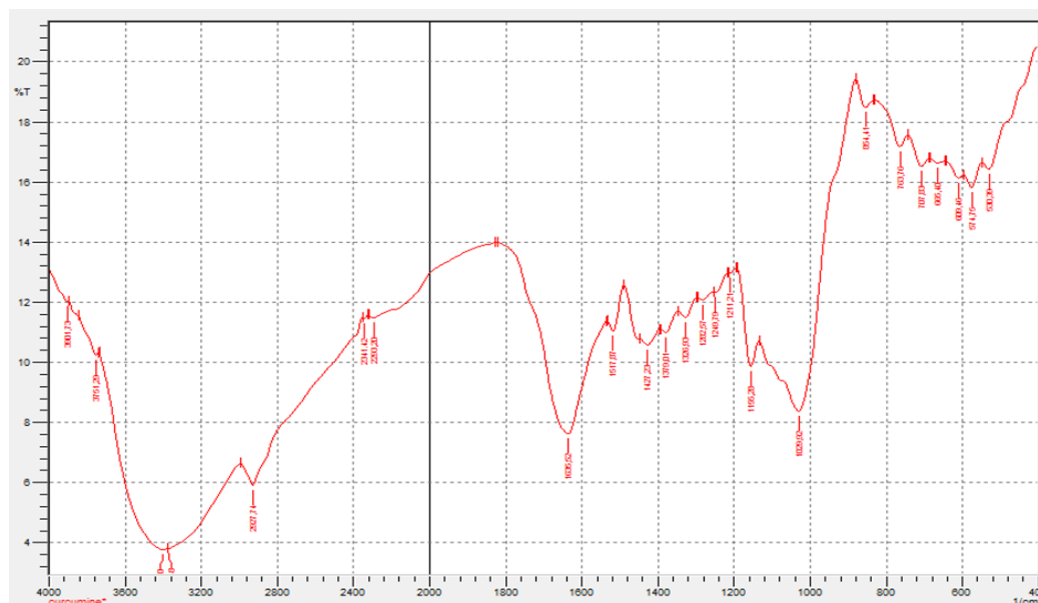
Solvant	Eau	Ethanol	Méthanol	DCM	Acétate d'éthyle	DMSO
Solubilité	-	+	+	++	++	+++

Les résultats du tableau **V.1** révèlent que la curcumine est soluble dans les solvants organiques polaires et insoluble dans les solvants apolaires comme l'eau.[133]

#### V.2.2. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

Le spectre IR de la curcumine (Cf. figure V.1), indique une bande large et intense dans la région  $3402\text{ cm}^{-1}$ . Cette bande est attribuée à la fréquence de vibration d'élongation de la liaison O-H sur le phénol. Deux bandes d'absorption sont localisées à 1635 et 1517  $\text{cm}^{-1}$  qui correspondent respectivement aux mélanges de vibrations d'étirement de  $\nu(\text{C}=\text{O})$  et  $\nu(\text{C}=\text{C})$ . Une bande d'absorption est située à 1250  $\text{cm}^{-1}$  et une autre est localisée à 1030  $\text{cm}^{-1}$ , ces deux bandes correspondent respectivement aux vibrations  $\nu(\text{C}-\text{O})$  et  $\nu(-\text{OCH}_3)$ . [134]

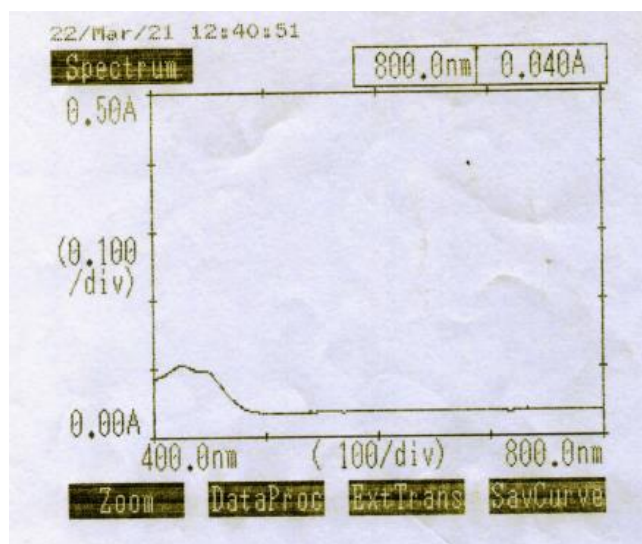
NB/ Le KBr ne présente aucun pic dans le domaine exploité, toutes les bandes de vibrations enregistrées sont donc propres à la curcumine.



**Figure V.1 :** Spectre IR de la curcumine

### V.2.3. La spectroscopie Ultraviolet-Visible

Afin de déterminer la longueur d'onde d'absorption maximale de la curcumine dissoute dans le DMSO, un balayage dans le domaine situé entre 100 et 800 nm a été réalisé. La figure ci-dessous illustre le spectre obtenu.



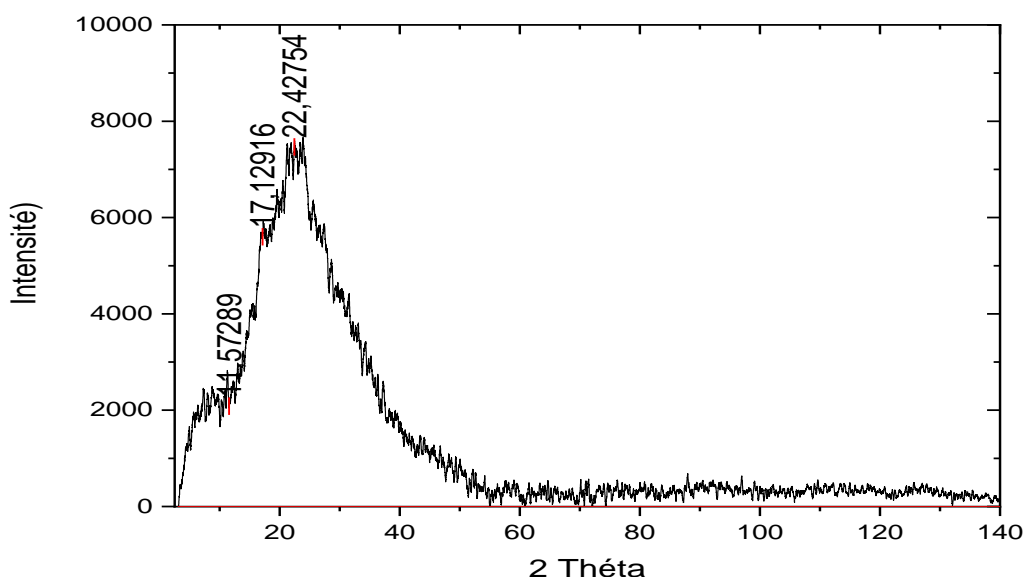
**Figure V.2 :** Spectre UV de la curcumine.

La Figure V.2 montre le spectre d'absorption UV-Vis de la curcumine dans le DMSO. On observe dans ce spectre une bande d'absorption maximale située à  $\lambda_{\max} = 426$  nm, cette longueur d'onde est similaire à celle mentionnée dans la bibliographie.[135]

Dans ce cas, on peut utiliser l'UV-Vis comme outil de caractérisation qualitative de notre substance active.

#### V.2.4. Diffraction aux rayons X

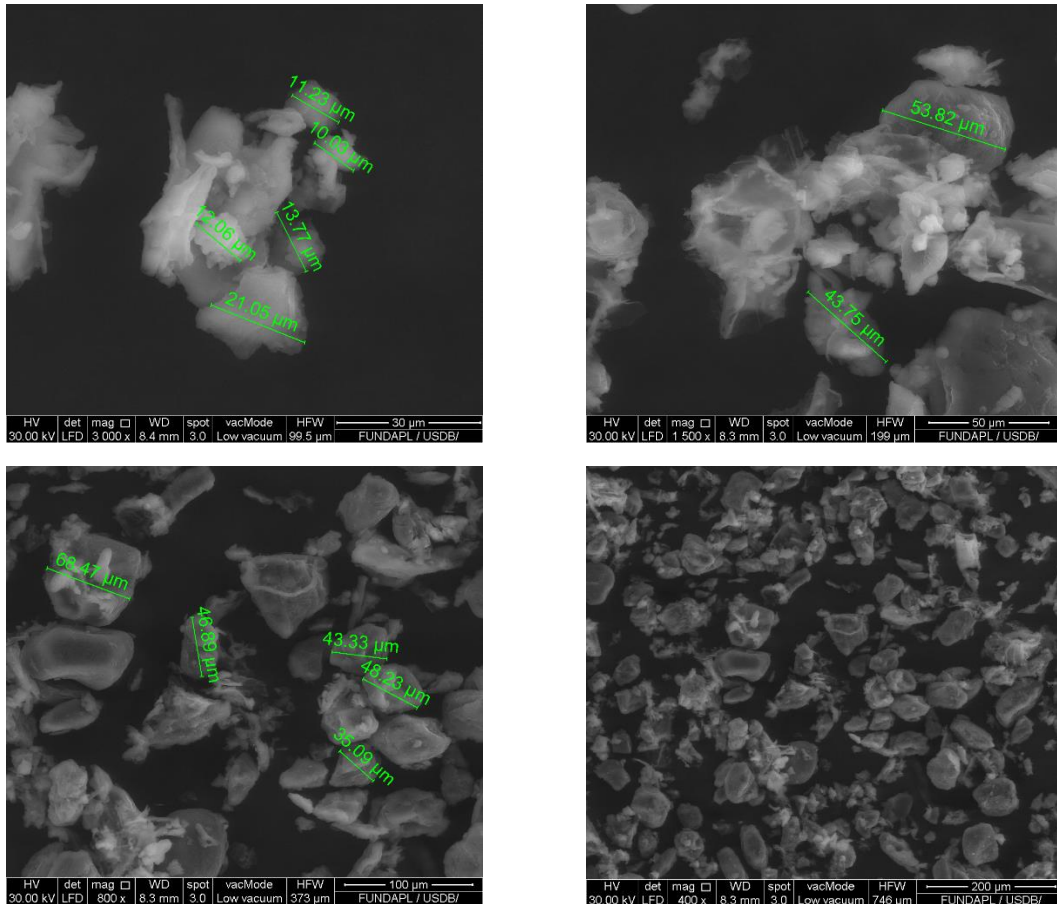
Le diffractogramme DRX de la curcumine solide brute est présenté sur la figure V.3. Comme indiqué sur le spectre de la curcumine pure, un seul pic bien distinct caractéristique à un angle de diffraction de  $2\theta$  égal à 22.4. Les autres pics adjacents ne sont pas très significatifs. Cela révèle que la curcumine brute est relativement présente sous forme en quasi-totalité amorphe.



**Figure V.3 :** Diffractogramme de la Cur brute

#### V.2.5. Microscopie électronique à balayage (MEB)

La morphologie de la Cur a été observée à l'aide d'un microscope électronique à balayage. D'après l'image, il apparaît clairement que les particules primaires de curcumine brute possèdent une morphologie large et irrégulière et une structure hétérogène : bâtonnets, sphères, agglomérats avec des tailles différentes à l'échelle micrométrique. (Cf. Figures V.4)



**Figures V.4 :** MEB de la curcumine brute à différentes prises

#### V.2.6. Taille des particules

L'analyse granulométrique par voie sèche a révélé que le diamètre moyen de la Cur brute est de 53  $\mu\text{m}$ , ce qui concorde parfaitement avec la distribution granulométrique de la curcumine indiqué dans la bibliographie.[136]



**Figure V.5 :** Particules de la curcumine retenue au tamis.



### V.3. Micronisation de la curcumine

#### V.3.1. Criblage des stabilisants

Le processus de nanodimensionnement est sensible au choix des stabilisants car les stabilisants (excipients polymères et/ou tensioactifs) peuvent empêcher l'agglomération des particules et compenser l'énergie libre supplémentaire des surfaces fraîchement exposées. Dans notre étude, il a été constaté que la curcumine était uniformément dispersible dans tous les tensioactifs que nous avons testés.

Le Tableau V.2 illustre les résultats d'études de criblage de stabilisants. Il a été constaté qu'une augmentation substantielle de la taille a été obtenue avec le tween 80. Dans le cas de la gomme arabique, la distribution des tailles est devenue large. Les tailles de particules obtenues avec la lécithine de soja étaient micrométriques. La combinaison entre la lécithine de soja et la gomme arabique a donné le meilleur résultat.

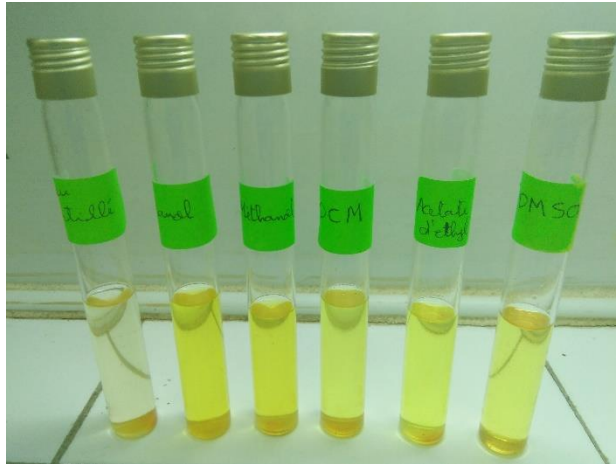
**Tableau V.2 :** Suivi de la stabilité des différentes NS en fonction du temps

Surfactants	Taille (nm)	
	Jour N°01	Jour N°07
Tween 80	<b>10.6</b>	<b>655.7</b>
Gomme arabique	<b>192.5</b>	<b>364.2</b>
Lécithine de soja	<b>3600.1</b>	<b>3783.6</b>
Combinaison lécithine de soja /gomme arabique	<b>119.1</b>	<b>124.7</b>

#### V.3.2. Choix du solvant

Divers solvants miscibles à l'eau ont été testés et le solvant dans lequel la quantité maximale de Cur dissoute a été sélectionnée comme phase solvant pour des études ultérieures en tenant compte de la toxicité de ces derniers. La figure (V.6) montre la solubilité du CUR dans différents solvants organiques. Le DMSO s'est avéré donner la solubilisation maximale de la Cur par rapport aux autres solvants mais compte tenu de sa toxicité probable, on a opté pour l'acétate d'éthyle qui a aussi démontré une bonne solubilisation de la Cur par rapport aux autres solvants.

Avec les restrictions imposées à l'utilisation de solvants chlorés tels que le dichlorométhane, il est raisonnable d'utiliser de l'acétate d'éthyle, un solvant polaire, pour fournir une qualité de produit acceptable et des rendements commercialement viables. L'ordre de solubilité du CUR dans divers solvants tamisés s'est avéré être : DMSO > acétate d'éthyle > éthanol > méthanol > eau distillée.



**Figure V.6 :** La solubilité de la curcumine dans les différents solvants

### V.3.3. La formulation de la nanosuspension

Le choix de la combinaison gomme arabique et lécithine de soja est dicté par le caractère naturel de ces deux produits. La formulation obtenue a présenté une couleur jaune clair, moins de variabilité structurale, une dispersion lisse et bien homogène



**Figure V.7 :** Nanosuspension de curcumine avec lécithine de soja et gomme arabique comme stabilisants

#### V.4. Lyophilisation de la nanosuspension

La Ns de curcumine a été lyophilisée pour une meilleure conservation dans le temps car cette dernière fournie à la nanosuspension plus de stabilité en évitant le murissement d'Ostwald.[136]. La poudre obtenue après lyophilisation est illustrée ci-dessous :



**Figure V.8 :** Poudre de la NS de curcumine lyophilisée et broyée

La poudre obtenue a présenté une couleur différente de celle de la curcumine brute. Il semble la curcumine a été encapsulée dans le mélange de stabilisants.

#### V.5. Caractérisation de la nanosuspension

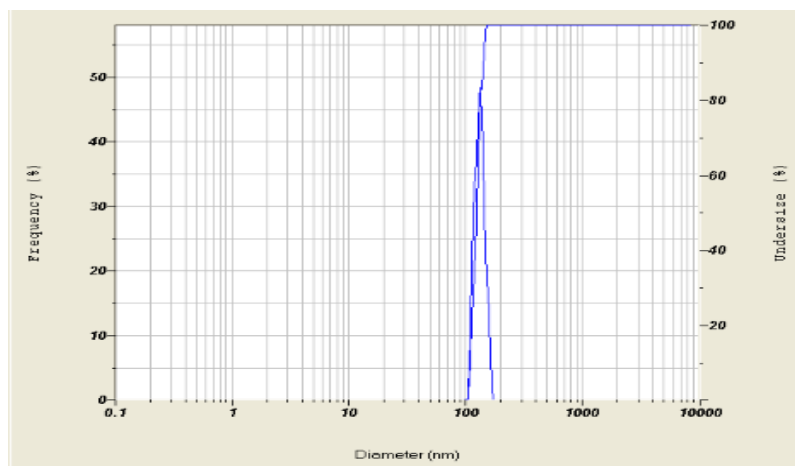
##### V.5.1. Taille des particules de la nanosuspension

Les tailles des particules ont été mesurées pendant 8 jours successifs à la même heure et la dernière valeur que nous avons notée J inf correspond à deux mois depuis J1

**Tableau V.3 :** Taille des particules de la NS de Cur avec le temps

Jours	Taille des particule ( nm )			Taille moyenne	Indice de polydispersité			PI moyen
	Essai N°01	Essai N°02	Essai N°03		Essai N°01	Essai N°02	Essai N°03	
<b>Jour 1</b>	116.1	119.8	121.4	119.1	0.489	0.418	0.426	0.444
<b>Jour 2</b>	120.4	150.3	120.6	130.43	0.400	0.528	0.411	0.446
<b>Jour 3</b>	114.1	103.4	81.8	99.76	0.421	0.530	0.453	0.468
.								
.								
<b>Jour 8</b>	105.4	124.7	89.4	106.4	0.659	0.511	0.303	0.491
<b>J inf</b>	219.2	223.2	213.8	218.7	0.491	0.422	0.476	0.463

La taille des particules de NS présente une importance primordiale dans les performances des systèmes d'administration de médicaments par voie orale. Il est présenté comme le diamètre hydrodynamique moyen des particules. La mesure de la taille des particules était nécessaire pour confirmer la production des particules dans la nano-gamme. Il a été observé que la granulométrie de la formulation était de 119.1 nm avec un PDI de 0,4 indiquant que la formulation est monodisperse ceci est justifié par une courbe monomodale. (Cf. Figure V.9)



**Figure V.9 :** Courbe de la distribution de taille de la nanosuspension

#### V.5.2. Charge des particules

**Tableau V.4 :** Potentiel zêta de la NS de curcumine

Jours	Potentiel zêta ( mV)			Moyenne (mV)
	Essai N°01	Essai N°02	Essai N°03	
<b>Jour 1</b>	-19.3	-22.8	-17.4	-19.83
<b>Jour 2</b>	66.8	-20.2	45.5	30.7
<b>Jour 3</b>	31.1	34.2	45.7	37
•				
•				
<b>Jour 8</b>	17.5	13.2	19.3	16.66
<b>J inf</b>	28.7	27.4	8.6	15

L'amplitude du potentiel zêta est une indication de la force répulsive présente dans les nanoparticules et un facteur clé pour prédire la stabilité à long terme du système de dispersion colloïdale. Le potentiel zêta présente un effet important dans le stockage et la stabilité du système de dispersion colloïdale et cela reflète les barrières électrostatiques qui pourraient empêcher les nanoparticules de l'agrégation et de l'agglomération et par conséquent la déstabilisation.

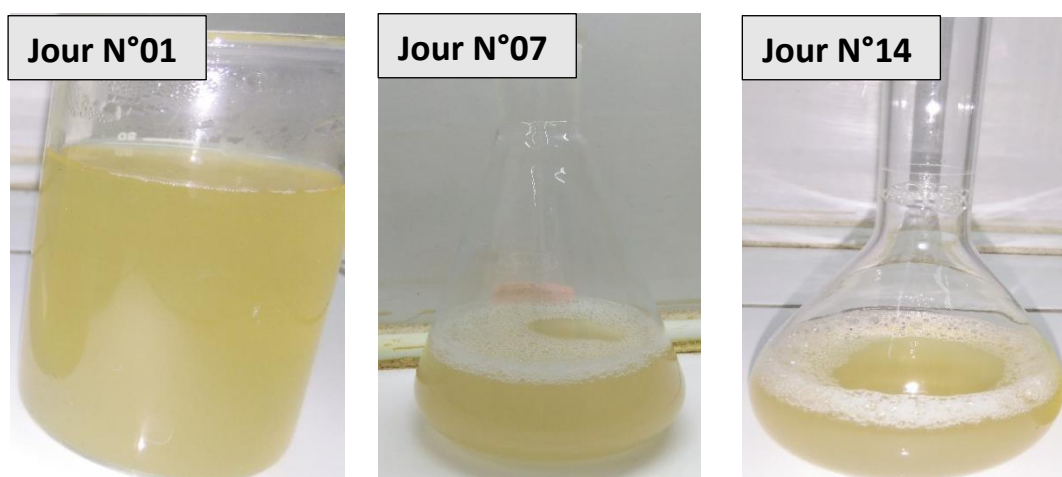
Il est bien connu que le potentiel zêta dans la plage  $\pm 30$  mV et  $\pm 20$  mV est considéré comme idéal pour la NS électrostatique et la NS stabilisé par effet stérique respectivement.[12]

Dans notre étude, les polymères utilisés sont des stabilisants non ioniques qui donnent une NS stabilisée par effet de répulsion stérique qui empêche ainsi les particules de se rapprocher les unes des autres.

A la lumière des valeurs du potentiel zêta obtenues, on peut dire que la NS préparée est stable dans la durée de l'étude.

#### V.5.3. Suivi de l'aspect visuel de la nanosuspension

Après deux semaines, les observations visuelles ne mettent pas en évidence une variation de l'homogénéité (changement de couleur, séparation de phase, migration, etc.) supérieur à un niveau acceptable, alors notre nanosuspension a été jugée stable dans l'intervalle du temps choisi.



**Figures V.10 :** Suivi de la stabilité de la nanosuspension pendant 14 jours

#### V.5.4. Taille, potentiel zêta et stabilité la nanosuspension après lyophilisation

**Tableau V.5 :** Taille, indice de polydispersité et potentiel zêta de la poudre de la NS lyophilisé

	Taille (nm)	Indice de polydispersité	Potentiel zêta (mV)
Essai N°01	<b>192.6</b>	<b>2.111</b>	<b>47.6</b>
Essai N°02	<b>158.4</b>	<b>1.251</b>	<b>57.5</b>
Essai N°03	<b>225.2</b>	<b>0.831</b>	<b>2.1</b>
Moyenne	<b>192.06</b>	<b>1.398</b>	<b>35.73</b>

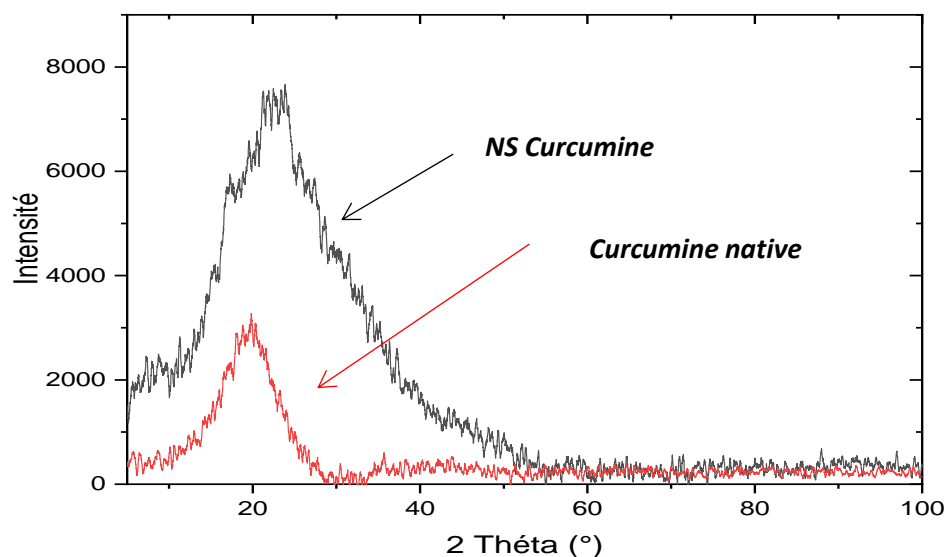
La taille des nanoparticules après la lyophilisation a augmenté de 119.1 nm jusqu'à 192.06 nm. La taille des particules a augmenté suite à leur agrégation ; l'agrégation des particules pendant la lyophilisation est inévitable malgré l'utilisation d'un cryoprotecteur.[137]

Le potentiel zêta pourrait prédire la stabilité au stockage de la nanosuspension. Dans notre étude, le potentiel zêta de la nanosuspension reconstituée de la poudre lyophilisée était de 35.73 mV Cette valeur garantissait la stabilité de la nanosuspension reconstituée.[136]

#### V.5.5. Diffraction des rayons X

La diffraction par rayons X nous a permis d'avoir une idée sur l'état d'organisation des atomes à l'intérieur de notre réseau atomique. C'est ainsi que l'examen des spectres RX de la formulation stabilisée par la gomme arabique et la lécithine de soja montre des pics à des angles deux  $\theta$  de 17,3 et 19,8, indiquant la nature amorphe de la NS de Cur et laisse supposer que la curcumine s'est dispersée de manière moléculaire dans la gomme arabique et la lécithine de soja. Cependant, l'intensité du pic a été augmentée par rapport à la curcumine pure. La nanonisation a provoqué une intensification de l'état amorphe par réorganisation complète de la structure provoquée par la présence des excipients.

La figure ci-dessous illustre les spectres DRX de la curcumine native et la curcumine à l'état nanométrique



**Figure V.11 :** superposition des diffractogramme de la Cur brute et de la NS de Cur lyophilisé

La figure V.11 qui représente les spectres de la Cur brute et de la NS de Cur lyophilisé superposées. Lors de l'examen, on remarque que les pics sont présents pour la même valeur de 2 thêta, ce qui suggère que la Cur a conservé son état amorphe et que la molécule de curcumine qu'on a utilisée ne présente pas de polymorphisme.

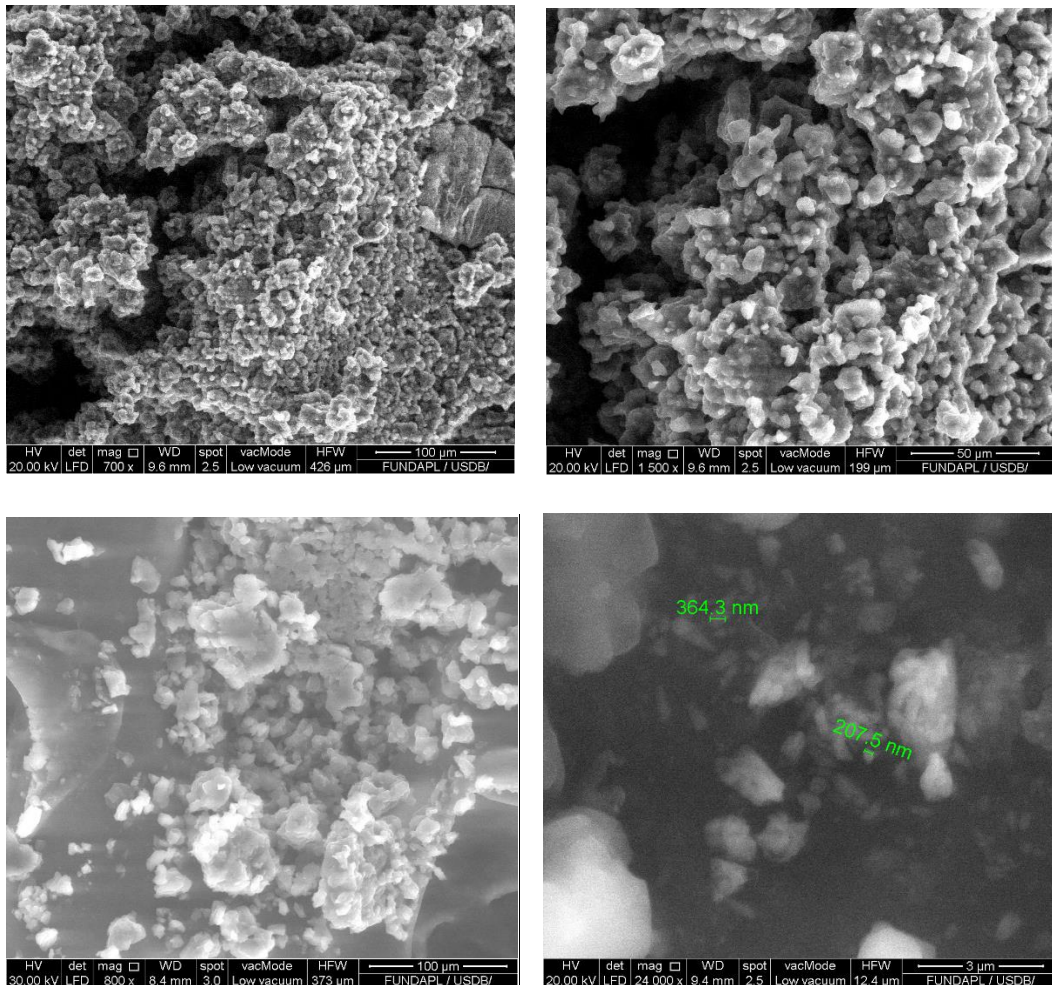
Par contre, notre résultat n'est pas en accord avec la bibliographie qui confirme que la curcumine brute présente un état cristallin. Ce qui nous a laissé supposer que la curcumine utilisée comme matière première n'était pas pure et notre hypothèse a été confirmée par mesure des points de fusion.

#### V.5.6. Observations par MEB

Afin d'observer la morphologie et la structure de la curcumine à l'état nanométrique, des images par microscopie MEB ont été prises.

Les figures V.12 ci-dessous montre les images MEB de la poudre lyophilisée obtenue à partir de la NS dans des conditions optimales. Les nanoparticules ressemblent à des perles sphériques ou ellipsoïdales avec une structure poreuse et une distribution de taille non uniforme. La morphologie a complètement changé par rapport à la Cur brute. La taille mesurée était plus grande que celle obtenue par DLS. Ceci est tout à fait raisonnable

du fait que par ce microscope n'est pas sensible à la taille nanométrique, il faut dans ce cas recourir au microscope électronique à transmission.



**Figures V.12 :** MEB de la poudre lyophilisé de la NS de Cur

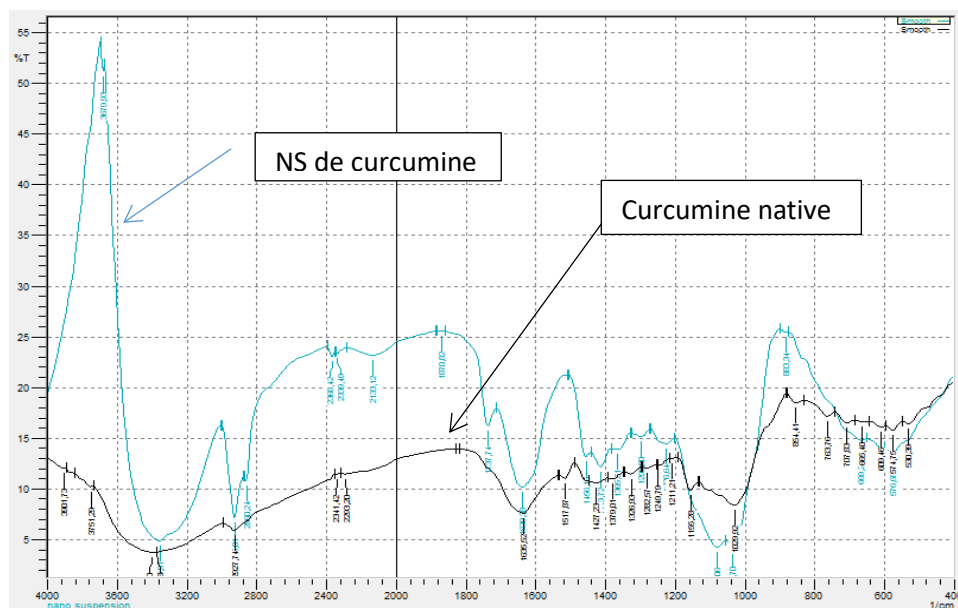
Bien que l'association de la gomme arabique et de la lécithine de soja puissent fournir un encombrement stérique approprié pour inhiber l'agrégation et la croissance des particules, l'agrégation des particules pendant la lyophilisation est inévitable. Le comportement morphologique des particules de curcumine en suspension en présence de polymères a également été confirmé par Thorat et al. [137]. Ils ont également signalé que les particules de curcumine ressemblent clairement à des agrégats, formés par l'assemblage de plusieurs nanoparticules sphériques. La morphologie de la poudre lyophilisée de la NS de Cur s'est avérée être influencé par la teneur en stabilisants.



Sur la base de ces photographies, il peut être conclu que la structure très poreuse pourrait être principalement attribuée à la bonne solubilité et à la vitesse de dissolution rapide de la NS de Cur. Cela signifie que l'association de la lécithine de soja et la gomme arabique pourrait couvrir de manière homogène la surface des molécules de curcumine et forme de particules micellaires de formes sphériques. Ces résultats de morphologie bien que non concluantes du point de vue taille mais ont pu prouver que la NS de Cur a été formée avec succès en utilisant une combinaison de lécithine de soja et gomme arabique comme stabilisants.

#### V.5.7. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Le pic de forte intensité des nanoparticules de la NS de Cur observé à 1639  $\text{cm}^{-1}$  a été attribué à la vibration d'étirement du carbonyle de l'énol. On observe une bande à 2925, 1423 et 1298  $\text{cm}^{-1}$ , ce qui pourrait être dû à la vibration d'étirement C-H et à l'apparition de groupes méthyle.



**Figure V.13 :** superposition des spectres FTIR de la curcumine native et la NS de curcumine

Le pic pour les deux formulations correspond au groupe fonctionnel -OCH<sub>3</sub> et C=C qui ont apparu à 2860 et 1639  $\text{cm}^{-1}$ , suggérant que Cur était présente dans NS et ne s'est pas dégradé au cours du processus de préparation. Nous avons également observé un

pic majeur de Cur à environ 3355 cm, qui a été attribué aux vibrations -OH de la fonction phénol liés de manière intermoléculaire.

Le spectre FTIR de la curcumine brute et de la poudre lyophilisée de la NS de la curcumine pour mettre en évidence les interactions entre Cur et les excipients. Comme on le voit, les spectres FTIR semblables démontrent que la structure chimique de la curcumine n'a pas été modifiée après le processus de nanonisation. Cependant, le spectre FTIR des nanoparticules de curcumine lyophilisées a montré quelques petites différences dans les plages de 800 à 400 cm<sup>-1</sup> (étirement C-O), et aussi l'apparition de nouveaux pics comme le pic à 3355 en raison de l'utilisation du stabilisateurs la gomme arabique et lécithine de soja.

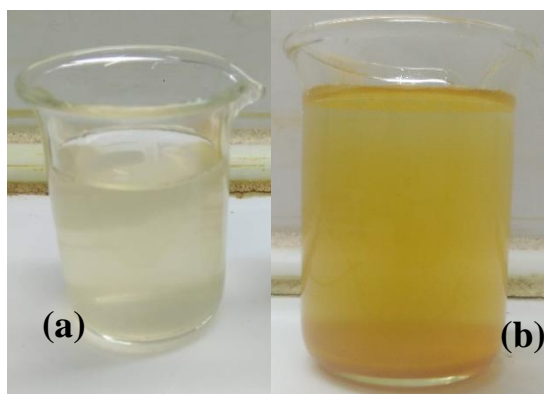
On remarque aussi que l'amplitude des groupements a changé. De plus, il y avait une augmentation de l'intensité pour le pic typique de Cur dans Cur-NS comme cela a été constaté avec le pic à 3402 cm<sup>-1</sup> qui correspond à la fonction phénol, ce qui prouve qu'il y a toujours existence de cette fonction réputée pour être responsable de la majorité des activités biologiques de la curcumine, mais il y'a juste une variation du moment dipolaire des liaisons de la fonction phénolique due au changement d'intensité de la bande , ce changement semble être due au procédé de nanonisation.

#### V.5.8. Comparaison entre la solubilité de la Cur brute et de la NS de Cur

D'après la figure V.14, la poudre lyophilisée de la NS de Cur (a) s'est avéré être librement dispersée dans l'eau en présence de stabilisants par la formation d'un mélange homogène, ce qui est clairement différent de la poudre de Cur brute (b) qui a sédimenté à cause de sa faible solubilité dans l'eau.

Donc on constate que la solubilité de la curcumine dans l'eau a été améliorée après le procédé de nanonisation et c'est le résultat clé le plus recherché dans notre présente étude.

La figure ci-dessous illustre de façon claire les solutions obtenues en dissolvant la curcumine brute et la curcumine lyophilisée dans l'eau.



**Figure V.14** : Solubilité de la poudre lyophilisée de la NS de Cur **(a)** et la poudre de Cur native **(b)** dans l'eau.

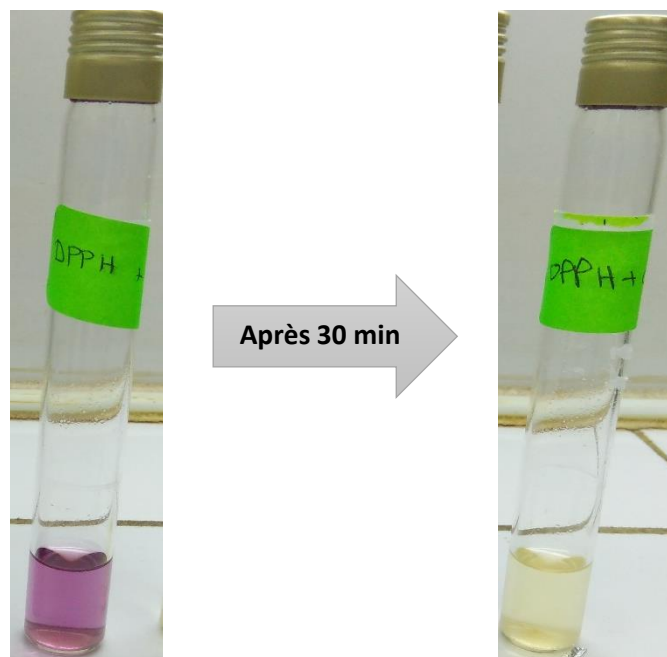
## **V.6. Activités biologiques :**

Dans cette partie de notre travail, on a tenté de mettre en évidence l'effet de la réduction de la taille des particules de curcumine, cette dernière molécule très réputée pour ses activités biologiques et thérapeutiques prouvées.

### **V.6.1. Activité antioxydante**

Nous avons effectué cette étude comparative de l'activité antioxydante de la Cur brute et de la NS de Cur par la méthode du DPPH, une méthode reconnue comme étant simple, rapide et efficace en raison de la grande stabilité du radical DPPH.

Les figures ci-dessous illustre le changement de la couleur des échantillons après les 30min l'incubation :

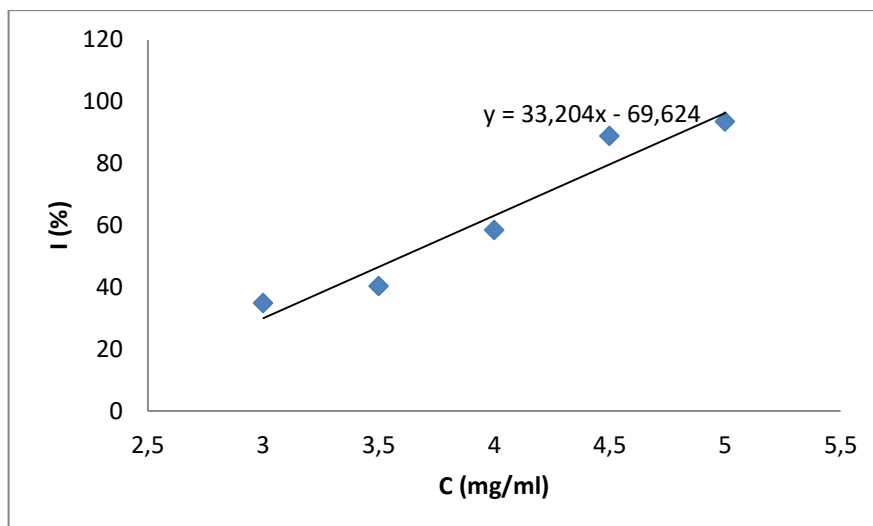


**Figures V.15 :** échantillons avant incubation et après incubation

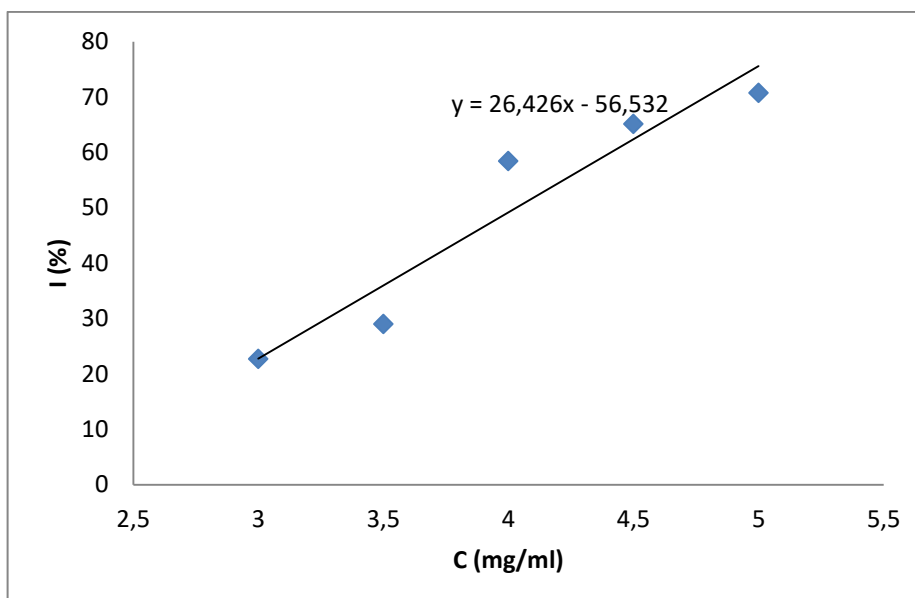
La mesure de l'absorbance de chaque concentration nous a permis de calculer les pourcentages d'inhibitions en fonction de la concentration (IC%) selon :

$$I\% = [(Abs\ contrôle - Abs\ test) / Abs\ contrôle] \times 100 \dots \dots \dots (V.1)$$

Ces derniers nous ont servi à tracer les courbes (V.16) et (V.17) qui représentent la variation du pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations de la Cur brute et de la NS de Cur respectivement.



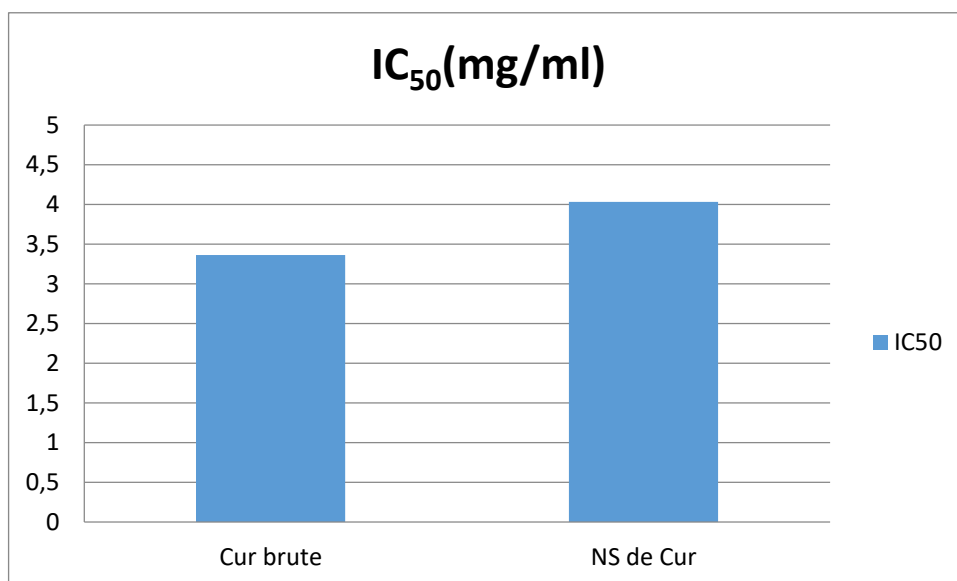
**Figure V.16 :** Pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations de la Cur brute



**Figure V.17 :** Pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations de la NS de Cur

Les  $IC_{50}$  de la Cur brute et la NS de Cur sont calculés à partir de la partie linéaire des courbes de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des différents composés à tester. A partir des équations  $y=33.204x-69.624$ ,  $y=26.426x-56.532$  et qui correspondent respectivement à la Cur brute et la NS de Cur, nous avons pu déterminer les

valeurs de l'IC<sub>50</sub>, qui sont **3.362 mg/ml** pour la Cur brute et **4.03 mg/ml** pour la NS de Cur. Ces résultats ont été présentés sous forme d'histogramme :



**Figure V.18 :** Histogramme des valeurs des concentrations inhibitrices IC<sub>50</sub> de la Cur brute et de la NS de Cur

De ces résultats, nous pouvons déduire que la réduction de 50% du DPPH a été atteinte. Pour tous les produits testés. Il apparaît que la Cur brute présente une activité antioxydante plus élevée à celle de la NS de Cur car l'IC<sub>50</sub> de la Cur brute est inférieure à l'IC<sub>50</sub> de la NS de Cur comme montre l'histogramme illustré dans la figure V.18. Ceci est probablement attribué au stabilisant (lécithine de soja et gomme arabique) ajoutée à la NS de Cur, ces stabilisant ont augmenté la viscosité du milieu et par conséquent ont diminué la mobilité, ce qui a réduit les chocs entre les molécules de curcumine et le DPPH. [138]

Donc cette étude a montré que l'activité antioxydante de la curcumine est peut-être attribuée à son groupement hydroxyle phénolique et que la nanonisation de la curcumine n'a pas altéré son activité antioxydante.

### V.6.2. Activité antiinflammatoire in vitro

Nous avons effectué un criblage pour déterminer la concentration pour laquelle nous pouvons évaluer l'activité anti-inflammatoire en évaluant l'effet inhibiteur de la dénaturation d'albumine de la BSA pour la Cur brute et la NS de Cur en comparaison avec l'effet inhibiteur du Diclofenac utilisée comme contrôle positif, donc nous avons réalisé ce test sur 3 différentes concentrations pour chaque échantillon (0.0001, 0.1 et 1 mg/ml).

D'après les résultats d'absorbances obtenues, nous avons choisi la concentration de 0.1 mg/ml pour estimer et comparer l'effet inhibiteur de la Cur brute et de la NS de Cur. Le pourcentage d'inhibition (%I) a été calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\% I = 100 \times \frac{(Abs_0 - Abs_1)}{Abs_0} \quad (V.2)$$

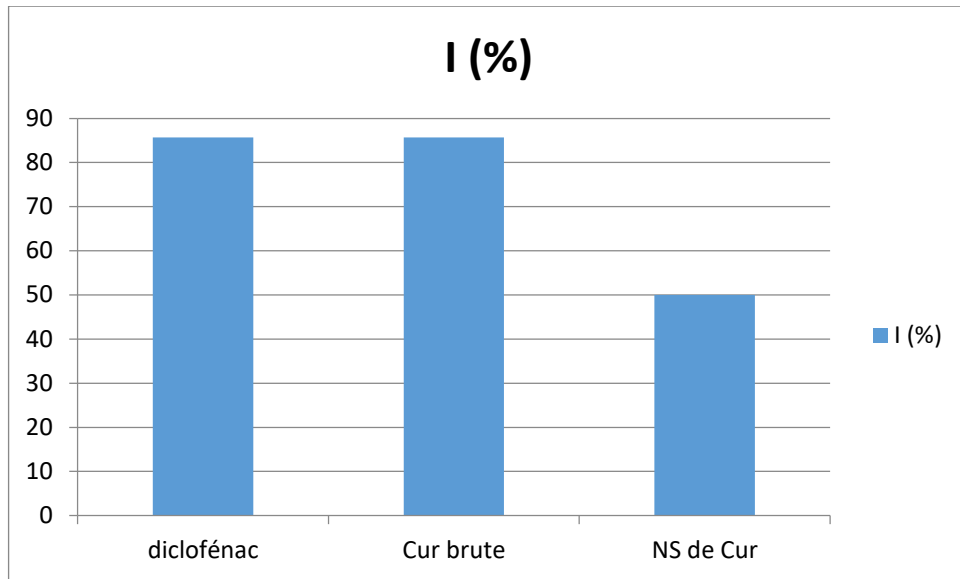
Les résultats de l'effet inhibiteur de la dénaturation de la BSA à la concentration de 0.1 mg/ml de chaque échantillon sont résumés dans le tableau V.6 et l'histogramme illustré dans la figure V.19 :

**Tableau V.6 :** Effet inhibiteur de la dénaturation de BSA par la Cur, la NS de Cur et le Diclofenac

	<b>Cur brute</b>	<b>NS de Cur</b>	<b>Diclofenac</b>
<b>Le pourcentage d'inhibition (%)</b>	85.71	50	85.7

L'effet maximum d'inhibition et de dénaturation de la Cur brute et de la NS de Cur à la concentration de 0.1 mg/ml était respectivement de 85.71 % et de 50%, alors que le standard du Diclofenac à 0.1 mg/ml a montré une inhibition de 85.7% de la dénaturation de la BSA.

De ces résultats, nous pouvons déduire que l'activité anti-inflammatoire de nos produits a été atteinte.



**Figure V.19 :** Histogramme présentant les pourcentages d'inhibition de la Cur brute, la NS de Cur et le Diclofenac

Selon l'histogramme ci-dessus, on remarque la Cur brute présente une activité anti-inflammatoire plus élevée que celle de la NS de Cur, ce résultat est confirmé en comparant le pourcentage d'inhibition et de la dénaturation de la BSA de la Cur brute, la NS de Cur et le Diclofenac qui a été utilisée comme contrôle positif :  $I\%$  de Cur brute  $\geq$   $I\%$  de Diclofenac  $>$   $I\%$  de Ns de Cur. Ceci est probablement attribué à l'encapsulation de la curcumine par les stabilisants (lécithine de soja et gomme arabique) ajoutée à la NS de Cur, ce qui a réduit le contact de la molécule de curcumine avec la BSA et par conséquent son effet de dénaturation des protéines a été ralenti.

Nous avons montré par cette étude que la nanonisation de la curcumine n'a pas améliorée son activité anti-inflammatoire et qui est attribuée aux composés phénoliques présents dans la curcumine et qui interagissent avec les régions aliphatiques autour du résidu lysine des protéines de la BSA.[139, 140]

Ce résultat est fort intéressant et nous laisse supposer que la Cur NS semble présenter un profil de libération prolongée, hypothèse à démontrer par des études plus approfondies.



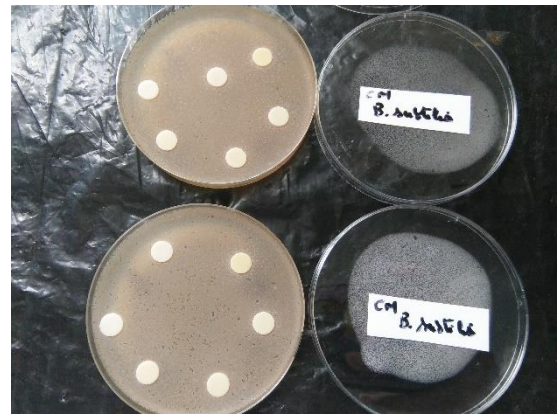
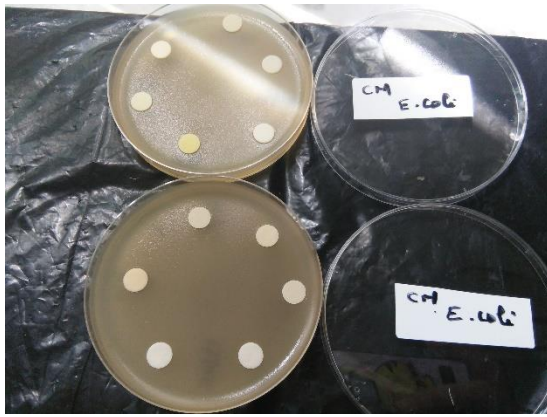
### V.6.3. Activité antibactérienne

Dans notre étude, les activités antibactériennes de la Cur brute et la NS de Cur ont été évaluées contre deux pathogènes (*Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*), en utilisant la méthode de diffusion sur disque sur milieu de culture Muller-Hinton gélosé. Nous avons utilisé le DMSO pour faire la dilution de nos produits.

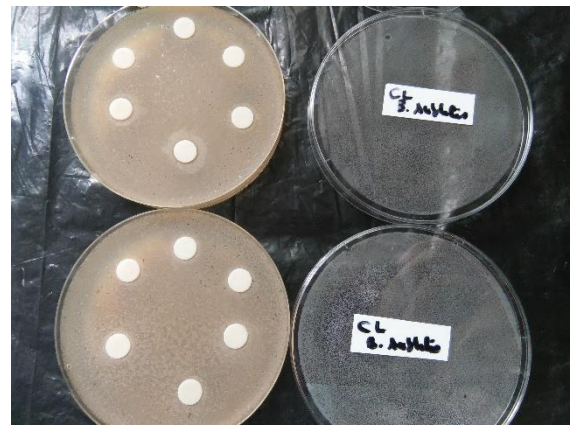
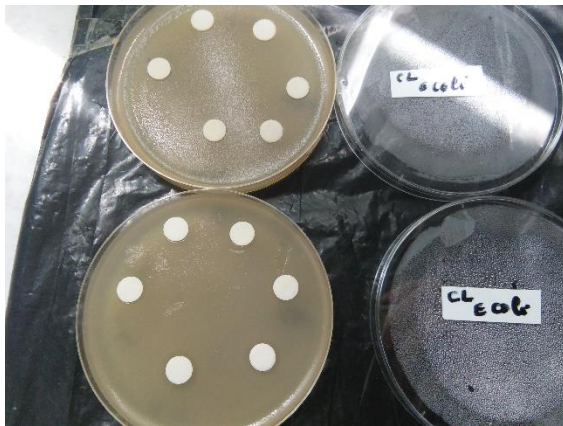
Les résultats des tests de l'activité antibactérienne sont regroupés dans le Tableau V.7 et présentés sur les figures V.20, V.21, V.22. L'action inhibitrice se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque imprégné.

**Tableau V.7 :** Résultat de l'activité antibactérienne de la Cur brute et la Ns de Cur

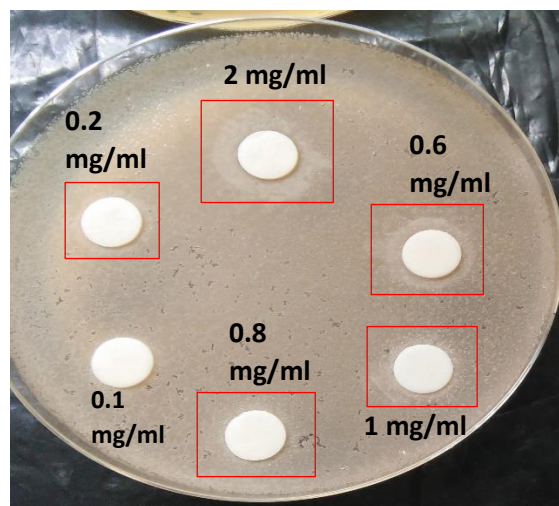
	C (mg/ml)	Zone d'inhibition (mm)	
		<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>
<b>Cur brute</b>	<b>0.1</b>	-	-
	<b>0.2</b>	-	-
	<b>0.6</b>	-	-
	<b>0.8</b>	-	-
	<b>1</b>	-	-
	<b>2</b>	-	-
<b>NS de Cur</b>	<b>0.1</b>	-	-
	<b>0.2</b>	<b>10.5</b>	-
	<b>0.6</b>	<b>13</b>	-
	<b>0.8</b>	<b>15</b>	-
	<b>1</b>	<b>16.5</b>	-
	<b>2</b>	<b>18</b>	-



**Figures V.20 :** Zone d'inhibition de la Cur brute contre *Escherchia coli* et *Bacillus subtilis* respectivement



**Figures V.21 :** Zone d'inhibition de la NS de Cur contre *Escherchia coli* et *Bacillus subtilis* respectivement



**Figure V.22 :** Zoom sur la zone d'inhibition de NS de Cur contre *Bacillus subtilis*

A partir des résultats du test, on a constaté que la Cur brute et la NS de Cur n'ont présentés aucune activité inhibitrice pour *Escherichia coli* dans toutes les concentrations.

La Cur brute n'a présenté aucune activité contre *Bacillus subtilis* par contre la NS de Cur a montré un effet inhibiteur avec une zone d'inhibition allant de 10.5 à 18 mm à différentes concentrations de 0.1 à 2 mg/ml.

L'échelle de l'estimation de l'activité antimicrobienne est donnée par Mutai et al (2009) [141] ; ils ont classé les diamètres de zones d'inhibition (D) de la croissance bactérienne en 5 classes;

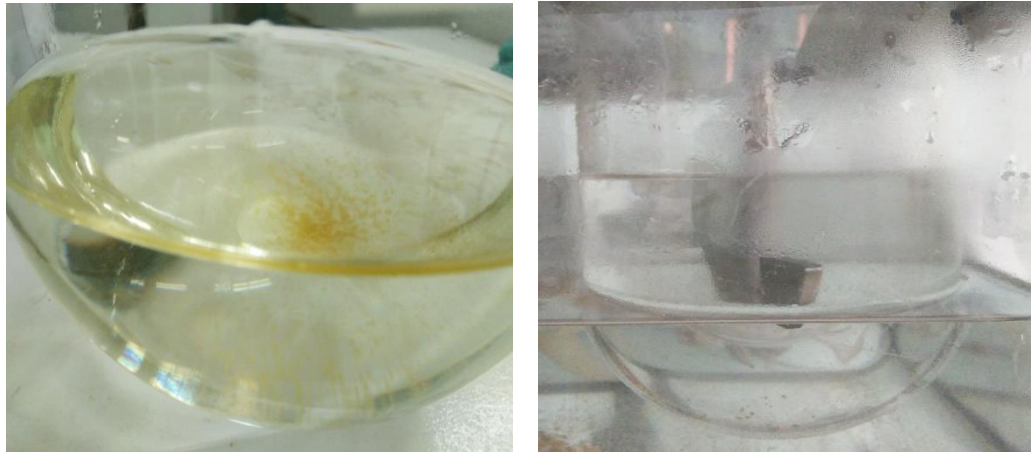
- Très fortement inhibitrice :  $D \geq 30\text{mm}$
- Fortement inhibitrice :  $21\text{mm} \leq D \leq 29\text{mm}$
- Modérément inhibitrice ;  $16\text{mm} \leq D \leq 20\text{mm}$
- Légèrement inhibitrice :  $11\text{mm} \leq D \leq 16\text{mm}$
- Non inhibitrice :  $D < 10$

A partir de cette échelle, on constate que l'activité antibactérienne de notre NS de curcumine est modérément inhibitrice ( $21\text{mm} \leq D \leq 29\text{mm}$ ). On conclut que notre nanosuspension de curcumine a un effet bactériostatique contre la souche *Bacillus subtilis* car elle a arrêté la prolifération de cette dernière.

#### **V.7. Résultat de l'étude de dissolution in vitro**

Les figures ci-dessous représente les vases du dissolutest contenant la Cur brute et la NS de Cur après les 120 minutes du test

On remarque que la Cur brute ne s'est pas solubiliser complètement et à sédimenter, contrairement à la poudre de la NS qui s'est complètement solubiliser dans le solvant.

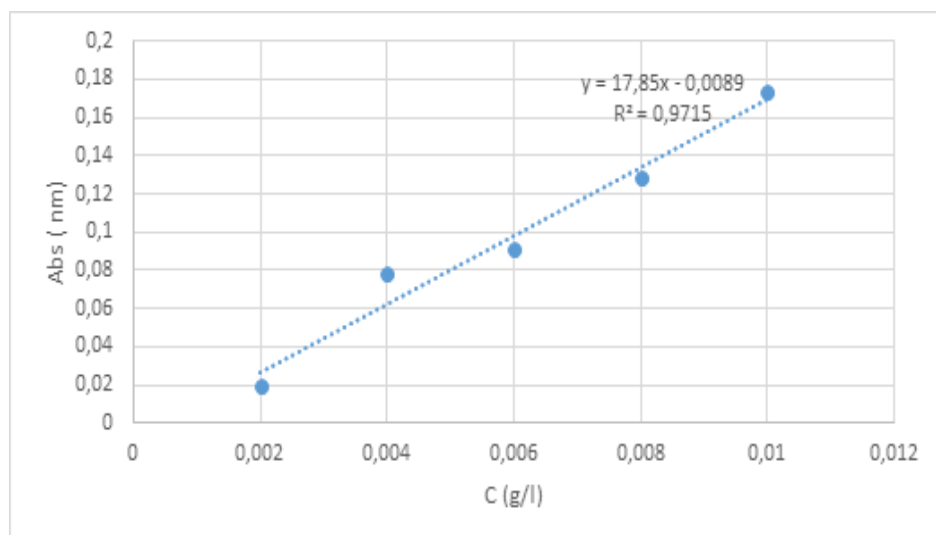


**Figures V.23 :** Résultats de dissolution de la Cur native et de la poudre lyophiliser de la NS respectivement

Pour déterminer le pourcentage de dissolution de la Cur brute et la Ns de Cur, il faut d'abord tracer les courbes d'étalonnages.

- Droite d'étalonnage de la Cur brute :

Une série de solutions filles de 0.002 mg/ml à 0.01 mg/ml ont été préparé à partir d'une solution mère de Cur (0.02mg/ml) dans le tampon phosphate salin (pH 7). Les absorbances de chaque solution ont été mesurées à 426 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-Vis et le tampon phosphate comme étalon de référence. La courbe standard a été générée pour toute la gamme de 0.002 à 0.01 mg/ml et indiquée sur la figure

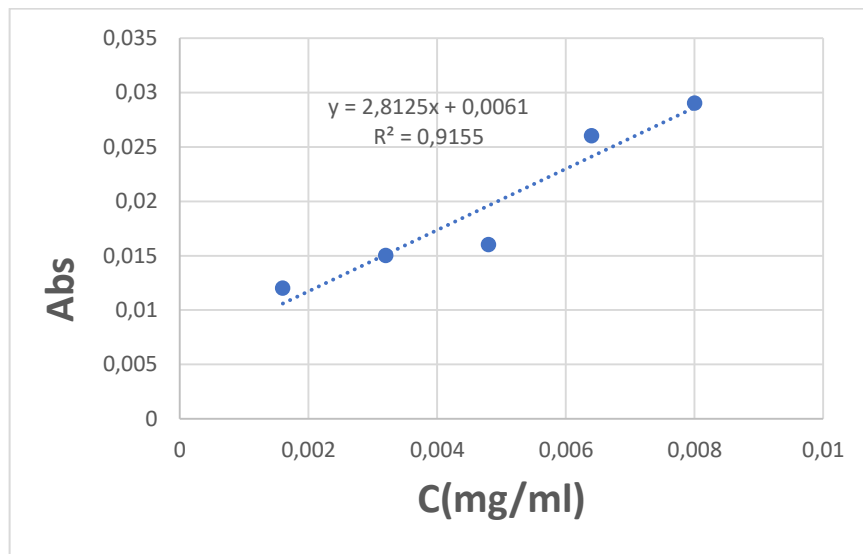


**Figure V.24 :** Courbe d'étalonnage de la Cur dans le tampon phosphate pH7

- Droite d'étalonnage de la NS de Cur :

Une série de solutions filles de 0.0016 mg/ml à 0.008 mg/ml ont été préparées à partir d'une solution mère de NS de Cur (0.02mg/ml) dans le tampon phosphate salin (pH 7), les absorbances de chaque solution ont été mesurées à 212 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-Vis et le tampon phosphate comme étalon de référence. La courbe standard a été générée pour toute la gamme de 0.0016 à 0.008 mg/ml.

La courbe standard de la NS de Cur est indiquée sur la figure V.25 :



**Figure V.25 :** Courbe d'étalonnage de la NS de Cur dans le tampon phosphate pH7

- Calcul des pourcentages de dissolution :

À partir des courbes d'étalonnage de la Cur et la NS de Cur brute illustrée dans les **Figures V.23 et V.24**, nous avons obtenu respectivement pour la Cur et la NS de Cur les équations :  $y = 17.85x - 0.0089$  et  $y = 2.8125x + 0.0061$ . Les valeurs des concentrations des échantillons collectés à des différents intervalles de temps et analysés par UV-Visible ont été calculées en utilisant ces équations à partir de ses absorbances (Tableau V.8) :

**Tableau V.8 :** valeurs des concentrations de la Cur et de la Ns de Cur brute

<b>La curcumine</b>						
<b>Temps (min)</b>	15	25	40	55	85	120
<b>C<sub>ech</sub> (mg/ml)</b>	0.008	0.0086	0.0094	0.01	0.011	0.011
<b>La nanosuspension de curcumine</b>						
<b>Temps (min)</b>	15	25	40	55	85	120
<b>C<sub>ech</sub> (mg/ml)</b>	0.067	0.068	0.069	0.071	0.072	0.073

Le pourcentage de dissolution de la Cur et la NS de Cur brute dans le milieu a été calculé en utilisant la relation V.3 :

$$\text{Le pourcentage de dissolution(\%)} = \frac{C}{C_0} \times 100 \dots \dots \dots \text{(V.3)}$$

Sachant que :

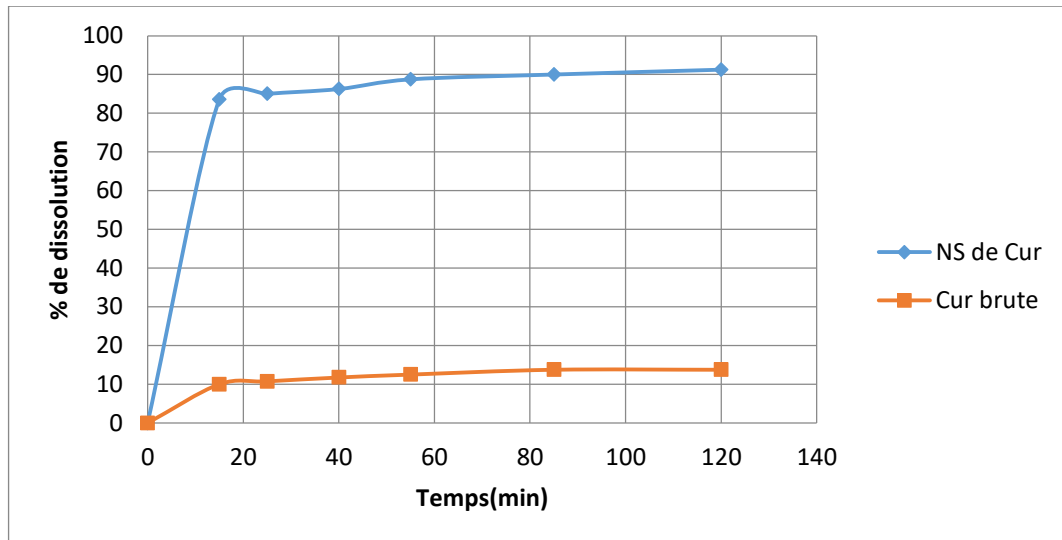
**C<sub>0</sub>** : c'est la concentration initiale de l'échantillon, et comme nous avons mis 40mg de chaque échantillon dans 500ml du milieu de dissolution donc C<sub>0</sub>=0.08 mg/ml.

Le tableau (V.9) regroupe les pourcentages de dissolution de chaque échantillon en fonction du temps.

**Tableau V.9 :** Les pourcentages de dissolution de la Cur et de la Ns de Cur brute

<b>La curcumine</b>						
<b>Temps (min)</b>	15	25	40	55	85	120
<b>% de dissolution</b>	10%	10.75%	11.75%	12.5%	13.75%	13.75%
<b>La nanosuspension de curcumine</b>						
<b>Temps (min)</b>	15	25	40	55	85	120
<b>% de dissolution</b>	83.75%	85%	86.25%	88.75%	90 %	91.25%

La figure V.26 illustre le profil de dissolution de la Cur brute et de la Ns de Cur :



**Figure V.26 :** Profils de dissolution de la Cur et de la Ns de Cur brute

Environ 83,75 % de la poudre lyophilisée de NS de Cur a été dissoute de manière homogène dans les premières 15 min à pH 7, alors que seulement 13,75 % de la poudre de Cur brute a été dissoute en 120 min.

Le taux de dissolution de la NS de Cur a été remarquablement amélioré par rapport à celui de la poudre de curcumine brute. Les principaux facteurs responsables de cette amélioration et donc de la vitesse de dissolution sont la grande surface, mouillabilité, porosité, état amorphe et absence d'agrégation et d'agglomération [142, 143]. Ainsi, la vitesse de dissolution de la NS de Cur pourrait être améliorée en raison des surfaces élevées par réduction de la taille des particules, état amorphe basée sur les résultats de DLS et DRX. Cela pourrait soutenir l'hypothèse que l'association des deux stabilisants « la lécithine de soja et la gomme arabique » est une combinaison très efficace pour améliorer la solubilité à saturation et la vitesse de dissolution de la curcumine.

Donc on en déduit que la dissolution plus rapide de la poudre lyophilisée de la NS de Cur est considérée comme bénéfique car, une fois administrée par voie orale, la nanosuspension rapidement dissoute peut-être facilement répartie dans les tissus du tractus gastro-intestinal en un temps plus court (en raison du gradient de concentration favorable) entraînant un début d'action rapide et une biodisponibilité améliorée. Par conséquent, les NS sont prometteuses pour une forme posologique aux propriétés physico-chimiques meilleures.

# *Conclusion générale*



## *Conclusion générale*

La curcumine est devenue de nos jours un ingrédient indispensable dans l'art culinaire. En plus de sa saveur et son goût, il est bien connu qu'elle présente des vertus thérapeutiques pour le traitement des inflammations articulaires mais présente un obstacle majeur pour son utilisation en tant que principe actif ; une solubilité très limitée dans l'eau.

Il était question dans notre étude de contribuer à l'amélioration de la biodisponibilité de la curcumine par formulation des nanosuspensions avec des stabilisants naturels (lécithine de soja et gomme arabique) en utilisant un procédé de précipitation anti-solvant connue sous le nom de nano-edge. L'optimisation de notre formule a eu lieu après un criblage des stabilisants et des solvants.

Au terme de notre travail, les principaux résultats peuvent être résumés comme suit :

- Par spectroscopie UV, la nature de notre matière a été confirmée. L'absorption maximale a été détectée à 426 nm.
- Par tamisage, la taille de la curcumine brute s'est révélée micrométrique d'un diamètre moyen de 53µm. Par contre la nanosuspension caractérisée par diffusion dynamique de la lumière est de type système monomodal avec une taille moyenne de 119.1nm et un potentiel zêta dans la plage de  $\pm 30$ mv indiquant que notre NS est stable.
- La spectroscopie IR a montré et par comparaison en comparant le spectre entre la Cur brute et la NS que la structure chimique de la curcumine n'a pas été modifiée après le procédé de nanonisation mais on a remarqué une augmentation de l'intensité pour le pic typique de la Cur à 3402cm<sup>-1</sup> correspondant aux groupements phénoliques, responsable des activités biologiques de la curcumine.
- La diffraction par RX a mis en évidence la structure amorphe de la curcumine avant et après lyophilisation avec augmentation des intensités des pics après la formulation, ce qui a suggéré que notre produit de départ ne présente pas un polymorphisme.

- La microscopie électronique à balayage a confirmé la structure hétérogène avec des formes diversifiées des grains de la curcumine avant le procédé de formulation,
- Le suivi de la stabilité de notre nanosuspension liquide at après lyophilisation en fonction du temps a révélé une stabilité du système dans l'intervalle choisi, cette stabilité a été approuvée par la mesure du potentiel zêta.
- La solubilité de la poudre lyophilisée de la NS dans l'eau a nettement augmenté
- L'évaluation des activités biologiques (antiinflammatoires, antioxydantes et antibactériennes) de la curcumine a montré que la nanonisation ne présente pas d'effet négatif sur ces activités.
- Notre nanosuspension formulée a présenté un taux de dissolution remarquable par rapport à la curcumine brute et donc sa biodisponibilité sera automatiquement améliorée.

Ce travail est loin d'être achevé, au contraire, il ouvre la voie pour un axe très passionnant, il serait intéressant de s'orienter vers d'autres perspectives :

- ✓ Utilisation des plans d'expérience pour déterminer les proportions des différents composés de la formulation et trouver la composition optimale.
- ✓ Utilisation du procédé d'homogénéisation à haute pression dans le but d'éviter l'utilisation d'un solvant.
- ✓ Utilisation d'une matière première pure présentant une structure cristalline.
- ✓ Déterminer le taux d'encapsulation de la curcumine par HPLC
- ✓ Utiliser d'autres voies dans le but d'améliorer la solubilité telles que l'encapsulation dans les cyclodextrines

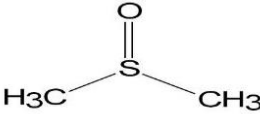
Enfin, aboutir à une forme galénique pratique et à libération prolongée serait fort intéressant pour les patients souffrant de maladies articulaires et de douleurs et pourrait enrichir les médicaments à usage gériatrique surtout de par son caractère naturel et comestible.

# *Annexes*

## Annexe N°01 : Solvants utilisés dans les tests


### a. Le diméthylsulfoxyde

**Tableau I :** propriétés physico-chimiques du DMSO

<b>synonymes</b>	<b>Diméthylsulfoxyde, DMSO, sulfinylbisméthane ,Méthylsulfoxyde</b>
<b>Formule chimique</b>	$C_2H_6OS$
<b>Structure chimique</b>	
<b>Masse molaire</b>	78.13 g/mol
<b>Description</b>	Liquide incolore et visqueux ou de cristaux incolores avec un arrière-goût sucré et est inodore
<b>Point d'ébullition</b>	189 °C
<b>Solubilité</b>	Miscible à l'eau et la plupart des solvants organiques ;
<b>Catégorie fonctionnelle</b>	Agent de pénétration; solvant.
<b>Rôle</b>	Solvant de la curcumine utilisé pour le test de caractérisation UV-visible de la matière première

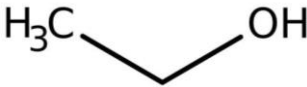
b. Le dichlorométhane

**Tableau II** : propriétés physico-chimiques du DCM

<b>synonymes</b>	<b>Dichlorométhane, DCM , chlorure de méthylène.</b>
<b>Formule chimique</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
<b>Structure chimique</b>	
<b>Masse molaire</b>	84,933 ± 0,005 g/mol
<b>Description</b>	Liquide incolore et volatil émettant une odeur douceâtre
<b>Point d'ébullition</b>	40 °C
<b>Solubilité</b>	Peu soluble dans l'eau, miscible avec la plupart des solvants organiques ;
<b>Catégorie fonctionnelle</b>	Solvant
<b>Rôle</b>	Utilisé dans le test de solubilité

c. L'éthanol

**Tableau III** : propriétés physico-chimique de l'éthanol

<b>Nom chimique et synonyme</b>	<b>Ethanol , alcool éthylique, EtOH</b>
<b>Formule chimique</b>	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O
<b>Structure chimique</b>	
<b>Masse molaire</b>	46,0684 ± 0,0023 g/mol
<b>Description</b>	Liquide incolore, volatil, inflammable d'odeur caractéristique
<b>Point d'ébullition</b>	79°C
<b>Solubilité</b>	Miscible à l'eau en toutes proportions, solubilité Complète dans les solvants polaires et apolaires (acétone, éther diéthylique)
<b>Catégorie fonctionnelle</b>	Solvant
<b>Rôle</b>	Utilisé dans le test de solubilité

d. Le méthanol

**Tableau IV** : propriétés physico-chimique du méthanol

<b>Nom chimique et synonyme</b>	<b>Méthanol , alcool méthylique</b>
<b>Formule chimique</b>	CH <sub>4</sub> O
<b>Structure chimique</b>	HO—CH <sub>3</sub>
<b>Masse molaire</b>	32,0419 ± 0,0014 g/mol
<b>Description</b>	Liquide léger, volatil, incolore, inflammable, toxique avec une odeur caractéristique, plus douce et sucrée que celle de l'éthanol
<b>Point d'ébullition</b>	°C
<b>Solubilité</b>	Miscible dans l'eau et dans l'acétone en toute proportion
<b>Catégorie fonctionnelle</b>	Solvant
<b>Rôle</b>	Test de solubilité ,

**Annexe N°02: les photos des appareils**



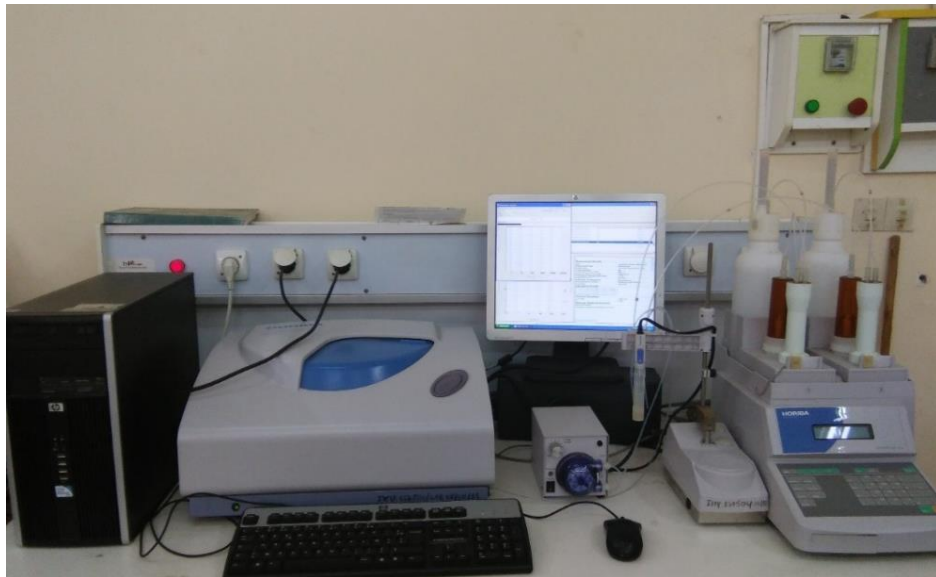
**Figure 1 :** Microscope électronique à balayage



**Figure 2:** Diffractomètre à rayons X



**Figure 3 :** Lyophilisateur échelle laboratoire



**Figure 4 :** spectrophotomètre à diffraction Laser (DLS)





**Figure 5:** Dissolu-test à palettes tournantes

*Références  
bibliographique*

## References bibliographiques:

1. Kelloff, G.J., et al., *Progress in cancer chemoprevention: development of diet-derived chemopreventive agents*. The Journal of nutrition, 2000. **130**(2): p. 467S-471S.
2. Priyadarsini, K.I., *The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent*. Molecules, 2014. **19**(12): p. 20091-20112.
3. Garige, M. and E. Walters, *Curcumin inhibits development and cell adhesion in Dictyostelium discoideum: Implications for YpkA signaling and GST enzyme function*. Biochemical and biophysical research communications, 2015. **467**(2): p. 275-281.
4. Andrade, C., *A critical examination of studies on curcumin for depression*. The Journal of clinical psychiatry, 2014. **75**(10): p. 1110-1112.
5. Turrini, E., L. Ferruzzi, and C. Fimognari, *Natural compounds to overcome cancer chemoresistance: toxicological and clinical issues*. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, 2014. **10**(12): p. 1677-1690.
6. Arunraj, T., et al., *Synthesis, characterization and biological activities of curcumin nanospheres*. Journal of biomedical nanotechnology, 2014. **10**(2): p. 238-250.
7. Rami, A. and N. Zarghami, *Comparison of inhibitory effect of curcumin nanoparticles and free curcumin in human telomerase reverse transcriptase gene expression in breast cancer*. Advanced Pharmaceutical Bulletin, 2013. **3**(1): p. 127.
8. Tønnesen, H.H., M. Måsson, and T. Loftsson, *Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability*. International journal of pharmaceutics, 2002. **244**(1-2): p. 127-135.
9. Bhavanishankar, T., et al., *Toxicity studies on turmeric (Curcuma longa): acute toxicity studies in rats, guineapigs and monkeys*. Indian journal of experimental biology, 1980. **18**(1): p. 73-75.
10. Pasquali, I., R. Bettini, and F. Giordano, *Supercritical fluid technologies: an innovative approach for manipulating the solid-state of pharmaceuticals*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2008. **60**(3): p. 399-410.
11. Bhatia, S., *Nanoparticles types, classification, characterization, fabrication methods and drug delivery applications*, in *Natural polymer drug delivery systems* 2016, Springer. p. 33-93.
12. Ravichandran, R., *Preparation and characterisation of curcumin nanosuspension for enhanced solubility and dissolution velocity*. International Journal of Nano and Biomaterials, 2010. **3**(2): p. 153-186.
13. Lone, J., et al., *Curcumin induces brown fat-like phenotype in 3T3-L1 and primary white adipocytes*. The journal of nutritional biochemistry, 2016. **27**: p. 193-202.
14. Goel, A., A.B. Kunnammakara, and B.B. Aggarwal, *Biochem. Pharmacol.* Vol. 75. 2008.
15. Strimpakos, A.S. and R.A. Sharma, *Antioxid. Redox. Signal*, 2008. **10**: p. 511-545.
16. Schraufstatter, E. and H. Bernt, *Antibacterial Action of Curcumin and Related Compounds*. Nature, 1949. **164**: p. 456-457.
17. Delaveau, P., *Les épices: Histoire, description et usage des différents épices, aromates et condiments* 1987: A. Michel.
18. *Curcuma longa*. *Altern. Med. Rev*, 2002.
19. Penso, G., *Les plantes médicinales dans l'art et l'histoire* 1986: R. Dacosta.
20. *Curcuma longa (curcuma)*. *Monograph. Altern. Med. Rev*. 2001.
21. Aggarwal, B.B., et al., *Curcumin: the Indian solid gold*. The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease, 2007: p. 1-75.
22. S, G., *Les Zingiberacées, une famille à épices.-116f, Th : Pharm : Nancy I ; 86/102*. 1986.

23. Anand, P., et al., *Bioavailability of curcumin: problems and promises*. Molecular pharmaceutics, 2007. **4**(6): p. 807-818.
24. *Le Curcuma ou le safran des Indes, Plantes et Nature* 2005: p. 16–17.
25. Bruneton, J., *Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. 4e éd, revue et augmentée, Paris, Tec & Doc, Éditions médicales internationales, 1288p. Dibong SD, Mpondo Mpondo E, Ngoye A, Kwin NF, Betti JL. 2011a. Ethnobotanique et phytomédecine des plantes médicinales vendues sur les marchés de Douala, Cameroun*. Journal of Applied Biosciences, 2009. **37**: p. 2496-2507.
26. Sharma, R.A., W.P. Steward, and A.J. Gescher, *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin*. The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease, 2007: p. 453-470.
27. Chattopadhyay, I., et al., *Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications*. Current science, 2004: p. 44-53.
28. Kohli, K., et al., *Curcumin: a natural antiinflammatory agent*. Indian Journal of Pharmacology, 2005. **37**(3): p. 141.
29. Organization, W.H., *WHO monographs on selected medicinal plants*. Vol. 2. 1999: World Health Organization.
30. Jayaprakasha, G., L.J.M. Rao, and K. Sakariah, *Chemistry and biological activities of C. longa*. Trends in Food Science & Technology, 2005. **16**(12): p. 533-548.
31. Revathy, S., et al., *Isolation , Purification and Identification of Curcuminoids from Turmeric ( Curcuma Longa L .) by Column Chromatography*. Journal of Experimental Sciences, 2011. **2** (7): p. 21–25.
32. Gupta, A.P., M.M. Gupta, and S. Kumar, *Simultaneous Determination of Curcuminoids in Curcuma Samples Using High Performance Thin Layer Chromatography*. Journal of Liquid Chromatography and Related Technology, 1999. **22** (10): p. 1561–1569.
33. Pabon, H., *A synthesis of curcumin and related compounds*. Recueil des Travaux Chimiques des Pays Bas, 1964. **83**(4): p. 379-386.
34. Esatbeyoglu, T., et al., *Curcumin—from molecule to biological function*. Angewandte Chemie International Edition, 2012. **51**(22): p. 5308-5332.
35. Tomren, M., et al., *Studies on curcumin and curcuminoids: XXXI. Symmetric and asymmetric curcuminoids: stability, activity and complexation with cyclodextrin*. International journal of pharmaceutics, 2007. **338**(1-2): p. 27-34.
36. Manjunath, P. and B. Shivaprakash, *Pharmacology and clinical use of dimethyl sulfoxide (DMSO): a review*. International Journal of Molecular Veterinary Research, 2013. **3**(1).
37. Arrieta, A., et al., *Säurestärke und Komplexbildung von Curcuminoiden*. Journal für Praktische Chemie, 1988. **330**(1): p. 111-118.
38. Tønnesen, H.H. and J. Karlsen, *Studies on curcumin and curcuminoids*. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung, 1985. **180**(5): p. 402-404.
39. Balasubramanian, K., *Theoretical calculations on the transition energies of the UV-visible spectra of curcumin pigment in turmeric*. 1991.
40. Khurana, A. and C.-T. Ho, *High performance liquid chromatographic analysis of curcuminoids and their photo-oxidative decomposition compounds in Curcuma longa L*. Journal of liquid chromatography, 1988. **11**(11): p. 2295-2304.
41. Jangle, R. and B. Thorat, *Reversed-phase high-performance liquid chromatography method for analysis of curcuminoids and curcuminoid-loaded liposome formulation*. Indian journal of pharmaceutical sciences, 2013. **75**(1): p. 60.
42. Neha, S., G. Ranvir, and C. Jangade, *Analgesic and antipyretic activities of Curcuma longa rhizome extracts in Wister Rats*. Veterinary world, 2009. **2**(8).

43. Nishiyama, T., et al., *Curcuminoids and sesquiterpenoids in turmeric (Curcuma longa L.) suppress an increase in blood glucose level in type 2 diabetic KK-Ay mice*. Journal of Agricultural and food Chemistry, 2005. **53**(4): p. 959-963.
44. Aggarwal, B.B. and K.B. Harikumar, *Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases*. The international journal of biochemistry & cell biology, 2009. **41**(1): p. 40-59.
45. Sharma, R., A. Gescher, and W. Steward, *Curcumin: the story so far*. European journal of cancer, 2005. **41**(13): p. 1955-1968.
46. Gupta, S.C., et al., *Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies*. Natural product reports, 2011. **28**(12): p. 1937-1955.
47. Wessler, S., et al., *The anti-inflammatory compound curcumin inhibits Neisseria gonorrhoeae-induced NF- $\kappa$ B signaling, release of pro-inflammatory cytokines/chemokines and attenuates adhesion in late infection*. 2005.
48. Cikrikci, S., E. Mozioglu, and H. Yilmaz, *Biological activity of curcuminoids isolated from Curcuma longa*. Records of Natural Products, 2008. **2**(1): p. 19.
49. Shoba, G., et al., *Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers*. Planta medica, 1998. **64**: p. 353-356.
50. Hatcher, H., et al., *Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials*. Cellular and molecular life sciences, 2008. **65**(11): p. 1631-1652.
51. Tamvakopoulos, C., et al., *Analysis of their vitro metabolites of diferuloylmethane (curcumin) by liquid chromatography—tandem mass spectrometry on a hybrid quadrupole linear ion trap system: newly identified metabolites*. European journal of drug metabolism and pharmacokinetics, 2007. **32**(1): p. 51-57.
52. Cruz–Correa, M., et al., *Combination treatment with curcumin and quercetin of adenomas in familial adenomatous polyposis*. Clinical Gastroenterology and Hepatology, 2006. **4**(8): p. 1035-1038.
53. Antony, B., et al., *A pilot cross-over study to evaluate human oral bioavailability of BCM-95® CG (Biocurcumax™), a novel bioenhanced preparation of curcumin*. Indian journal of pharmaceutical sciences, 2008. **70**(4): p. 445.
54. Cuomo, J., et al., *Comparative absorption of a standardized curcuminoid mixture and its lecithin formulation*. Journal of natural products, 2011. **74**(4): p. 664-669.
55. Kondo, A., et al., *Epigallocatechin-3-gallate potentiates curcumin's ability to suppress uterine leiomyosarcoma cell growth and induce apoptosis*. International journal of clinical oncology, 2013. **18**(3): p. 380-388.
56. Shutava, T.G., et al., *Layer-by-layer-coated gelatin nanoparticles as a vehicle for delivery of natural polyphenols*. ACS nano, 2009. **3**(7): p. 1877-1885.
57. Tsai, Y.-M., et al., *Optimised nano-formulation on the bioavailability of hydrophobic polyphenol, curcumin, in freely-moving rats*. Food chemistry, 2011. **127**(3): p. 918-925.
58. Basniwal, R.K., et al., *Curcumin nanoparticles: preparation, characterization, and antimicrobial study*. Journal of Agricultural and food Chemistry, 2011. **59**(5): p. 2056-2061.
59. Horikoshi, S. and N. Serpone, *Microwaves in nanoparticle synthesis: fundamentals and applications* 2013: John Wiley & Sons.
60. Jordanovska, S., *Les nanoparticules dans l'industrie pharmaceutique: comparaison des méthodes de fabrication*.
61. Kreuter, J., *Nanoparticles—a historical perspective*. International journal of pharmaceutics, 2007. **331**(1): p. 1-10.

62. Etheridge, M.L., et al., *The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products*. *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine*, 2013. **9**(1): p. 1-14.
63. Allen, T.M. and P.R. Cullis, *Drug delivery systems: entering the mainstream*. *Science*, 2004. **303**(5665): p. 1818-1822.
64. Merisko-Liversidge, E.M. and G.G. Liversidge, *Drug nanoparticles: formulating poorly water-soluble compounds*. *Toxicologic pathology*, 2008. **36**(1): p. 43-48.
65. Wang, A.Z., R. Langer, and O.C. Farokhzad, *Nanoparticle delivery of cancer drugs*. *Annual review of medicine*, 2012. **63**: p. 185-198.
66. Beirowski, J., et al., *Freeze drying of nanosuspensions, 2: the role of the critical formulation temperature on stability of drug nanosuspensions and its practical implication on process design*. *Journal of pharmaceutical sciences*, 2011. **100**(10): p. 4471-4481.
67. Gillies, E.R. and J.M. Frechet, *Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery*. *Drug discovery today*, 2005. **10**(1): p. 35-43.
68. Namazi, H., F. Fathi, and A. Heydari, *Nanoparticles based on modified polysaccharides. The delivery of nanoparticles*, 2012: p. 149-184.
69. Mody, V.V., et al., *Introduction to metallic nanoparticles*. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 2010. **2**(4): p. 282.
70. Liu, Z., et al., *Carbon nanotubes in biology and medicine: in vitro and in vivo detection, imaging and drug delivery*. *Nano research*, 2009. **2**(2): p. 85-120.
71. Chakravarthy, K.V., et al., *Doxorubicin conjugated quantum dots to target alveolar macrophages/inflammation*. *Nanomedicine*, 2011. **7**(1): p. 88.
72. Merisko-Liversidge, E., G.G. Liversidge, and E.R. Cooper, *Nanosizing: a formulation approach for poorly-water-soluble compounds*. *European journal of pharmaceutical sciences*, 2003. **18**(2): p. 113-120.
73. Müller, R.H., C. Jacobs, and O. Kayser, *Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy: rationale for development and what we can expect for the future*. *Advanced drug delivery reviews*, 2001. **47**(1): p. 3-19.
74. Chingunpituk, J., *Nanosuspension technology for drug delivery*. *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)*, 2007. **4**(2): p. 139-153.
75. Verma, S., B.D. Huey, and D.J. Burgess, *Scanning probe microscopy method for nanosuspension stabilizer selection*. *Langmuir*, 2009. **25**(21): p. 12481-12487.
76. LeBlanc, P.-P., *Traité de biopharmacie et pharmacocinétique* 1997: Éditions Vigot; Montréal: Presses de l'Université de Montréal.
77. Junghanns, J.-U.A. and R.H. Müller, *Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications*. *International journal of nanomedicine*, 2008. **3**(3): p. 295.
78. Torchilin, V.P., *Nanoparticulates as drug carriers* 2006: Imperial college press.
79. Ranjita Shegokar, R.H.M., *Nanoclysts: Industrially feasible multifunctional formulation technology for poorly soluble actives*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2010: p. 399,129-139,.
80. Patravale, V., A.A. Date, and R. Kulkarni, *Nanosuspensions: a promising drug delivery strategy*. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 2004. **56**(7): p. 827-840.
81. Müller, B. and R. Müller, *Particle size analysis of latex suspensions and microemulsions by photon correlation spectroscopy*. *Journal of pharmaceutical sciences*, 1984. **73**(7): p. 915-918.
82. Muller, R.H. and C.M. Keck, *Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs—a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles*. *Journal of biotechnology*, 2004. **113**(1-3): p. 151-170.

83. Gelderblom, H., et al., *Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation*. European journal of cancer, 2001. **37**(13): p. 1590-1598.
84. Möschwitzer, J.P., *Drug nanocrystals in the commercial pharmaceutical development process*. International journal of pharmaceutics, 2013. **453**(1): p. 142-156.
85. Peukert, W., H.-C. Schwarzer, and F. Stenger, *Control of aggregation in production and handling of nanoparticles*. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 2005. **44**(2): p. 245-252.
86. Patel, M., et al., *Nanosuspension: A novel approach for drug delivery system*. Jpsbr, 2011. **1**(1): p. 1-10.
87. Kipp, J.E., et al., *Method for preparing submicron particle suspensions*, 2005, Google Patents.
88. Kharb, V., et al., *Nanoparticle technology for the delivery of poorly water-soluble drugs*. Pharmaceutical technology (2003), 2006. **30**(2).
89. Edebo, L. and N. Richardson, *Enhancement of hydrophobic interaction, negative charge and phagocytosis by dinitrophenyl ligand coupling to Salmonella typhimurium 395 MS*. International Archives of Allergy and Immunology, 1985. **78**(4): p. 345-352.
90. Illum, L. and S. Davis, *The targeting of drugs parenterally by use of microspheres*. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, 1982. **36**(6): p. 242-248.
91. Kreuter, J., *Drug targeting with nanoparticles*. European journal of drug metabolism and pharmacokinetics, 1994. **19**(3): p. 253-256.
92. Gao, L., et al., *Studies on pharmacokinetics and tissue distribution of oridonin nanosuspensions*. International journal of pharmaceutics, 2008. **355**(1-2): p. 321-327.
93. Rao, C., A. Müller, and K. Anthony, *Cheetham nanomaterials chemistry: recent developments and new directions*, 2007, Wiley, New York.
94. Pranami, G., *Understanding nanoparticle aggregation*. 2009.
95. Chibowski, E., et al., *Influence of ionic surfactants and lecithin on stability of titanium dioxide in aqueous electrolyte solution*. Croatica Chemica Acta, 2007. **80**(3-4): p. 395-403.
96. Shi, J., *Steric stabilization, group inorganic materials science*. The Ohio State University, Columbus, 2002.
97. Ghosh, I., et al., *Nanosuspension for improving the bioavailability of a poorly soluble drug and screening of stabilizing agents to inhibit crystal growth*. International journal of pharmaceutics, 2011. **409**(1-2): p. 260-268.
98. Van Eerdenbrugh, B., et al., *A screening study of surface stabilization during the production of drug nanocrystals*. Journal of pharmaceutical sciences, 2009. **98**(6): p. 2091-2103.
99. Wahlstrom, J.L., et al., *Pharmacokinetic evaluation of a 1, 3-dicyclohexylurea nanosuspension formulation to support early efficacy assessment*. Nanoscale Research Letters, 2007. **2**(6): p. 291-296.
100. Peters, K., R.H. Müller, and D.Q. Craig, *An investigation into the distribution of lecithins in nanosuspension systems using low frequency dielectric spectroscopy*. International journal of pharmaceutics, 1999. **184**(1): p. 53-61.
101. Möschwitzer, J., et al., *Development of an intravenously injectable chemically stable aqueous omeprazole formulation using nanosuspension technology*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2004. **58**(3): p. 615-619.
102. George, M. and I. Ghosh, *Identifying the correlation between drug/stabilizer properties and critical quality attributes (CQAs) of nanosuspension formulation prepared by wet media milling technology*. European journal of pharmaceutical sciences, 2013. **48**(1-2): p. 142-152.

103. Langguth, P., et al., *Nanosuspension formulations for low-soluble drugs: pharmacokinetic evaluation using spironolactone as model compound*. Drug development and industrial pharmacy, 2005. **31**(3): p. 319-329.
104. Grau, M., O. Kayser, and R. Müller, *Nanosuspensions of poorly soluble drugs—reproducibility of small scale production*. International journal of pharmaceutics, 2000. **196**(2): p. 155-159.
105. Lee, J. and Y. Cheng, *Critical freezing rate in freeze drying nanocrystal dispersions*. Journal of controlled release, 2006. **111**(1-2): p. 185-192.
106. Verma, S., et al., *Physical stability of nanosuspensions: investigation of the role of stabilizers on Ostwald ripening*. International journal of pharmaceutics, 2011. **406**(1-2): p. 145-152.
107. Patil, P., et al., *Pulsed-laser-induced reactive quenching at liquid-solid interface: Aqueous oxidation of iron*. Physical review letters, 1987. **58**(3): p. 238.
108. Brisset, F., *Microscopie électronique à balayage et microanalyses* 2012: EDP sciences.
109. Tamaki, Y., T. Asahi, and H. Masuhara, *Nanoparticle formation of vanadyl phthalocyanine by laser ablation of its crystalline powder in a poor solvent*. The Journal of Physical Chemistry A, 2002. **106**(10): p. 2135-2139.
110. Jeon, H.-G., et al., *Study on electrophoretic deposition of size-controlled quinacridone nanoparticles*. The Journal of Physical Chemistry C, 2007. **111**(40): p. 14658-14663.
111. Schmook, F.P., J.G. Meingassner, and A. Billich, *Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption*. International journal of pharmaceutics, 2001. **215**(1-2): p. 51-56.
112. Patel, G.V., et al., *Nanosuspension of efavirenz for improved oral bioavailability: formulation optimization, in vitro, in situ and in vivo evaluation*. Drug development and industrial pharmacy, 2014. **40**(1): p. 80-91.
113. Fakes, M.G., et al., *Enhancement of oral bioavailability of an HIV-attachment inhibitor by nanosizing and amorphous formulation approaches*. International journal of pharmaceutics, 2009. **370**(1-2): p. 167-174.
114. Ghosh, S., et al., *Oral Delivery of 1, 3-Dicyclohexylurea Nanosuspension Enhances Exposure and Lowers Blood Pressure in Hypertensive Rats*. Basic & clinical pharmacology & toxicology, 2008. **102**(5): p. 453-458.
115. Guo, J.-j., et al., *Development and in vivo/in vitro evaluation of novel herpentrione nanosuspension*. International journal of pharmaceutics, 2013. **441**(1-2): p. 227-233.
116. Kayser, O., *A new approach for targeting to Cryptosporidium parvum using mucoadhesive nanosuspensions: research and applications*. International journal of pharmaceutics, 2001. **214**(1-2): p. 83-85.
117. Peters, K., et al., *Preparation of a clofazimine nanosuspension for intravenous use and evaluation of its therapeutic efficacy in murine Mycobacterium avium infection*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2000. **45**(1): p. 77-83.
118. Lakshmi, P. and G.A. Kumar, *Nanosuspension technology: A review*. Int J Pharm Sci, 2010. **2**(4): p. 35-40.
119. Drici, N., *Hydroxydes doubles lamellaires, synthèse, caractérisation et propriétés*, 2015, Université Sorbonne Paris Cité.
120. Abdelwahed, W., G. Degobert, and H. Fessi, *Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage*. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics, 2006. **63**(2): p. 87-94.
121. Abdelwahed, W., et al., *Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations*. Advanced drug delivery reviews, 2006. **58**(15): p. 1688-1713.



122. Samojlik, I., et al., *Antioxidant and hepatoprotective potential of essential oils of coriander (Coriandrum sativum L.) and caraway (Carum carvi L.)(Apiaceae)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(15): p. 8848-8853.
123. Paixao, N., et al., *Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines*. Food Chemistry, 2007. **105**(1): p. 204-214.
124. Maisuthisakul, P., R. Pongsawatmanit, and M.H. Gordon, *Characterization of the phytochemicals and antioxidant properties of extracts from Teaw (Cratoxylum formosum Dyer)*. Food Chemistry, 2007. **100**(4): p. 1620-1629.
125. Molyneux, P., *The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity*. Songklanakarin J. sci. technol, 2004. **26**(2): p. 211-219.
126. Popovici, C., *Effect of Microwave and Convective Drying Process on Antioxidant Potential of Agro-Food Products*. Agriculture Informatics 2013: p. 57.
127. Prakash, D., et al., *Total phenol, antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants*. International journal of food sciences and nutrition, 2007. **58**(1): p. 18-28.
128. Sánchez-Moreno, C., *Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems*. Food science and technology international, 2002. **8**(3): p. 121-137.
129. Williams, L., et al., *The in vitro anti-denaturation effects induced by natural products and non-steroidal compounds in heat treated (immunogenic) bovine serum albumin is proposed as a screening assay for the detection of anti-inflammatory compounds, without the use of animals, in the early stages of the drug discovery process*. West Indian Medical Journal, 2008. **57**(4).
130. Cuq, J., *Biochimie des protéines*. Polytech'Montpellier-Université Montpellier, 2006. **2**.
131. Nataro, J.P. and J.B. Kaper, *Diarrheagenic escherichia coli*. Clinical microbiology reviews, 1998. **11**(1): p. 142-201.
132. BOUHAIRI, S., *Bacillus subtilis: Caractères et applications*, 2017.
133. Anand, P., Sundaram C, Jhurani S, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin and cancer: an "old-age" disease with an "age-old" solution. Cancer Lett, 2008. **267**: p. 133-164.
134. Subhan, M., et al., *Synthesis and characterization of metal complexes containing curcumin (C 21 H 20 O 6) and study of their anti-microbial activities and DNA-binding properties*. Journal of Scientific research, 2014. **6**(1): p. 97-109.
135. Chignell, C.F., et al., *Spectral and photochemical properties of curcumin*. Photochemistry and photobiology, 1994. **59**(3): p. 295-302.
136. Gao, Y., et al., *Preparation and characterization of intravenously injectable curcumin nanosuspension*. Drug delivery, 2011. **18**(2): p. 131-142.
137. Thorat, A.A. and S.V. Dalvi, *Particle formation pathways and polymorphism of curcumin induced by ultrasound and additives during liquid antisolvent precipitation*. CrystEngComm, 2014. **16**(48): p. 11102-11114.
138. Carvalho, D.d.M., et al., *Production, solubility and antioxidant activity of curcumin nanosuspension*. Food Science and Technology, 2015. **35**(1): p. 115-119.
139. Choi, S., et al., *Regulation of endothelial barrier integrity by redox-dependent nitric oxide signaling: implication in traumatic and inflammatory brain injuries*. Nitric Oxide, 2019. **83**: p. 51-64.
140. Clemenzi, M.N., et al., *Tumour necrosis factor  $\alpha$  induces neuroinflammation and insulin resistance in immortalised hypothalamic neurones through independent pathways*. Journal of neuroendocrinology, 2019. **31**(1): p. e12678.
141. Mutai, C., et al., *Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolated from Acacia mellifera*. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 2009. **6**(1).

142. Vasconcelos, T., B. Sarmiento, and P. Costa, *Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs*. Drug discovery today, 2007. **12**(23-24): p. 1068-1075.
143. Suresh, K., et al., *Enhancement of solubility and dissolution rate of curcumin by solid dispersion technique*. Intl Res J Pharm, 2013. **4**(5): p. 226-32.