



Université de Constantine 3
Facultés de Génie des Procédés
Département de Génie Pharmaceutique

ÉTUDE DE L'ENCAPSULATION DE L'INSULINE POUR LA DÉLIVRANCE ORALE

THESE

Présentée pour l'Obtention du
Diplôme de Doctorat en Génie des Procédés
en Génie Pharmaceutique

Par
Naima FAGHMOUS

Année Universitaire
2020-2021

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné (e)**Faghmous Naima**....., déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce rapport ou mémoire.

Signature :

nfss



Université de Constantine 3
Facultés de Génie des Procédés
Département de Génie Pharmaceutique

N° de Série :

N° d'Ordre :

ÉTUDE DE L'ENCAPSULATION DE L'INSULINE POUR LA DÉLIVRANCE ORALE

THESE

Présentée pour l'Obtention du
Diplôme de Doctorat en Génie des Procédés
en Génie Pharmaceutique

Par
Naima FAGHMOUS

Devant le Jury Composé de :

Rihab BOUSHABA	Présidente	Professeur	Université Constantine 3
Djallel BOUZID	Directeur	Professeur	ENP de Constantine
Meriem EL KOLLI	Examineur	Professeur	Université Sétif 1
Mehmoud BOUNEKHAL	Examineur	Professeur	Université Sétif 1
Fouzia BELAIB	Examineur	Professeur	Université Constantine 3
Lotfi BENMEKHBI	Examineur	MCA	Université Constantine 3

Année Universitaire
2020-2021



Nom et Prénom : Naima FAGHMOUS
Titre : Étude de l'encapsulation de l'insuline pour la délivrance orale

Thèse en vue de l'Obtention du Diplôme de Doctorat
en Génie des Procédés en Génie Pharmaceutique

RÉSUMÉ

Ce travail s'articule autour de l'optimisation et la modélisation de la formulation des micro et nanoparticules contenant l'insuline par deux procédés d'encapsulation à savoir la gélification ionotropique (GI) et la double émulsion (EM), en utilisant une matrice polymérique naturelle (alginate/chitosane). Cette matrice est rendue furtive par l'ajout du PEG 4000 à la surface des micro et nanoparticules. L'optimisation de la formulation est entreprise en utilisant la méthodologie des surfaces de réponse en accord avec le plan de Box-Behnken, afin de déterminer les conditions optimales pour une taille minimale des particules avec une charge de surface maximale et une efficacité d'encapsulation maximale. Dans les différents cas le modèle obtenu est significatif avec $P < 0,05$ et $R^2 > 90\%$. La formulation optimale préparée par GI et EM, est caractérisée par une taille des particules de 145 nm, 193 nm avec une charge de surface négative de -30 mV, -44.2 mV, et efficacité d'encapsulation de 85%, 94,3%, respectivement.

Les résultats d'analyse thermique (ATG et DSC) et structurale (FTIR) ont montré la conservation de la structure de l'insuline après son encapsulation dans les nanoparticules furtives. L'étude comparative des profils de dissolution a confirmé la protection du principe actif dans le milieu gastrique simulé (taux de libération $< 40\%$) et la libération prolongée dans le milieu intestinal simulé. Le caractère de furtivité a été mis en évidence par le ralentissement de la cinétique de libération *in vitro* de l'insuline encapsulée, dans les deux milieux physiologiques simulés comparativement à des nanoparticules simples (non furtives). L'EM a montré un grand potentiel dans le développement des nanoparticules furtives, contenant le plus haut taux d'encapsulation de l'insuline, le plus faible taux de libération dans le milieu gastrique simulé et le plus lent dans le milieu intestinal simulé en le comparant à l'autre procédé. Les résultats obtenus suggèrent l'efficacité des nanoparticules furtives à base d'alginate/chitosane/PEG pour l'administration de l'insuline par voie orale tout en assurant le contrôle de sa cinétique de libération.

Mots clés : Plans d'expériences, RSM, nanoparticules furtives, gélification ionotropique, double émulsion.

Directeur de thèse : Djallel BOUZID - École Nationale Polytechnique de Constantine

Année Universitaire : 2020-2021

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu mon directeur de thèse **Pr. Djallel BOUZID**, professeur à l'École Polytechnique de Constantine, pour ses conseils avisés, sa patience, sa disponibilité sans faille et ses perspectives éclairées. Merci pour la confiance qu'il m'a accordée dans mes travaux de recherche.

Je remercie vivement **Pr. Rihab BOUSHABA** de l'Université de Constantine 3 qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de jury d'expertise et de soutenance de cette thèse.

Je remercie aussi l'ensemble des membres du jury : **Pr. Meriem EL KOLLI**, **Pr. Mehmoud BOUNEKHAL** de l'Université de Sétif 1, **Dr. Fouzia BELAIB** et **Dr. Lotfi BENMEKHBI** de l'Université de Constantine 3 pour l'acceptation d'examiner ce travail et pour leurs intérêts portés au sujet de cette thèse.

Mes remerciements s'adressent également à l'ensemble de l'École Nationale Polytechnique de Constantine, en particulier au directeur de l'école, **Pr. Djamel HAMANA**. C'est dans les laboratoires de l'école que j'ai effectué la plus grande partie de mes analyses. Merci à toute l'équipe de départements de Génie des Procédés et Génie des Matériaux. Par la même occasion, je remercie les ingénieurs des laboratoires, **Mmes Halla, Sabah, Oumaima, Asma**, mes collègues, **Dr. Loubna Chettibi**, **Dr. A. Ali HAYOUNE** et **Dr. BOUTCHICHA**. Un grand merci pour ma collègue **Dr. Souheila TOUAITI** pour ses conseils et son encouragement sans oublier ma chère amie **Mme Fatima Zohra BADAOU**.

Mes remerciements vont aussi, à l'ingénieur **Mme Inesse HADADI** et **Pr. Khelifi DOUADI**, directeur de l'École de Biotechnologie de Constantine.

Je remercie aussi, Le Doyen de la Faculté de Génie des Procédés de l'Université de Constantine 3, **Pr. Abdesalam-Hassen MENIAI**, ainsi que l'ensemble du staff de département de Génie Pharmaceutique.

Merci à tous ceux qui m'ont aidée, d'une manière ou d'une autre, dans ce travail.

Enfin, je garde ma dernière pensée pour ma famille qui a su me supporter tout au long de ce chemin, dans les bons et les mauvais moments. Rien de tout cela n'aurait été possible sans l'aide et le soutien de mon mari Mohamed le long des années de thèse.

DÉDICACES

Je remercie Dieu tout puissant d'avoir pu achever ce modeste travail que je dédie :

À la mémoire de mon père et ma mère

À mes fils Yahia et Firas nés au cours de cette thèse

À mon époux Mohamed

À mes chers frères et sœurs

À toute la famille et toutes mes amies.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	xii
LISTE DES TABLEAUX	xvii
LISTE DES ABREVIATIONS	xix
RESUME	xx
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
CHAPITRE I : L'INSULINE ET LA VOIE ORALE	
1.1. Introduction.....	4
1.2. Les modes d'administration.....	4
1.2.1. Intérêts de la voie orale	4
1.2.2. Limites de l'administration orale d'insuline	5
1.3. Stratégies d'optimisation de la biodisponibilité de l'insuline administrée par voie orale	8
1.3.1. Les inhibiteurs enzymatiques	9
1.3.2. Les promoteurs d'absorption.....	9
1.3.3. Les systèmes mucoadhésifs à base de polymères	10
1.3.4. Vectorisation de l'insuline par des particules (l'encapsulation)	10
1.4. Les générations des nanoparticules.....	13
1.4.1. Première génération.....	14
1.4.2. Deuxième génération.....	14
1.4.3. Troisième génération.....	14
1.5. Les polymères les plus utilisés pour l'encapsulation	15
1.5.1. Polymères synthétiques	16
1.5.2. Polymères naturels	16
1.6. L'enrobage par le PEG.....	16
1.7. Mécanismes de libération du principe actif à partir des micro/nanoparticules.....	17
1.8. Conclusion	17
CHAPITRE II : DIFFÉRENTES TECHNIQUES D'ENCAPSULATION	
2.1. Introduction.....	18
2.2. Les différentes techniques d'encapsulation	18
2.2.1. Gélation ionotropique.....	19
2.2.2. Les techniques d'émulsification.....	28
2.3. Mode de libération des principes actifs encapsulés dans les émulsions multiples ...	40
2.3.1. Mécanisme avec rupture de film	40

2.3.2. Mécanismes sans rupture de film	41
2.4. Exemple d'application des émulsions doubles : l'insuline par voie orale	43
2.5. Conclusion	44
CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES	
3.1. Introduction.....	46
3.2. Matériel	46
3.2.1. Le principe actif	46
3.2.2. Polymères utilisés comme matrices d'encapsulation	46
3.2.3. Produits utilisés en technique de l'émulsification (la double émulsion).....	48
3.2. Méthodologie de la recherche expérimentale	50
3.2.1. Formulation des micro et nanoparticules par la technique de la gélation ionotrope	50
3.2.2. Formulation des micro et nanoparticules encapsulant l'insuline par la double émulsion	51
3.3. Caractérisation des micro et nanoparticules	53
3.3.1. Microscopie optique.....	53
3.3.2. Diffusion Dynamique de la lumière (DLS, Dynamic Light Scattering)	54
3.3.3. Efficacité d'encapsulation	55
3.3.4. Spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)	56
3.3.5. Analyse thermogravimétrique	56
3.3.6. Analyse calorimétrique différentielle à balayage (DSC)	56
3.4. Analyse conductimétrique des émulsions multiples	57
3.5. Analyse rhéologique	57
3.6. Profil de libération de l'insuline encapsulée dans les milieux simulés.....	58
3.7. Méthodologie des plans d'expériences	59
3.7.1. Étude de criblage (screening).....	60
3.7.2. Étude par surfaces de réponses (MSR)	61
3.8. Tests de stabilité des nanoparticules dans le temps	62
3.9. Conclusion	62
CHAPITRE IV : OPTIMISATION DE LA FORMULATION DES NANOPARTICULES PAR GÉLATION IONOTROPIQUE	
4.1 Introduction.....	64
4.2. Plan de Criblage	64
4.2.1 Détermination des facteurs et du domaine d'étude	64
4.2.2. Les réponses	65
4.2.3. Résultats expérimentaux	65
4.2.4. Analyse graphique des résultats	66
4.3. Plan Box-Behnken	71

4.3.1. Choix des facteurs d'étude	72
4.3.2. Réponses.....	72
4.3.3. Analyse statistique des résultats obtenus pour la taille des particules	73
4.3.4. Analyse statistique des résultats obtenus pour le potentiel Zêta	74
4.3.5. Analyse statistique des résultats obtenus pour le taux d'efficacité d'encapsulation 75	
4.4. Modélisation de l'EE par RSM.....	81
4.5. Détermination et validation de l'optimum	83
4.6. Conclusion	83
CHAPITRE V : OPTIMISATION DE LA FORMULATION DES MICRO ET NANOPARTICULES ENCAPSULANT L'INSULINE PAR DOUBLE ÉMULSION	
5.1. Introduction.....	85
5.2. Plan de criblage.....	85
5.2.1. Détermination des facteurs et du domaine d'étude	85
5.2.3. Résultats et discussion.....	86
5.2.4. Étude des effets principaux	87
5.3. Plan Box-Behnken	92
5.3.1. Détermination des facteurs et du domaine d'étude	92
5.3.2. Réponses.....	92
5.3.3. Analyse statistique des résultats de la taille des particules	93
5.3.4. Analyse statistique des résultats de potentiel zêta.....	95
5.3.5. Analyse statistique des résultats du taux d'encapsulation.....	96
5.4. Modélisation par RSM.....	97
5.4.1. Optimisation de la taille par RSM.....	98
5.4.2. Optimisation du potentiel zêta par RSM	100
5.4.3. Optimisation du taux d'efficacité d'encapsulation.....	102
5.5. Étude de l'effet de recouvrement de la double émulsion par PEG 4000	104
5.6. Étude rhéologique	106
5.7. Conclusion	107
CHAPITRE VI : SUIVI ET CARACTÉRISATION DES NANOPARTICULES D'INSULINE OPTIMISÉES	
6.1. Introduction.....	109
6.2. Caractérisation de l'optimum.....	109
6.2.1. Observation morphologique	109
6.2.2. Caractérisation granulométrique, du potentiel zêta et taux d'encapsulation....	111
6.3. Caractérisation thermique et structurale	111
6.3.1. Analyse thermogravimétrique (ATG)	111

6.3.2. Propriétés thermiques par analyse enthalpique différentielle (DSC).....	113
6.3.3. Analyse par spectrométrie FTIR	114
6.4. Étude de libération de l'insuline en milieux simulés	118
6.5. Modélisation de la cinétique de libération du principe actif.....	123
6.6. Suivi de la stabilité de la formulation optimale	127
6.6.1. Analyse morphologique	127
6.6.2. Suivi granulométrique, du potentiel zêta et taux d'efficacité d'encapsulation.....	128
6.7. Conclusion	130
CONCLUSION GÉNÉRALE	131
BIBLIOGRAPHIE.....	134
LISTE DES ANNEXES	
Annexe A : Vocabulaire De Base Des Plans D'expériences.....	152
Annexe B : Protocole de préparation de la phase mobile pour la quantification de l'insuline par HPLC.....	156
Annexe C : Validation de la méthode de dosage par HPLC-Spécificité	157
Annexe D : Courbes d'étalonnages	159
Annexe E : Tables de Student et Fisher.....	161
Annexe F : Modélisation mathématiques des profils de dissolution	163
ARTILCE	

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 A — Caractéristique anatomique des différentes sections du tractus gastro-intestinal; B — Schématisation de la structure cellulaire de l'épithélium intestinal (D'après Chen et al., 2011).....	7
1.2 Schématisation des voies de passage de la barrière épithéliale de l'intestin (D'après Chen et al., 2011).....	8
1.3 Schématisation des différents vecteurs pour la délivrance d'insuline par voie orale : A — Liposomes, B — Nanocapsules lipidiques, C — Nanosphères de polymère, D — Nanocapsules de polymère. (Wawrezynieck et al., 2008).....	11
1.4 Schématisation des différents types de liposomes monocouches (Torchilin, 2005).....	12
1.5 Schématisation des différentes formes de nanoparticules : A — Nanosphères ; B — Nanocapsules (Kumari et al., 2010).....	13
1.6 Schéma des trois générations de nanoparticules (Goutayer, 2008)	15
1.7 Polymères biodégradables couramment utilisés dans l'application de délivrance de médicaments (D'après (Kamaly et al., 2012).....	16
2.1 Les différents procédés d'encapsulation.....	19
2.2 Structure chimique de l'alginate de sodium : monomères d'acides uroniques (a) ; conformation des chaînes (b) ; et distribution des blocs (c) (Ching et al., 2017 ; Draget et al., 2005).....	21
2.3 Mécanisme de gélification de l'alginate en présence d'ions calcium : a- Chélation des cations divalents b- Formation de la jonction entre les chaînes (Fang et al., 2007).....	23
2.4 Le model dit « egg-box » (Li et al., 2007; Morris et al., 1978)	24
2.5 Illustration du mode de diffusion dans le gel Ca-alginate (Palluault, 2010)	24
2.6 Illustration du mode de gélification interne dans le gel Ca-alginate (Palluault, 2010).....	25
2.7 Schématisation de la déacétylation de la chitine (Zargar et al., 2015).....	26
2.8 Charge globale de l'insuline en fonction du pH (Callet, 2010).....	28
2.9 Les 2 types d'émulsions doubles (Aserin, 2008).....	30
2.10 Schéma représente la composition de l'interface d'une émulsion multiple stabilisée par deux émulsifiants antagonistes avec une distribution idéale (Leister et Karbstein, 2020).....	31
2.11 Représentation schématique de la méthode d'émulsification en deux étapes (a) réalisation de l'émulsion directe (b) réalisation de l'émulsion double (Allouche et al., 2003).....	33
2.12 Représentation schématique d'un diagramme de phase ternaire de type eau / huile / émulsionnant (Stauffer, 2014).....	35
2.13 Phénomènes de mûrissement dans les émulsions doubles H/E/H (a) mûrissement d'Ostwald (b) mûrissement de composition (Leister et Karbstein, 2020).....	36
2.14 Représentation schématique de (a) la coalescence entre globules et (b) la coalescence entre gouttelettes (Leister Karbstein, 2020).....	36
2.15 Représentation schématique de la coalescence des gouttelettes avec le globule (Leister et Karbstein, 2020).....	37

2.16	Représentation de l'échange de tensioactifs aux interfaces d'une émulsion double H/E/H (Dickinson, 2011).....	37
2.17	Représentation schématique de la réduction ou du gonflement des gouttelettes : déséquilibre de pression osmotique (Dickinson, 2011; Protat, 2016).....	38
2.18	Libération d'un composé hydrosoluble par coalescence des gouttelettes internes à la surface des globules dans une émulsion E/H/E. représente l'espèce encapsulée (Bonnet, 2008).....	41
2.19	Représentation schématique des différents mécanismes de libération sans rupture de film, dans les émulsions doubles E/H/E (Bonnet, 2008).....	42
3.1	Protocole de formulation des nanoparticules recouvertes avec du PEG 4000.....	51
3.2	Différentes étapes de préparation des émulsions multiples	53
3.3	Principe de la mesure de la charge de surface par granulométrie laser (Rami, 2010).....	55
3.4	Lieu géométrique des points expérimentaux d'un plan de Box-Behnken à trois facteurs (Vaillé et Goupy, 2006).....	61
4.1	Diagramme des effets principaux sur la taille des particules.....	67
4.2	Diagramme des effets sur le potentiel zêta.....	68
4.3	Diagramme des effets principaux sur le taux d'efficacité d'encapsulation..	69
4.4	Diagramme des effets d'interactions sur la taille des particules.....	70
4.5	Diagramme des effets d'interaction sur le potentiel zêta.....	70
4.6	Diagramme des effets d'interaction sur le taux d'efficacité d'encapsulation.....	71
4.8	Diagrammes (A) de contour et (B) de surface de réponse de l'effet d'interaction X_1 - X_2 à X_3 moyen sur la taille.....	78
4.9	Diagrammes (A) de contour et (B) de surface de réponse de l'effet d'interaction X_1 - X_3 à X_2 moyen sur la taille.....	78
4.10	Diagrammes (A) de contour et (B) de surface de réponse de l'effet d'interaction de X_2 - X_3 à X_1 moyen sur la taille.....	79
4.11	Diagrammes (A) de contour et (B) de surface de réponse de l'effet d'interaction X_1 - X_2 à X_3 moyen sur le potentiel zêta	80
4.12	Diagrammes (A) de contour et (B) de surface de réponse de l'effet d'interaction X_1 - X_3 à X_2 moyen sur le potentiel zêta	80
4.13	Diagrammes (A) de contour et (B) de surface de réponse de l'effet d'interaction X_2 - X_3 à X_1 moyen sur le potentiel zêta	81
4.14	Diagrammes (A) de contour et (B) de surface de réponse de l'effet d'interaction X_1 — X_2 à X_3 moyen sur EE.....	81
4.15	Diagrammes (A) de contour et (B) de surface de réponse de l'effet d'interaction X_1 - X_3 à X_2 moyen sur EE.....	82
4.16	Diagrammes (A) de contour et (B) de surface de réponse de l'effet d'interaction X_2 - X_3 à X_1 moyen sur EE.....	82
5.1	Diagramme des effets principaux sur TP.....	87
5.2	Diagramme des effets sur le potentiel zêta.....	88
5.3	Diagramme des effets principaux sur EE.....	89
5.4	Diagramme des interactions des effets sur la taille des particules.....	90
5.5	Diagramme des interactions pour le potentiel zêta.....	91
5.6	Diagramme des interactions pour le taux d'encapsulation.....	91
5.7	Diagrammes (A) de contour et (B) de surface de réponse de l'effet d'interaction de X_1 - X_2 à X_3 moyen sur la taille	98

5.8	Diagrammes (A) de contour et (B) de surface de réponse de l'effet d'interaction X_1 - X_3 à X_2 moyen sur la taille	99
5.9	Diagrammes (A) de contour et (B) de surface de réponse de l'effet d'interaction X_2 - X_3 à X_1 moyen sur la taille.....	99
5.10	Diagrammes (A) de contour et (B) de surface de réponse de l'effet d'interaction X_1 - X_2 à X_3 sur le potentiel zêta.....	100
5.11	Diagrammes (A) de contour et (B) de surface de réponse sur l'effet d'interaction X_1 - X_3 à X_2 sur le potentiel zêta.....	101
5.12	Diagrammes (A) de contour et (B) de surface de réponse de l'effet d'interaction X_2 - X_3 à X_1 moyen sur le potentiel zêta.....	101
5.13	Diagrammes (A) de contour et (B) de surface de réponse de l'effet d'interaction X_1 - X_2 à X_3 moyen sur EE.....	102
5.14	Diagrammes (A) de contour et (B) de surface de réponse de l'effet d'interaction X_1 - X_3 à X_2 moyen sur EE.....	102
5.15	Diagrammes (A) de contour et (B) de surface de réponse de l'effet d'interaction X_2 - X_3 à X_1 moyen sur EE.....	103
5.16	Histogramme illustrant l'effet de recouvrement d'EM par du PEG sur TP	105
5.17	Histogramme illustrant l'effet de recouvrement d'EM par du PEG sur PZ	105
5.18	Histogramme illustrant l'effet de recouvrement d'EM par du PEG sur EE	106
5.19	Évolution de la viscosité des EMs en fonction du taux de cisaillement (EM1 : émulsion recouverte avec du chitosane et PEG, EM2 : émulsion recouverte avec du chitosane 0,07%, EM3 : émulsion recouverte avec du chitosane 0,05%).....	107
6.1	: Observations en microscopie optique des nanoparticules obtenues par gélification ionotropique (A : NPs sans insuline, B : NPs NF et C : NPsF)....	110
6.2	Observations en microscopie optique des émulsions multiples (A : EM, B : EM d'insuline, C : EM recouverte avec le chitosane et D : EM recouverte de chitosane et PEG).....	110
6.3	Analyse thermogravimétrique (ATG) de l'insuline à l'état pur et nanodispersé (essai optimal).....	112
6.4	Thermogrammes de l'insuline pure et encapsulée dans les nanoparticules furtives (essais optimaux).....	113
6.5	Spectres FTIR des polymères utilisé	115
6.6	Spectres FTIR de l'insuline pure (C) et des nanoparticules furtives encapsulant l'insuline, préparé par EM (A : Npf-EM) et GI (B : NPf-GI).....	117
6.7	Profil de dissolution des nanoparticules furtives (NPf-GI) et non furtives (NPnf-GI) préparées par GI à pH 1,2.....	119
6.8	: Profil de dissolution de l'émulsion multiple à pH 1,2 : Nanoparticules furtives (NPf-EM), Nanoparticules non furtives (NPnf-EM) et EM sans chitosane.....	120
6.9	Profil de dissolution des nanoparticules furtives (NPf-GI) et non furtives (NPnf-GI) préparées par GI à pH 6,8.....	121
6.10	Profil de dissolution de l'émulsion multiple à pH 6,8 : Nanoparticules furtives (NPf-EM), Nanoparticules non furtives (NPnf-EM) et EM sans chitosane.....	121
6.11	Profil de dissolution des nanoparticules furtives (NPf-GI) et non furtives (NPnf-GI) préparées par GI à pH 7,4.....	122

6.12	Profil de dissolution des nanoparticules préparées par émulsion multiple à pH 7,4 : EM sans chitosane ; des nanoparticules furtives (NPf-EM); des nanoparticules non furtives (NPnf-EM).....	123
6.13	Observations en microscopie optique des particules d'insuline furtives obtenues par gélation ionotropique : A – état initial ; B– après 45 jours et conservées à 4 °C.....	127
6.14	Observations en microscopie optique des particules d'insuline non furtives obtenues par émulsion multiple : A – état initial ; B– après 45 jours et conservées à 4 °C.....	127
6.15	Observations en microscopie optique des particules d'insuline furtives obtenues par émulsion multiple : A – état initial ; B– après 45 jours et conservées à 4 °C.....	128
6.16	Évolution du diamètre moyen, potentiel zêta et taux d'efficacité d'encapsulation des nanoparticules furtives (NPf) et non furtives (NPnf) préparées par EM et GI durant le stockage à $+4\pm 2$ °C.....	129

LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
1.1	Variations du pH dans les différentes sections du tractus gastro-intestinal (Hörter et Dressman, 2001).....	5
3.1	Matrice d'essais de l'étude de criblage	60
3.2	Plan de Box-Behnken pour 3 facteurs	62
4.1	Facteurs du criblage et leurs niveaux réels et codés pour gélation ionotropique.....	65
4.2	Les réponses choisies pour gélation ionotropique.....	65
4.3	Plan de criblage des facteurs et ses réponses pour gélation ionotropique...	65
4.4	Facteurs et domaine d'étude.....	72
4.5	Plan de Box-Behnken avec les réponses expérimentales (unités codées)	72
4.6	Coefficients de régression estimés pour la taille	73
4.7	Analyse de la variance pour la taille	74
4.8	Coefficients de régression estimés pour le potentiel zêta.....	74
4.9	Analyse de la variance pour le potentiel zêta.....	75
4.10	Coefficients de régression estimés pour le taux d'efficacité d'encapsulation	76
4.11	Analyse de la variance pour le taux d'efficacité d'encapsulation.....	77
4.12	Les valeurs des facteurs de gélation ionotropique.....	83
4.13	Les valeurs des réponses mesurées et prédites de l'optimum de gélation ionotropique.....	83
5.1	Facteurs du criblage et leurs niveaux réels et codés pour double émulsion	86
5.2	Plan de criblage des facteurs et ses réponses pour émulsion multiple.....	86
5.3	Facteurs et domaine d'étude pour émulsion multiple	92
5.4	Plan de Box-Behnken avec les réponses expérimentales (unités codées)	93
5.5	Coefficients de régression estimés pour la taille.....	93
5.6	Analyse de la variance pour la taille.....	94
5.7	Coefficients de régression estimés pour le potentiel zêta.....	95
5.8	Analyse de la variance pour le potentiel zêta	96
5.9	Coefficients de régression estimés pour le taux d'efficacité d'encapsulation.....	96
5.10	Analyse de la variance pour le taux d'efficacité d'encapsulation.....	97
5.11	Les valeurs des facteurs de l'émulsion multiple.....	104
5.12	Les valeurs des réponses mesurées et prédites de l'optimum de l'émulsion multiple.....	104
6.1	Caractéristiques des nanoparticules d'insuline furtives et non furtives....	110
6.2	Paramètres de la modélisation du profil de dissolution (Abdelkader et al., 2018a ; Siepmann et Peppas, 2012).....	123
6.3	Paramètres cinétiques des modèles obtenus (pour la désignation des paramètres voir Tableau 6.2).....	125

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A : absorbance
ATG : Analyse thermogravimétriques
CM : carré moyen
CMM : carré moyen du modèle
CMR : carré moyen des résidus
CMT : carré moyen total
DDL : degré de liberté
DLS : diffusion dynamique de la lumière
DSC : calorimétrie différentielle a balayage
EE : efficacité d'encapsulation
EM : Emulsion multiple
E/H : Emulsion eau/huile
E/H/E : Emulsion eau/huile/eau
F_{cri} : F critique
F_{obs} : F observé
FTIR : Infra-rouge à transformée de fourier
GI : Gélation ionotropique
HLB : Balance hydrophile lipophile
H/E/H : huile/eau/huile
LOD : limite de détection
LOQ : limite de quantification
MEB : Microscope Électronique à Balayage
NP : nanoparticules
NPsf : Nanoparticules furtives
PBS : tampon phosphate salin
PCS : spectroscopie à corrélation de photons
RSM : Méthodologie de surface de réponse
R² : coefficient de régression
R²_{ajus} : coefficient de régression ajusté
RSD : écart type résiduel
S : pente (slope)
SC : somme des carrés des écarts

RÉSUMÉ

Ce travail s'articule autour de l'optimisation et la modélisation de la formulation des micro et nanoparticules furtives contenant l'insuline par deux procédés d'encapsulations à savoir la gélation ionotropique (GI) et la double émulsion (EM) en utilisant une matrice polymérique naturelle (Alginate/Chitosane). Cette matrice est rendue furtive par l'ajout du PEG 4000 à la surface des particules. L'optimisation de la formulation est entreprise en utilisant la méthodologie des surfaces de réponse (RSM) en accord avec le plan de Box-Behnken, afin de déterminer les conditions optimales pour une taille minimale des particules avec une charge de surface maximale et une efficacité d'encapsulation maximale. Dans les différents cas le modèle obtenu est significatif avec une valeur de $p < 0,05$ et $R^2 > 90\%$. La formulation optimale préparée par GI et EM, est caractérisée par une taille des particules de 145 nm, 193nm, avec une charge de surface négative de -30 mV, -44.2 mV, et une efficacité d'encapsulation de 85%, 94,3%, respectivement.

Les résultats d'analyse thermique (ATG et DSC) et structurale (FTIR) ont montré la conservation de la structure de l'insuline après son encapsulation dans les nanoparticules furtives. L'étude comparative des profils de dissolution a confirmé la protection du principe actif dans le milieu gastrique simulé (taux de libération < 40%) et la libération prolongée dans le milieu intestinal simulé. Le caractère de furtivité a été mis en évidence par le ralentissement de la cinétique de libération *in vitro* de l'insuline encapsulée, dans les deux milieux physiologiques simulés comparativement à des nanoparticules simples (non furtives). L'EM a montré un grand potentiel dans le développement des nanoparticules furtives, contenant le plus haut taux d'encapsulation de l'insuline, le plus faible taux de libération dans le milieu gastrique simulé et le plus lent dans le milieu intestinal simulé en la comparant avec la GI. Les résultats obtenus suggèrent l'efficacité des nanoparticules furtives à base d'alginate/chitosane/PEG pour l'administration de l'insuline par voie orale tout en assurant le contrôle de sa cinétique de libération.

Mots clés : Plans d'expériences, RSM, nanoparticules furtives, gélation ionotropique, double émulsion.

ABSTRACT

This work aimed both at optimization and modeling of stealth nanoparticle formulation containing insulin by two encapsulation processes, namely ionotropic gelation (IG) and Double emulsion (ME) using a natural polymer matrix (Alginate/Chitosan). This matrix is made stealthy by addition the PEG 4000 to the nanoparticle surface. The synthesis optimization is obtained by the RSM response surfaces methodology in agreement with the Box-Behnken design to determine the optimal conditions for minimum particle size with maximum surface charge and maximum efficiency encapsulation. In the different cases, the model obtained is significant with a *p-value* < 0.05 and $R^2 > 90\%$. Optimal formulations prepared by GI and EM are characterized by a particle size of 145 nm and 193 nm, a negative surface charge of -30 mV and -44.2 mV, and encapsulation efficiency of 85% and 94.3%, respectively.

Thermal (ATG and DSC) and structural (FTIR) analysis results showed the structural retention of insulin after its encapsulation in stealth nanoparticles. The comparative study of dissolution profiles confirmed the protection of the active substance in the simulated gastric environment (release rate <40 %) and the sustained release in the simulated intestinal environment. The stealth character was improved by *in vitro* release kinetic slowing of encapsulated insulin in the two simulated physiological media compared to simple (non-stealth) nanoparticles. EM has shown great potential in stealth nanoparticles development with the highest rate of insulin encapsulation, the lowest rate of release in the simulated gastric medium, and the slowest in the simulated intestinal medium compared to GI. The results suggest the effectiveness of alginate/chitosan/PEG-based stealth nanoparticles for oral administration of insulin while ensuring the control of its release kinetics.

Keywords: Design of experiments, RSM, stealth nanoparticles, Ionotropic gelation, Double emulsion.

ملخص

يتعلق هذا العمل بتحسين و نمذجة تخليق الجسيمات النانوية الشبكية التي تحتوي على الأنسولين من خلال عمليات تغليف وهي التكوّن المؤثر للتأين (GI)، والمستحلب المزدوج (EM). وذلك باستخدام نسيج غشائي لبوليمرات طبيعية (ألجينات / شيتوزان)، تم جعلها متخفية عن طريق إضافة PEG 4000 إلى سطح الجسيمات النانوية. يتم إجراء تحسين التوليف باستخدام منهجية أسطح استجابة RSM وفقاً لتصميم Box-Behnken. من أجل تحديد الظروف المثلى لأدنى حجم للجسيمات مع أقصى شحنة وكفاءة للسطح. في الحالات المختلفة النموذج الذي تم الحصول عليه قيم مع $p > 0.05$ و $R^2 < 90\%$. تتميز الصيغة المثلى التي أعدها GI و EM بحجم جسيم يبلغ 145 نانومتر، 193 نانومتر مع شحنة سطحية سالبة تبلغ 30- مللي فولت، -64.9 مللي فولت، وكفاءة تغليف 85٪، 09.49٪، على التوالي.

أظهرت نتائج التحليل الحراري (ATG و DSC) والهيكلية (FTIR) الاحتفاظ الهيكلي بالأنسولين بعد تغليفه في جزيئات متناهية الصغر. أكدت الدراسة المقارنة لملفات الذوبان حماية المادة الفعالة في بيئة المعدة المحاكاة (معدل الإطلاق $> 40\%$) والإطلاق المستمر في البيئة المعوية المحاكاة. تم إثبات الطابع التخفي من خلال تباطؤ حركية التحرر في المختبر للأنسولين المغلف، في الوسطين الفيسيولوجيين المحاكين مقارنة بالجسيمات النانوية البسيطة (غير الشبكية). أظهرت EM إمكانات كبيرة في تطوير الجسيمات النانوية الخفية، التي تحتوي على أعلى معدل لتغليف الأنسولين، وأقل معدل إطلاق في وسط المعدة المحاكى ، و الأبطأ في وسط الأمعاء المحاكى مقارنة بالتقنية الأخرى. تشير النتائج التي تم الحصول عليها إلى فعالية الجينات النانوية الشبكية القائمة على الألجينات / الشيتوزان / PEG في إعطاء الأنسولين عن طريق الفم مع ضمان التحكم في حركية إطلاقه.

الكلمات المفتاحية: تصميم التجارب، RSM، الجسيمات النانوية الشبكية، الهلام المؤين للتأين، المستحلب المزدوج

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Actuellement, le seul traitement ayant prouvé son efficacité thérapeutique pour le diabète de type 1, est l'administration d'insuline par voie parentérale, précisément par voie sous-cutanée ; inconfortable et contraignante pour le patient. Cette voie d'administration présente plusieurs inconvénients notamment :

- Une reproductibilité imparfaite du profil normal des concentrations d'insuline endogène au cours de la journée, suite à une dissémination systémique de l'insuline injectée dans le système veineux périphérique (Retnakaran et al., 2004).
- Un hyperinsulinisme périphérique et un risque de lipodystrophie à long terme (Picard et al., 2017).
- Une observance thérapeutique faible en raison de la complexité du traitement (Paquot, 2010)
- Des obstacles d'ordre psychologique : phobie des injections (Murthi et al., 2010).

La voie orale est l'une des alternatives les plus étudiées dans les nouvelles voies d'administration de l'insuline. L'administration orale de l'insuline est plus naturelle, permettant ainsi de reproduire la délivrance physiologique de cette dernière après l'effet du premier passage hépatique. Cependant, la limite majeure de cette voie est liée aux nombreuses barrières physiques et chimiques rencontrées jusqu'à la délivrance de l'insuline au foie. Les principaux obstacles sont (Andreani et al., 2014a ; Basha et al., 2020) :

- Dégradation naturelle dans le tractus gastro-intestinal en raison de l'environnement acide de l'estomac combiné à l'action des enzymes protéolytiques.
- Faible absorption de l'insuline par l'épithélium intestinal en raison de son hydrophilie et de sa grande taille.

En effet, des stratégies de protection et de vectorisation de l'insuline sont nécessaires pour promouvoir une administration orale de l'insuline. Parmi les nouvelles stratégies qui ont pour objectif l'administration orale d'insuline, les micro et nanoparticules polymériques et les émulsions multiples de type Hydrophile/Lipophile/Hydrophile (H/L/H) sont apparues comme des systèmes très intéressants pour l'encapsulation des substances hydrophiles et fragiles telle que l'insuline (Basha et al., 2020 ; Li et al., 2013). Les émulsions multiples présentent l'avantage sur les autres vecteurs tels que les liposomes et les nanoparticules d'être formulées avec des constituants courants et selon un protocole opératoire relativement plus simple (Basha et al., 2020).

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse s'est focalisé sur la mise au point des vecteurs polymériques mucoadhésives à base des polysaccharides de charges opposées et rendues furtives par création d'une couronne hydrophile avec du PEG 4000 fixée par interactions électrostatiques avec le polymère polycationique. Ces vecteurs protègent l'insuline de l'environnement du tractus gastro-intestinal permettant le passage de la barrière intestinale et ils sont capables d'éviter le système phagocytaire mononucléé lors de leur administration par voie orale, dans le but d'explorer la possibilité d'utilisation de la voie orale pour la vectorisation de l'insuline dans l'organisme.

L'encapsulation de l'insuline dans ces vecteurs est basée sur des procédés physico-chimiques : l'encapsulation par gélation ionotropique et une technique d'émulsification notamment la double émulsion.

Cette thèse est structurée en six chapitres, en plus d'une introduction générale et d'une conclusion.

L'introduction présente les problèmes liées à l'administration de l'insuline par voie sous-cutanée et la nécessité de développer des stratégies de protection et de vectorisation de ce principe actif pour une administration orale.

Le premier chapitre décrit les différentes stratégies utilisées dans la littérature pour l'administration de l'insuline par voie orale, telles que les techniques d'encapsulation, entre autre les émulsions multiples et les trois générations de nanoparticules, ainsi que les polymères destinés à l'encapsulation et la vectorisation des principes actifs.

Le deuxième chapitre est consacré à l'état de l'art des différentes techniques d'encapsulation de l'insuline utilisées au cours de cette thèse, à savoir la gélation ionotropique et les techniques d'émulsification. Comme il donne une présentation détaillée de la structure chimique, des propriétés des polymères utilisés dans les différents travaux d'encapsulation, à savoir le chitosane, l'alginate et le PEG4000.

Le troisième chapitre est destiné à la description du matériel, des méthodes et des techniques d'analyses qualitatives et quantitatives utilisées dans ce travail. Ce chapitre présente les protocoles opératoires de formulation et de caractérisation de ces systèmes particuliers encapsulant l'insuline, ainsi que le protocole de l'étude de la dissolution *in vitro* et l'étude de stabilité. L'approche des plans d'expériences est présentée aussi dans ce chapitre, celle-ci consiste à organiser la démarche expérimentale et l'analyse décisionnelle.

Le quatrième chapitre est consacré à l'optimisation des conditions de la formulation des nanoparticules furtives via le procédé de gélation ionotropique en se basant sur la formation d'un complexe polyélectrolyte d'alginate/chitosane par gélation de l'alginate, suivie par la complexation avec le chitosane et le recouvrement de la surface des particules à l'aide de PEG, en vue d'une administration par voie orale. Dans ce but, la méthodologie des plans d'expériences est utilisée afin d'évaluer l'influence des facteurs étudiés, à savoir la vitesse et le temps d'homogénéisation, ainsi la concentration en PEG4000 sur les caractéristiques de particules obtenues. L'usage d'un plan d'optimisation permet de trouver le modèle mathématique adéquat décrivant correctement les variations de la réponse en fonction des facteurs.

Le cinquième chapitre est consacré à l'optimisation de la formulation des micro et nanoparticules encapsulant l'insuline par la technique de double émulsion, en se basant sur le plan Box-Behnken à trois variables, à savoir la concentration du surfactant lipophile dans la première émulsion et la concentration du surfactant hydrophile dans la deuxième émulsion, ainsi la fraction volumique de la phase aqueuse interne. Ceci a permis de déterminer les conditions optimales qui donnent les meilleures réponses (taille de particules, potentiel zêta et taux d'encapsulation). À l'optique des résultats obtenus, un modèle polynomiale expliquant et prédisant le procédé de la double encapsulation (émulsion multiple) est déterminé.

Le dernier chapitre porte sur une étude comparative des différents systèmes précédemment obtenus. Ce qui a permis de définir le meilleur système d'encapsulation de l'insuline et ceci sur la base de la caractérisation du profil de libération *in vitro* de l'optimum, préparé par les deux techniques étudiées, dans différents milieux physiologiques simulés.

Les résultats obtenus dans les différentes études sont enfin discutés dans une synthèse générale, exposée dans la conclusion générale ainsi que les perspectives envisagées de ces recherches.

CHAPITRE I : L'INSULINE ET LA VOIE ORALE

1.1. Introduction

L'insuline, nécessaire à la régulation de la glycémie, est la seule hormone hypoglycémisante. Cette molécule est actuellement administrée exclusivement au moyen d'injections (voie parentérale) ; inconfortables et contraignantes pour le patient.

Ce chapitre présente, en premier lieu, des données bibliographiques détaillant les différentes contraintes liées à l'administration de l'insuline par voie orale. Ce travail s'étant focalisé sur l'administration d'insuline par voie orale, en effet, une partie importante décrira les différentes stratégies utilisées par de nombreux travaux relatés dans la littérature pour permettre une telle administration.

1.2. Les modes d'administration

En routine, la voie sous-cutanée (SC) est utilisée pour administrer des doses quotidiennes d'insuline. La voie intraveineuse (IV) est parfois employée en situation d'urgence. Pour le patient, les injections SC présentent plusieurs inconvénients tels qu'une douleur au point d'injection, des réactions allergiques, une hyper insulinémie périphérique ayant pour conséquence une hypoglycémie ; ces effets secondaires peuvent conduire à une faible observance. Un autre point important est que ce type d'administration ne reproduit pas parfaitement la dynamique de libération de l'insuline endogène et peut varier selon le site d'injection, provoquant des problèmes de contrôle glycémique (Shah et al., 2016).

1.2.1. Intérêts de la voie orale

En récapitulant les différentes stratégies d'administration actuellement étudiées, il apparaît que l'insulinothérapie par voie orale offre le plus grand nombre d'avantages au patient, de par son utilisation simple, rapide, discrète et non stigmatisée, et ne nécessitant pas de piqûre ou de matériel particulier. La conservation du premier passage hépatique et la limitation des hypoglycémies sévères sont aussi de réels avantages pour les patients, mais aussi les praticiens. Ce premier passage hépatique n'est possible que par une administration orale et il permet de mimer la sécrétion physiologique de l'insuline, contrairement à l'administration sous-cutanée (Callet, 2010 ; Rekha et Sharma, 2013).

1.2.2. Limites de l'administration orale d'insuline

La voie orale est l'une des alternatives les plus étudiées dans les nouvelles voies d'administration de l'insuline. Cependant, cette voie présente toutefois des limites dans le cas de l'insuline. La biodisponibilité des protéines ou des peptides délivrés par voie orale est très faible ; elle est en général inférieure à 1% (Gowthamarajan et Kulkarni, 2003). La limite majeure est liée aux nombreuses barrières physiques et chimiques rencontrées jusqu'à la délivrance de l'insuline au foie.

A. Barrières chimiques et enzymatiques

Le pH est variable tout le long du tractus gastro-intestinal. Le pH de l'estomac varie entre 1 et 3, celui du duodénum entre 6 et 6,5 et enfin celui du gros intestin entre 5,5 et 7 (Hörter et Dressman, 2001). L'environnement acide peut faciliter les changements de conformation et la dissociation des hexamères d'insuline en engendrant la formation de dimères. Ces dimères d'insuline sont toujours actifs, mais leur stabilité est alors altérée. La variation de pH survenant lors du passage au niveau de l'intestin conduit à la perte de stabilité de l'insuline et à son inactivité (Whittingham et al., 2002). Le Tableau 1.1 donne un aperçu sur les variations de pH dans le tractus gastro-intestinal.

Tableau 1.1 : Variations du pH dans les différentes sections du tractus gastro-intestinal (Hörter et Dressman, 2001)

Sections	pH moyen		Longueur (cm)	Surface (m ²)	Temps de résidence moyen (h)	
	À jeun	Après repas			À jeun	Après repas
Estomac	1.7	3.5	20	0.1	1.5	3.5
Duodénum	6.1	6.5	30	0.1	< 60 secondes	
Jéjunum	6.6	5.6	240	60		
Iléon	7.4	7.5	360	60	3.5	
Colon	Ascendant	7.1	120	0.75	11.0	
	Transverse	7.6			12.0	
	Descendant	7.4			11.0	

Diverses enzymes protéolytiques susceptibles de contribuer à la dégradation de l'insuline sont rencontrées tout le long du tractus gastro-intestinal. Les enzymes majoritairement présentes dans l'estomac sont la pepsine, la gélatinase et la lipase. Ces

enzymes assurent l'hydrolyse peptidique. La trypsine, la chymotrypsine et les carboxypeptidases sont sécrétées par le pancréas et délivrées dans l'intestin (Chen et al., 2018).

Ces enzymes protéolytiques sont susceptibles de contribuer à la dégradation de l'insuline. L'hydrolyse commence dans l'estomac avec l'intervention de la pepsine et se poursuit dans le duodénum par l'action combinée des endopeptidases (trypsine, chymotrypsine et élastase) et des exopeptidase (carboxypeptidases). La trypsine, bien qu'étant la moins spécifique, est l'enzyme la plus impliquée dans la dégradation de l'insuline. Une autre enzyme dénommée insuline-degrading enzyme a été isolée dans le cytoplasme de l'entérocyte du rat. Cette dernière est capable de dégrader 92% de l'insuline. (Neelam et al., 2010).

B. Barrières physiques

L'intestin grêle, première partie de l'intestin, se décompose en trois parties : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Le duodénum, responsable de l'absorption de plus de 90% des nutriments, est composé d'entérocytes, représentant plus de 80% des cellules de l'intestin, de cellules à mucus ou cellules caliciformes (15%), de cellules M des plaques de Peyer et de cellules de Paneth (Chen et al., 2011 ; Renukuntla et al., 2013 : Figure 1.1).

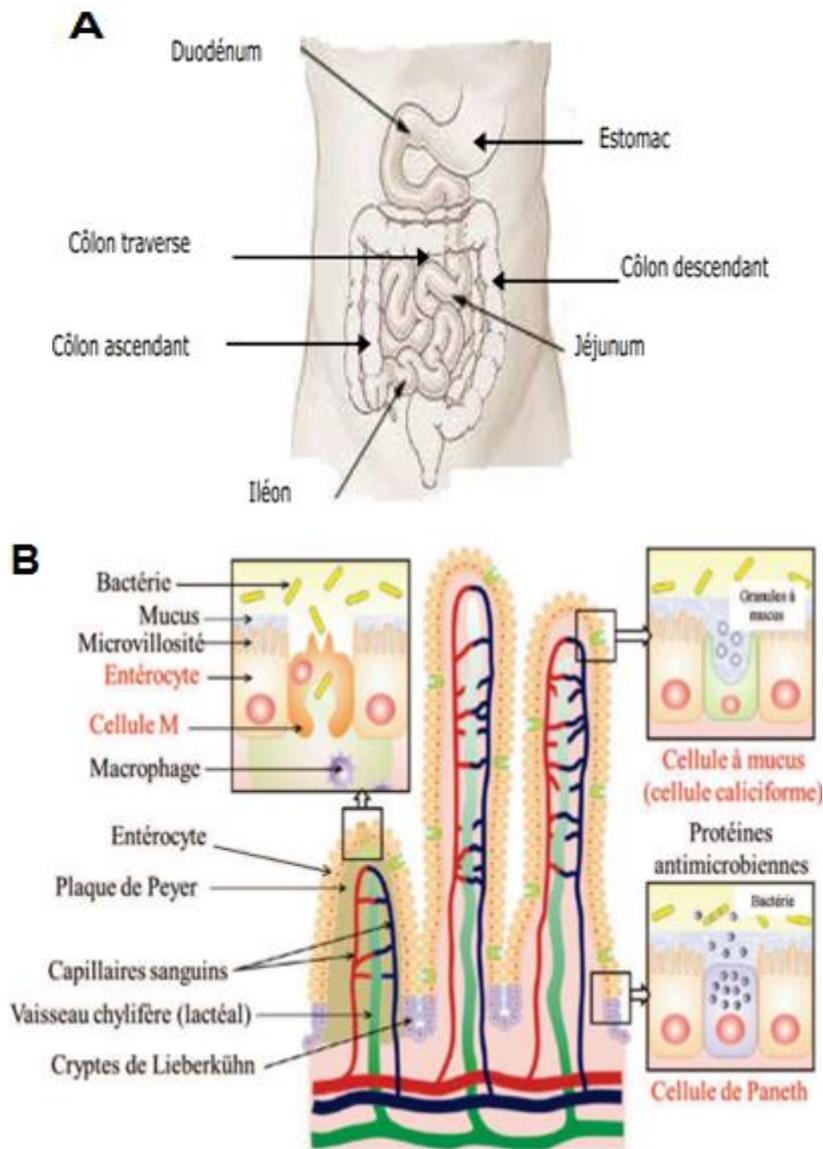


Figure 1.1 : A – Caractéristique anatomique des différentes sections du tractus gastro-intestinal ; B – Schématisation de la structure cellulaire de l'épithélium intestinal (D'après Chen et al., 2011)

Les principes actifs, administrés par voie orale doivent franchir des barrières d'absorption avant d'arriver dans la circulation sanguine. Une fois présentes dans la lumière duodéno-jéjunale de l'intestin grêle, les molécules peuvent emprunter deux voies pour atteindre le courant sanguin, la voie paracellulaire (intercellulaire) s'opérant uniquement par les jonctions serrées qui participent au maintien de la structure épithéliale ou la voie transcellulaire (intracellulaire) (Figure 1.2), cette dernière voie peut être franchie par les entérocytes ou par les cellules « M » (Chen et al., 2011, 2018).

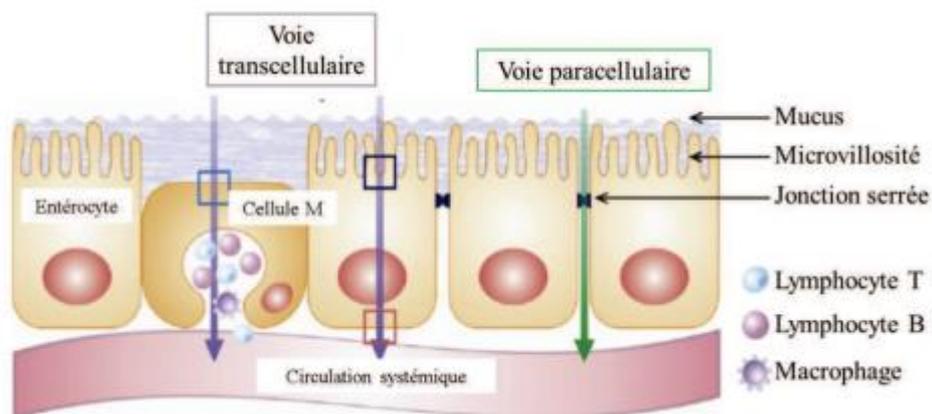


Figure 1.2 : Schématisation des voies de passage de la barrière épithéliale de l'intestin
(D'après Chen et al., 2011)

La voie de passage utilisée dépend des propriétés physico-chimiques des peptides et des protéines, notamment l'hydrophilie, la masse moléculaire, la solubilité, le coefficient de partage, le pH isoélectrique, liaisons hydrogène, etc. Il est à noter que les molécules hydrophobes utilisent majoritairement la voie transcellulaire, quant aux molécules hydrophiles empruntent la voie paracellulaire par diffusion passive à travers les jonctions serrées (Woitiski et al., 2011).

Les jonctions serrées sont perméables aux petites molécules hydrophiles entraînées avec le passage de l'eau (ions, urée, glucose, xylose, acides aminés). Les jonctions s'ouvrent en général quand les molécules sont cationiques ou anioniques. De plus, ces jonctions sont dépendantes de la présence d'ions bivalents, tels que le Ca^{2+} (Rekha et Sharma, 2013 ; Sonaje et al., 2012).

La perméabilité peptidique par la voie paracellulaire est alors très restreinte et représente moins de 1% des échanges ayant lieu à la surface de l'épithélium. Il va de soi que, dans les conditions normales, cette voie exclut le passage de grosses molécules, notamment, l'insuline sous sa forme prédominante hexamère (Khafagy et al., 2007).

1.3. Stratégies d'optimisation de la biodisponibilité de l'insuline administrée par voie orale

Les stratégies employées visent à surmonter les barrières chimiques, biochimiques et physiques, dans le but de maximiser le passage intestinal de l'insuline, les techniques les plus fréquemment employées (Neelam et al., 2010) sont :

- La mise au point de formulations incluant des inhibiteurs enzymatiques, ou des promoteurs d'absorption ;
- L'élaboration de systèmes muco-adhésifs à base de polymères ;
- La modification de la structure de l'insuline : analogue résistant à la digestion ;
- Les différentes techniques d'encapsulation (entre autres les émulsions multiples).

1.3.1. Les inhibiteurs enzymatiques

L'activité protéolytique se produisant dans le tractus gastro-intestinal est la limite majeure à l'administration d'insuline par voie orale. La co-administration d'inhibiteurs enzymatiques avec des principes actifs peptidiques a été l'une des premières stratégies pour pallier au problème. Des études ont montré l'efficacité de l'administration simultanée des inhibiteurs enzymatiques et de l'insuline sur des segments d'intestin de rat permet d'augmenter la biodisponibilité de l'insuline grâce à l'inactivation de l' α chymotrypsine qui est l'enzyme responsable de la dégradation de l'insuline (Agarwal et al., 2001). D'autres études ont confirmé le potentiel intéressant de la co-administration de l'insuline avec des inhibiteurs enzymatiques, les plus utilisés sont les inhibiteurs de trypsine, chymotrypsine et carboxypeptidases (Rekha et Sharma, 2013).

En dépit de leur toxicité, l'utilisation des inhibiteurs enzymatiques à long terme reste discutable, car ces derniers peuvent être la cause d'une part, d'importantes perturbations de la digestion ou des altérations du métabolisme à long terme. L'emploi d'inhibiteurs enzymatiques ne représente donc pas une approche pratique pour protéger les biothérapeutiques de la protéolyse (Chast, 2017).

1.3.2. Les promoteurs d'absorption

Les promoteurs d'absorption se définissent comme étant des composants qui facilitent l'absorption d'un principe actif en augmentant la diffusion de celui-ci au travers d'une barrière biologique. Ils agissent sur la perméabilité cutanée en modifiant la structure de la kératine, en dénaturant les lipides intercellulaires afin d'accroître la perméabilité à travers la bicouche.

Les promoteurs d'absorption sont utilisés afin d'augmenter le passage de l'insuline à travers la barrière intestinale. Il existe plusieurs types de promoteurs d'absorption (des agents de surface, des sels biliaires, des chélateurs de calcium, des acides gras ou des esters gras), avec des actions bien différentes (Wong et al., 2016). Certains permettent d'ouvrir les

jonctions serrées, d'autres de dégrader localement les membranes cellulaires ou de diminuer la viscosité du mucus (Katsuma et al., 2006).

Les limites majeures à l'usage de promoteurs d'absorption sont liées aux irritations de la peau qu'ils engendrent (dénaturation des lipides intercellulaires). En effet, l'altération de l'intégrité membranaire offre l'opportunité aux pathogènes biologiques tels que les toxines et les bactéries d'atteindre la circulation systémique et d'engendrer des complications plus ou moins graves (Whitehead et al., 2008).

1.3.3. Les systèmes mucoadhésifs à base de polymères

Le terme « mucoadhésion » fait référence à l'adhérence entre des supports polymères et des muqueuses et se manifeste par certains polymères qui deviennent adhésifs à l'état hydraté, l'eau étant le médiateur de l'adhésion. Les systèmes d'administration contenant des polymères muco-adhésifs fournissent un contact intime avec la muqueuse, ce qui réduit la dégradation du médicament dans le fluide liminal, et de localiser le système de délivrance de médicament pour un certain site (Zou et al., 2016). De plus, les polymères avec une fonctionnalité cationique qui reste protonée à pH intestinal est une autre approche intéressante. Le groupement amine chargé positivement peut se lier à des protéines de la zone pellucide de l'assemblage des jonctions serrées menant à la signalisation qui aboutit finalement à l'ouverture des jonctions serrées (Duggan et al., 2017).

1.3.4. Vectorisation de l'insuline par des particules (l'encapsulation)

Une autre stratégie adoptée par les chercheurs depuis plusieurs décennies est la vectorisation de l'insuline. Elle repose sur l'encapsulation de cette protéine dans des vecteurs de nature lipidique ou synthétique, et vise à protéger cette substance, et à en contrôler ou moduler sa libération sur son site après encapsulation (Wong et al., 2016).

À ce jour, quatre groupes de vecteurs synthétiques ont été étudiés dans le cadre de la délivrance orale d'insuline : les liposomes et les nanocapsules lipidiques, et les nanosphères et les nanocapsules polymériques (Wawrezynieck et al., 2008 : Figure 1.3).

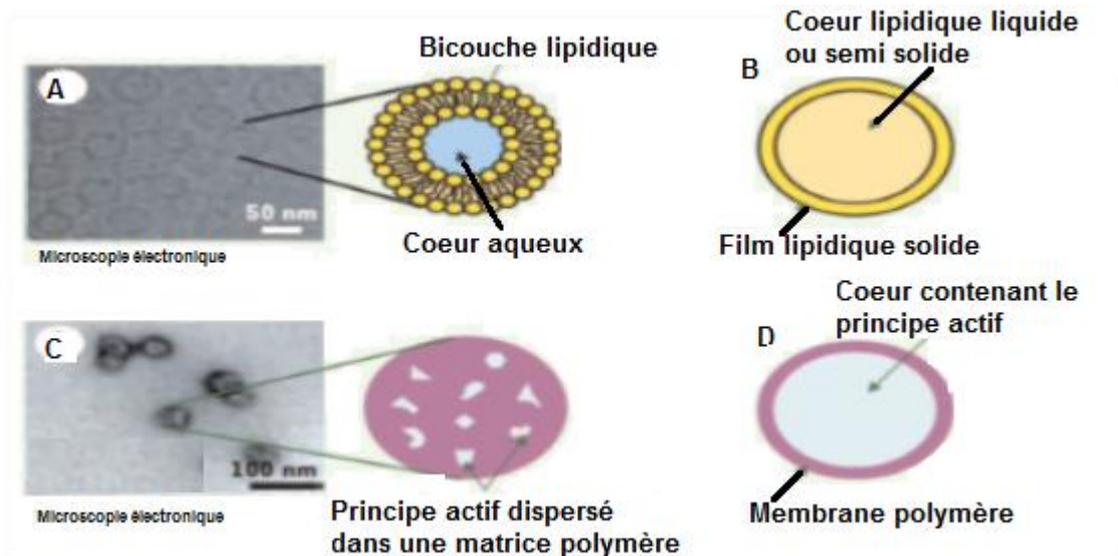


Figure 1.3 : Schématisation des différents vecteurs pour la délivrance d'insuline par voie orale : A — Liposomes, B — Nanocapsules lipidiques, C — Nanosphères de polymère, D — Nanocapsules de polymère. (Wawrezinieck et al., 2008)

A. Les liposomes

Les liposomes sont des vésicules composées d'une ou de plusieurs bicouches de phospholipides organisées autour d'un cœur aqueux contenant un principe actif hydrosoluble dans le cas de la vectorisation médicamenteuse (Cui et al., 2015). Ils sont classés en trois groupes selon leur taille et le nombre de bicouches lipidiques qu'ils contiennent : les liposomes de petite taille formés d'une monocouche lipidique (10 à 100 nm), les liposomes de grande taille formés d'une monocouche lipidique (100 à 300 nm) et des liposomes multicouches. Des agents de ciblage, tels que des anticorps ou des ligands de récepteurs, ou des agents de furtivité, tels que le polyéthylène glycol dans le cas de la pegylation, peuvent être greffés à leur surface, afin de cibler un site d'action spécifique ou d'augmenter leur temps de circulation (Renukuntla et al., 2013 ; Torchilin, 2005 : Figure 1.4).

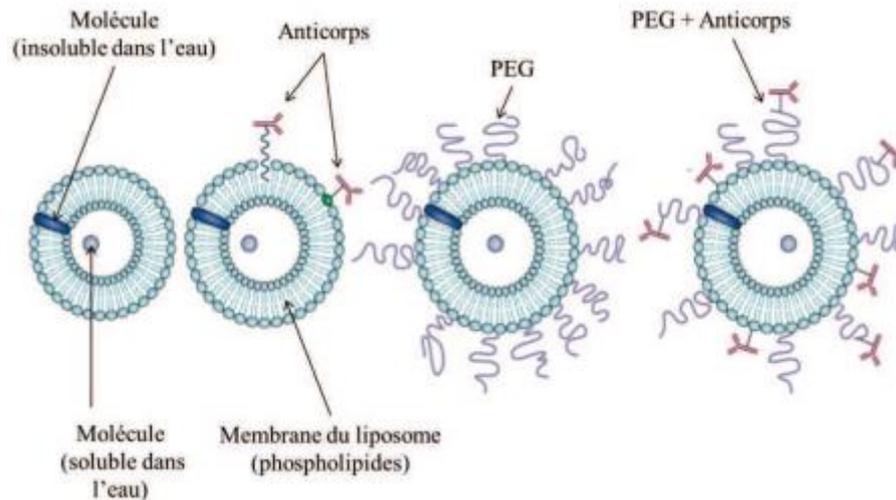


Figure 1.4 : Schématisation des différents types de liposomes monocouches (Torchilin, 2005)

B. Les particules et capsules lipidiques

Les particules et les capsules lipidiques sont réalisées à partir de lipides solides à température ambiante. Elles sont le plus souvent synthétisées par émulsion huile/eau. L'avantage qu'elles apportent, tout comme les liposomes, est lié à la nature de leur membrane. Elle est souvent composée de glycérides qui sont biocompatibles. Cependant, la faible stabilité de ces structures nécessite la présence de surfactants dont le choix doit faire l'objet d'une attention particulière, en raison de leur possible toxicité. Bien que les lipides soient de nature biocompatible, et ils sont le plus souvent approuvés par l'agence américaine de sécurité des médicaments (Food and Drug Administration, FDA), une administration excessive de lipides peut engendrer des complications telles que les hyperlipidémies et des troubles gastro-intestinaux (Gamboa et al., 2018).

C. Les nanoparticules polymériques

Au cours des dernières décennies, les vecteurs à base de polymères se sont largement développés (Delie et Blanco-Príeto, 2005). Ces vecteurs sont des systèmes colloïdaux basés sur des polymères biodégradables et biocompatibles solides naturels ou synthétiques (Wong et al., 2020b).

D'une manière générale, les nanoparticules ou nanovecteurs sont des particules colloïdales dont le diamètre varie entre 10 et 1000 nm. Le principal attrait de cette faible taille par rapport aux microparticules est l'utilisation potentielle par voie parentérale,

notamment en voie intraveineuse (Martins et al., 2018). Quel que soit la méthode employée, elle génère globalement deux types de structures particulières : les nano capsules et les nano sphères (Figure 1.5).

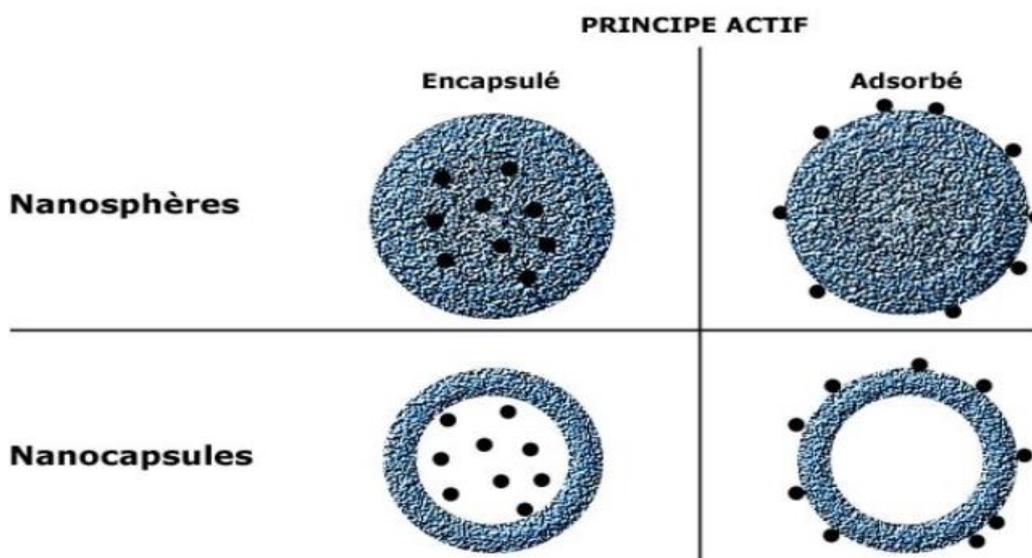


Figure 1.5 : Schématisation des différentes formes de nanoparticules : A — Nanosphères ; B — Nanocapsules (Kumari et al., 2010)

Les nanosphères sont des structures matricielles sphériques composées d'un réseau polymère. Le principe actif peut se trouver dispersé dans le réseau polymère durant la formation des nanosphères ou adsorbé à la surface de ces particules après préparation par des liaisons hydrophobes électrostatiques ou covalentes.

Les nanocapsules sont définies comme des structures réservoirs, sphériques, à paroi polymère et avec un cœur hydrophile ou lipophile. Dans ce cas le principe actif est couramment dissous dans le cœur, mais peut se trouver adsorbé à la surface des nanocapsules (Kumari et al., 2010).

1.4. Les générations des nanoparticules

Les études d'amélioration du comportement biologique des nanoparticules portant sur les modifications de leurs propriétés de surface permettent d'obtenir trois générations de nanoparticules.

1.4.1. Première génération

La première génération de nanoparticules est formée de colloïdes stables sur lesquels est accroché le principe actif afin de ralentir leur élimination par le système rénal. L'effet de ces particules est alors prolongé. Cependant, bien que ce genre de particules permette le ralentissement de leur élimination par voie rénale, elles sont tout de même considérées comme des corps étrangers par le système immunitaire de l'organisme, et plus précisément par le système réticuloendothélial. De ce fait, elles sont souvent rapidement prises en charge par les macrophages. Ces nanovecteurs de première génération ont donc une courte durée de vie en circulation sanguine, et s'accumulent généralement dans certains organes comme le foie et la rate (Gao et al., 2010).

Afin de réduire le phénomène d'opsonisation, et donc augmenter leur temps de transport dans la circulation sanguine pour qu'elles puissent atteindre la zone d'intérêt, il faut rendre ces nanoparticules « furtives » vis-à-vis du système immunitaire (Deuxième génération).

1.4.2. Deuxième génération

L'apparition de la seconde génération de nanoparticules est liée à l'utilisation d'agents de furtivité, dont l'objectif principal de ces nanoparticules furtives, une fois administrées dans le compartiment sanguin est d'augmenter la durée de vie de circulation de l'agent dans le sang. En effet, le recouvrement de ces particules par d'agent de furtivité les permet d'échapper à la capture par les cellules du système immunitaire en esquivant la fixation des opsonines (Andreani et al., 2014 ; Huckaby et Lai, 2018).

Généralement, les agents de furtivité utilisés pour créer une couche protectrice autour des transporteurs sont des polymères. Le polyéthylène glycol (PEG), ou polyoxyéthylène (POE), est le plus couramment utilisé, en raison des avantages qu'il possède, tels que la biocompatibilité, la solubilité en milieu aqueux, la non toxicité, et a en outre leur faible immunogénicité et antigénicité. En plus, il est autorisé à l'injection chez l'homme par l'organisation américaine *Food and Drug Administration* (FDA) (D'souza et Shegokar, 2016).

1.4.3. Troisième génération

La caractéristique principale des colloïdes furtifs est de rester plus longtemps dans la circulation sanguine que les autres nanoparticules. Cependant, ils finissent par être

extravasés hors du compartiment sanguin, notamment dans les zones de vascularisation ayant d'importantes fenestrations comme le foie ou les zones d'angiogenèse (Abdelkader et al., 2018 ; Yu et al., 2016).

Afin d'augmenter l'affinité des nanoparticules furtives pour un type tissulaire ou cellulaire déterminé, le principe d'adressage moléculaire orienté vers des marqueurs spécifiques est apparue. Les nanoparticules de troisième génération présentent la particularité de porter un système de ciblage cellulaire spécifique. Ainsi, ils correspondent à des vecteurs de deuxième génération auxquels a été fixé sur leur surface des ligands biologiques qui seront reconnus par les cellules composant le tissu d'intérêt ou la cible concernée (Figure 1.6 : Goutayer, 2008).

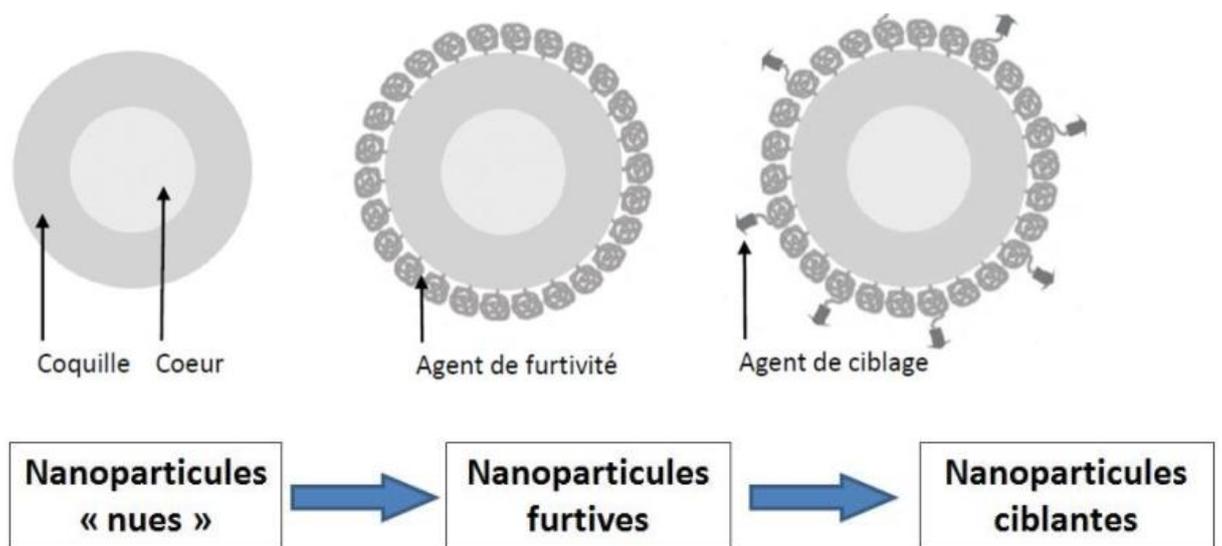


Figure 1.6 : Schéma des trois générations de nanoparticules (Goutayer, 2008)

Les ligands peuvent être des anticorps ; le plus souvent monoclonaux (Brigger et coll, 2002), des peptides, des saccharides (Prego et al., 2006), des oligonucléotides (Wong et al., 2020b), ou d'autres molécules comme le folate (Jain et al., 2012). L'ajout de ces ligands à la surface des nanoparticules favorise généralement leur capture par les macrophages (El Leithy et al., 2019a).

1.5. Les polymères les plus utilisés pour l'encapsulation

Aujourd'hui, il existe une grande variété de polymères d'origine naturelle ou synthétique destinés à l'encapsulation et la vectorisation des principes actifs. Mais, quelle que soit leur origine, ces matériaux doivent être biocompatibles, non toxiques, non cancérigènes et biodégradables.

1.5.1. Polymères synthétiques

Les polymères les plus utilisés pour la formulation de nanoparticules médicamenteuses sont le poly(acide lactique), le poly(acide glycolique) et l'acide poly(lactique-coglycolique), respectivement abrégés PLA, PGA et PLGA en anglais (Kamaly et al., 2012) : Figure 1.7).

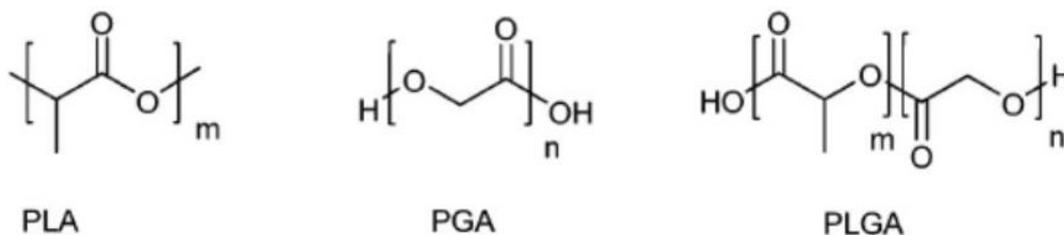


Figure 1.7 : Polymères biodégradables couramment utilisés dans l'application de délivrance de médicaments (D'après (Kamaly et al., 2012))

1.5.2. Polymères naturels

Les polymères naturels sont considérés les moins toxiques. La plupart sont déjà utilisés comme excipient (Sonia and Sharma, 2012). Les trois principaux polymères saccharidiques utilisés aujourd'hui pour le développement de vecteurs thérapeutiques sont le chitosane, l'alginate et l'acide hyaluronique (Bianchera and Bettini, 2020). Elles présentent l'avantage d'être stables et facilement modifiable chimiquement et biochimiquement. De plus, ils sont hydrophiles et biodégradables, dégradés par les enzymes et biocompatibles. Les polysaccharides chargés comme le chitosane et l'alginate présentent aussi l'avantage de former des complexes avec les principes actifs chargés eux aussi par interactions électrostatiques (Li et al., 2020).

1.6. L'enrobage par le PEG

Le polyéthylène glycol (PEG) est un polymère hydrophile non ionique. Il est composé de chaînes de taille variable pouvant moduler la densité des nanoparticules enrobées. Il est ajouté à la surface des NPs par plusieurs types de liaisons, dont les plus courantes sont les liaisons covalentes. Le PEG est connu pour sa compatibilité avec l'organisme, et c'est pourquoi il est approuvé par la FDA. Il a des effets potentialisateurs des NPs, car il permet de réduire l'accumulation des NPs dans les organes tels que le foie et la rate (Huckaby et Lai, 2018 ; Knop et al., 2010) ; comme il diminue les phénomènes

d'opsonisation (Andreani et al., 2014b ; Hinds et al., 2005 ; Prego et al., 2006). L'enrobage des NPs par le PEG prévient également de l'agrégation des NPs par sa forte stabilité stérique.

Les études d'optimisation du taux de PEG à la surface des particules, ainsi que la taille et la structure des chaînes de polymère montrent qu'avec une taille égale, une chaîne ramifiée sera plus efficace qu'une chaîne linéaire, mais également avec une masse molaire inférieure à 2000 g/mol, la durée de vie en circulation est peu affectée (Elvassore et al., 2001 ; Khutoryanskiy, 2018 ; Papadimitriou et al., 2012).

1.7. Mécanismes de libération du principe actif à partir des micro/nanoparticules

Le mécanisme de libération du médicament de la matrice polymère peut être classé en trois processus principaux en se basant sur les caractéristiques et les propriétés physiques et chimiques du polymère (Hsieh, 2012), à savoir :

- La diffusion de médicaments à travers les polymères non dégradables (système de contrôle de diffusion).
- Le gonflement et la diffusion du médicament avec un polymère gonflant (système de gonflement)
- La libération du médicament par la dégradation et l'érosion (système de contrôle de l'érosion).

De plus, la cinétique de libération à partir de ces particules dépend des certains paramètres incluant la taille des particules, le type et le poids moléculaire du polymère ; le rapport polymère /principe actif; et la structure et porosité de la forme de la matrice (Guidotti et al., 2020; Kamaly et al., 2016).

1.8. Conclusion

L'administration de l'insuline par voie orale présente deux problèmes majeurs : dégradation de cette protéine dans le tractus digestif et des difficultés à passer la barrière intestinale. L'encapsulation de l'insuline dans des particules de polymères semble donc être un moyen de protéger la protéine des différentes attaques qu'elle est susceptible de subir le long du tractus gastro-intestinal (pH gastrique acide, enzymes protéolytiques).

De plus, les propriétés physico-chimiques du polymère utilisé dans la formulation pourraient faciliter et augmenter son passage à travers l'épithélium intestinal.

CHAPITRE II : DIFFÉRENTES TECHNIQUES D'ENCAPSULATION

2.1. Introduction

Plusieurs méthodes d'encapsulation permettent de générer des vecteurs. Les propriétés de ces vecteurs (taille, épaisseur de la paroi, perméabilité) dépendent de la nature des composants et des méthodes de fabrication utilisées, dans l'objectif est de véhiculer de façon spécifique et protéger les substances actives qui sont dégradées par les enzymes protéolytiques notamment l'insuline (Martins et al., 2014). Ce chapitre se focalise sur la présentation de ces vecteurs les plus utilisés, ainsi quelques techniques d'encapsulation.

2.2. Les différentes techniques d'encapsulation

Plusieurs techniques d'encapsulation existent, elles sont généralement classées en trois groupes suivant le procédé industriel utilisé (Richard and Benoît, 2000). Elles se classent en (Figure 2.1) :

- **Procédés mécaniques** qui mettent en œuvre des techniques de pulvérisation, de formation de gouttes ou de gouttelettes et d'extrusion.
- **Procédés physicochimiques** qui se basent sur les variations de solubilité et la précipitation des agents encapsulant (des polymères) sous l'effet de variation des conditions physiques ; tels que la température et le pH sont en fonction de l'ajout d'un non-solvant, mais aussi sur la maîtrise des changements d'état (fusion, solidification) des polymères,
- **Procédés chimiques** au cours desquels il s'effectue simultanément la synthèse de la membrane (ou la matrice) et l'encapsulation de la matière active comme la polymérisation et la polycondensation interfaciale.

Dans cette étude, uniquement des procédés physico-chimiques notamment l'encapsulation par gélation ionotropique et une technique d'émulsification (la double émulsion) ont été appliquées. Soulignant qu'il ne sera développé ici d'une manière plus détaillée que ces techniques.

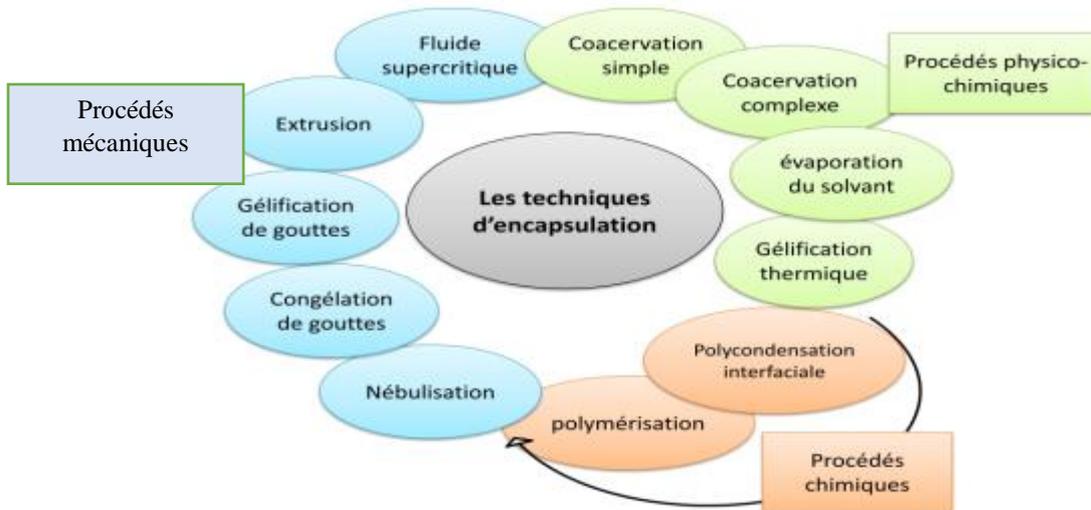


Figure 2.1 : Les différents procédés d'encapsulation

2.2.1. Gélation ionotropique

La gélation ionotropique est basée sur la capacité de réticuler des polyélectrolytes en présence de certains ions pour former des hydrogels. Le cas le plus connu est celui de la gélation de l'alginate en présence de calcium. Les micro et macrosphères sont produites via une goutte à goutte d'une solution d'alginate et de principe actif dans une solution du chlorure de calcium. Les ions calcium se répendent alors dans les gouttes d'alginate formant un réseau tridimensionnel de l'alginate ioniquement réticulé (Sarmento et al., 2007a).

Étant donné que la formation des gouttelettes se fait via une aiguille, la taille des particules est relativement importante. Néanmoins des gouttelettes de plus petite taille peuvent être formées en utilisant des vibrations ou un système de pulvérisation (Patil et al., 2010a).

Cette technique présente l'avantage principal de permettre une formulation douce et de conserver ainsi l'activité biologique des protéines, elle est aussi simple, rapide, rentable et industrialisable. Mais aussi elle présente un inconvénient majeur. En effet, la matrice et la membrane formées ne sont pas capables de contrôler la libération sur une longue période, cependant pour contrôler cette dernière il est nécessaire d'incorporer des polyélectrolytes chargés pouvant se complexer avec l'alginate et former un deuxième enrobage de principe actif, le polymère le plus utilisé est le chitosane (Motwani et al., 2008 ; Sezer, 1999).

A. Généralités sur l'alginate

L'alginate est le biopolymère polyanion le plus utilisé dans l'encapsulation par gélotion ionotropique. Vu leurs nombreuses propriétés comme épaississant, stabilisant, gélifiant et filmogène, ce polysaccharide « polyvalent » est très utilisé en industrie. Ce biopolymère est abondant dans la nature comme un composé structural majeur qui est extrait des parois cellulaires des algues brunes et de capsules bactériennes (Lee and Mooney, 2012).

Les développements récents dans la régulation de la biosynthèse de l'alginate dans des bactéries et la modification relativement facile des bactéries pourraient permettre la production d'alginate hautement spécifique pour une large gamme d'applications (Aderibigbe et Buyana, 2018).

- **Structure chimique**

L'alginate est un copolymère linéaire, constitué de deux unités monosaccharidiques : l'acide D-mannuronique (M) et l'acide L-guluronique (G). Il s'agit donc d'un polyuronide. Ces acides sont liés entre eux par des liaisons glycosidiques du type (1-4). Les molécules d'acide uronique sont réparties le long de la chaîne de l'alginate sous forme de blocs.

Il en existe 3 types (Figure 2.2-a) des séquences homopolymériques ne contenant que des unités d'acide mannuronique (blocs M) ou guluronique (blocs G), ainsi que des blocs hétéropolymériques contenant à la fois les deux unités d'acide uronique (blocs MG) (Pawar et Edgar, 2012). La composition et l'organisation des acides uroniques en séquences sont donc très variables en fonction du type d'alginate.

En ce qui concerne la conformation des chaînes, l'alginate possède quatre types de liaisons glycosidiques : di-axial (GG), di-équatoriale (MM), axial-équatoriale (GM) et équatoriale axiale (MG) (Figure 2.2).

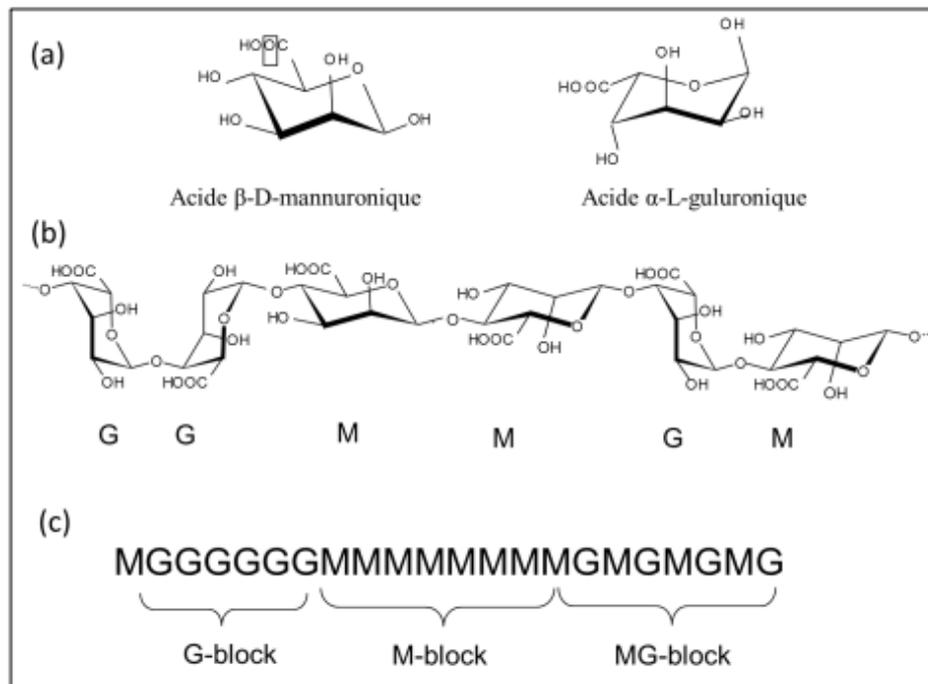


Figure 2.2 : Structure chimique de l'alginate de sodium : (a) – monomères d'acides uroniques ; (b) – conformation des chaînes ; et (c) – distribution des blocs (Ching et al., 2017 ; Draget et al., 2005)

• Propriétés de l'alginate

- **Solubilité :** L'alginate de sodium est soluble dans l'eau froide formant une solution colloïdale visqueuse. Il est insoluble dans l'alcool et dans les solutions hydroalcooliques dans lesquelles la teneur en alcool est supérieure à 30% (m/m). Il est également insoluble dans les autres types de solvants organiques (chloroforme, éther...) (Shilpa et al., 2003). La solubilité de l'alginate dépend de trois paramètres principaux (Draget et al., 2005) :

- **pH du solvant :** Il détermine la présence de charges électrostatiques au niveau des acides uroniques. Les valeurs de pKa déterminés par titration potentiométrique des deux résidus composant l'alginate à savoir l'acide D-mannuronique et L — guluronique sont de 3,38 et 3,68, respectivement. Le pKa final de l'alginate diffère faiblement du pKa des deux acides uroniques qui le compose.
- Une chute brutale du pH va entraîner la précipitation des molécules d'acide alginique, alors qu'un ajout progressif de protons va permettre de former un gel d'acide alginique. On note que pour des valeurs de pH faibles la solubilité

dépend des séquences constituant le polymère, selon l'ordre suivant :
Séquences GG < Séquences MM < Séquences MG.

- **La force ionique** : Elle agit par la présence de groupements anioniques au niveau du polysaccharide et peut modifier la conformation moléculaire.
- **La présence d'ions divalents** : Ils peuvent interagir avec les groupements carboxyliques et influencent donc la solubilité de l'alginate. La dureté de l'eau (teneur en Ca^{2+}) par exemple est un facteur important lors de la préparation d'une solution d'alginate.
- **Bioadhésion** : la bioadhésion est définie comme l'adhésion ou le contact entre deux surfaces dont l'une est un substrat biologique. Si l'une des surfaces est une couche de muqueuse, le terme « 'mucoadhésion »' est utilisé. L'alginate est classé comme polymère naturel avec des propriétés mucoadhésives supérieures à d'autres polymères comme le chitosane, la carboxyméthylcellulose et l'acide polylactique. En effet, des études ont montré que les polymères polyanioniques sont plus efficaces que les polymères polycationiques et non ioniques (George et Abraham, 2006; Gombotz et Wee, 1998). Cette propriété de l'alginate est à l'origine de son utilisation dans le domaine de la bioencapsulation comme matrice d'encapsulation des médicaments administrés par voie orale (Bagre et al., 2013; Chen et Subirade, 2006).
- **Gélification de l'alginate** : l'alginate est un gélifiant naturel qui peut former des hydrogels physiques par gélification ionotropique en présence d'ions divalents ou par gélification acide par diminution du pH. Il a été démontré que les propriétés mécaniques de l'hydrogel d'alginate obtenu dépendent du ratio entre les blocs M et les blocs G (ratio M/G) qui compose l'alginate. En effet, les alginates composés d'un ratio (M/G) élevé forment des gels mous et élastiques, alors que les alginates avec un ratio (M/G) faible donnent des gels durs et cassants (Kakita et Kamishima, 2008) ; Leister et Karbstein, 2020; Sonaje et al., 2012).
- **Gélification ionotropique de l'alginate** : la gélification ionotropique de l'alginate est liée à son affinité pour certains ions par formation de liaisons ioniques accompagnées de changements conformationnels. En effet, les chaînes de polymère d'alginate interagissent avec les cations divalents ou trivalents (Fe^{3+} , Al^{3+}) pour former des hydrogels. L'affinité de l'alginate vis-à-

vis des ions bivalents diminue dans l'ordre suivant : Pb > Cu > Cd > Ba > Sr > Ca > Co, Ni, Zn > Mn (Fatin-Rouge et al., 2006). Le calcium demeure le cation le plus couramment utilisé pour induire la formation de gel d'alginate (Reis et al., 2006a).

- **Mécanisme de gélification** : quand des ions divalents tels que Ca^{2+} sont introduits dans une solution d'alginate de sodium, un réseau expansé se forme. Les étapes de la réticulation ionique de l'alginate sont schématisées dans la Figure 2.3.

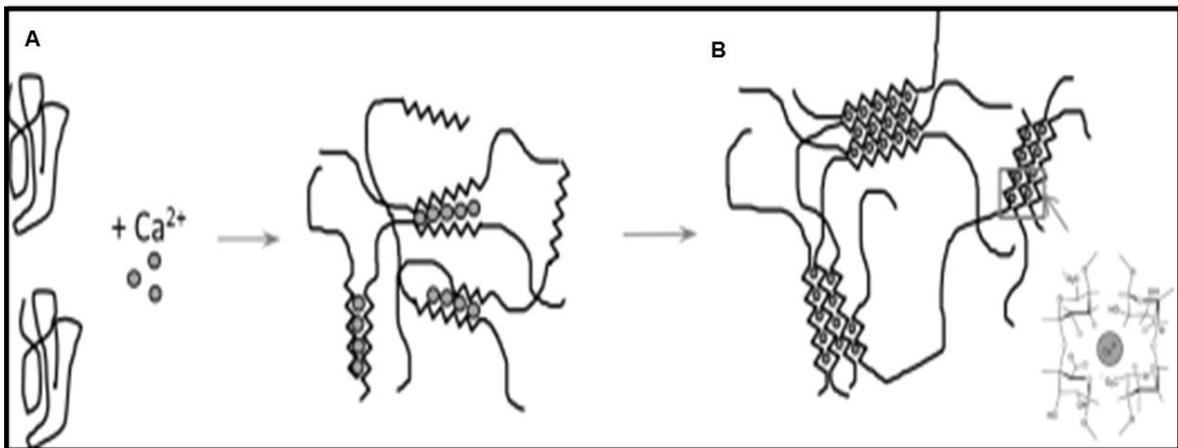


Figure 2.3 : Mécanisme de gélification de l'alginate en présence d'ions calcium : A Chélation des cations divalents B- Formation de la jonction entre les chaînes (Fang et al., 2007)

Deux blocs G ou MG de deux chaînes de polymères adjacentes peuvent être réticulés en présence d'un cation bivalent par des interactions électrostatiques entre deux groupements carboxyliques COO^- du polysaccharide. La formation d'une zone de jonction entre les chaînes alginates, via le contre-ion calcium par exemple, aboutit de proche en proche à la formation d'un hydrogel (Figure 2.3).

Lorsque deux brins de polymère sont face à face, la conformation des blocs G ou MG forment des cavités dans lesquelles viennent se loger les ions Ca^{2+} . Cette dimérisation des blocs est appelée structure type « boîte d'œufs » dans laquelle les œufs représentent les ions (Morris et al., 1978 ; Figure 2.4).

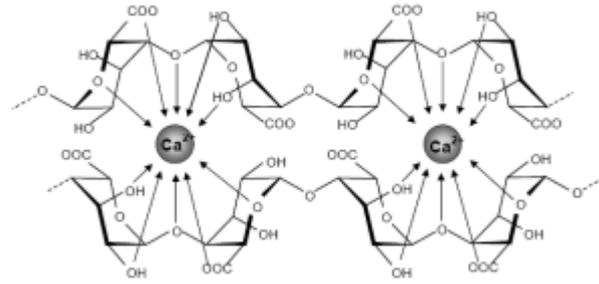


Figure 2.4: Le model dit « egg-box » (Li et al., 2007; Morris et al., 1978)

- **Techniques de gélification**

Il existe deux approches de préparation d'hydrogel d'alginate par réticulation ionique :

- **Gélification externe ou par diffusion**

Le procédé de « **gélification externe** » est très simple et mis en œuvre à température ambiante. Il consiste à verser goutte à goutte une solution d'alginate dans une solution contenant du calcium libre (Figure 2.5). La gélification de l'alginate est immédiate à la périphérie de la goutte. Des échanges peuvent ensuite se produire entre l'intérieur et l'extérieur de la goutte. Quand l'alginate joue le rôle de matrice immobilisante, on aura recours à cette technique de gélification. Par conséquent, on utilise principalement cette méthode dans la fabrication de billes, films et fibres ; ce principe est mis à profit pour réaliser des encapsulations d'enzymes ou bactéries, mais les hydrogels formés ne sont pas homogènes. L'inconvénient de cette méthode est la non-uniformité de l'hydrogel obtenu : la concentration en alginate décroît de la surface au centre du gel (Kaklamani et al., 2014 ; Liu et al., 2004).

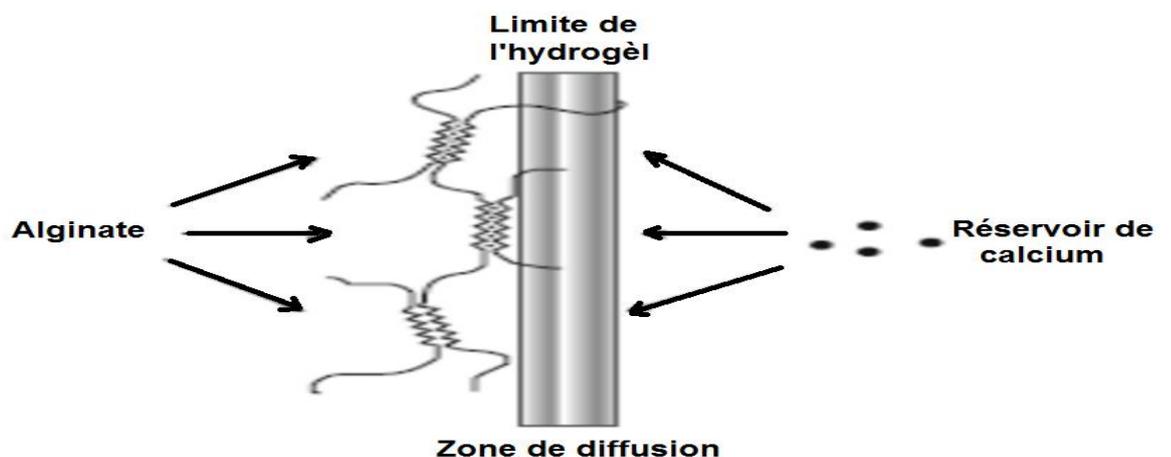


Figure 2.5 : Illustration du mode de diffusion dans le gel Ca-alginate (Palluault, 2010)

- **Gélfication interne**

Une approche dite de « **gélfication interne** ou *in situ* », où la source de calcium initialement sous forme insoluble (CaCO_3 , CaSO_4 ,...) est dispersée dans la solution d'alginate. Pour obtenir un gel d'alginate homogène, il convient de piéger le calcium du milieu. Une fois le calcium piégé, l'alginate peut se dissoudre. Ensuite, les ions de calcium sont par la suite libérés de façon contrôlée typiquement par diminution progressive du pH (par solubilisation donc de la source de calcium) qui déclenche la libération des ions dans la solution d'alginate. L'abaissement progressif du pH est généralement obtenu par ajout de lactones à hydrolyse lente telle que la gluconolactone (GDL) servant à l'encapsulation de principes actifs et pour l'immobilisation de cellules (Silva et al., 2006b; Figure 2.6).

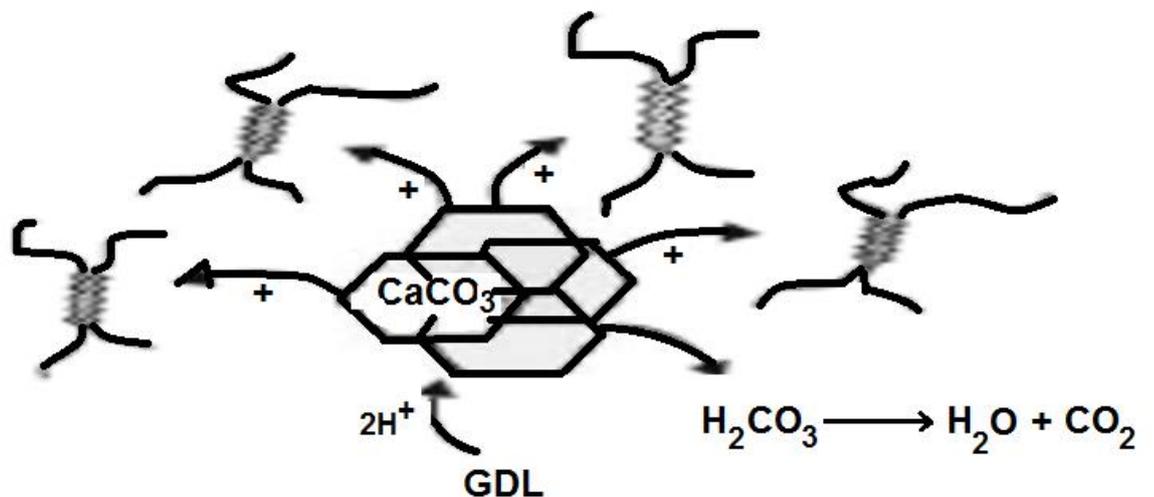


Figure 2.6 : Illustration du mode de gélfication interne dans le gel Ca-alginate (Palluault, 2010)

- **État «prégel» de l'alginate de calcium et le recouvrement avec du chitosane**

Dès 1992, une technique permettant de préparer des nanoparticules à base d'alginate de calcium a été décrite par gélification ionotrope. Le procédé consiste à former un système «prégel» d'alginate de calcium, puis à le faire interagir avec du chitosane (Sarmiento et al., 2007a).

L'état «prégel» d'alginate de calcium est obtenu en mélangeant une solution d'alginate de sodium très diluée et une solution de chlorure de calcium également très diluée. Ces billes sont secondairement recouvertes par une membrane de chitosane afin d'en

diminuer la porosité et d'en augmenter la stabilité en milieu gastro-intestinal (Bagre et al., 2013).

Lors de l'immersion des billes d'alginate dans une solution de chitosane, des interactions électrolytiques entre les groupes carboxyles de l'alginate et les amines polycationiques du chitosane permettant la formation de complexes polyélectrolytiques avec les résidus mannuroniques de l'alginate du «prégel» et conduit à la formation de nanoparticules. Le diamètre moyen de celle-ci varie de 300 à 750 nm, augmentant lorsque la concentration en alginate augmente. La présence de chitosane permet d'assurer une stabilité des billes en milieu acide (estomac), avant libération du contenu en milieu intestinal (Azevedo et al., 2014).

- **Généralité sur le chitosane**

Le chitosane est un copolymère polycationique issu de la chitine composant la paroi cellulaire de nombreux champignons et l'exosquelette des arthropodes (Shahidi et Abuzaytoun, 2005). La chitine est composée de chaînes linéaires de N-acétyl-glucosamine reliées par des ponts — -osidiques. Le chitosane est obtenue après déacétylation de la chitine non soluble (Zargar et al., 2015 : Figure 2.7). Le chitosane est métabolisé dans les lysosomes, dégradé peu à peu en sucres aminés et totalement éliminé par l'organisme (Kean and Thanou, 2010).

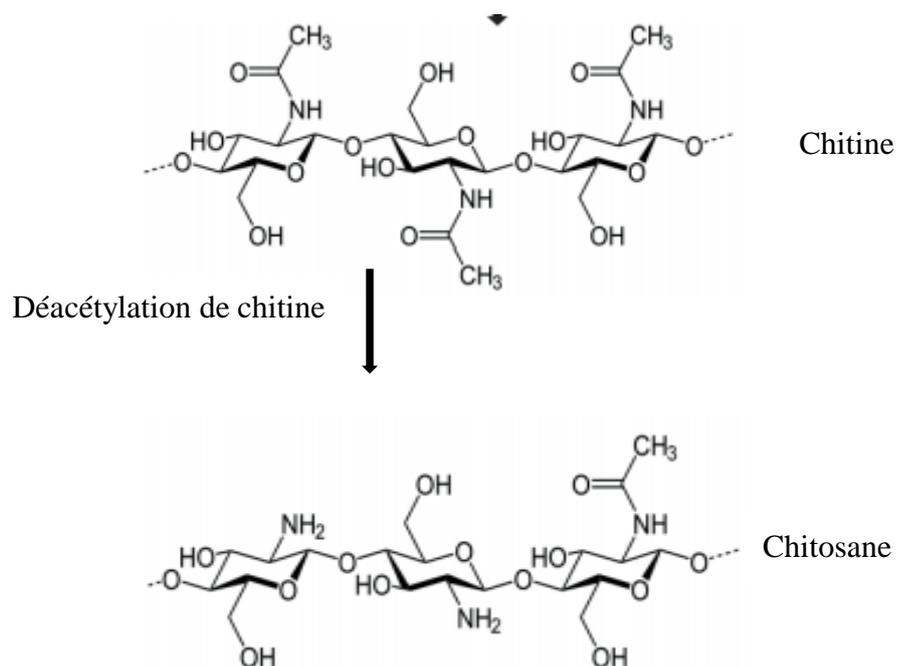


Figure 2.7 : Schématisation de la déacétylation de la chitine (Zargar et al., 2015)

Le chitosane est mucoadhésif et a également la capacité d'ouvrir transitoirement les jonctions serrées des épithéliums. Cette dernière action est due à l'interaction des charges positives du chitosane avec les protéines de la jonction serrée, comme les occludines et les protéines zonula occludens-1 (ZO-1), interaction engendrant une réorganisation des filaments d'actine et l'ouverture des jonctions (Sonaje et al., 2012). Ces deux propriétés font du chitosane un composé intéressant pour la vectorisation de principes actifs au niveau des différents épithéliums de l'organisme (Pawar et Jaganathan, 2016). Les procédés de formulation à partir de chitosane sont relativement doux et n'engendrent généralement pas de détérioration du principe actif ; c'est donc un polymère de choix dans la fabrication de vecteurs de médicaments (Vieira et al., 2018).

- **L'encapsulation de l'insuline par gélation ionotropique**

La gélation ionotropique a été largement utilisée pour encapsuler l'insuline avant administration par voie orale chez le rat, notamment la pré-gélification ionotropique suivie de la formation d'un polyélectrolyte avec le chitosane. Plusieurs études ont montré des diminutions de la glycémie suite à l'utilisation des nanoparticules furtives encapsulant l'insuline, préparées par gélation ionique suivie par un greffage de leur surface avec un agent ciblant (El Leithy et al., 2019b ; Lopes et al., 2016).

En effet, l'insuline est un polypeptide disposant de groupements ionisables portés par les résidus de certains acides aminés. L'insuline peut arborer de ce fait une charge globale dépendante du pH. Un point isoélectrique est défini pour une valeur de pH pour laquelle une électroneutralité de la molécule est observée. Li et al. (1954) ont déterminé le point isoélectrique de l'insuline par électrophorèse dans une gamme de pH comprise entre 5,3 et 5,4. En fonction du pH, l'insuline peut être considérée comme un polyélectrolyte soit chargé positivement soit chargé négativement (Callet, 2010 : Figure 2.8).

Les conditions idéales permettant la formation de nanoparticules d'insuline par gélation ionotropique correspondent à une valeur de pH où l'insuline est à la fois biologiquement active et chargée soit à la valeur du pH physiologique (pH 6,2). L'insuline peut donc être complexée idéalement avec un polyélectrolyte de charge positive (Callet, 2010).

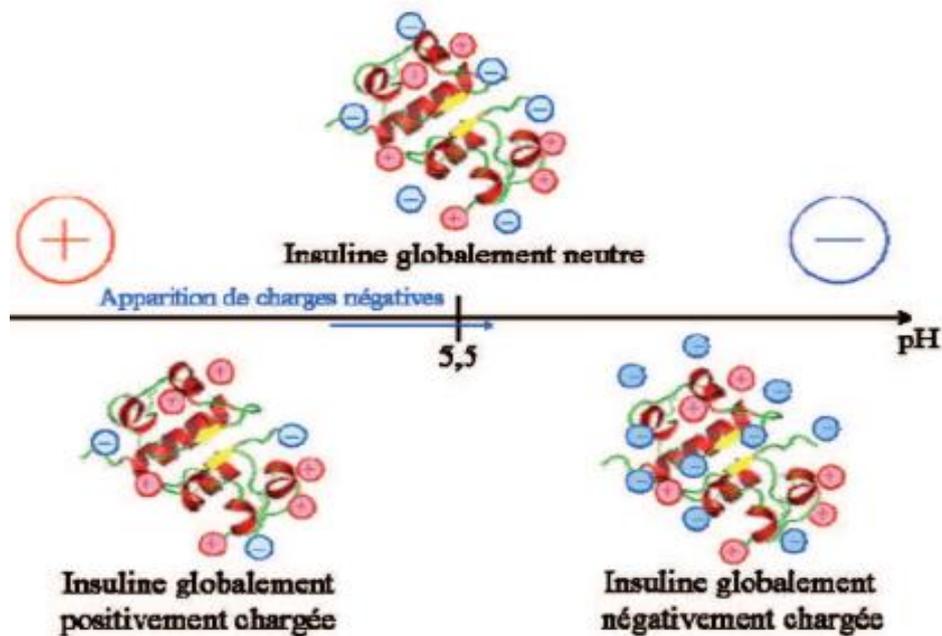


Figure 2.8: Charge globale de l'insuline en fonction du pH (Callet, 2010)

2.2.2. Les techniques d'émulsification

A. Émulsification couplée à la gélification interne

Parmi les méthodes de gélification ionotropique, on trouve la méthode d'émulsification/internal gélification qui est basée essentiellement sur la dispersion d'une phase aqueuse qui contient la substance active à encapsuler, l'alginate de sodium et des ions de calcium (CaCO_3) dans une phase huileuse qui est la phase continue. Une réduction brutale du pH, lors de l'ajout d'un acide organique soluble dans la phase huileuse permet de reléguer le calcium de son sel insoluble et entraîne la gélification de billes d'alginate (Liu et al., 2013 ; Reis et al., 2006 b).

Plusieurs travaux antérieurs ont mis au point une méthode combinant l'émulsification et la gélification interne pour produire des billes de petite taille (Liu et al., 2013 ; Silva et al., 2005). Schématiquement, une émulsion E/H est formée à partir d'une phase aqueuse contenant l'alginate de sodium dissous et un sel de calcium insoluble en suspension, la phase huileuse étant pour sa part constituée d'une huile végétale.

La gélification sera induite lors de la libération des ions de calcium par l'ajout des gouttelettes d'acide acétique glacial. Une dernière étape consiste à diluer l'émulsion dans un grand volume de chlorure de calcium pour permettre une gélification externe des billes lors de la coalescence entre les gouttelettes contenant l'alginate prégélifiée et celle contenant le

chlorure de calcium. Après ajout d'un certain volume de cette solution de chlorure de calcium, on observe une inversion de phase de l'émulsion puis finalement une séparation des phases huileuses et aqueuses permettant de récupérer les billes de gel (Liu et al., 2003).

Par rapport à la gélification externe, la technique par émulsification et gélification interne a permis d'obtenir des gels plus homogènes, assurant une meilleure stabilité de la bille en milieu gastro-intestinal simulé. Le rendement d'encapsulation est cependant plus faible que par gélification externe (Reis et al., 2006b).

➤ **L'encapsulation de l'insuline par émulsification/gélification interne**

Cette technique par gélification interne au sein d'une émulsion a été utilisée également pour développer un vecteur d'administration de l'insuline par voie orale (Lopes et al., 2015 ; Silva et al., 2006a). Différents protocoles de purification des microparticules ont été évalués, incluant des centrifugations et des cycles de lavage (Reis et al., 2007 ; Santos et al., 2013).

B. Double émulsion pour la délivrance de médicaments

Une autre voie d'encapsulation possible concerne, les émulsions multiples ; grâce à leur structure compartimentée, les émulsions multiples sont rapidement apparues comme des systèmes intéressants de par leur taux d'encapsulation élevé vis-à-vis des composés hydrosolubles. En effet, elles sont fortement utilisées pour la délivrance de molécules actives (Desai et al., 2005 ; Jiménez-Colmenero, 2013).

• **Généralités sur les émulsions doubles**

Une émulsion est composée d'une phase aqueuse, d'une phase huileuse et d'un agent émulsifiant. La phase aqueuse (ou assimilée) peut contenir des électrolytes, des composés organiques plus ou moins solubles (hydrophiles), etc. La phase organique est constituée par une huile d'origine minérale (hydrocarbure, dérivés halogénés...), végétale ou animale, une huile de silicone, etc. Quant à l'interface, elle consiste le plus souvent en une monocouche d'émulsifiants adsorbée, mais peut également renfermer des cristaux liquides lyotropes, de fines particules solides (silice par exemple) ou même des électrolytes inorganiques (Canselier et Poux, 2004).

Il existe deux types d'émulsions : les émulsions simples et les émulsions multiples. Les premières sont constituées d'une phase dispersée (nommée également discontinue ou

interne) dans une phase continue (appelée aussi externe ou dispersante), et sont de type « huile-dans-eau » (H/E) si la phase dispersée est lipophile et la phase continue hydrophile. Dans le cas inverse, cette émulsion est appelée « eau-dans-huile » (E/H).

Les émulsions multiples sont des émulsions d'émulsions. On distingue la phase interne, la phase intermédiaire agissant comme une membrane et la phase externe. Chaque phase peut contenir des principes actifs différents, ceci permet de conjuguer des molécules incompatibles : l'une dans la phase interne et l'autre dans la phase externe. Ces phases peuvent être hydrophiles et séparées par une phase intermédiaire huileuse (cas des émulsions E/H/E, ou bien deux phases huileuses séparées par une phase aqueuse (émulsion H/E/H) (Figure 2.9 : Aserin, 2008).

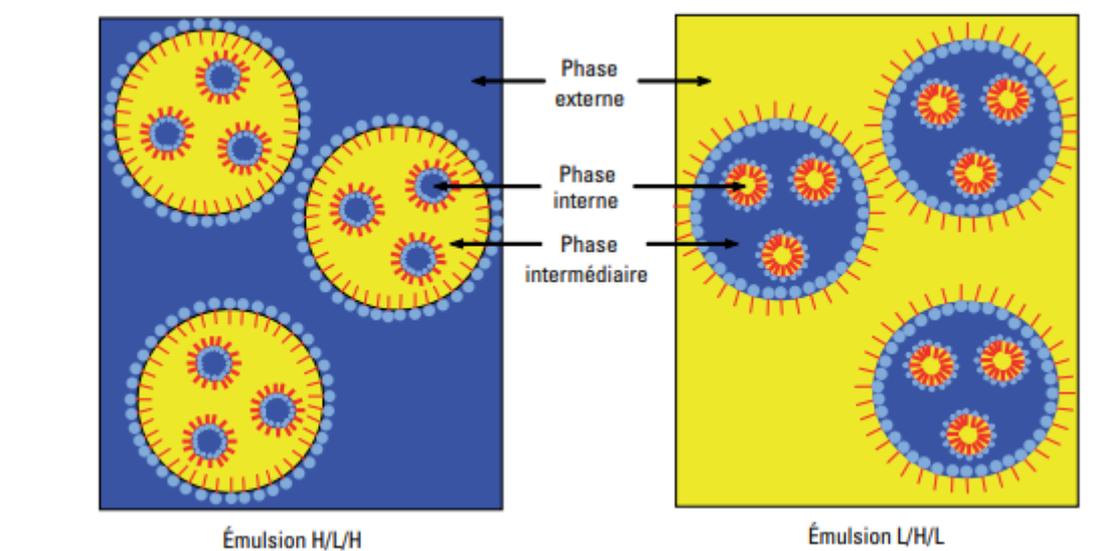


Figure 2.9 : Les 2 types d'émulsions doubles (Aserin, 2008)

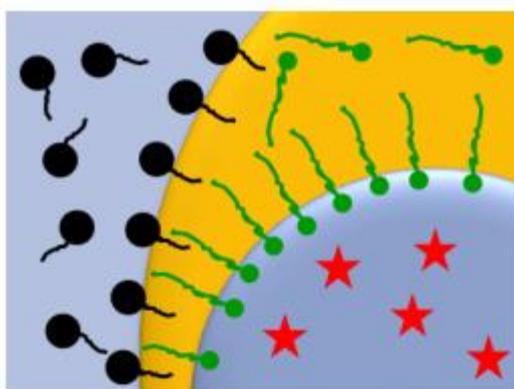
- **Rôle des agents de surface dans les émulsions multiples**

Une émulsion double est un système polydispersé dans lequel à la fois un système eau-dans-huile (W/O) et un système huile-eau (O/W) existent simultanément. Pour stabiliser l'émulsion primaire W/O un émulsifiant lipophile (de faible valeur HLB 2–8) est nécessaire, alors que pour réémulsionner l'émulsion primaire dans la phase aqueuse externe, un émulsifiant hydrophile (valeur HLB élevée 6–16) est obligatoire (Bhattacharjee et al., 2018).

L'emploi d'agents de surface lipophile et hydrophile a pour but de diminuer la tension entre les liquides non miscibles et ainsi assurer une certaine stabilité à ces systèmes. Pour les émulsions multiples E/H/E : les molécules de l'émulsionnant primaire, à tendance lipophile, s'orientent à l'interface E/H et celles de l'émulsionnant secondaire à tendance

hydrophile, à l'interface externe H/E. Ils donnent ainsi si leur taux et leur nature sont bien adaptés à celui de la phase huileuse, deux films monomoléculaires. Les parties apolaires des émulsionnants se trouvent dans l'huile alors que les parties polaires se trouvent dans la phase aqueuse interne et externe.

Il s'en suit que les émulsifiants se présentent selon une couche biomoléculaire, formant avec l'huile, l'enveloppe même de la vésicule. En effet, l'agent de surface lipophile introduit dans l'émulsion H/L constituant de l'interface interne Eau/Huile, s'oriente en structure lamellaire et aurait ainsi un rôle prépondérant dans la stabilisation de la membrane huileuse, alors que l'agent de surface hydrophile, en s'adsorbant surtout au niveau de l'interface externe Huile/Eau, aurait lui, un rôle important dans la dispersion des globules huileux (Leister et Karbstein, 2020 : Figure 2.10).



● Émulsifiant hydrophile, ● Émulsifiant lipophile, ★ Substance active osmotique

Figure 2.10 : Composition de l'interface d'une émulsion multiple stabilisée par deux émulsifiants antagonistes avec une distribution idéale (Leister et Karbstein, 2020).

Tous les émulsifiants synthétiques, ou parfois d'origine naturelle peuvent être utilisés, avec cependant, une préférence pour les émulsifiants non ioniques d'origine synthétique lors de la formulation d'une émulsion multiple à usage pharmaceutique. Parmi les émulsifiants lipophiles les plus performants, tels que les esters de sorbitane à longue chaîne hydrocarbonée, les dérivés perfluorés et surtout les agents de surface macromoléculaires, et comme émulsifiants hydrophiles, tels que les esters de sorbitane polyoxyéthylénés (Tween®) et aussi les copolymères d'oxyde d'éthylène et d'oxyde de propylène, dit Poloxamer (Leister et Karbstein, 2020).

Les émulsifiants connaissent au moins deux impératifs :

- Le respect d'équilibre entre les concentrations respectives de l'émulsifiant hydrophile et l'émulsifiant lipophile, car si par exemple le premier se trouve en plus grande concentration, il risque de solubiliser le second et la migration de ce dernier vers l'interface externe, ce qui pourrait avoir comme conséquence de déstabilisation de l'émulsion multiple.
- La valeur de la balance hydrophile — lipophile (HLB) du mélange d'émulsifiant ne doit pas trop élevée, pour éviter le risque d'inversion ou de formation d'une émulsion de premier ordre L/H (Bhattacharjee et al., 2018 ; Ding et al., 2019 ; Leister et Karbstein, 2020).

C. Procédés classiques de fabrication des émulsions multiples

Quatre procédés classiques peuvent être utilisés pour la fabrication des émulsions multiples :

- **Procédé à deux étapes**

L'émulsification en deux étapes est le procédé le plus souvent employé, car c'est le plus simple et le plus facile à maîtriser. Une première émulsion d'huile dans eau ou eau dans huile (O/W ou W/O) est réalisée. Cette émulsion est ensuite immédiatement dispersée dans la phase externe contenant un surfactant approprié (Figure 2.11). Le point critique de cette préparation est la deuxième étape. Il semble que le surfactant compris à l'interface interne joue le rôle de stabilisant, et que le surfactant de l'interface externe ait un rôle important dans la dispersion des globules (Allouche et al., 2003).

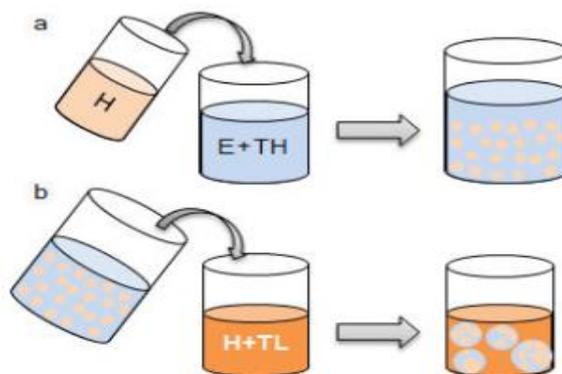


Figure 2.11 : Représentation schématique de la méthode d'émulsification en deux étapes (a) réalisation de l'émulsion directe (b) réalisation de l'émulsion double (Allouche et al., 2003)

Cette méthode est très intéressante parce qu'elle permet un bon contrôle de la taille des globules après la deuxième émulsification. De plus, cela permet de contrôler la quantité de gouttelettes encapsulées dans les globules. Le dernier avantage de cette technique est la possibilité de formuler une émulsion double comportant une phase externe et une phase interne différentes, ce qui n'est pas possible quand l'émulsification est réalisée en une seule étape (Allouche et al., 2003 ; Ding et al., 2019).

Plusieurs systèmes d'émulsions doubles E/H/E formulées grâce à un procédé d'émulsification en deux étapes ont été décrits dans la littérature (Pimentel-Moral et al., 2018 ; Qi et al., 2011 ; Schmidts et al., 2010).

- **Procédé en continu en une étape**

Des émulsions doubles peuvent être également formulées en une seule étape avec deux tensioactifs antagonistes, chacun solubilisé dans une phase (Kim et Weitz, 2011 ; Morais et al., 2008). Les différents éléments de la formule sont ajoutés au système tout en maintenant une agitation très rapide. En raison des contraintes de cisaillement très élevées, les gouttelettes d'huiles injectées s'allongent et forment des structures concaves qui encapsulent ainsi des gouttelettes d'eau. En revanche, ce procédé est plus complexe et peu courant, car très difficile à contrôler la taille et de la composition des gouttes multiples, il nécessite une formulation particulière ainsi qu'un matériel très performant. Il dépend en particulier, dans la quantité de tensioactif lipophile, du taux de cisaillement, des viscosités des deux phases et de la tension interfaciale (Besnard et al., 2013).

- **Procédé par inversion de phases**

Ce procédé est également rare, car complexe à mettre en œuvre et nécessite un matériel spécifique. Une première émulsion W/O est préparée. Puis une phase aqueuse contenant un tensioactif hydrophile est ajoutée progressivement jusqu'à atteindre un seuil de quantité d'eau. Au moment où ce seuil est atteint, l'apport d'eau est arrêté, formant ainsi une émulsion double W/O/W stable (Morais et al., 2009).

Cette méthode nécessite une grande précision lors de l'ajout de la phase aqueuse. Ainsi, il a été démontré dans la littérature que: plus les concentrations, en tensioactif hydrophile et en phase dispersée, sont grandes, plus la probabilité d'obtenir une inversion de phase menant à des émulsions doubles est importante (Sajjadi et al., 2002). De plus, l'effet de la balance hydrophile-lipophile (HLB) sur la formation ou non des émulsions doubles par inversion de phase a été démontré dans la littérature (Sajjadi et al., 2003)

- **Procédé utilisant les diagrammes ternaires**

Ce procédé, parfois compliqué, nécessite la préparation de trois solutions initiales (Figure 2.12) :

- un isotrope aqueux ;
- un isotrope huileux ;
- une mésophase cristalline.

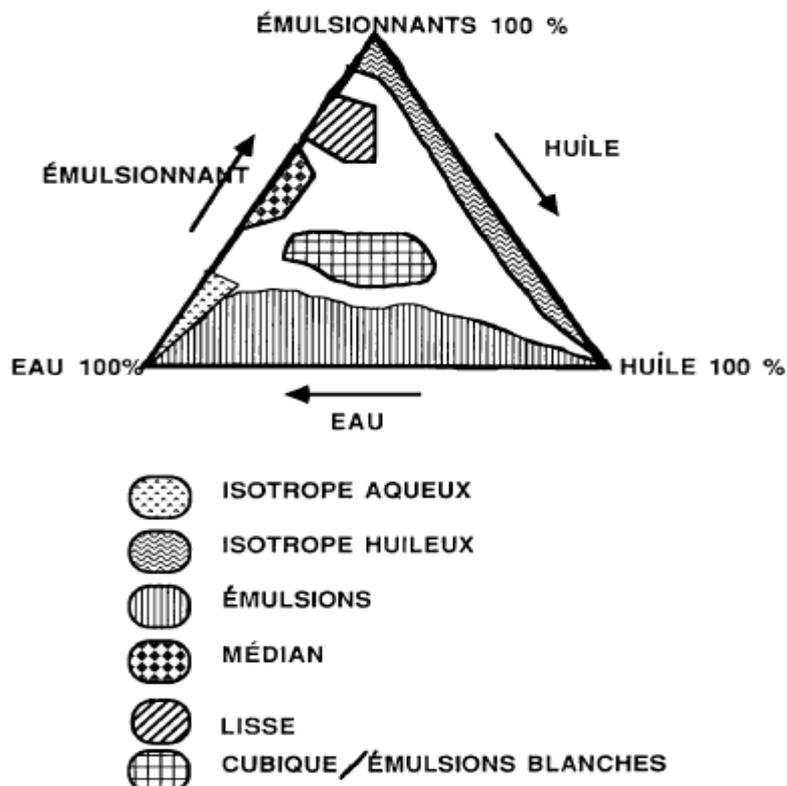


Figure 2.12 : Représentation schématique d'un diagramme de phase ternaire de type eau / huile / émulsifiant (Stauffer, 2014)

Ces trois phases sont ensuite mélangées dans des proportions définies afin de former une émulsion multiple. Il est également possible d'obtenir des microémulsions multiples par ce procédé. Un isotrope huileux contenant de petites quantités d'eau est mélangé à une solution aqueuse contenant un tensioactif hydrophile dans des proportions bien définies. Il se forme alors une microémulsion double (Stauffer, 2014).

Un autre moyen très utilisé dans la littérature pour la formulation des émulsions doubles est la microfluidique. Cette technique permet d'avoir le même nombre de gouttelettes dans chaque globule d'émulsions doubles, et cela de manière très précise grâce au dispositif spécifique (Lee et al., 2016).

D. Déstabilisation relative aux émulsions multiples

Tout comme dans les émulsions simples, il existe plusieurs voies de déstabilisation dans les émulsions doubles. Les plus fréquentes sont le mûrissement et la coalescence. Les émulsions multiples, compte tenu de leur structure complexe, sont sensibles à d'autres facteurs entraînant leur destruction. Les principales voies de déstabilisation affectant les émulsions multiples sont :

- Le mûrissement d'Ostwald (Figure 2.13-a) intervient essentiellement entre les gouttelettes et la phase externe. Le mûrissement de composition va intervenir lorsque les deux phases, externe et interne, ont des compositions différentes. Ce phénomène conduit à terme à l'équilibre des compositions (Figure 2.13-b : bKabalnov, 2001 ; Leister and Karbstein, 2020).
- Le phénomène de coalescence est plus complexe que dans les émulsions simples,
- car il peut intervenir de plusieurs manières (Chávez-Páez et al., 2012; Dima and Dima, 2020):



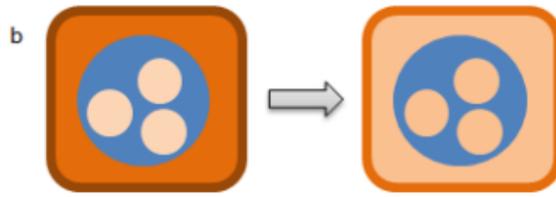


Figure 2.13 : Phénomènes de mûrissement dans les émulsions doubles H/E/H (a) mûrissement d'Ostwald (b) mûrissement de composition (Leister et Karbstein, 2020)

- **Coalescence entre globules** : Ce phénomène pouvant avoir lieu est une coalescence entre deux globules, entraînant une augmentation de leur taille (Dickinson, 2011 : Figure 2.14-a).
- **Coalescence entre deux gouttelettes** : Le deuxième type de coalescence est la coalescence entre les gouttelettes à l'intérieur des globules ou encore entre une gouttelette et un globule, on parle alors de coalescence multiple (Figure 2.14-b). Cela conduit à une distribution en taille des gouttelettes plus hétérogène, mais ne conduit pas à une réduction de l'encapsulation (González-Ochoa et al., 2003).

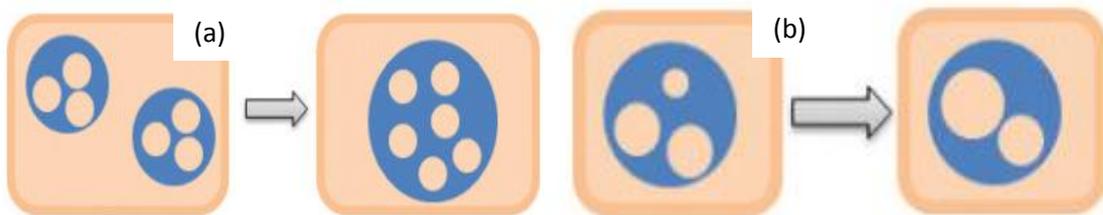


Figure 2.14 : Représentation schématique de (a) la coalescence entre globules et (b) la coalescence entre gouttelettes (Leister et Karbstein, 2020)

- **Coalescence entre une gouttelette interne et un globule** : Ce phénomène conduit à un transfert des gouttelettes internes vers la phase continue et donc à la perte de la structure multiple de la façon suivante : la gouttelette interne s'adsorbe sur la paroi du globule puis il y a rupture du film interfacial entre la gouttelette et la phase continue externe (Leister et Karbstein, 2020 : Figure 2.15).

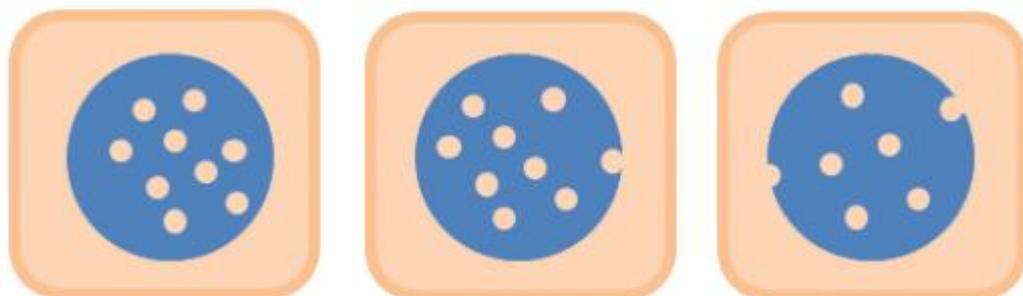


Figure 2.15 : Représentation schématique de la coalescence des gouttelettes avec le globule (Leister et Karbstein, 2020)

Cette coalescence peut être exacerbée en ajoutant un excès de tensioactif hydrophile dans la phase continue d'une émulsion E/H/E (Nollet et al., 2018).

Dans le cas des émulsions multiples stabilisées par deux tensioactifs antagonistes, des échanges peuvent avoir lieu au niveau des interfaces ce qui peut contribuer à déstabiliser l'émulsion formée (Figure 2.16).

En effet, pour ces émulsions, chaque émulsifiant stabilise initialement une interface donnée (E/H ou H/E en fonction de sa courbure). Or, ces émulsifiants ont tendance à migrer vers l'interface de courbure opposée conduisant à terme à deux interfaces de composition identique, favorisant ainsi la coalescence. L'échange des tensioactifs peut se faire soit par simple diffusion, soit par transport dans des micelles inverses.

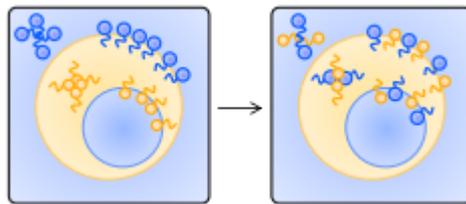


Figure 2.16 : Représentation de l'échange de tensioactifs aux interfaces d'une émulsion double H/E/H (Dickinson, 2011)

Enfin, un autre phénomène peut perturber la composition des émulsions doubles, cela a lieu quand la pression osmotique à l'intérieur des gouttelettes est plus faible ou plus élevée que dans la phase externe, ce qui conduit à un échange diffusif de matière entre la phase continue et les gouttelettes via un film de phase dispersée (Dickinson, 2011; Jiao et al., 2002; Leister and Karbstein, 2020). Il peut faciliter la coalescence dans le cas d'un gonflement des gouttes internes et alors conduire à la perte de la structure multiple. Pour rééquilibrer les pressions, une réduction ou un gonflement des gouttelettes a lieu (Figure 2.17).

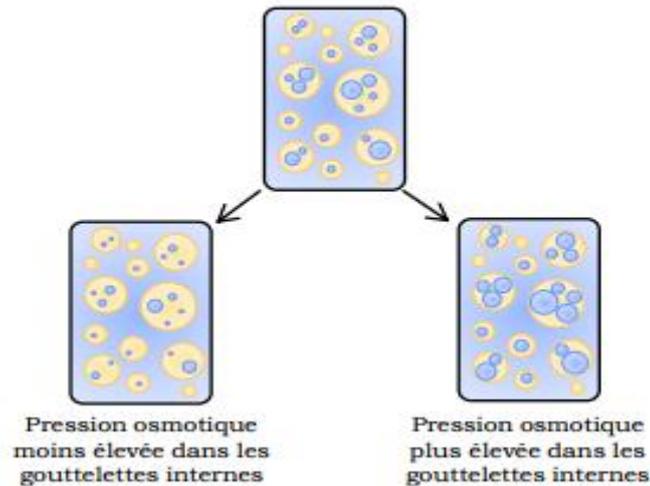


Figure 2.17 : Représentation schématique de la réduction ou du gonflement des gouttelettes : déséquilibre de pression osmotique (Dickinson, 2011; Protat, 2016)

E. Nouvelles approches de stabilisation des émulsions multiples

Les émulsions multiples sont par nature des systèmes hors équilibre thermodynamique comme tous les types des émulsions. Il est donc nécessaire de recourir à des molécules permettant de les stabiliser. Afin d'assurer cette fonction, il est possible d'agir sur l'interface entre les phases à l'aide d'émulsifiants tels que les tensioactifs, les particules, les polymères et les protéines, ou de modifier la viscosité de la phase externe grâce aux agents de viscosité (Aserin, 2008 ; Bhattacharjee et al., 2018).

Plusieurs approches ont été établies afin d'améliorer la stabilité des émulsions multiples. Certaines sont indispensables, quelle que soit la nature de l'émulsion formulée :

- Stabilisation de l'émulsion interne (primaire) en réduisant la taille des gouttelettes, et/ou par augmentation de la viscosité de la phase aqueuse interne par addition à cette dernière d'agents gélifiants (Delample et al., 2014).
- Utilisation de deux solutés afin d'équilibrer les pressions osmotiques entre la phase aqueuse interne et la phase aqueuse externe, limitant ainsi la migration d'eau (Lutz et al., 2009 ; Sun et al., 2019).
- L'emploi des huiles cristallisables à température ambiante et de surfactifs particuliers colloïdaux pickering émulsion, qui constituent de fortes barrières mécaniques entravant l'échange d'eau (Aserin, 2008).

- Stabilisation des interfaces interne et externe par des macromolécules amphiphiles (tensioactifs polymériques, protéines, polysaccharides...). Plusieurs études exploitant le concept d'amélioration de la viscosité et/ou de gélification de la phase W1 ont impliqué une large gamme de biopolymères alimentaires. Certains chercheurs ont préparé une émulsion stable, dans laquelle la phase aqueuse W1 a été gélifiée par de l'alginate de sodium (Sun et al. 2019 ; Perez-Moral et al., 2014).

F. Lien entre la stabilité des émulsions multiples et leurs propriétés rhéologiques

La rhéologie est une branche de la physique qui étudie l'écoulement ou la déformation de la matière, et en particulier des fluides complexes, sous l'effet des contraintes qui leur sont appliquées. Alors que la viscosité d'un fluide simple est une constante indépendante de la contrainte ou du cisaillement appliqué, celle d'un fluide complexe peut présenter des comportements très variés : rhéo-fluidification, rhéo-épaississement, existence d'un seuil d'écoulement, thixotropie, etc. Les matériaux étudiés peuvent avoir différents comportements en rhéologie :

- **Fluides newtoniens** : Le comportement newtonien, est celui des liquides purs, par exemple l'eau. Dans ce cas, la viscosité est constante et indépendante de la contrainte appliquée et du gradient de vitesse.
- **Fluides non newtoniens**
 - Comportement rhéo-fluidifiant (pseudo-plastique) : La viscosité diminue si la contrainte de cisaillement auquel est soumis le fluide croît. Ceci est très souvent observé dans les solutions de polymère ou les dispersions. Ce phénomène peut être dû, dans le cas des suspensions à l'orientation des entités en suspension dans le sens de l'écoulement ou leur réorganisation sous l'effet du cisaillement. Ces matériaux présentent au repos une structure organisée qui provoque une résistance à l'écoulement. En outre l'accélération de l'écoulement force les constituants à s'orienter de façon parallèle entre eux. L'ensemble oppose ainsi une résistance moindre à l'écoulement d'où une viscosité moins importante.
 - **Comportement rhéoépaississant (Dilatant)** : La viscosité augmente si la contrainte de cisaillement augmente (comportement très rare)(Kostenko, 2019).
 - Dans le cas des émulsions multiples les caractéristiques rhéologiques pourraient constituer des indicateurs incontournables de la stabilité physique de ces

systèmes. Leur très grande diversité permet en effet de provoquer un vieillissement accéléré par application de cisaillement intense (Schneider, 2018).

2.3. Mode de libération des principes actifs encapsulés dans les émulsions multiples

La compréhension des modes de libération des molécules encapsulées au niveau de la phase interne de l'émulsion multiple et des paramètres dont ils dépendent est en effet essentielle afin de maîtriser le profil de libération de la formulation réalisée.

La littérature montre que la libération d'un principe actif contenu dans les émulsions doubles (et en particulier dans l'émulsion interne) dépend de nombreux facteurs physico-chimiques qui peuvent être reliés au principe actif, tels que son pKa (constante d'acidité), son coefficient de partage, sa taille, sa diffusabilité et à l'émulsion elle-même, notamment, la nature et la concentration des tensioactifs ; de l'équilibre osmotique entre les deux phases aqueuses interne et externe (plus le gradient de concentration entre les deux phases est important, plus la cinétique de libération est rapide) ; de la nature de l'huile et celle des espèces encapsulées (Vasiljevic et al., 2006).

Deux grands types de mécanismes peuvent expliquer la libération des principes actifs encapsulés dans les émulsions multiples : les mécanismes avec rupture de film et les mécanismes sans rupture de film. Suivant les formulations des émulsions doubles, l'un ou l'autre de ces mécanismes, voire les deux, peuvent entrer en jeu.

2.3.1. Mécanisme avec rupture de film

La coalescence des gouttelettes internes à la surface des globules gras conduit à la fuite des espèces encapsulées vers la phase aqueuse externe (Graber, 2010) ; Aserin, 2008 ; Benichou et al., 2004 : Figure 2.18).

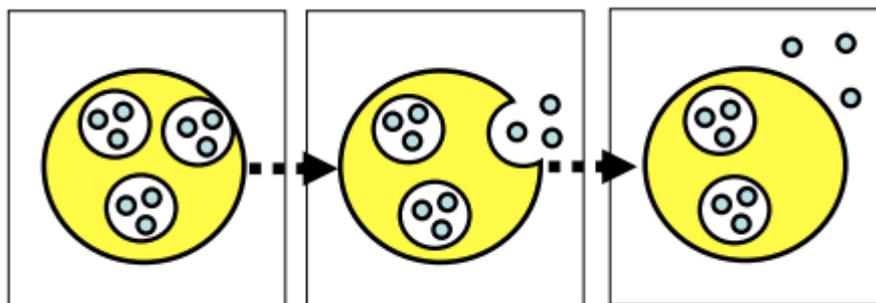


Figure 2.18 : Libération d'un composé hydrosoluble par coalescence des gouttelettes internes à la surface des globules dans une émulsion E/H/E. représente l'espèce encapsulée (Bonnet, 2008)

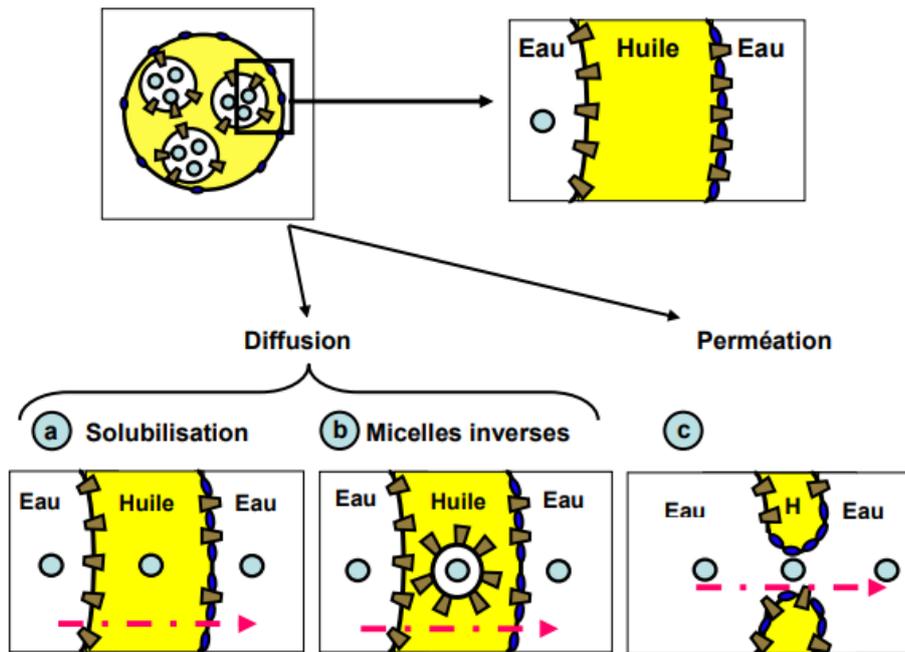
La nature des émulsifiants utilisés pour stabiliser les émulsions H/E et E/H a une influence majeure sur l'existence du mécanisme de coalescence puisque les émulsifiants conditionnent les propriétés des films interfaciaux (Leister et Karbstein, 2020; Sun et al., 2019).

2.3.2. Mécanismes sans rupture de film

En raison de la différence de composition existant entre les phases aqueuses interne et externe, le potentiel chimique de l'espèce encapsulée est différent pour les deux phases, ce qui favorise le transfert des espèces encapsulées entre les gouttes internes et la phase continue jusqu'à l'équilibre des potentiels chimiques. Par ailleurs, si les pressions osmotiques des gouttelettes internes et de la phase externe ne sont pas ajustées, de l'eau peut passer d'une phase aqueuse à l'autre. Suivant le sens de passage de l'eau, on peut observer un gonflement ou une rétractation des gouttelettes internes (Leister and Karbstein, 2020).

Plusieurs mécanismes permettent d'expliquer le transport des molécules encapsulées vers la phase aqueuse sans rupture de film (Aserin, 2008 ; Benichou et al., 2004) : La diffusion peut s'effectuer :

- **par la solubilisation** des espèces directement dans la phase huile (Figure 2.19-a). Ce mécanisme n'est envisageable que dans le cas de substances non ioniques ;
- **par l'intermédiaire de micelles inverses** de tensioactif hydrophobe présentes dans la phase huile. Ce mécanisme pourrait concerner le transport d'espèces chargées (Figure 2.19-b) ;
- **par la formation réversible de trous** thermiquement activés à travers le film interfacial (ElShafei et al., 2010) : Figure 2.19-c). Lorsque l'épaisseur d'huile entre les gouttelettes internes et la phase aqueuse externe est très fine, la libération des molécules peut avoir lieu par un mécanisme de perméation. Ces pores, qui se formeraient en permanence, permettraient le passage d'espèces hydrophiles de petite taille, dotées par conséquent d'un coefficient de diffusion important.



● représente l'espèce encapsulée ▲ le tensioactif lipophile ● le tensioactif hydrophile

Figure 2.19 : Représentation schématique des différents mécanismes de libération sans rupture de film, dans les émulsions doubles E/H/E (Bonnet, 2008)

Deux mécanismes ont été proposés afin d'expliquer la diffusion du principe actif hydrosoluble à travers la membrane grasse : le transport par micelles inverses et la diffusion simple de l'espèce chimique (ElShafei et al., 2010).

A. Transport par micelles inverses

Même lorsque la pression osmotique est équilibrée de part et d'autre de la membrane, un phénomène de coalescence peut être observé. Ce phénomène est dû au transport par micelles inverses. Il est similaire à celui observé par Higuchi lors de l'étude des matrices polymériques (ElShafei et al., 2010).

Le mécanisme de transport par micelles inverses dépend de la viscosité et de la nature de la phase intermédiaire huileuse. Ainsi, de la nature du principe actif encapsulé et du tensioactif employé.

Ce processus se déroule en trois étapes :

- Une phase de latence pendant laquelle les micelles se forment. Le temps de latence décroît lorsque la concentration en surfactant hydrophobe augmente ;

- Une phase de libération rapide par transport micellaire. Cette phase est accélérée lorsque la concentration en surfactant hydrophobe augmente ;
- Une dernière phase où la libération du principe actif est ralentie. Ceci s'explique par un équilibre créé, dû à l'égalisation des pressions osmotiques de part et d'autre de la membrane (ElShafei et al., 2010).

B. Diffusion/Perméation

Le mécanisme de diffusion est majoritairement observé. La diffusion est passive, et est régie par la loi de Fick. Plus les molécules vont diffuser vite de la phase interne vers la phase externe, plus la vitesse de diffusion sera élevée. Le transport à travers la phase huileuse pour aller de la phase aqueuse interne vers la phase aqueuse externe est évidemment important. Il peut laisser passer des espèces non ionisées, des micelles inverses et/ou des micelles gonflées des deux agents tensioactifs hydrophiles et lipophiles. Le passage se fait préférentiellement dans les zones où la couche d'huile est très mince (Graber, 2010).

Il a notamment été observé que la présence de surfactants ayant une valeur de HLB élevée facilitait la diffusion. Le transport par diffusion et/ou perméation est le seul observé lorsque l'émulsion est stabilisée par des polymères. Il a été démontré que ce phénomène est beaucoup plus dépendant de la nature du polymère employé que de celle de la phase grasse (Weiss et al., 2005).

Dans le cas des émulsions E/H/E, la littérature décrit deux principaux mécanismes de libération des principes actifs :

- Par diffusion grâce à un transport facilité par le tensioactif lipophile à travers la membrane huileuse.
- Par gonflement puis rupture de la phase huileuse qui provoque alors le mélange des compartiments aqueux internes et externes (Graber, 2010).

2.4. Exemple d'application des émulsions doubles : l'insuline par voie orale

Les émulsions doubles sont en particulier envisagées dans l'espoir de pouvoir utiliser certains principes actifs fragiles ou à faible biodisponibilité par voie orale. C'est ainsi que plusieurs équipes ont essayé de développer des émulsions doubles d'insuline pour l'administration par voie orale. Elles ont pour intérêt de protéger le principe actif introduit

en phase interne, modifiant ainsi sa libération et favorisant son absorption (Cárdenas-Bailón et al., 2015; Cournarie et al., 2004; Mutaliyeva et al., 2017).

Des nouvelles études ont également montré l'intérêt des émulsions multiples E/H/E pour l'administration de l'insuline par voie orale (Basha et al., 2020 ; Mutaliyeva et al., 2017). En effet, l'administration des émulsions multiples de l'insuline chez le rat en dose unique a montré une efficacité de l'effet hypoglycémiant de la préparation, et a donc prouvé que ces systèmes permettaient la protection et l'adsorption intestinale de l'insuline. Cependant, il a été remarqué que la forte proportion d'huile dans la formule entraînait des problèmes lors de l'administration chronique : diarrhées, stéatorrhées, etc. L'utilisation de formules comportant une proportion plus faible d'huile a été testée avec succès (Cournarie et al., 2004).

2.5. Conclusion

Dans ce chapitre les techniques d'encapsulation faisant l'objet de cette étude, à savoir la gélification ionotropique et les techniques d'émulsification sont présentées et suivies d'une présentation détaillée de la structure chimique, des propriétés et des mécanismes de gélification des polymères utilisés, le chitosane et l'alginate, dans les différents travaux d'encapsulation au cours de cette thèse. Enfin, les différentes techniques de préparation des émulsions multiples et ses caractéristiques, notamment leur stabilité ont été détaillées.

Ces études montrent le réel intérêt de ces systèmes d'encapsulation. En particulier, les émulsions multiples biocompatibles ont de grandes potentialités d'application dans le domaine pharmaceutique. Les études citées dans les paragraphes précédents montrent que celles-ci permettent effectivement d'encapsuler puis de libérer des principes actifs fragiles tels que l'insuline. En revanche, ces systèmes restent compliqués à mettre en place : la formulation du système (choix de l'huile, des émulsifiants, du procédé d'émulsification) doit être adaptée à chaque molécule d'intérêt.

De plus, dans ces études, la stabilité à long terme des émulsions est souvent loin d'être suffisante pour permettre une application industrielle. Ainsi, malgré le réel potentiel des émulsions multiples pour des applications d'encapsulation et de libération contrôlée de principes actifs, ces systèmes sont encore rarement utilisés en industrie.

Il est donc d'un grand intérêt d'arriver à mettre au point un procédé de formulation permettant d'obtenir des émulsions multiples de façon simple et reproductible, c'est-à-dire

en utilisant le moins de stabilisants et d'étapes d'émulsification possibles. De plus, une meilleure compréhension de la physico-chimie de ces systèmes permettrait d'améliorer leurs propriétés, telles que leur taux d'encapsulation ou leur stabilité sur le long terme, et donc d'en faire de meilleurs candidats pour l'administration de l'insuline par voie orale. Enfin, l'utilisation d'émulsions multiples semble être un moyen prometteur de permettre une libération contrôlée de ce principe actif encapsulé.

CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES

3.1. Introduction

Ce chapitre est destiné à la description du matériel, des techniques d'analyses qualitatives et quantitatives utilisées dans ce travail et les différents protocoles opératoires de formulation et de caractérisation des systèmes particuliers encapsulant l'insuline, ainsi que le protocole de l'étude de la libération de principe actif à partir des différents systèmes matriciels obtenus via l'utilisation de deux techniques d'encapsulation à savoir la gélification ionotropique et la double émulsion.

3.2. Matériel

3.2.1. Le principe actif

Le principe actif à encapsuler est l'insuline humaine, c'est une hormone peptidique de formule brute $C_{257}H_{383}N_{65077}S_6$, de poids moléculaire $5807,57 \pm 0,299$ g/mole, cristallisée, sa température de fusion ($F = 81$ °C), fourni par: Sanofi Aventis (Allemagne). Ce principe actif se présente sous forme d'une poudre fine de couleur blanche. Ce peptide est insoluble dans l'eau et soluble dans les acides dilués.

3.2.2. Polymères utilisés comme matrices d'encapsulation

Les polymères utilisés pour l'encapsulation de l'insuline ayant déjà fait l'objet de cette thèse en tant que matériaux supports, sont des polymères naturels polysaccharidiques, notamment, l'alginate de sodium et le chitosane.

Les alginates sont très utilisés dans le domaine pharmaceutique pour sa biocompatibilité, biodégradabilité, ces propriétés mucoadhésives et ces conditions de gélification très douces, c'est-à-dire ne nécessitant pas d'avoir recours à des solvants ou à des hautes températures. De plus, il se rétracte dans l'environnement acide et gonfle à pH neutre, qui permettrait donc de protéger le principe actif dans l'estomac (Bagre et al., 2013).

Le chitosane est un copolymère naturel cationique qui est biodégradable, biocompatible, mucoadhésif et a également la capacité d'améliorer l'absorbance de principe actif à la surface des muqueuses (structure anionique) par interaction ionique (Avadi et al., 2010).

Afin de modifier les propriétés de surface des nanoparticules et limiter la fixation des protéines plasmatiques, le polyéthylène glycol de masse moléculaire 4000g/mole (PEG 4000) a été utilisé en tant qu'un agent de furtivité. De nombreuses études antérieures ont montré que l'efficacité optimale pour réduire l'adsorption protéique sur les nanoparticules est obtenue avec le greffage de PEG de poids moléculaire élevé (Wani et al., 2020).

A. Alginate de Sodium

L'alginate de sodium ($\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_6$) utilisé dans le cadre de cette thèse a été fourni par la société SIGMA-Aldrich (Royaume-Uni) d'une viscosité de 250 cP pour une solution à 2% en masse à 25 °C. Ce polymère est issu de l'algue *Macrocystis pyrifera* et appartient au lot 104K0112. L'alginate présente une masse molaire moyenne varie généralement entre environ 20 000 g/mole et 240000 g/mole. Son point de fusion : >300 °C. Ce polysaccharide se présente sous forme de poudre blanche ou brun jaunâtre pâle et sa densité est de 1,601 g/cm³. Elle se gonfle dans l'eau, mais elle ne dissout pas ; elle est insoluble dans les solvants organiques, peu soluble dans l'éthanol et soluble dans les solutions d'hydroxydes alcalins.

B. Chitosane

Le chitosane utilisé dans cette étude a été fourni par la société ALDRICH-Chemistry (Allemagne). Son degré de désacétylation est environ 70 %. Ce chitosane a une masse moléculaire moyenne. Ce polysaccharide se présente sous forme de poudre fine blanche. Sa densité : 1,35 – 1,40 g/cm³. Il est peu soluble dans l'eau, pratiquement insoluble dans l'éthanol, facilement soluble dans les acides dilués.

C. PEG 4000

Le PEG 4000 ou macrogel de masse molaire moyenne de 4000 g/mol, de formule brute $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$ est un polymère hydrophile non ionique. C'est un polymère d'oxyde d'éthylène qui se présente sous forme d'un solide blanc. Le PEG est soluble dans l'eau, le toluène, le dichlorométhane, l'alcool et l'acétone, mais n'est pas soluble dans les hydrocarbures aliphatiques comme l'hexane, le cyclohexane ou le diéthyléther. Le PEG utilisé a été fourni auprès de la société SIGMA-Aldrich (France). Sa température de fusion se situe entre 54 et 58 °C ; sa densité est de 1,20–1,21 g·cm⁻³ à 25 °C ; sa viscosité dynamique se situe entre 76–110 cSt à 98,9 °C.

3.2.3. Produits utilisés en technique de l'émulsification (la double émulsion)

Pour formuler des systèmes particuliers encapsulant l'insuline par les techniques d'émulsification, notamment la double émulsion, les produits suivants ont été utilisés, en plus des polysaccharides, de PEG 4000, du principe actif déjà décrits précédemment :

A. Phase hydrophile

- **PBS (pH 7,4)** : Solution tampon phosphate saline (préparée selon les recommandations de la pharmacopée européenne (annexe B).
- **Tween® 80** : Le Tween® 80 de formule brute $C_{64}H_{124}O_2$.
 - Poids moléculaire : 1310 g/mol ;
 - Viscosité : 425 mPas ;
 - HLB : 15.0, soluble dans l'eau ; insoluble dans l'huile minérale ;
 - Aspect : liquide huileux jaune.
- Le Tween® 80 utilisé a été fourni de la société SIGMA-Aldrich (France).

B. Phase lipophile

Il a été démontré que, du point de vue biodisponibilité des espèces encapsulées, les huiles seraient relativement plus efficaces (Tan et al., 2019). L'huile de paraffine, huile minérale issue d'hydrocarbures, a été choisie puisqu'elle présente une huile inerte, qui peut franchir le tube digestif sans être absorbée par l'organisme donc sans aucune valeur calorifique (Ozturk et al., 2015).

- **Huile de paraffine** : C'est une huile limpide, pratiquement insoluble dans l'eau, sa densité relative est voisine de $0,90 \text{ g cm}^{-3}$ à 20 °C (Ph.EUR.7^{ème} édition.). Cette huile a été fournie auprès de la société SIGMA-Aldrich (Allemagne). Sa viscosité est de 110 à 230 mPas. Elle est insoluble dans l'eau et l'éthanol. Soluble dans le benzène, disulfure de carbone, chloroforme, éther diéthylique.
- **Agents de surface lipophiles** : Ces agents font partie de la famille Span®. Les tensioactifs Span® sont des esters d'acides gras et d'anhydrosorbitol ($X = \text{OH}$ ou R-CO_2^- (résidus d'acides gras) ou mono – ou triesters). Ce sont des tensioactifs non ioniques : mixtures d'esters partiels de sorbitol et de ses anhydrides et sont fabriqués à partir d'acides gras comme l'acide laurique, palmitique, stérique, ou oléique. Les tensioactifs span® sont lipophiles. Ils sont généralement solubles ou dispersibles dans

l'huile, formant des émulsions E/H. Les tensioactifs Span® sont très utilisés pour leurs excellentes propriétés d'émulsification (Sanatkaran et al., 2014).

- Le tensioactif lipophile utilisé est : le Span 80[®], provenant de SIGMA-Aldrich USA.
- Formule brute: $C_{24}H_{44}O$
- Poids moléculaire : 429 g/mole ;
- Viscosité : 970–1080 m Pas ;
- Densité : 1.01 g/cm^{-1} ;
- HLB : 4.3 ;
- Solubilité : Peu soluble dans l'eau, soluble dans l'huile minérale.
- Ce surfactif se présente sous forme d'un liquide visqueux jaune.

C. Autres produits

- L'acide acétique : L'acide acétique glacial fourni auprès de GPR-RECTAPUR, de pureté 99,9 % a permis de faciliter la solubilisation du chitosane ;
- Chlorure de calcium ($CaCl_2$) a été fourni auprès de AnalaR-NORMAPUR. Il a été utilisé pour la réticulation de l'alginate ;
- L'hydroxyde de sodium (NaOH) : L'hydroxyde de sodium (Sigma-Aldrich) de pureté 100%, a été utilisé pour ajuster le pH de la solution du chitosane avant la complexation avec le pré-gel d'alginate ;
- Sels de phosphate sodique : Les sels NaH_2PO_4 , KH_2PO_4 et Na_2HPO_4 (Sigma-Aldrich) de pureté 99.99 %, ont été utilisés pour la préparation de la solution tampon phosphate saline à pH 7,4 et la solution tampon phosphate à pH 6,8 (annexe B) pour l'étude in vitro de la libération de l'insuline à travers la multiple émulsion et les micro/ nanoparticules synthétisées.

3.2. Méthodologie de la recherche expérimentale

Afin de s'affranchir de l'utilisation de solvants organiques et d'additifs, la gélation ionotropique et la double émulsion ont été choisies comme des techniques d'encapsulation de l'insuline.

3.2.1. Formulation des micro et nanoparticules par la technique de la gélation ionotropique

Dans cette partie, les micro et nanoparticules sont formées par gélation ionotropique, procédé qui repose sur la formation de complexes polyélectrolytes à base d'alginate de sodium et de chitosane par le biais d'interactions électrostatiques après la prégélation de l'alginate réticulée (Sarmiento et al., 2007a). Le protocole de formulation décrit ci-dessous est inspiré de celui proposé dans les travaux de Sarmiento et al. (2007a) avec quelques modifications en termes de greffage des micro et nanoparticules par le PEG 4000.

A. Protocole de formation des micro et nanoparticules par gélation ionotropique

L'alginate de sodium est mis en solution dans l'eau ultra pure à la concentration de 0,063% (m/v). Également, le chitosane est dissout dans l'acide acétique (1%, m/v) à la concentration de 0,07% (m/v). Les solutions des deux polymères sont maintenues sous agitation 24 heures pour assurer une bonne homogénéisation. Le pH d'alginate de sodium et de chitosane a été ajusté à 4,9 et 4,6 respectivement à l'aide d'une solution de HCl (1N) et une solution concentrée de NaOH.

Une quantité de 7 mg d'insuline humaine sont mises dans 117,5 ml d'alginate sous agitation magnétique modérée (600 trs/min). La réticulation de l'alginate est assurée en ajoutant 7 ml de chlorure de calcium (18 mmole) goutte à goutte à la solution d'alginate.

Afin d'induire la formation de complexes polyélectrolytes encapsulant l'insuline, 12,5 ml de la solution du chitosane sont ajoutées goutte à goutte au pré-gel d'alginate à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille (diamètre 0,4 mm). La complexation est réalisée à température ambiante (20-25°C), sous un homogénéisateur avec différentes vitesses d'agitation (selon la matrice de plan des expériences). Lorsque l'apparition d'une opalescence est observée après ajout de la solution de chitosane, celle-ci indique la formation de complexes. La suspension obtenue est alors conservée sous agitation magnétique pendant 15 minutes, afin de permettre la stabilisation des complexes formés. Le recouvrement de la surface des particules est assuré par l'ajout de PEG 4000 de différentes concentrations (selon

la matrice de plans d'expériences). La dispersion est également maintenue sous agitation modérée pendant 15 minutes, pour quelle se stabilise. (Figure 3.1)

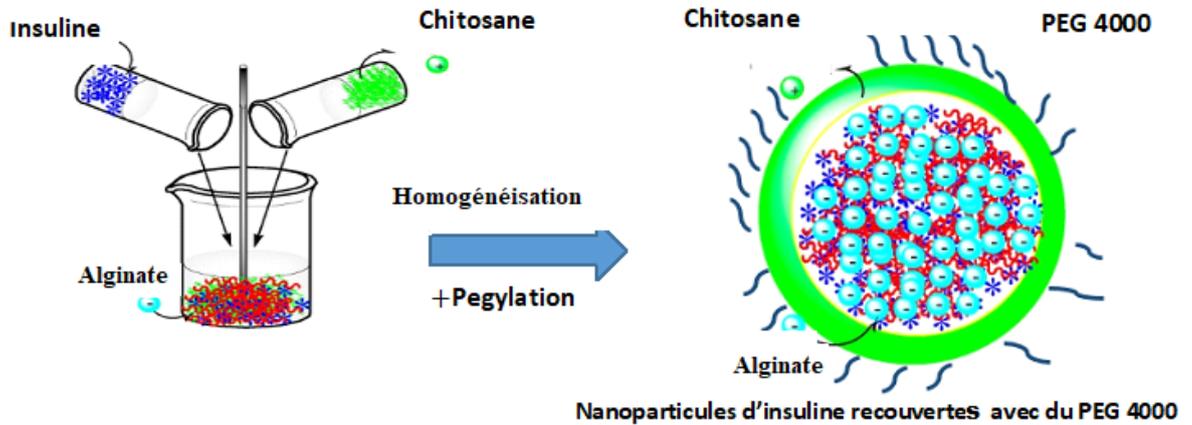


Figure 3.1 : Protocole de formulation des nanoparticules recouvertes avec du PEG 4000

3.2.2. Formulation des micro et nanoparticules encapsulant l'insuline par la double émulsion

L'objectif de cette partie est de mettre au point une émulsion multiple (E/H/E) caractérisée par un aspect homogène, une taille minimale des particules et une stabilité maximale dans le but d'évaluer l'effet protecteur de ce type de systèmes vis-à-vis de l'insuline ainsi que sa libération lors d'une administration orale. Comme pour les émulsions simples, l'utilisation de tensioactifs est indispensable pour stabiliser les doubles émulsions, instables d'un point de vue thermodynamique (Li et al., 2013).

A. Choix des tensioactifs

Pour stabiliser l'interface interne Eau/Huile, un tensioactif lipophile non ionique a été choisi. Il s'agit du Sorbitan monooléate (Span 80). C'est un tensioactif ayant montré un rôle essentiel dans l'obtention d'une émulsion primaire E/H caractérisée par un film interfacial rigide et de bonne qualité (Lv et al., 2014). Il a été utilisé à la concentration de 5 à 15 % pour réaliser les différentes formulations.

L'interface externe Huile/Eau est stabilisée avec un tensioactif hydrophile non ionique, il s'agit de mono-oléate de sorbitane polyoxyéthyléné (Tween 80). Il a été utilisé à la concentration de 1 à 5 % pour réaliser la matrice des expériences.

En outre, ces tensioactifs sont caractérisés par une biodégradabilité et une excellente compatibilité non seulement entre eux, mais aussi avec l'huile de paraffine (Lv et al., 2014).

B. Protocole de formulation des multiples émulsions E/H/E

Le protocole de formulation des multiples émulsions E/H/E décrit ci-dessous est inspiré de celui proposé dans les travaux de Li et al. (2012) et Li et al. (2013) avec quelques modifications. Les différentes émulsions ont été préparées selon les trois étapes suivantes :

- **Première étape : Préparation de l'émulsion primaire**

La phase aqueuse interne a été préparée après dissolution de l'insuline humaine dans une solution de tampon phosphate (PBS) pH 7,4 (USP), à la concentration de 5 mg/ml de PBS sous agitation magnétique modérée (600 trs/min).

Une émulsion primaire E/H est formulée en dispersant cette phase aqueuse dans une phase huileuse contenant l'huile de paraffine et le surfactif lipophile (Span 80), goutte à goutte sous une agitation (800 trs/min) à l'aide d'un agitateur à hélice pendant 15 min.

- **Deuxième étape : Préparation de l'émulsion secondaire**

L'émulsion primaire obtenue dans la première étape est ensuite dispersée dans une phase aqueuse externe contenant l'alginate de sodium (0,067% (m/v) ; pH 4,7) et le surfactif hydrophile (Tween 80), sous une agitation à (600 trs/min) pendant 15 min, ce qui induit la formation de l'émulsion multiple H/L/H.

- **Troisième étape : Enrobage de l'émulsion multiple par chitosane**

Les émulsions secondaires ont été enrobé par chitosane, en se basant sur le procédé de la gélation ionotropique. Brièvement, un volume de 0,5 ml de solution de chlorure de calcium (0,2%,(m/v)) a été ajouté goutte à goutte dans 12 ml de l'émulsion préparée, sous agitation modérée (600 trs/min) pendant 30 minutes. Ensuite, 2 ml de solution de Chitosane (0,07% (m/v), pH 4,7) ont été ajoutés goutte à goutte, pendant 90 minutes afin d'assurer une complexation optimale. Le recouvrement de la surface des globules des émulsions multiples est assuré par l'ajout de 2 ml d'une solution contenant 0,17% (m/v) PEG 4000. L'ensemble est maintenu sous agitation en utilisant un homogénéisateur (POLYTRON PT2500E) à une vitesse de rotation de 600 trs/min pendant 30 min, afin de permettre un

recouvrement optimal des nanoparticules d'insuline par interaction électrostatique (Figure 3.2).

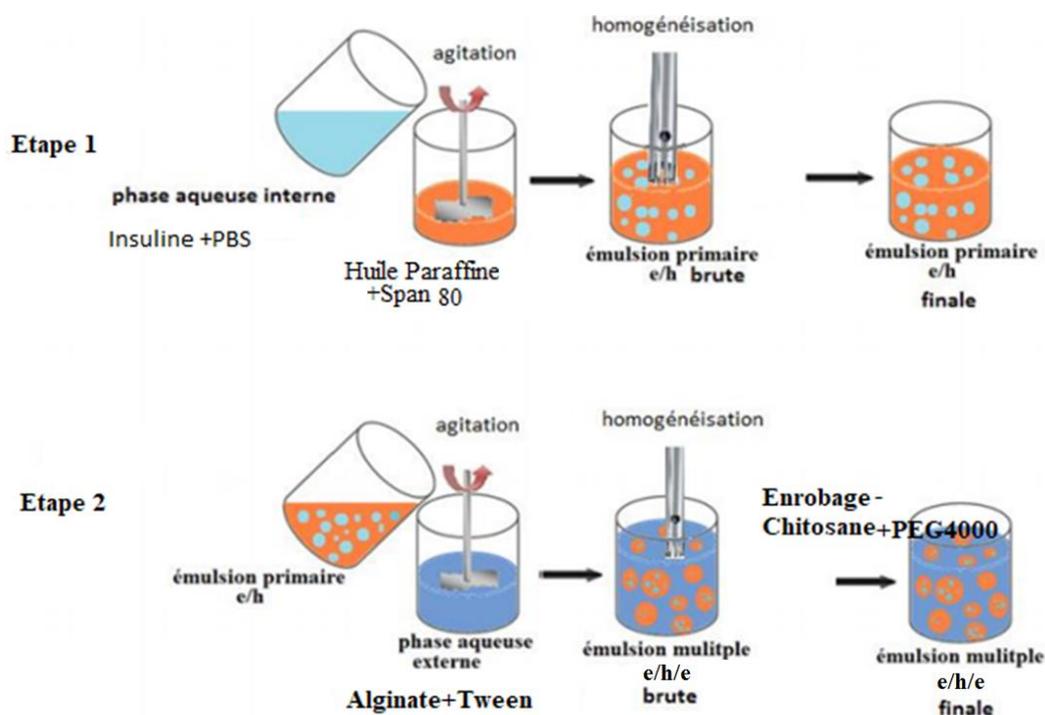


Figure 3.2 : Différentes étapes de préparation des émulsions multiples

3.3. Caractérisation des micro et nanoparticules

Les caractéristiques des particules obtenues en utilisant les deux techniques d'encapsulation décrites ci-dessous sont réalisées comme suit : la taille des particules des échantillons formulés ainsi que leur potentiel zêta ont été évalués par diffusion dynamique de la lumière. Le taux d'encapsulation a également été mesuré par une méthode indirecte en utilisant la chromatographie liquide haute performance et la spectrophotométrie UV-visible. L'observation de la morphologie des particules a été réalisée par microscopie optique. Le comportement thermique a été étudié par analyse thermogravimétrique et analyse calorimétrique différentielle à balayage. Également, une caractérisation structurale a été réalisée par spectroscopie FTIR.

3.3.1. Microscopie optique

La morphologie des micro et nanoparticules, préparées via les deux techniques d'encapsulation, a été examinée par microscopie optique. Un échantillon est déposé entre lame et lamelle de verre et placé sur une platine amovible, puis observé au grossissement

X2000. Cette platine permet des déplacements précis de l'échantillon afin de faire la mise au point et de trouver une région d'intérêt. Les observations ont été réalisées à l'aide d'un microscope optique de type Oxion, équipé d'une caméra numérique permettant l'acquisition des images obtenues. L'examen au microscope permet de visualiser d'éventuelles hétérogénéités des particules et vérifier leur état d'agrégation.

3.3.2. Diffusion Dynamique de la lumière (DLS, Dynamic Light Scattering)

La taille moyenne des particules, l'indice de polydispersité (PDI), *i.e.* la distribution en taille et la charge de surface (le potentiel zêta) des particules ont été mesurés en utilisant un Zetasizer Nano ZS (Horiba, Japon) à 25 °C. Cet instrument est équipé d'un laser He-Ne émettant à 532 nm et la diffusion de la lumière est récoltée par un détecteur positionné à un angle de 173 ° et 90 °. Cette technique est basée sur la mesure de la variation en fonction du temps de l'intensité de la lumière diffusée par les particules soumises au mouvement du brownien (Lim et al., 2013).

L'interprétation de ces variations se fait par le biais d'une fonction de corrélation, et sachant que le coefficient de diffusion des particules (D) peut être relié à leur taille grâce à l'équation de Stokes-Einstein (Équation 3.1) :

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi \eta D} \quad (\text{Équation 3.1})$$

avec R_h , le rayon hydrodynamique, k_B la constante de Boltzmann, T la température absolue et η la viscosité.

Dans le cadre de ce travail, la mesure de la taille des particules a été effectuée dans des cuves de spectroscopie en quartz, tandis que le potentiel zêta (charge de surface) des nanoparticules a été mesuré dans des cellules à capillaire replié. L'intensité de diffusion a été mesurée à un angle de 173° par rapport à la source lumineuse en utilisant un détecteur à système photodiode à avalanche. Toutes les mesures sont répétées 3 fois.

La mesure de la vitesse de déplacement des particules permet d'obtenir un profil bien précis donnant toutes les informations sur la taille et son homogénéité dans l'échantillon. Cette homogénéité en termes de taille est déterminée par la mesure de l'indice de polydispersité (PDI). Plus sa valeur est grande et plus l'échantillon est dit « polydisperse », c'est-à-dire non homogène en taille. Horiba fixe les limites suivantes :

- Si le PdI est < 0.1 , l'échantillon est dit monodispersé ;
- Pour un PdI entre 0.1 et 0.5 , l'échantillon est standard ;
- Si le PdI est > 0.7 , l'échantillon est extrêmement polydisperse et donc la mesure est peu fiable.

Pour la mesure de la charge de surface (potentiel zêta), un champ électrique E est appliqué entre deux électrodes ce qui induit un déplacement des micro et nanoparticules à une vitesse liée à leur potentiel zêta. Un laser est ensuite dirigé créant des interactions avec les particules qui génèrent un signal diffusé.

Ainsi le potentiel zêta est déduit de la mobilité des particules induite qui modifie la fréquence du signal diffusé (Figure 3.3).

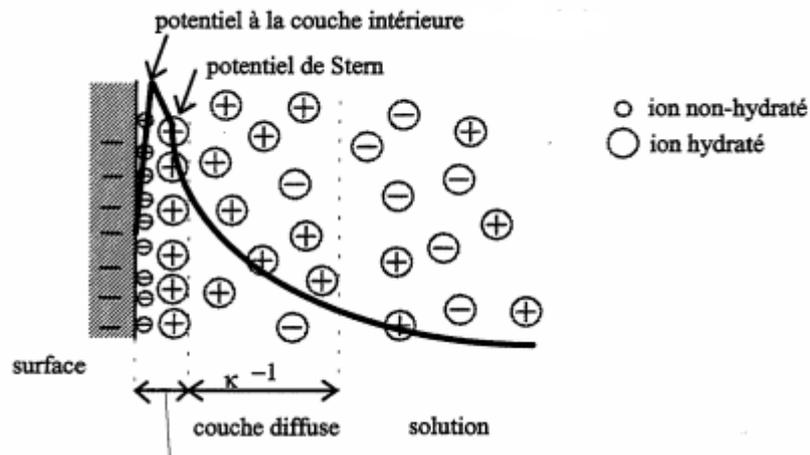


Figure 3.3 : Principe de la mesure de la charge de surface par granulométrie laser (Rami, 2010)

3.3.3. Efficacité d'encapsulation

L'efficacité d'encapsulation a été déterminée par la méthode indirecte. Elle consiste en une centrifugation des différentes dispersions obtenues ($20000 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 10 min). Le surnageant est collecté pour le dosage en indirect de l'insuline.

Pour les émulsions multiples, la quantification de l'insuline non encapsulée dans le surnageant a été effectuée par une méthode validée de chromatographie liquide haute performance (Sarmiento et al., 2006b). L'appareil est de marque SHIMADZU (RF-20A : colonne C18, détection par UV à 214 nm). Le protocole et les chromatogrammes obtenues lors de la validation de la spécificité de la méthode de dosage par HPLC sont décrits dans l'annexe C.

Dans le cas des micro et nanoparticules formulées par la gélotion ionotropique, le surnageant est analysée par Spectroscopie UV-visible (UV-1800 SHIMADZU) à 505 nm suivant un protocole inspiré et validé des travaux de Reis et al. (2008).

L'équation suivante a ensuite été utilisée pour déterminer cette efficacité d'encapsulation :

$$EE (\%) = \frac{(\text{quantité totale théorique d'insuline} - \text{quantité d'insuline non encapsulée})}{(\text{quantité totale théorique d'insuline})} * 100$$

3.3.4. Spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectrométrie infrarouge est utilisée pour confirmer l'interaction entre l'insuline et la matrice polymérique. Cette interaction peut être identifiée par le déplacement des bandes caractéristiques attribuées aux différents groupes fonctionnels présents dans les substances, comme, les groupements carbonyles et amines.

Les spectres FTIR du principe actif libre, les polymères libres (alginate, chitosane, PEG4000) et du complexe préparés ont été enregistrés avec un spectromètre de type SHIMADZU (L1600400). Il est piloté par un microordinateur. Les échantillons, en poudre, ont été balayés par des rayons de longueur d'onde appartenant à la région 4000-400 cm⁻¹.

3.3.5. Analyse thermogravimétrique

Afin de connaître le comportement en température de l'ensemble des membranes polymériques étudiées (température de dégradation, température de désorption d'eau, et stabilité thermique), Une analyse thermogravimétrique (ATG) a été conduite sur un appareil TA Instrument TGA Q500, pour mesurer le courant ascendant de la perte de poids des membranes dans l'intervalle de température de 20 à 550 °C. Les différentes dispersions ont été d'abord lyophilisées. Les échantillons (2 à 3 mg) contenus dans des creusets en aluminium ont été testés avec une cadence de chauffage de 5 °C/min et sous un flux d'hélium.

3.3.6. Analyse calorimétrique différentielle à balayage (DSC)

L'analyse calorimétrique différentielle (DSC) permet de déterminer les températures de transit ion vitreuse (T_g), de fusion (T_f) et de dégradation thermique des différentes catégories de matériaux.

Elle permet donc de visualiser les transitions exothermiques telles que la cristallisation et les transitions endothermiques comme la fusion. La calorimétrie différentielle à balayage mesure les différences des échanges de chaleur entre un échantillon à analyser et une référence (capsule vide d'aluminium).

L'appareillage de DSC utilisé est de marque (NETZSCH STA 409 PC). L'analyse thermique a été menée en scellant 10 mg d'échantillon de particules lyophilisées (4-5 mg) dans des capsules en aluminium, avec un sertissage mécanique.

La capsule est introduite dans un calorimètre différentiel à balayage équipé d'un capteur en céramique HSS8 de Metter Toledo. Une montée en température de 5 °C à 350 °C a été effectuée à une vitesse de 10 °C/min, pour pouvoir détecter la dégradation thermique des polysaccharides (chitosane et alginate) et du PEG 4000, la transition vitreuse (si elle existe) et l'état de l'insuline encapsulée (cristallin ou amorphe).

Cette montée est suivie d'une phase de refroidissement à une vitesse 5 °C/min, pour pouvoir de détecter le point de cristallisation des micro et nanoparticules. Le même protocole a été utilisé pour les différents systèmes.

3.4. Analyse conductimétrique des émulsions multiples

Afin de déterminer le type des émulsions formulées, une mesure de leur conductivité électrique a été réalisée en utilisant un conductimètre de type Ino Lab Cond 720 (Jeneway, Allemagne). Les essais ont été conduits sous agitation à 20°C sur chaque émulsion multiple fraîchement préparée après dilution au 1/20 dans de l'eau distillée ; l'essai est répété deux fois, la moyenne des essais est calculée.

3.5. Analyse rhéologique

Le but du test a été d'appréhender le comportement rhéologique des EM préparées dans les conditions optimales. Un rhéomètre à couple de rotation imposé (Anton Paar MCR-102) a été utilisé ; ce dernier est équipé d'un système cône-plan (CP25-1) avec un plateau de 24.982 mm de diamètre et d'un entrefer de 0,105 mm ; l'angle du cône utilisé était de 2 degrés. L'analyse a été menée à la température de $+20 \pm 0.1$ °C.

3.6. Profil de libération de l'insuline encapsulée dans les milieux simulés

La libération *in vitro* de l'insuline à partir des différentes formulations est étudiée en fonction du temps dans le milieu similaire gastrique (un tampon acide, pH 1,2) et intestinal (un tampon phosphate à pH 6,8 et pH 7,4). Les différents milieux de dissolution ont été préparés (annexe B) selon les directives de la pharmacopée européenne.

Les dispersions de nanoparticules chargées en insuline sont introduites dans un sac de dialyse formé d'un film de cellulose (seuil de rétention 50000 Da, Spectra/Por 6, Bioblock Scientific, Illkirch, France), dont les extrémités sont obturées par deux pinces, dont l'une est aimantée et permet la rotation du sac.

Le sac de dialyse contenant l'échantillon est immergé dans le milieu de libération (500 ml) placé dans un appareil dissolutest (DISTEK-2500), sous agitation modérée (100 rpm) et à 37 ± 0.5 °C.

Des prélèvements d'un volume de 1 ml des différents milieux sont réalisés à des intervalles de temps réguliers après immersion du sac de dialyse dans les milieux de libération. Sachant que l'étude de dissolution dans le milieu gastrique (pH 1,2) et intestinal (pH 6,8 et pH 7,4) a été réalisée durant 2 h et 6 h, 24 h respectivement en fonction du temps de transit dans le tractus gastrointestinal (Venkata Siddhartha et al., 2014a). À chaque mesure, le volume prélevé est réintroduit dans le milieu de libération pour respecter les conditions sink.

La quantité d'insuline libérée par les nanoparticules a été mesurée par spectrophotométrie UV à une longueur d'onde $\lambda = 277$ nm. Cette approche est appliquée aux nanoparticules obtenues par gélation ionotropique. Pour les nanoparticules formulées par double émulsion, l'insuline libérée est quantifiée par la méthode CLHP décrite précédemment.

- Les résultats ont été exprimés en pourcentage de l'augmentation de la concentration de l'insuline libérée et dosée dans le milieu de libération.
- Le logiciel DDSOLVAR a été utilisé afin de simuler les paramètres des mécanismes entrant en jeu lors de l'étude de la cinétique de libération *in vitro* de l'insuline encapsulés dans les nanoparticules formulées. C'est un outil complet d'analyse de données et de mise en forme graphique fournissant tout un éventail de fonctionnalités (analyse de pics, ajustement de courbes, statistiques...).

○ **Validation de la méthode de dosage de l'insuline lors de la libération *in vitro***

Avant d'effectuer les essais de dissolution, la linéarité de la méthode a été vérifiée. La linéarité d'une méthode est sa capacité, à l'intérieur d'un certain intervalle, à fournir des résultats proportionnels à la concentration en soluté à doser dans l'échantillon (FDA, 1996). Pour évaluer la linéarité de cette méthode, cinq solutions d'insuline ont été préparées par dissolution de la poudre d'insuline dans les différents milieux de dissolution. Les droites d'étalonnage de l'insuline dans le milieu gastrique et intestinal simulés (annexe D) obtenues montrent une bonne corrélation pour la gamme de concentration de 2 à 40 µg/mL de solution ($R^2 > 0,9$). En effet, l'insuline libérée est dosée par spectroscopie UV-Visible à 277 nm.

3.7. Méthodologie des plans d'expériences

La planification expérimentale sera utilisée pour étudier l'influence des différents paramètres de formulation sur les propriétés des micro et nanoparticules, tout en limitant le nombre d'expériences à réaliser.

L'objectif de cette méthodologie qui obéit à des règles mathématiques strictes est d'optimiser l'organisation des essais expérimentaux tout en faisant varier tous les facteurs simultanément afin d'obtenir un maximum de renseignements avec le minimum d'expériences ainsi qu'une optimisation et une modélisation des résultats (Goupy et Creighton, 2006).

- **Formule de codage :** L'intérêt des unités codées est de pouvoir présenter les plans d'expériences de la même manière quels que soient les domaines d'étude retenus et quels que soient les facteurs. La formule permettant le passage des variables réelles (A) aux variables codées (X) est donnée par (Goupy et Creighton, 2006):

$$X = \frac{A-A_0}{\text{pas}} \quad (\text{Équation 3.2})$$

A_0 : la valeur centrale ou milieu du domaine, donné par :

$$A_0 = \frac{A_+ + A_-}{2} \quad (\text{Éq. 3.3})$$

Pas : le pas de variation, donné par :

$$\text{Pas} = \frac{A_+ - A_-}{2} \quad (\text{Éq. 3.4})$$

Où ; A^- est le niveau bas de la variable correspond à la variable codée -1. A^+ est le niveau haut de la variable correspond à la variable codée +1.

3.7.1. Étude de criblage (screening)

Le criblage des facteurs constitue une étape préalable lors d'une étude par les plans d'expériences. Dans cette étude ayant pour but d'estimer le « poids » de chacune des variables étudiées, on suppose à priori que les effets sont totalement additifs, ceci implique que la relation entre les réponses mesurées et les variables à la forme d'un modèle polynomial du 1^{ier} degré (équation 3.4) qui néglige toutes les interactions entre les facteurs

$$Y = a_0 + \sum_{i=1}^3 a_i X_i + \sum_{i=1, j=1}^3 a_{ij} X_i X_j + a_{123} X_1 X_2 X_3 \quad (\text{Éq. 3.4})$$

où Y représente la réponse, a_0 la moyenne des réponses, a_i les effets des facteurs principaux, a_{ij} et a_{123} les effets des interactions respectivement du deuxième et troisième ordre.

La matrice d'expériences de criblage utilisée dans le cadre de ce travail est celle du plan factoriel complet à deux niveaux (2^k). Le chiffre 2 indique le nombre de niveaux par facteur et le k en exposant signifie qu'il y a k facteurs étudiés (VAILLÉ and GOUPY, 2006). Ce plan possède un nombre de niveaux limité à deux pour chaque facteur. Toutes les combinaisons de niveaux sont effectuées au cours de l'expérimentation. En effet, il s'agit d'un plan factoriel complet à 3 facteurs. La matrice est constituée alors de 8 expériences en total où chaque expérience est répétée 3 fois pour la précision.

La matrice du plan d'expériences complet utilisé pour établir chaque formulation est représentée dans le tableau suivant (Tableau 3.1) :

Tableau 3.1 : Matrice d'essais de l'étude de criblage

N° d'essai	Facteur 1	Facteur 2	Facteur 3
F1	-1	-1	-1
F2	+1	-1	-1
F3	-1	+1	-1
F4	+1	+1	-1
F5	-1	-1	+1
F6	+1	-1	+1
F7	-1	+1	+1
F8	+1	+1	+1

3.7.2. Étude par surfaces de réponses (MSR)

La méthodologie de plans des surfaces de réponses est utilisée à la suite du screening qui vise à déterminer les conditions expérimentales optimales. Cet outil est basé sur un modèle du second ordre (Équation 3.6), qui permet de calculer en chaque point du domaine expérimental d'intérêt la valeur de la réponse avec une précision au moins égale à celle qu'on obtiendrait si l'on faisait l'expérience (Goupy et Creighton, 2006).

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^K b_i X_i + \sum_{i=1}^K b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{K-1} \sum_{j=i+1}^K b_{ij} X_i X_j \quad (\text{Éq. 3.6})$$

où X_i et X_j représentent les variables codées du système, b_0 , b_i ($i = 1, 2, \dots, k$), b_{ii} ($i = 1, 2, \dots, k$) et b_{ij} ($i = 1, 2, \dots, k-1$; $j = 2, 3, \dots, k$) sont respectivement les coefficients de régression pour les termes d'ordonnée à l'origine, linéaire, quadratique et d'interaction et k désigne le nombre de facteurs.

Parmi les différents types de plans des surfaces de réponses couramment utilisés, le plan de Box-Behnken a été choisi, car il est de mise en œuvre aisée, car tous les facteurs ne prennent que trois niveaux : - 1, 0 et + 1, en variables codées (Sawant et al., 2017). Les points expérimentaux sont au milieu des arêtes de chacun des côtés du cube (Figure 3.4). Ce plan comporte douze essais auxquels on peut ajouter un (ou plusieurs) point central. La matrice du Tableau 3.2 indique ces douze essais accompagnés d'un seul point central. Dans la pratique, 3 ou 4 points au centre sont souvent réalisés.

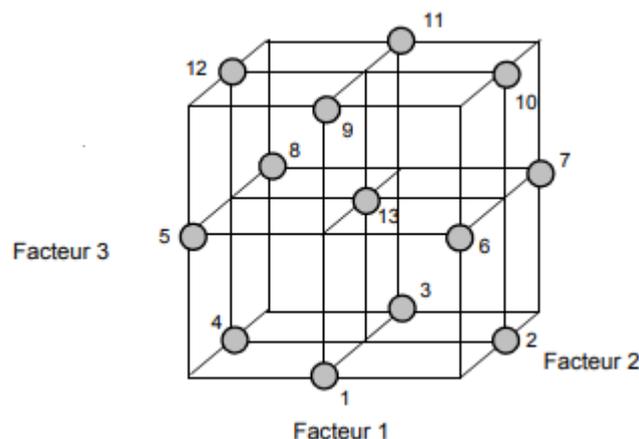


Figure 3.4: Lieu géométrique des points expérimentaux d'un plan de Box-Behnken à trois facteurs (VAILLÉ and GOUPY, 2006)

Tableau 3.2 : Plan de Box-Behnken pour 3 facteurs

N ° essai	Facteur 1	Facteur 2	Facteur 3
1	1	1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	-1	-1	0
5	1	0	1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	-1	0	-1
9	0	1	1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	-1	-1
13-15	0	0	0

Dans le cadre de cette thèse, le logiciel Minitab-version 17 est utilisé afin de construire la matrice d'expériences du plan et l'analyse statistique et graphique des résultats. C'est un logiciel statistique développé par le département de statistique de l'Université de Pennsylvanie (U.S.A.). Il sert principalement au traitement des données expérimentales, statistique descriptive, analyse de la variance, méthodes relatives à la corrélation, la régression simple et multiple et tests d'indépendance.

3.8. Tests de stabilité des nanoparticules dans le temps

Les essais optimaux des nanoparticules d'insuline obtenues par gélation ionotropique et la technique d'émulsification sont aliquotées dans des tubes à centrifuge et conservées à 4 °C pendant 45 jours.

La taille, le PDI, le potentiel zêta et le taux d'efficacité d'encapsulation des nanoparticules ont été mesurés comme décrit ci-dessus une fois par semaine et pendant 45 jours.

3.9. Conclusion

Parmi les différentes méthodes d'encapsulation, la méthode de gélation ionotropique et la méthode de double émulsion ont été choisies et mises au point. Ce sont des techniques relativement simples, permettant de s'affranchir de l'utilisation de solvants organiques et l'obtention de particules de l'ordre du micromètre ou de nanomètre.

Au vu des nombreux paramètres susceptibles d'influencer les propriétés des micro et nanoparticules encapsulant l'insuline, il convient d'optimiser la composition de ces systèmes particuliers ainsi que les techniques de production.

L'approche par les plans d'expériences consiste à organiser la démarche expérimentale et l'analyse décisionnelle en appliquant plusieurs outils et tests statistiques. L'utilisation et l'intérêt des plans d'expériences conduisent à établir un plan comportant le maximum de précision dans les résultats avec un minimum d'expériences. Dans ce travail, le plan d'expériences a été utilisé afin d'étudier l'influence des différents paramètres de formulation sur les propriétés des micro et nanoparticules formulées via les différentes techniques d'encapsulation utilisées.

CHAPITRE IV : OPTIMISATION DE LA FORMULATION DES NANOPARTICULES PAR GÉLATION IONOTROPIQUE

4.1 Introduction

Cette partie de travail a pour objectif l'optimisation des conditions de la formulation des nanoparticules furtives en se basant sur la formation de complexes polyélectrolytes d'alginate/chitosane par prégélation de l'alginate, suivie par la complexation avec le chitosane et le recouvrement de la surface des particules de PEG 4000, en vue d'une administration par voie orale.

Le premier chapitre a permis d'appréhender que, dans la littérature, il existe plusieurs paramètres importants interviennent dans la formation de gouttelettes via le procédé de gélation ionotropique (Patil et al., 2010b ; Reis et al., 2008). La formation de gouttelettes sphériques et de taille mono disperse nécessite un ajustement ou compromis à trouver entre ces paramètres. De ce fait, la méthodologie des plans d'expériences a été appliquée. Ces méthodes de modélisation permettent notamment d'établir des modèles mathématiques faisant intervenir différents paramètres qui affectent la formation de complexes polyélectrolytes (PEC) recouverts avec du PEG 4000.

4.2. Plan de Criblage

Un screening préalable a été réalisé afin de déterminer les limites de variation inférieures et supérieures des paramètres critiques de la technique d'encapsulation par gélation ionotropique qui seront étudiés.

4.2.1 Détermination des facteurs et du domaine d'étude

Le choix des facteurs est basé sur des critères expérimentaux relatifs aux essais préliminaires et sur les résultats des études antérieures (Azevedo et al., 2014 ; Sarmiento et al., 2007b).

Une matrice de criblage d'un plan factoriel complet à deux niveaux a été réalisée, ce qui permet de montrer l'influence des 3 facteurs à deux niveaux sur les réponses désirées. Les trois facteurs étudiés ainsi que leurs limites de variation (niveaux) lors de l'étude du criblage sont indiqués dans le tableau 4.1.

Tableau 4.1 : Facteurs du criblage et leurs niveaux réels et codés pour la gélation ionotropique

Facteurs	Niveau	
	-1	+1
La vitesse d'homogénéisation (X ₁)	800 rpm	2000 rpm
La concentration du PEG 4000 (X ₂)	0,175 % (w/v)	0,35 % (w/v)
Le temps d'homogénéisation (X ₃)	15 min	45 min

4.2.2. Les réponses

Les réponses recherchées sont la taille des particules, le potentiel zêta et le taux d'efficacité d'encapsulation (Tableau 4.2).

Tableau 4.2 : Les réponses choisies pour la gélation ionotropique

Réponses	Abréviation	unités
La taille des particules	TP	nm
Le potentiel zêta	PZ	mV
Le taux d'efficacité d'encapsulation	EE	%

4.2.3. Résultats expérimentaux

Les résultats d'analyse obtenus à l'issue de la caractérisation granulométrique, de la mesure de l'EE et du PZ, sont consignés dans le tableau 4.3. Les PECs préparés ont une surface de charge négative varie de (-12,5±0,26 mV à -31,5 ±0,26 mV), la taille des particules varie de 104,7±6,3 nm à 7783,05±8,05 nm avec une bonne polydispersité (PDI) et un taux d'efficacité d'encapsulation compris entre 27,47%±3,29 et 94,43%±3,6.

Tableau 4.3 : Plan de criblage des facteurs et ses réponses pour gélation ionotropique

Ordre d'essai	X ₁	X ₂	X ₃	TP (nm)	PZ (mV)	EE (%)
01	800	0.175	15	7783,05±8,05	-14,4±0,28	27,47±3,29
02	2000	0.175	15	225,85±6,8	-24,85±0,13	94,43±3,6
03	800	0.35	15	5948,76±5,5	-13,7±0,20	45,79±6,7
04	2000	0.35	15	149,5 ±2,4	-12,5±0,26	85,2±3,12
05	800	0.175	45	1170,5±5,5	-16,9±0,10	78,71±5,6
06	2000	0.175	45	142±4,8	-31,55±0,26	94±4,39
07	800	0.35	45	503,56±4,4	-18,5±0,31	86,38±3,8
08	2000	0.35	45	104,7±6,3	-19,25±0,18	84,77±6,5

4.2.4. Analyse graphique des résultats

A. Diagramme des effets principaux sur la taille (Figure 4.1)

- **Effets de la vitesse d'agitation sur la taille des particules**

D'après l'analyse du diagramme des effets principaux, il apparaît que la vitesse d'agitation (X_1) a un effet capital sur la réduction de la taille des particules formées. Elle est inversement proportionnelle au diamètre des particules. La réduction de la taille est due aux forces de cisaillement qui engendrent des faibles diamètres. En effet, les particules de faible diamètre sont obtenues avec la vitesse d'agitation la plus élevée « +1 ». Ce résultat est en accord avec la littérature (Yoneki et al., 2015).

- **Effets de la concentration en PEG sur la taille des particules**

Aux vues de l'allure de la courbe illustrant l'effet de la concentration en PEG (X_2) sur la taille des particules, il s'avère que celle-ci a tendance à s'accroître, avec l'accroissement de ce facteur du niveau le plus bas au niveau le plus haut. Cette augmentation est due à l'augmentation de l'épaisseur de la couche polymérique. L'agrégation des particules colloïdales peut également être prévenue à cause de l'adsorption ou le greffage de ce polymère hydrophile à la surface des particules (Kouchakzadeh et al., 2010 ; Sorasitthyanukarn et al., 2020). Néanmoins, l'influence de ce facteur semble ne pas trop affecter cette réponse, au vu des écarts relativement faibles enregistrés.

- **Effets du temps d'homogénéisation sur la taille des particules**

Il apparaît que le temps d'homogénéisation (X_3) est inversement proportionnel au diamètre des particules, plus le temps est lent, plus la taille des particules est petite. Il est évident d'expliquer ce comportement par l'hypothèse d'une augmentation du nombre d'interactions électrostatiques entre les chaînes polysaccharidiques de charge opposée, ainsi avec le polymère hydrophile adsorbé sur le PEC formé avec le temps, tout en limitant le risque de former des agrégats, et par conséquent la taille des particules diminue (Sorasitthyanukarn et al., 2020).

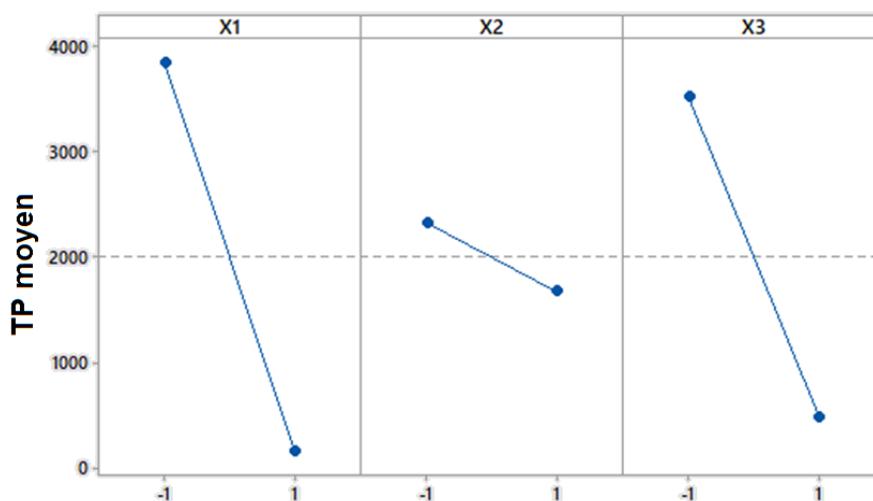


Figure 4.1 : Diagramme des effets principaux sur la taille des particules

B. Diagramme des effets principaux sur le potentiel zêta

- **Effet de la vitesse d'agitation sur le potentiel zêta**

Il a été constaté que l'augmentation de la vitesse d'agitation (X_1) induit une augmentation du potentiel zêta en valeur absolue (Figure 4.2). Ceci est dû à la réduction de la taille des particules formulées sous l'effet des forts taux de cisaillement, ce qui permet d'assurer leur faible tendance d'agrégation. Ce résultat est cohérent avec des travaux antérieurs (Rahmawati et al., 2017 ; Zohri et al., 2020).

- **Effet de la concentration en PEG 4000 sur le potentiel zêta**

D'après le diagramme (Figure 4.2), on en déduit que la concentration en PEG (X_2) a une influence importante sur le potentiel zêta. Le passage du niveau bas « -1 » au niveau haut « +1 », induit une diminution du potentiel zêta en valeur absolue. Il est judicieux de noter que la charge de surface des particules formulées, dépend fortement au rapport de charge (- /+) des polysaccharides. Étant donné que la valeur mesurée correspond à une charge globale, mais après le recouvrement de la surface des PECs par du PEG 4000, ce dernier influe sur la répartition de la charge dans la double couche diffuse. Ces observations sont cohérentes avec les résultats rapportés dans la littérature (Andreani et al., 2014a, 2014c).

- **Effets du temps d'homogénéisation sur le potentiel zêta**

L'analyse du graphique illustrant l'effet du temps d'homogénéisation (X_3) montre clairement que ce dernier a un effet synergique sur le potentiel zêta (Figure 4.2). Ceci pourrait être attribué à la réduction de la taille des particules formulées en fonction du temps d'homogénéisation via le procédé de la gélation ionique, ce qui permet d'assurer leurs

stabilités électrostatiques en suspension et leur faible tendance d'agrégation, aboutissant à une augmentation de leur potentiel zêta en valeur absolue (Patil et al., 2012 ; Sarmiento et al., 2007c).

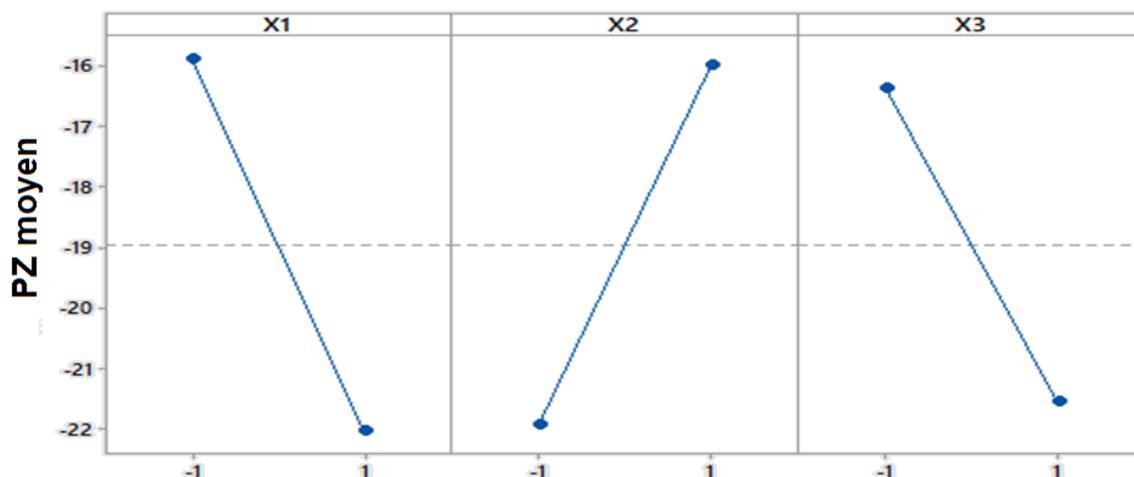


Figure 4.2 : Diagramme des effets sur le potentiel zêta

C. Diagramme des effets principaux sur le taux d'encapsulation

- **Effets de la vitesse d'agitation sur le taux d'encapsulation**

Il apparaît que, le passage de la valeur minimale à la valeur maximale de la vitesse d'agitation (X_1) joue un rôle primordial dans l'amélioration du taux d'encapsulation (Figure 4.3). Cela peut être dû aux forces de cisaillements induisant la diminution de la taille des particules formulées, ce qui permet en parallèle l'augmentation du nombre d'interactions électrostatiques, ainsi de la surface spécifique de ces particules, par conséquent de la quantité d'insuline encapsulée dans les micro et les nanoparticules (Gatti et al., 2018 ; Zohri et al., 2020).

- **Effet de la concentration de PEG 4000 sur le taux d'encapsulation**

D'après le graphique (Figure 4.3), il est évident de noter par ailleurs que la variation de ce paramètre (X_2) porte une faible modification sur le sens de l'allure de cette réponse. Ceci est prévisible, du fait que l'encapsulation par gélation ionique est assurée beaucoup plus par la complexation entre les polymères de charge opposée (Patil et al., 2010, 2012). Néanmoins, le recouvrement de la surface des PECs avec du PEG a pour effet de renforcer l'interaction entre le médicament et la matrice polysaccharidique (Sorasitthyanukarn et al., 2020).

- **Effet du temps d'homogénéisation sur le taux d'encapsulation**

L'augmentation du temps d'homogénéisation (X_3) est accompagnée par une augmentation du taux d'encapsulation (Figure 4.3). Cela est dû à la formation d'un grand nombre d'interactions entre les chaînes polymériques en fonction du temps, contribuant à l'augmentation de la quantité d'insuline encapsulée. Des résultats similaires sont rapportés par montrent une corrélation d'effet de ce facteur sur l'obtention des particules de taille contrôlée et une meilleure efficacité d'encapsulation (Abdelkader et al., 2018a ; Yoneki et al., 2015 ; Zohri et al., 2020).

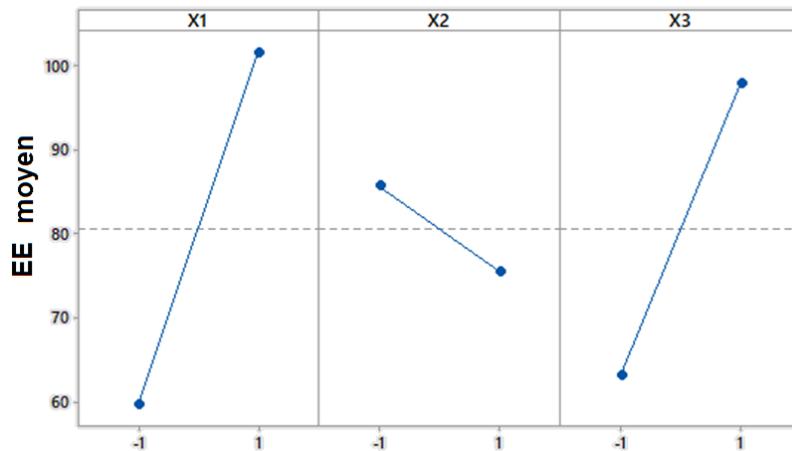


Figure 4.3 : Diagramme des effets principaux sur le taux d'efficacité d'encapsulation

D. Diagrammes des effets d'interactions des facteurs

Un diagramme des interactions montre l'impact exercé par les variations d'un facteur sur un autre facteur. Il est utilisé en conjonction avec une analyse de la variance. Il est utile pour juger de la présence d'interaction entre les facteurs. Dans un diagramme des interactions, des droites parallèles indiquent l'absence d'interaction. Plus les droites s'écartent de la parallèle, plus le degré d'interaction est élevé (Goupy et Creighton, 2006).

- **Diagramme des effets d'interactions sur la taille**

D'après le diagramme, l'interaction de la vitesse d'agitation (X_1) et la concentration en PEG (X_2) influe sur la taille des particules (Figure 4.4). En parallèle, l'interaction de la vitesse d'agitation (X_1) et le temps d'homogénéisation (X_3) a une importante influence sur cette réponse. Par contre, l'interaction de la concentration en PEG 4000 (X_2) et le temps d'homogénéisation (X_3), a une faible influence sur la taille des particules.

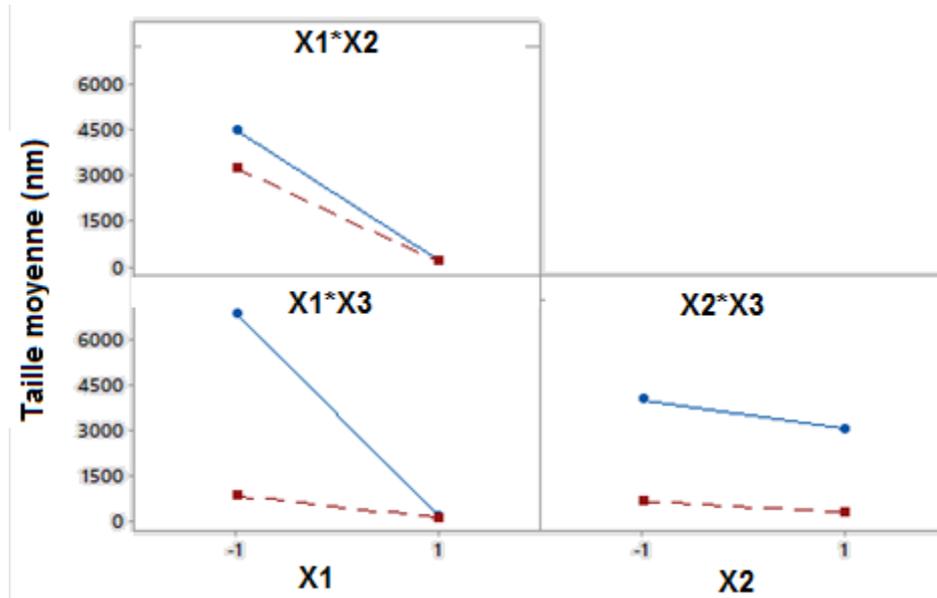


Figure 4.4 : Diagramme des effets d'interactions sur la taille des particules

- Diagramme des effets d'interaction sur PZ (Figure 4.5)

L'effet d'interaction de la vitesse d'agitation avec la concentration en PEG (X_2) montre que la vitesse d'agitation (X_1) influe sur l'effet de la concentration en PEG (X_2) sur PZ. En outre, l'interaction de la vitesse d'agitation avec le temps d'homogénéisation révèle une faible influence sur PZ. Tandis que cette réponse n'est pas trop affectée par l'interaction de la concentration en PEG (X_2) avec le temps d'homogénéisation (X_3).

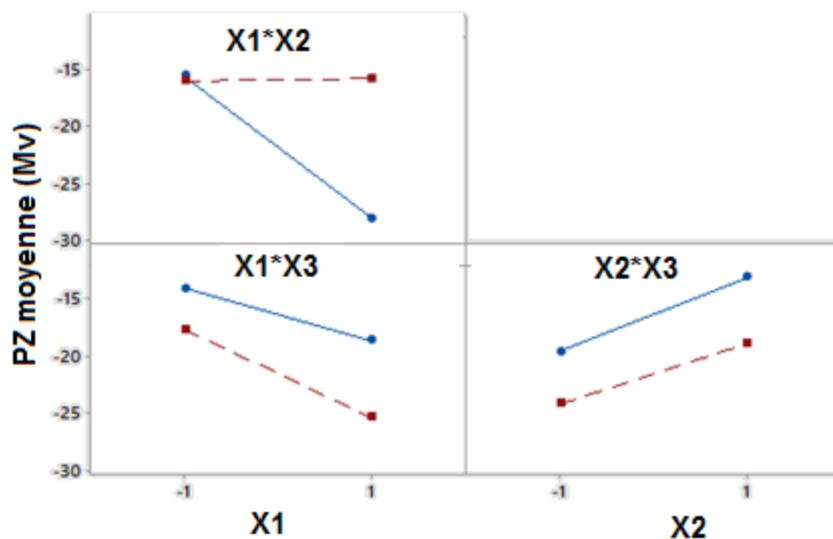


Figure 4.5 : Diagramme des effets d'interaction sur le potentiel zêta

- **Diagramme des effets d'interaction des facteurs sur EE (Figure 4.6)**

Il apparaît que l'interaction de la vitesse d'agitation (X_1) avec le temps d'homogénéisation (X_3) ainsi que celle de la concentration en PEG (X_2) avec le temps d'homogénéisation a une faible influence sur le taux d'efficacité d'encapsulation contrairement à l'interaction de la vitesse d'agitation (X_1) avec la concentration en PEG 4000 (X_2) a une importante influence sur le taux d'efficacité d'encapsulation de l'insuline.

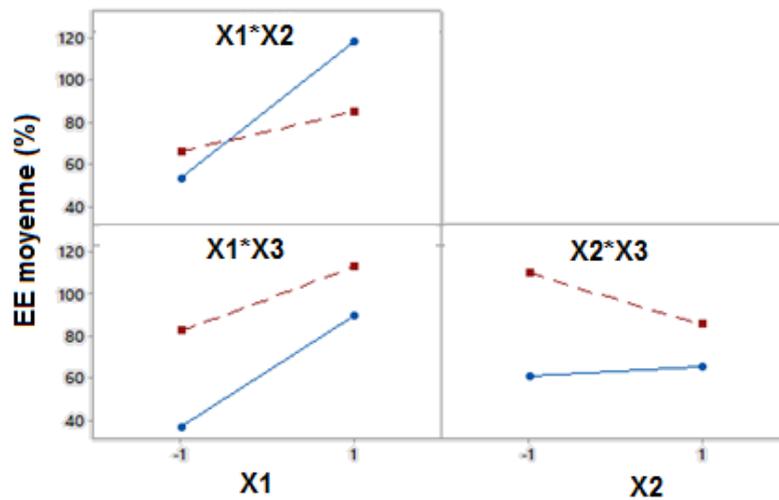


Figure 4.6 : Diagramme des effets d'interaction sur le taux d'efficacité d'encapsulation

D'après les résultats du plan de criblage, il est évident que conclure que le plan complet à deux niveaux (2^3), a permis d'avoir une idée préliminaire sur l'influence des différents facteurs étudiés sur les propriétés des particules mise en jeu. Néanmoins, ce plan ne peut pas décrire correctement le procédé d'encapsulation par gélation ionotropique, puisque il existe d'autres termes importants, tels que les termes aux carrés et les interactions. Pour cela, il est nécessaire d'avoir une bonne modélisation des paramètres étudiés et où il faut passer à des modèles mathématiques du second degré.

4.3. Plan Box-Behnken

Afin d'élucider l'effet des conditions expérimentales sur la taille des particules, leur charge de surface et le taux d'efficacité d'encapsulation de l'insuline dans les micro et nanoparticules formulées par gélation ionotropique, un plan d'expérience de type Box Behnken à trois facteurs et trois niveaux a été utilisé.

4.3.1. Choix des facteurs d'étude

Le choix des facteurs est basé sur les résultats du plan de criblage. Les trois facteurs étudiés sont la vitesse d'agitation (X_1), la concentration du PEG 4000 (X_2) et le temps d'homogénéisation (X_3), dont ses limites de variation sont fixées (Tableau 4.4).

Tableau 4.4 : Facteurs et domaine d'étude

Facteurs	Niveau		
	(-1)	(0)	(+1)
X_1 : La vitesse d'agitation (rpm)	800	1400	2000
X_2 : La concentration en PEG 4000 (%) (m/v)	0,175	0,26	0,35
X_3 : Le temps d'homogénéisation (min)	15	30	45

4.3.2. Réponses

Les réponses recherchées dans cette étude sont la taille des particules (TP), le potentiel zêta (PZ) et le taux d'efficacité d'encapsulation de l'insuline (EE). La matrice d'expériences est obtenue lors de la réalisation des 15 essais du plan de Box-Behnken (Tableau 4.5). Les PECs préparés ont une surface de charge négative varie de $(-16,5 \pm 0,25 \text{mV}$ à $-31,5 \pm 0,26 \text{mV})$, la taille des particules varie de 126,9 nm à $536,2 \pm 10,1 \text{nm}$ avec une bonne polydispersité (PDI) et un taux d'efficacité d'encapsulation compris entre $44,07\% \pm 4,61$ et $94,77\% \pm 5,38$.

Tableau 4.5 : Plan de Box-Behnken avec les réponses expérimentales (unités codées)

Essai	X1	X2	X3	TP (nm)	PDI	PZ (mV)	EE (%)
01	-1	-1	0	$536,2 \pm 10,1$	$0,42 \pm 0,02$	$-24,8 \pm 0,17$	$74,28 \pm 3,38$
02	1	-1	0	$490,7 \pm 14,2$	$0,32 \pm 0,04$	$-24,9 \pm 0,15$	$75,79 \pm 5,07$
03	-1	1	0	$456,5 \pm 7,93$	$0,57 \pm 0,02$	$-16,5 \pm 0,25$	$79,6 \pm 4,46$
04	1	1	0	$303,7 \pm 8,71$	$0,55 \pm 0,05$	$-18,5 \pm 0,13$	$87,6 \pm 5,83$
05	-1	0	-1	$416,5 \pm 6,44$	$0,34 \pm 0,06$	$-24,15 \pm 0,36$	$45,2 \pm 3,28$
06	1	0	-1	$127,3 \pm 12,14$	$0,35 \pm 0,03$	$-23,9 \pm 0,35$	$45,79 \pm 0,21$
07	-1	0	1	$208,4 \pm 11,04$	$0,26 \pm 0,07$	$-24,2 \pm 0,16$	$44,07 \pm 4,61$
08	1	0	1	$126,9 \pm 15,95$	$0,36 \pm 0,05$	$-24,9 \pm 0,21$	$45,9 \pm 5,21$
09	0	-1	-1	$231,2 \pm 14,08$	$0,32 \pm 0,04$	$-31,5 \pm 0,26$	$84,9 \pm 4,17$
10	0	1	-1	$504,2 \pm 10,29$	$0,30 \pm 0,03$	$-18,5 \pm 0,35$	$86,38 \pm 7,87$
11	0	-1	1	$187,5 \pm 12,80$	$0,28 \pm 0,06$	$-29,1 \pm 0,17$	$94,12 \pm 4,86$
12	0	1	1	$180,2 \pm 13,40$	$0,26 \pm 0,05$	$-19,25 \pm 0,13$	$94,77 \pm 5,38$
13	0	0	0	$514,3 \pm 7,14$	$0,49 \pm 0,15$	$-24,15 \pm 0,15$	$87,59 \pm 7,72$
14	0	0	0	$514 \pm 6,79$	$0,25 \pm 0,07$	$-24,2 \pm 0,30$	$87,6 \pm 6,90$
15	0	0	0	$153,7 \pm 11,47$	$0,40 \pm 0,07$	$-24,8 \pm 0,10$	$87,5 \pm 5,31$

4.3.3. Analyse statistique des résultats obtenus pour la taille des particules

A. Coefficients de régression estimés

Les coefficients de régression avec les données codées sont représentés dans le Tableau 4.6. Les valeurs de $p < 0,05$ indiquent que les termes du modèle sont statistiquement significatifs. Concernant maintenant l'estimation des divers paramètres inconnus du modèle, il est intéressant de remarquer que l'effet linéaire de la vitesse d'agitation (X_1) et le temps d'homogénéisation (X_2) sont significatifs (valeur de $p < 0,05$). Ainsi, les effets quadratiques (X_1^2 , X_3^2) et l'effet d'interaction X_2X_3 sont jugés significatifs. Les autres termes du modèle ne sont pas significatifs ($p > 0,05$).

Tableau 4.6 : Coefficients de régression estimés pour la taille

Termes	Coefficients	<i>t-Student</i>	<i>p-value</i>
Constante	514,3	18,22	0,000
X_1	-108,6	-6,28	0,002
X_2	37,4	2,16	0,083
X_3	-72,0	-4,17	0,009
X_1^2	-99,3	-3,90	0,011
X_2^2	-43,3	-1,70	0,150
X_3^2	-195,3	-7,67	0,001
X_1X_2	48,2	1,97	0,106
X_1X_3	51,9	2,12	0,087
X_2X_3	-70,1	-2,87	0,035

B. Détermination du modèle mathématique

L'équation de régression polynomiale en unités codées pour le modèle primaire (avant d'exclure les termes non significatifs), s'écrit comme suit :

$$Y_1 = 514,3 - 108,6 * X_1 + 37,4 X_2 - 72,0 X_3 - 99,3 X_1^2 - 43,3X_2^2 - 195,3X_3^2 + 48,2 X_1 * X_2 + 51,9X_1 * X_3 - 70,1 X_2 * X_3 \quad (\text{Eq. 4.1})$$

Dans le but d'affiner le modèle et de trouver l'équation polynomiale optimale, les termes non significatifs sont éliminés. En effet, l'équation de régression polynomiale optimale de second degré pour le nouveau modèle du plan Box-Behnken en unités codées s'écrit comme suit :

$$Y_1 = 514,3 - 108,6 * X_1 - 72,0 X_3 - 99,3 X_1^2 - 195,3X_3^2 - 70,1 X_2 * X_3 \quad (\text{Eq. 4.2})$$

C. Validation du modèle

L'analyse statistique de ce nouveau modèle conduit aussi à la table d'analyse de la variance (Tableau 4.7). Il apparaît que, la somme des carrés due aux résidus est nettement inférieure à la somme des carrés due à la régression. De plus, pour un risque de 5%, la valeur $F_{\text{crit}}(8,4)$ est inférieure à la valeur $F_{\text{obs}}(16,53)$. D'autre part, le coefficient de détermination ajusté ($R^2_{\text{ajust}} = 90,90\%$) est élevé, ce qui permet de noter que les réponses obtenues par le modèle mathématique choisi sont proches de celles mesurées lors de l'expérimentation, cela permet d'accepter le modèle quadratique proposé.

Tableau 4.7 : Analyse de la variance pour la taille

Source	DL	SC	CM	F	p-value
Régression	9	355799	39533	16,53	0,003
Linéaire	3	147071	49024	20,50	0,003
Carré	3	169018	56339	23,56	0,002
Interaction	3	39710	13237	5,54	0,048
Erreur résiduelle	5	11955	2391		
Inadéq. de l'ajust	3	11955	3985	32309,51	0,000
Erreur pure	2	0	0		
Totale	14	367754			
R ² (%)	96,75				
R ² ajusté (%)	90,90				

4.3.4. Analyse statistique des résultats obtenus pour le potentiel Zêta

A. Coefficients de régression estimés

Les coefficients de régression estimés pour le potentiel zêta sont donnés dans le Tableau 4.8.

Tableau 4.8 : Coefficients de régression estimés pour le potentiel zêta

Termes	Coefficients	t-Student	p-value
Constante	-24,383	-24,383	0,000
X ₁	-0,319	-0,64	0,551
X ₂	4,700	9,42	0,000
X ₃	0,081	0,16	0,877
X ₁ ²	1,760	2,40	0,062
X ₂ ²	1,448	1,97	0,106
X ₃ ²	-1,665	-2,27	0,073
X ₁ X ₂	-0,475	-0,67	0,531
X ₁ X ₃	-0,238	-0,34	0,750
X ₂ X ₃	-0,800	-1,13	0,308

B. Détermination du modèle mathématique

Le modèle mathématique représentant le potentiel zêta en unités codées est le suivant :

$$Y_2 = -24,383 - 0,319 X_1 + 4,700 X_2 + 0,081 X_3 + 1,760 X_1^2 + 1,448 X_2^2 - 1,665 X_3^2 - 0,475 X_1 X_2 - 0,238 X_1 X_3 - 0,800 X_2 * X_3 \quad (\text{Eq. 4.3})$$

L'équation polynomiale optimale en éliminant les termes des effets non significatifs est une équation de régression polynomiale de second degré pour le nouveau modèle en unités codées et qui s'écrit comme suit :

$$Y_2 = -24,383 + 4,700 X_2 + 1,76 X_1^2 \quad (\text{Eq. 4.4})$$

C. Validation du modèle

L'analyse de la variance du modèle est résumée dans le tableau 4.9. Selon la valeur $F\text{-crit}(7,7) = 3.79$ qui est inférieure à F observée ($F_{\text{obs}} = 11,86$) et R^2 ajusté qui est élevée (87,47%), le modèle peut donc être jugé de qualité suffisante, ce qui permet d'accepter le modèle quadratique.

Tableau 4.9 : Analyse de la variance pour le potentiel zêta

Source	DL	SC	CM	F	P-value
Régression	9	212,504	23,612	11,86	0,007
Linéaire	3	177,586	59,195	29,74	0,001
Carré	3	31,230	10,410	5,23	0,053
Interaction	3	3,688	1,229	0,62	0,633
Erreur résiduelle	5	9,952	1,990		
Inadéq. de l'ajust	3	9,691	3,230	24,69	0,039
Erreur pure	2	0,262	0,131		
Totale	14	222,456			
R ²	%	95,53%			
R ² ajusté	%	87,47%			

4.3.5. Analyse statistique des résultats obtenus pour le taux d'efficacité d'encapsulation

A. Coefficients de régression

Les coefficients de régression sont donnés par le Tableau 4.10.

Tableau 4.10 : Coefficients de régression estimés pour le taux d'efficacité d'encapsulation

Termes	Coefficients	<i>t-Student</i>	<i>P-value</i>
Constant	87,46	38,38	0,000
X₁	1,49	1,07	0,334
X₂	0,145	1,73	0,145
X₃	2,07	1,49	0,197
X₁²	-26,47	-12,89	0,000
X₂²	18,33	8,92	0,000
X₃²	-15,75	-7,67	0,001
X₁X₂	1,62	0,82	0,448
X₁X₃	0,31	0,16	0,881
X₂X₃	-0,21	-0,11	0,920

B. Détermination du modèle mathématique

L'équation de régression polynomiale pour le modèle primaire en unités codées s'écrit comme suit :

$$Y_3 = 87,46 + 1,49 X_1 + 0,145 X_2 + 2,07X_3 - 26,47 X_1^2 + 18,33 X_2^2 - 15,75 X_3^2 + 1,62X_1 * X_2 + 0,31X_1 * X_3 - 0,31X_2 * X_3 \quad (\text{Eq. 4.5})$$

L'équation polynomiale optimale en éliminant les termes des effets non significatifs est une équation de régression polynomiale de second degré pour le nouveau modèle et qui s'écrit comme suit en unités codées:

$$Y_3 = 87,46 - 26,47 X_1^2 + 18,33 X_2^2 - 15,75 X_3^2 \quad (\text{Eq. 4.6})$$

C. Validation du modèle

L'analyse de la variance du modèle qui s'ensuit en fonction de la valeur de $p > 0,05$ montre qu'il n'y a pas d'effet linéaire significatif pour les différents facteurs et leurs interactions. Il apparaît aussi que $F_{\text{obs}} > F_{\text{crit}}$ ($F_{\text{crit}}(8,6) = 4.15$). Par ailleurs, les valeurs de R^2 (98,49%) et R^2 ajusté (95,79%) sont bonnes, ce qui indique que le modèle est relativement bien ajusté. Donc il existe une bonne corrélation entre les valeurs mesurées et les valeurs calculées, donc le modèle quadratique est accepté (Tableau 4.11).

Tableau 4.11 : Analyse de la variance pour le taux d'efficacité d'encapsulation

Source	DL	SC	CM	F	P-value
Régression	9	5096,77	566,31	36,35	0,000
Linéaire	3	98,56	32,85	2,11	0,218
Carré	3	4987,12	1662,37	106,70	0,000
Interaction	3	11,09	3,70	0,24	0,867
Erreur résiduelle	5	77,90	15,58		
Inadéq.de l'ajust	3	77,79	25,93	498,35	0,002
Erreur pure	2	0,10	0,05		
Totale	14	5174,67			
R² (%)	98,49				
R² ajusté (%)	95,79				

4.3. Modélisation par la méthodologie de la surface de réponse (RSM)

Pour la recherche des conditions optimales, i.e. les valeurs des facteurs permettant d'aboutir à une meilleure formulation par le procédé d'encapsulation par gélification ionotropique, la méthode de surfaces de réponses a été utilisée. Cette méthode permet de visualiser les effets mutuels des facteurs. Deux types de graphiques sont produits : graphiques du contour des réponses et les diagrammes de surface et ce en maintenant une variable constante et en faisant varier les autres paramètres dans les limites expérimentales choisies. Ils permettent d'illustrer les effets linéaires, quadratiques et interactifs sur chaque variable de sortie (Bezerra et al., 2008 ; Kouchakzadeh et al., 2010).

Les graphiques du contour des réponses et les diagrammes de surface des réponses obtenus d'après le plan d'expériences sont représentés dans les Figures allant de 4.7 jusqu'à 4.15.

4.3.1. Modélisation de la taille des particules par RSM

D'après les résultats de l'analyse de la surface de réponse obtenus et sa projection présentée par la courbe isoréponse (Figure 4.7), il apparaît que l'augmentation de la vitesse d'agitation (X_1) de son niveau bas à son niveau maximum (2000 rpm) est suivie par une diminution de la taille. Cependant, l'augmentation de la concentration en PEG 4000 (X_2) est accompagnée par une augmentation de la taille. Le diagramme de surface de réponse présente à partir de sa forme parabolique une taille minimale qui se trouve en bas de la surface.

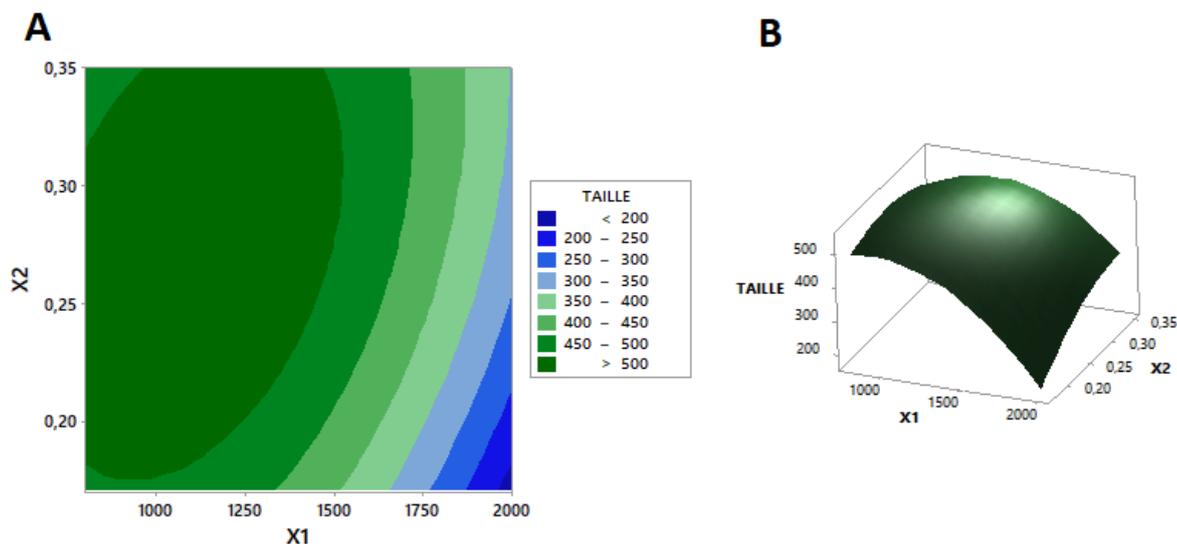


Figure 4.7 : Diagrammes (A) de contour et (B) de surface de réponse de l'effet d'interaction X_1 - X_2 à X_3 moyen sur la taille

À partir de la forme parabolique de la surface de réponse, ainsi de la courbe isoréponse (Figure 4.8), il apparait que les valeurs optimales de TP se trouvent aux extrémités où se trouvent les valeurs maximales de la vitesse d'agitation (X_1).

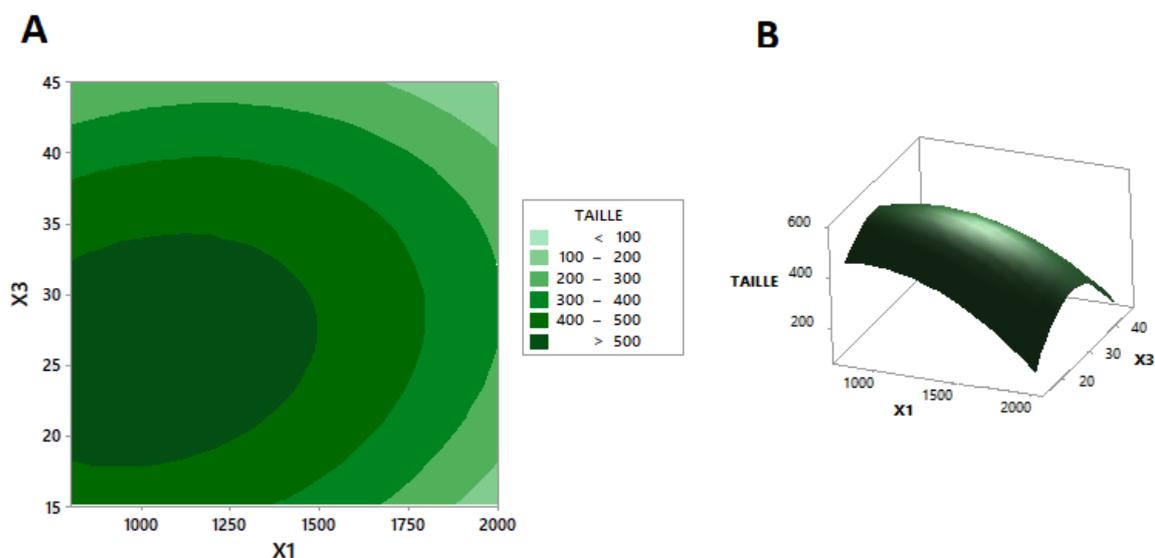


Figure 4.8 : Diagrammes (A) de contour et (B) de surface de réponse de l'effet d'interaction X_1 - X_3 à X_2 moyen sur la taille

La surface de réponse de l'interaction X_2 - X_3 indique que l'augmentation de la concentration en PEG 4000 est suivie par une augmentation importante de la taille, contrairement à l'augmentation du temps d'homogénéisation (Figure 4.9). Cela est affirmé par la courbe isoréponse qui précise la région des tailles minimales pour les plus faibles

concentrations en PEG 4000 (autour du niveau -1) et les valeurs maximales du temps d'homogénéisation (autour du niveau +1).

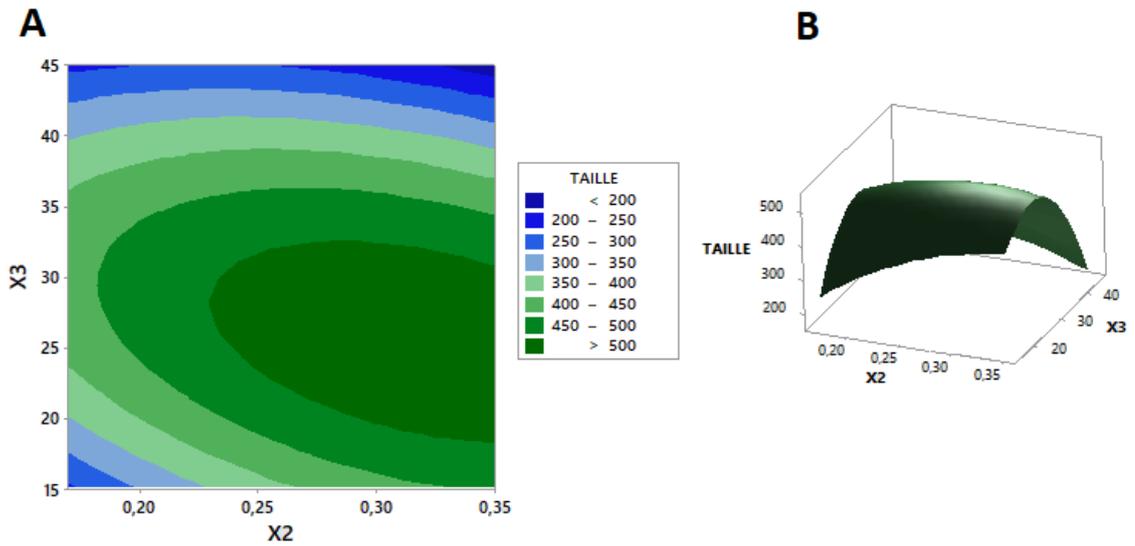


Figure 4.9 : Diagrammes (A) de contour et (B) de surface de réponse de l'effet d'interaction de X_2 - X_3 à X_1 moyen sur la taille

4.3.2. Modélisation de PZ par RSM

L'optimisation du potentiel zêta a été réalisée par l'analyse des diagrammes de contour (Figures 4.10, 4.11 et 4.12). La nature plane de la surface de réponse et du contour illustrant l'effet d'interaction entre la vitesse d'agitation (X_1) et la concentration en PEG 4000 (X_2) sur PZ montre qu'il existe en effet une interaction négligeable entre ces deux paramètres. En outre les valeurs élevées de PZ sont obtenues avec les plus faibles concentrations en PEG 4000 (X_2) (Figure 4.10).

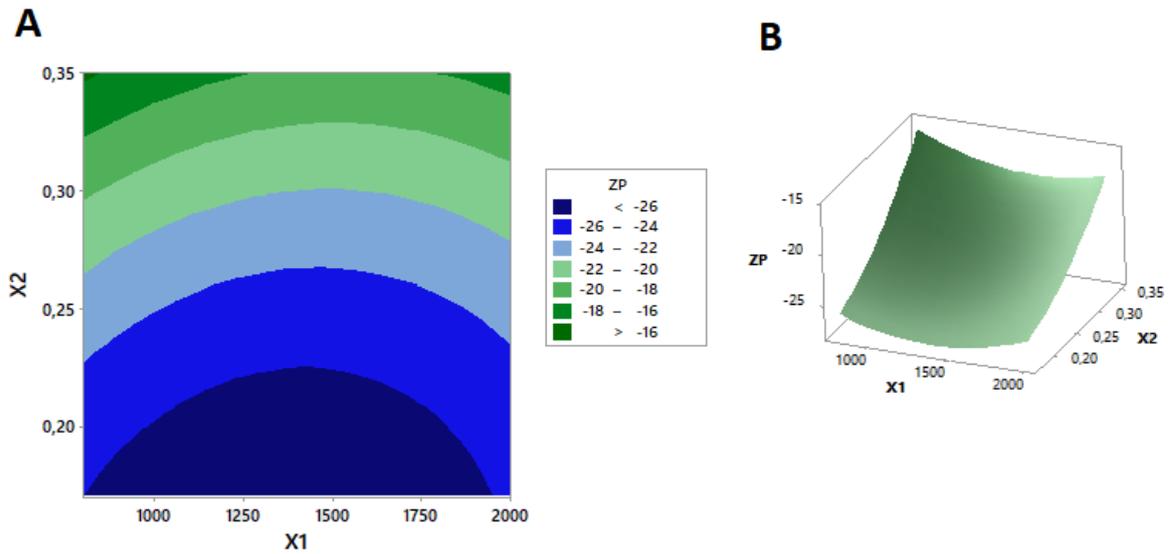


Figure 4.10 : Diagrammes (A) de contour et (B) de surface de réponse de l'effet d'interaction X_1 - X_2 à X_3 moyen sur PZ

L'analyse de la surface de réponse et des courbes isoréponses de l'effet d'interaction de la vitesse d'agitation (X_1) et le temps d'homogénéisation (X_3) sur PZ montre qu'il existe une zone optimale entre les variables et un optimum ($PZ > 26$ mV en valeur absolue), qui peut se rencontrer au niveau moyen « 0 » de la vitesse d'agitation (X_1) (Figure 4.11).

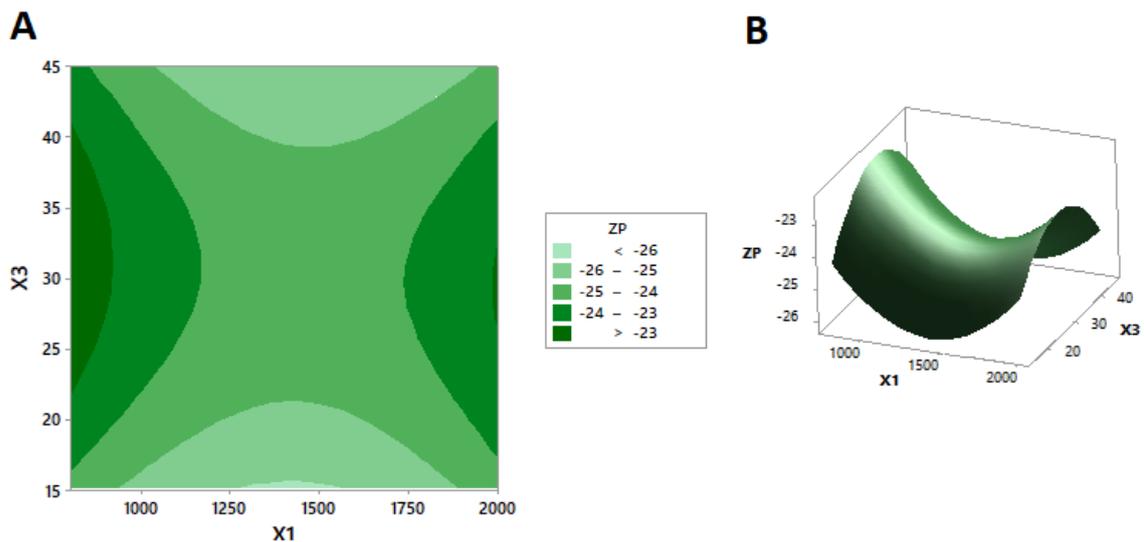


Figure 4.11 : Diagrammes (A) de contour et (B) de surface de réponse de l'effet d'interaction X_1 - X_3 à X_2 moyen sur PZ

Le diagramme de surface de réponse qui présente l'effet d'interaction entre la concentration en PEG 4000 (X_2) et le temps d'homogénéisation (X_3) sur PZ montre une surface plane inclinée vers le niveau inférieur de la concentration en PEG (X_2) (Figure 4.12).

En effet, les plus fortes valeurs de la charge de surface ($PZ > 30$ mV en valeur absolue) sont obtenues, en fixant la concentration en PEG (X_2) à son niveau inférieur et le temps d'homogénéisation (X_3) à son niveau supérieur ou inférieur. Le maximum de PZ est donné par la surface confisquée dans la plus petite parcelle du graphe.

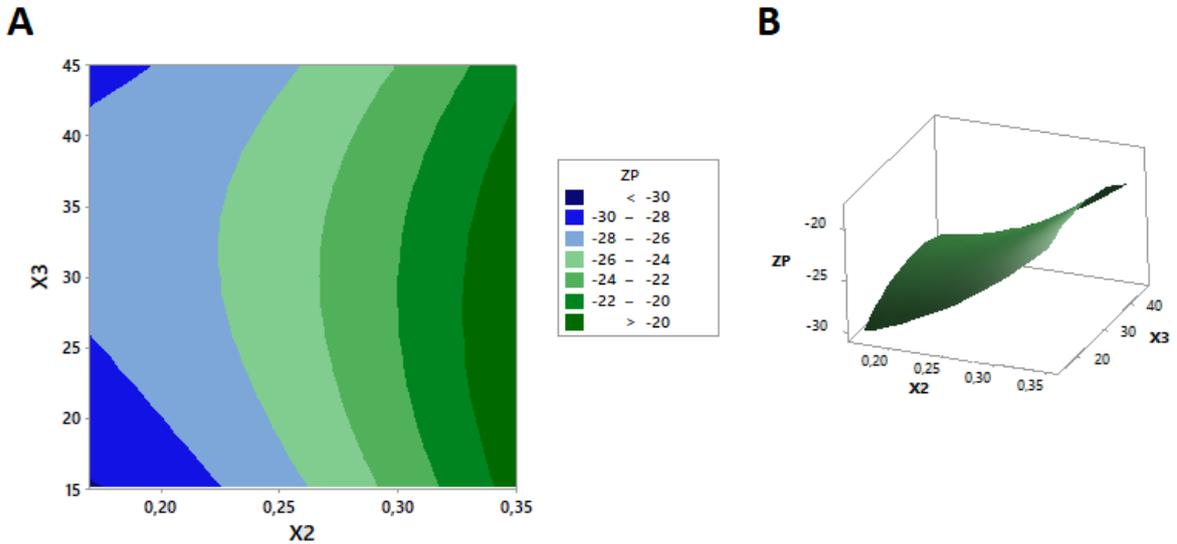


Figure 4.12 : Diagrammes (A) de contour et (B) de surface de réponse de l'effet d'interaction X_2 - X_3 à X_1 moyen sur PZ

4.4. Modélisation de l'EE par RSM

Le diagramme de surface de réponse qui présente l'interaction entre la vitesse d'agitation (X_1) et la concentration en PEG 4000 (X_2) montre à partir de sa forme parabolique une zone optimale, où se trouve un EE (%) maximum en haut de la surface et celle-ci aux alentours de la valeur moyenne de la vitesse d'agitation (X_1) (Figure 4.13).

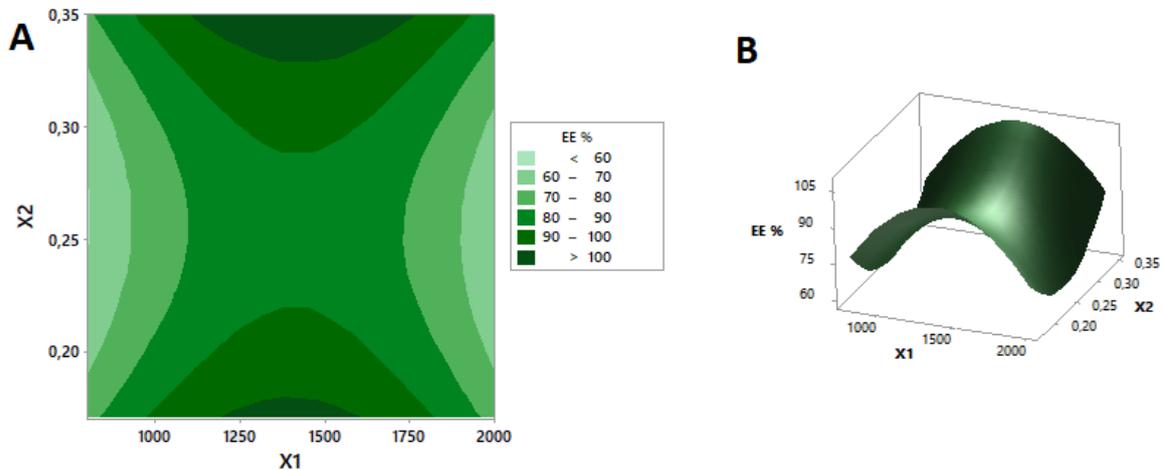


Figure 4.13 : Diagrammes (A) de contour et (B) de surface de réponse de l'effet d'interaction $X_1 - X_2$ à X_3 moyen sur EE

L'interaction entre la vitesse d'agitation (X_1) et le temps d'homogénéisation (X_3) montre une surface de réponse de nature parabolique, ainsi le diagramme de contour montre qu'il y a une zone optimale entre les variables. Ainsi, les valeurs optimales peuvent être facilement déterminées (Figure 4.14). En effet, le maximum de l'EE est obtenu, en fixant les variables aux niveaux moyens « 0 ».

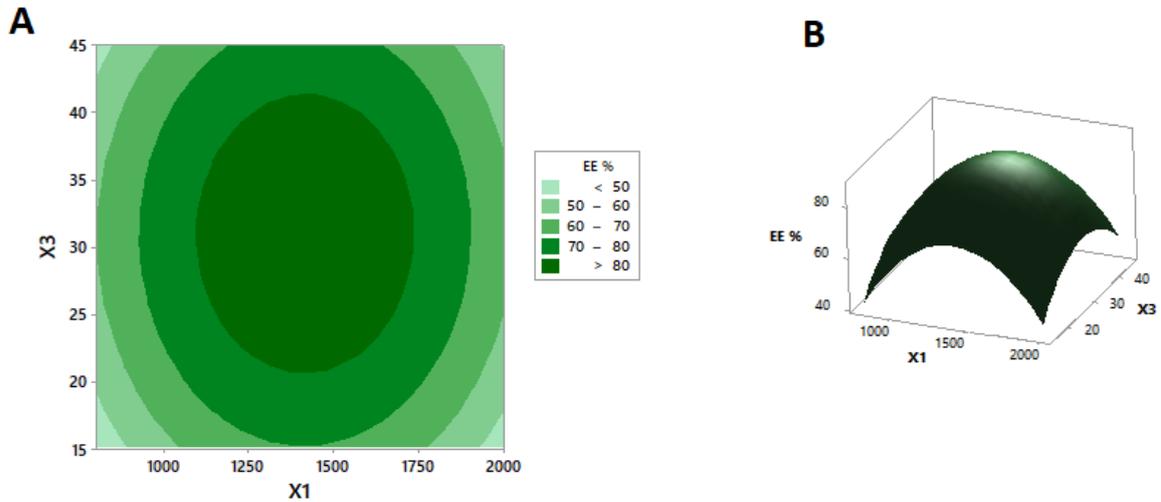


Figure 4.14 : Diagrammes (A) de contour et (B) de surface de réponse de l'effet d'interaction X_1 - X_3 à X_2 moyen sur EE

La combinaison d'effet d'interaction X_2 - X_3 sur EE est présentée par une surface de réponse de nature ondulatoire (Figure 4.15). Celle-ci montre qu'il y a une grande différence entre la zone minimale et la zone maximale. En effet, les valeurs d'EE les plus élevées sont obtenues avec les valeurs minimales et maximales de la concentration en PEG (X_2), en fixant le temps d'homogénéisation (X_3) à son niveau moyen « 0 ».

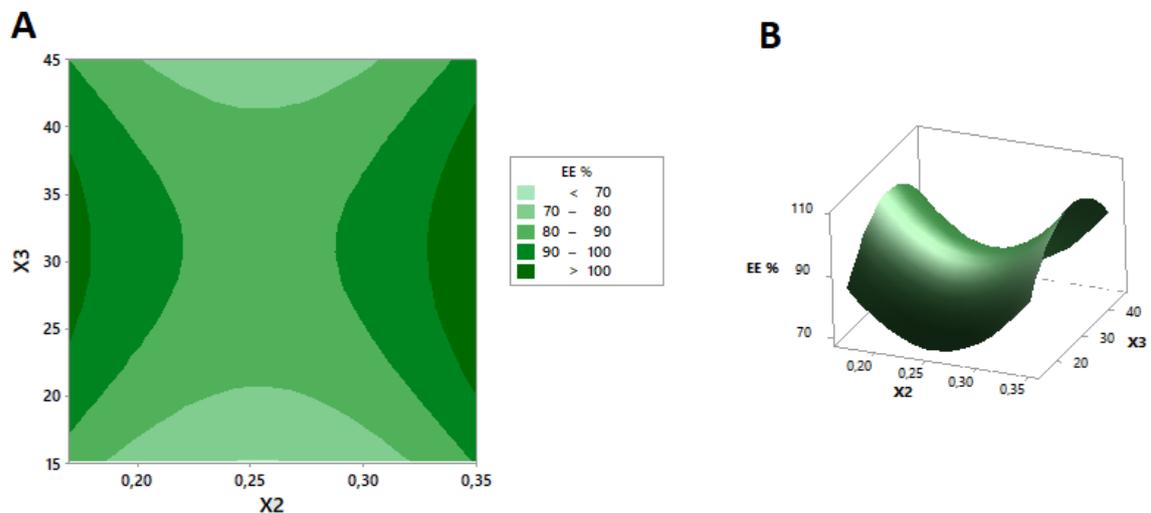


Figure 4.15 : Diagrammes (A) de contour et (B) de surface de réponse de l'effet d'interaction X_2 - X_3 à X_1 moyen sur EE

4.5. Détermination et validation de l'optimum

Le but de cette partie de travail a porté sur la détermination d'une formule optimale d'un complexe poly électrolyte recouvert avec du PEG 4000 à l'échelle de nano dans l'objectif de contenir et de protéger l'insuline, préparée par le procédé de la gélation ionotropique. Donc les critères de choix d'un optimum sont :

- Un diamètre des particules minimal ;
- Un taux d'efficacité d'encapsulation maximal ;
- Un potentiel zêta maximal (> 30 mV en valeur absolue).

En introduisant les valeurs cibles des réponses dans le modèle, une formulation optimale sera obtenue pour les variables suivants (Tableau 4.12) :

Tableau 4.12 : Les valeurs des facteurs de gélation ionotropique

Variable	Valeur codée	Valeur réelle
Vitesse d'agitation (X_1)	0,6161	1636,36 rpm
Concentration en PEG (X_2)	-1	0,17%
Temps d'homogénéisation (X_3)	+1	45 min

Des essais de confirmation ont été réalisés, en utilisant les valeurs cibles (optimales) obtenues. Les résultats d'analyse de cet essai optimal présentent les propriétés de réponses les plus importantes et qui sont conformes aux critères élaborés (Tableau 4.13).

Tableau 4.13 : Les valeurs des réponses mesurées et prédites de l'optimum de gélation ionotropique

Réponse	Valeur réelle	Valeur prédite
TP	145 nm	142,7 nm
PZ	-30 mV	-29,75 mV
EE	85%	81,07%

4.6. Conclusion

Une méthode de fabrication des micro et nanoparticules par gélation ionotropique a été mise au point. Dans ce travail, le plan de criblage factoriel complet à deux niveaux (2^3) a été utilisé comme étape préliminaire, afin de sélectionner les facteurs les plus influents sur les réponses. Afin d'optimiser les paramètres de formulation fournissant un taux

d'encapsulation optimal de l'insuline dans des nanoparticules de diamètre minimal avec une charge de surface optimale, la méthodologie des surfaces de réponses a été utilisée en se basant sur le plan de Box-Behnken. Pour étudier l'effet des variables indépendantes la réponse est modélisée sous forme d'un polynôme en fonction de ces paramètres. D'après l'étude statistique, le modèle obtenu est significatif pour les trois réponses estimées ($p < 0,05$) traduisant une corrélation satisfaisante entre les valeurs mesurées et les valeurs ajustées.

En effet, un modèle mathématique adéquat de la formulation optimale par le procédé de la gélation ionotropique a été obtenu. Cette formulation répond bien aux critères désirés, à savoir des particules de petite taille (145 nm), une meilleure efficacité d'encapsulation (85%), ainsi avec une forte charge négative (-30 mV), ce qui permet d'assurer leurs stabilités électrostatiques en suspension et leur faible tendance d'agrégation. La région du point optimal correspond aux valeurs suivantes des facteurs : vitesse d'agitation (1636,36 rpm), concentration en PEG 4000 (0,17%) et un temps d'homogénéisation de 45 min.

CHAPITRE V : OPTIMISATION DE LA FORMULATION DES MICRO ET NANOPARTICULES ENCAPSULANT L'INSULINE PAR DOUBLE ÉMULSION

5.1. Introduction

L'objectif de cette partie est de formuler une émulsion multiple (E/H/E) caractérisée par un aspect homogène et une taille minimale des particules dans le but d'évaluer l'effet protecteur de ce type de systèmes vis-à-vis de l'insuline lors d'une administration orale. La méthodologie des surfaces de réponse en accord avec la matrice de Box-Behnken est appliquée afin d'optimiser la formulation de l'émulsion multiple (E/H/E) à base d'insuline. Dans un premier temps, un plan de criblage a été utilisé.

5.2. Plan de criblage

Le plan factoriel complet à deux niveaux a été choisi, car c'est généralement le plus employé dans des études similaires (Petkar et al., 2018; Zielińska et al., 2019), afin d'étudier le criblage des facteurs ayant un impact considérable dans la formulation des émulsions multiples, cela permettra de déterminer l'influence de chacun de ces facteurs sur les réponses obtenues.

5.2.1. Détermination des facteurs et du domaine d'étude

Le choix des facteurs est basé sur des critères expérimentaux relatifs aux essais préliminaires et sur des résultats antérieurs (Balcaen et al., 2016 ; Bhattacharjee et al., 2018 ; Schuch et al., 2013). Le procédé de préparation des émulsions multiples est basé sur l'émulsification en deux étapes. Les facteurs examinés lors de cette étude sont la concentration en surfactant lipophile (Span 80), la concentration en surfactant hydrophile (Tween 80) et la proportion volumique de la phase aqueuse interne (Tableau 5.1).

Tableau 5.1 : Facteurs du criblage et leurs niveaux réels et codés pour double émulsion

Facteurs	Niveaux	
	-1	+1
X₁ : Concentration en Span 80 (%) (m/m)	5	15
X₂ : Concentration en Tween 80(%) (m/m)	1	5
X₃ : Proportion volumique de la phase aqueuse interne dans l'émulsion primaire E/H (% , v/v)	20	40

5.2.2. Les réponses

Les trois réponses étudiées sont :

- La taille des globules (TP) ;
- La charge de la surface (PZ) ;
- Le taux d'efficacité d'encapsulation (EE).

5.2.3. Résultats et discussion

Les différentes émulsions multiples ont été préparées selon le procédé en deux étapes d'émulsification. Les émulsions préparées ont une surface de charge négative varie de (-1,4 mV à -63,1 mV), la taille des globules varie de 269,2 nm à 2785,3 nm avec un taux d'efficacité d'encapsulation compris entre 32,68% et 86,50% (Tableau 5.2).

Tableau 5.2 : Plan de criblage des facteurs et ses réponses pour l'émulsion multiple

Ordre d'essai	X ₁	X ₂	X ₃	TP (nm)	PZ (mV)	EE (%)
01	-1	-1	-1	2785,3± 8,05	-1,4± 0,28	37,86±3,29
05	+1	-1	-1	284,7 ±6,84	-16,9± 0,13	61,20±3,65
03	-1	+1	-1	1113,6 ±5,58	-10,8± 0,20	32,68±6,79
04	+1	+1	-1	860,6 ±2,48	-12,1± 0,26	49,98±3,12
05	-1	-1	+1	1616,4 ±5,50	-31,4± 0,10	57,20±5,61
06	+1	-1	+1	269,2±4,85	-42,1± 0,26	48,72±4,39
07	-1	+1	+1	780,3 ±4,48	-36,4 ±0,31	41,85±3,86
08	+1	+1	+1	664,7± 6,34	-63,1 ±0,18	86,50±6,54

5.2.4. Étude des effets principaux

Le diagramme des effets principaux renseigne sur l'influence simultanée de tous les facteurs sur les caractéristiques des émulsions multiples préparées (TP, PZ, EE).

A. Diagramme des effets principaux sur la taille (Figure 5.1)

- **Effet de la concentration en Span 80 (X_1) sur TP**

La concentration en Span 80 représente le facteur capital influençant sur TP, car du niveau bas au niveau élevé, une diminution importante de la réponse a été constatée. Cette diminution pourrait être due au fait que l'augmentation de la quantité en Span 80 diminue la tension interfaciale E/H qui va empêcher la coalescence des gouttelettes aqueuses internes et donc réduire la taille des globules formées (Vasiljevic et al., 2006). Ce résultat est en accord avec d'autres études antérieures (Ding et al., 2019 ; Rosly et al., 2020).

- **Effet de la concentration en Tween 80 (X_2) sur TP**

La concentration en Tween 80 a un effet plus ou moins important sur TP. En effet, l'augmentation de sa concentration permet d'éviter le regroupement des particules par l'effet de la diminution de la tension interfaciale H/E (Jusoh et al., 2018).

- **Effet de la proportion volumique de la phase aqueuse interne (X_3) sur TP**

Le graphique (figure 5.1) a permis de conclure : lors de l'augmentation de la fraction volumique de la phase aqueuse interne, les gouttelettes se déplacent moins au sein de l'émulsion primaire en raison d'un manque de place ce qui permet d'éviter le grossissement des particules par la prévention de leur adhésion. Ce qui est compatible avec la théorie de (Adebileje et al., 2017 ; Balcaen et al., 2016).

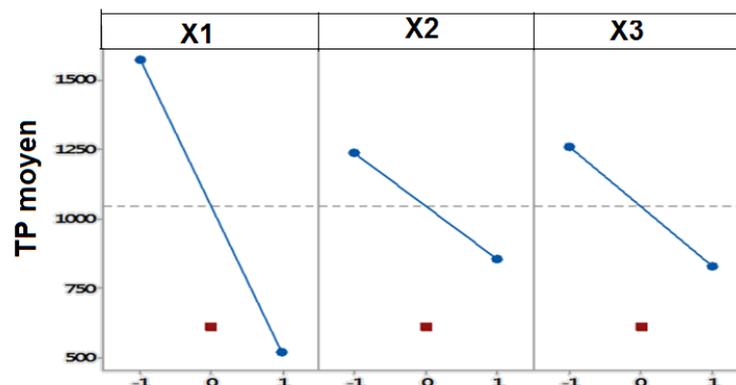


Figure 5.1 : Diagramme des effets principaux sur TP

B. Diagramme des effets principaux sur le potentiel zêta (Figure 5.2)

- **Effet des surfactants (X_1 et X_2)**

Les concentrations en Span 80 et en Tween 80 ont une influence importante sur le potentiel zêta (Figure 5.2). Lors du passage du niveau bas au niveau haut, la charge des particules (en valeur absolue) augmente, cela est dû au rôle de ces deux surfactants dans l'augmentation de la stabilité de l'émulsion formulée, qui est traduite par l'augmentation du potentiel zêta. Les résultats sont cohérents avec ceux rapportés dans la littérature (Rosly et al., 2020 ; Tian et al., 2016).

- **Effet du volume de la phase aqueuse interne (X_3)**

L'augmentation du ratio de la phase aqueuse interne dans l'émulsion primaire est suivie par une augmentation du volume de la phase aqueuse interne renfermant le polymère anionique (l'alginate de sodium) dans l'émulsion secondaire, ce qui provoque l'augmentation de la charge négative en surface des particules (Falkeborg et Guo, 2015). Ce résultat est en accord aussi avec l'étude de (Lertsutthiwong et al., 2008).

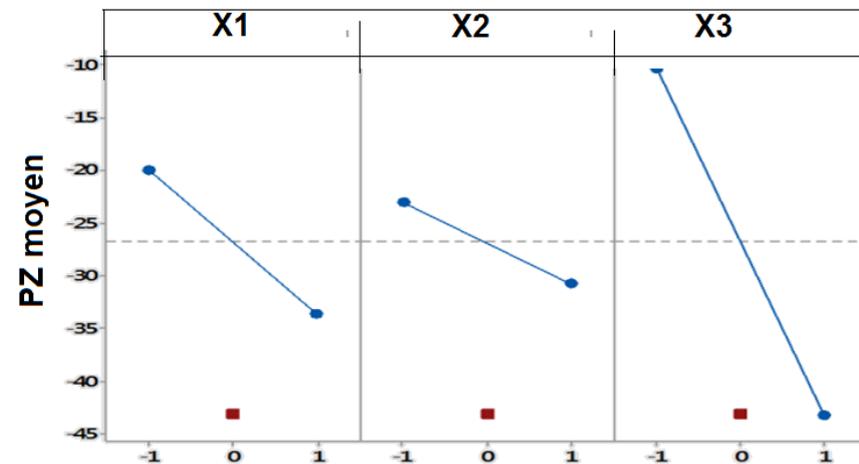


Figure 5.2 : Diagramme des effets sur le potentiel zêta

C. Diagramme des effets principaux sur le taux d'efficacité d'encapsulation (Figure 5.3)

- **Effets de la concentration en Span 80 (X_1) sur EE**

Le passage de la valeur minimale à la valeur maximale montre que la concentration de Span 80 joue un rôle primordial dans l'amélioration de l'EE. Cela peut être dû à sa capacité de former une interface rigide autour des globules encapsulant le principe actif.

- **Effet de la concentration en Tween 80 (X₂) sur EE**

Il a été constaté une faible variation de l'EE lors de la variation de la concentration en Tween 80. Cela devrait se traduire par le fait que l'encapsulation est assurée beaucoup plus par l'ajout de chitosane et d'alginate. De plus, Schuch et al. (2014) ont démontré que l'augmentation du surfactant hydrophile dans l'émulsion secondaire est accompagnée en générale par une diffusion de la phase interne dans la phase externe (coalescence) d'où une probabilité accrue d'un faible rendement d'encapsulation (Schuch et al., 2013). Ce résultat est en accord aussi avec l'étude de Schmidts et al., (2009).

- **Effet de la proportion volumique de la phase aqueuse interne (X₃) sur EE**

L'augmentation du ratio de la phase aqueuse interne est accompagnée par une augmentation de l'EE. Cela est dû à l'augmentation de la quantité d'insuline à encapsuler. L'influence du volume aqueux interne sur l'efficacité d'encapsulation des nanoparticules reste controversée dans la bibliographie (Adebileje et al., 2017 ; Li et al., 2020). Des résultats contradictoires sur le lien entre la taille des nanoparticules et leur efficacité d'encapsulation avec le ratio E/H sont en effet rapportés (Ding et al., 2019). Un point reste cependant acquis, à savoir que l'augmentation du volume de la phase aqueuse interne contribue à l'augmentation du taux de charge jusqu'à une certaine limite (Abdelkader et al., 2018a ; Bhattacharjee et al., 2018).

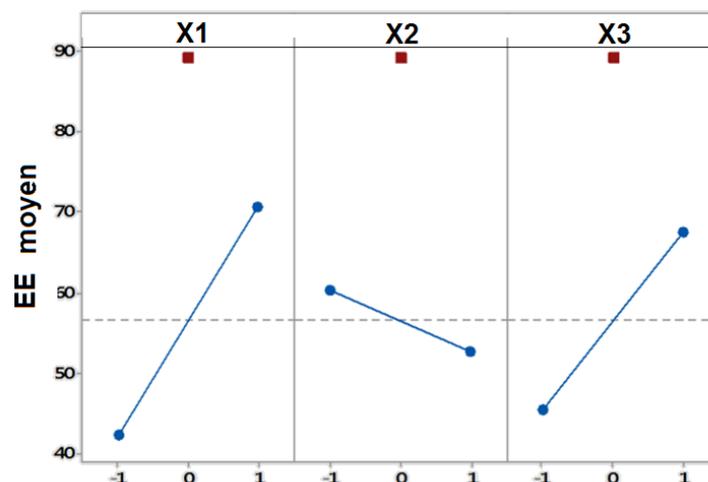


Figure 5.3 : Diagramme des effets principaux sur EE

D. Diagrammes des effets d'interactions des facteurs

- **Diagramme des interactions sur la taille**

Les effets d'interaction des différents facteurs sur la taille des particules des émulsions préparées sont représentés dans le diagramme (Figure 5.4). Il apparaît que l'interaction de la concentration en Span 80 et celle de Tween 80 a une influence importante sur la taille des particules (Rosly et al., 2020). Ainsi que l'interaction de la concentration en Span 80 et la proportion de la phase aqueuse interne, influe sur la taille des globules des émulsions. Par contre, le graphique montre que l'interaction de la concentration de Tween 80 avec la proportion volumique de la phase aqueuse interne a un effet presque négligeable sur cette réponse.

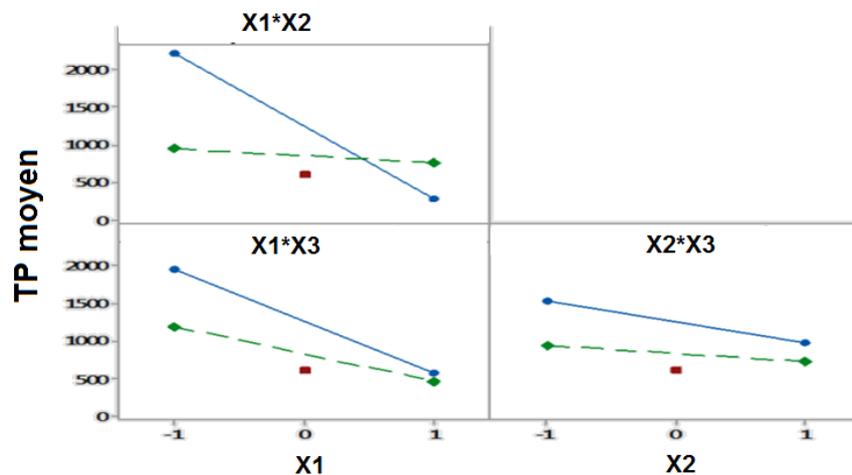


Figure 5.4 : Diagramme des interactions des effets sur la taille des particules

- **Diagramme des interactions sur le potentiel zêta**

Selon le diagramme des interactions (Figure 5.5), le potentiel zêta n'est pas influencé par l'interaction de l'effet de la concentration de Span 80 avec celui de Tween 80 et par l'interaction entre le ratio de Tween 80 et le ratio de la phase aqueuse interne. Par contre, l'interaction entre la concentration en Span 80 et le ratio de la phase aqueuse qui est indiquée par deux segments de droites non parallèles a une influence importante sur cette réponse.

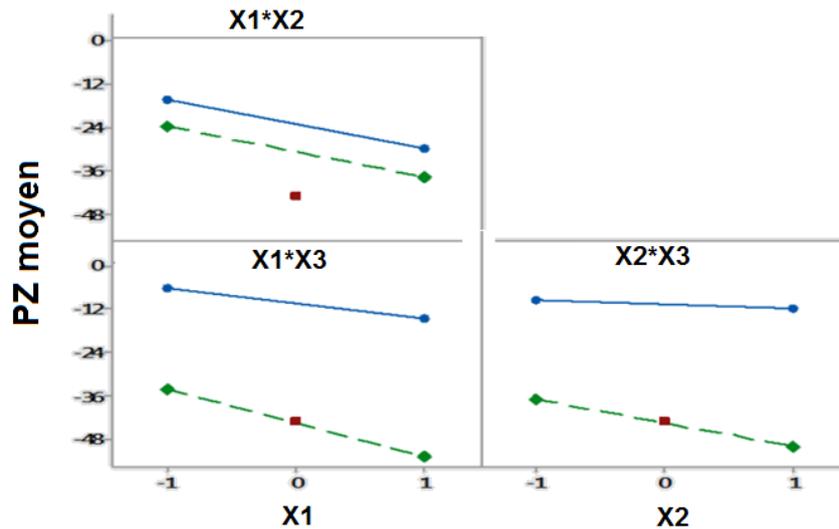


Figure 5.5 : Diagramme des interactions pour le potentiel zêta

- **Diagramme des interactions des facteurs sur EE**

En comparant les graphes d'interactions (Figure 5.6), il apparaît que l'interaction entre l'effet de la concentration en Span 80 et celle de Tween 80 a un effet sur le taux d'efficacité d'encapsulation, ainsi que l'interaction de l'effet de la concentration en Span 80 avec la fraction volumique de la phase aqueuse influe légèrement sur cette réponse. Contrairement à l'interaction de l'effet de la concentration en Tween 80 et la fraction volumique de la phase aqueuse, révèle que celle-ci n'a pas d'effet sur le taux d'efficacité d'encapsulation.

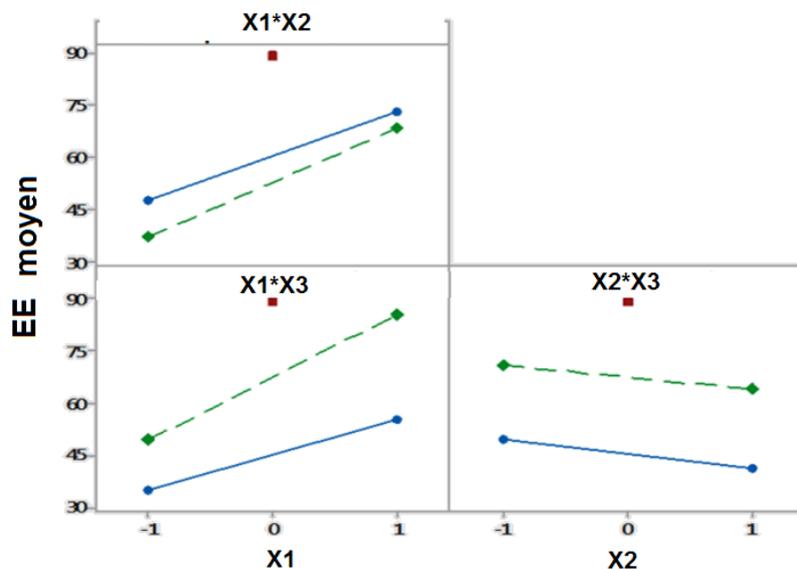


Figure 5.6 : Diagramme des interactions pour le taux d'encapsulation

5.3. Plan Box-Behnken

L'optimisation des conditions de formulation des émulsions multiples est effectuée selon la méthode de surface de réponse (RMS) par le plan Box-Behnken en utilisant un modèle polynomial du second degré avec interaction d'ordre 2.

Les graphiques de contour et l'analyse statistique des résultats obtenus permettent de visualiser la variation de la réponse en fonction des différents facteurs à l'aide de graphique de type surface de réponse et courbe isoréponse pour établir un modèle mathématique adéquat, afin de déterminer les conditions optimales pour une taille des particules minimales, une charge de surface (potentiel zêta) maximale, une efficacité d'encapsulation maximales.

5.3.1. Détermination des facteurs et du domaine d'étude

Les facteurs ayant un impact considérable dans la formulation des multiples émulsions sont choisis, en se basant sur des critères expérimentaux relatifs aux essais préliminaires et sur des résultats antérieurs (Balcaen et al., 2016 ; Bhattacharjee et al., 2018 ; Schuch et al., 2013). Les facteurs examinés lors de cette étude sont : la concentration en Span 80, la concentration en Tween 80 et le ratio de la phase aqueuse interne (Tableau 5.3).

Tableau 5.3 : Facteurs et domaine d'étude pour émulsion multiple

Facteurs	Niveau (-1)	Niveau (0)	Niveau (+1)
X ₁ : Concentration en Span 80 (% , m/m)	5	10	15
X ₂ : Concentration en Tween 80 (% , m/m)	1	3	5
X ₃ : Fraction volumique de la phase aqueuse interne (% , v/v)	20	30	40

5.3.2. Réponses

Les trois réponses étudiées sont les mêmes déjà fixées au chapitre précédent :

- La taille des globules (TP) ;
- La charge des globules (PZ) ;
- Le taux d'efficacité d'encapsulation (EE).

D'après la matrice d'expériences et les résultats expérimentaux (réponses) obtenus lors de la réalisation des 15 essais du plan de Box-Behnken pour trois facteurs (Tableau 5.4), il apparait que la taille des globules varie de 193,3 nm et 3022,9 nm avec une bonne polydispersité, le potentiel zêta varie de -4,5 mV et -64,8 mV et le taux d'efficacité d'encapsulation compris entre 30,72% et 92,48%.

Tableau 5.4 : Plan de Box-Behnken avec les réponses expérimentales (unités codées)

Ordre d'essai	X ₁	X ₂	X ₃	TP (nm)	PDI	ZP (mv)	EE (%)
01	-1	-1	0	3022,9 ± 6,85	0,52 ± 0,015	-4,5 ± 0,06	35,87 ± 6,68
02	+1	-1	0	284,7 ± 3,37	0,36 ± 0,044	-25,2 ± 0,96	84,72 ± 5,30
03	-1	+1	0	1741,0 ± 6,17	0,37 ± 0,017	-18,9 ± 0,28	30,72 ± 2,92
04	+1	+1	0	560,8 ± 2,73	0,45 ± 0,035	-29,6 ± 0,45	78,30 ± 5,09
05	-1	0	-1	2283,3 ± 4,56	0,34 ± 0,026	-17,4 ± 0,23	48,28 ± 5,70
06	+1	0	-1	443,2 ± 2,53	0,55 ± 0,040	-18,8 ± 0,18	88,87 ± 3,54
07	-1	0	+1	1450,4 ± 5,56	0,36 ± 0,017	-31,2 ± 0,08	47,67 ± 5,11
08	+1	0	+1	193,3 ± 2,61	0,26 ± 0,006	-64,8 ± 0,38	92,48 ± 4,06
09	0	-1	-1	1350,7 ± 4,71	0,52 ± 0,020	-12,1 ± 0,21	74,87 ± 4,31
10	0	+1	-1	820,8 ± 2,05	0,33 ± 0,031	-15,2 ± 0,16	71,90 ± 4,01
11	0	-1	+1	382,1 ± 2,24	0,18 ± 0,026	-30,2 ± 0,61	65,96 ± 3,61
12	0	+1	+1	495,3 ± 3,75	0,36 ± 0,035	-36,2 ± 0,36	75,00 ± 4,33
13	0	0	0	400,0 ± 2,34	0,44 ± 0,015	-29,9 ± 0,23	89,23 ± 4,30
14	0	0	0	456,8 ± 2,06	0,35 0,031	-31,5 ± 0,30	80,56 ± 3,00
15	0	0	0	498,6 ± 2,38	0,47 0,017	-33,2 ± 0,46	81,05 ± 3,08

5.3.3. Analyse statistique des résultats de la taille des particules

A. Coefficients de régression estimés

Les valeurs de probabilité inférieures à 0,05 indiquent que les termes du modèle sont statistiquement significatifs (Tableau 5.5).

Tableau 5.5 : Coefficients de régression estimés pour la taille

Termes	Coefficients	t-Student	p-value
Constant	452,0	4,40	0,007
X ₁	-875,7	-13,94	0,000
X ₂	-161,7	-2,57	0,050
X ₃	-289,5	-4,61	0,006
X ₁ ²	625,6	6,77	0,001
X ₂ ²	325,0	3,51	0,017
X ₃ ²	17,7	0,19	0,856
X ₁ X ₂	389,5	4,38	0,007
X ₁ X ₃	143,3	1,61	0,168
X ₂ X ₃	178,5	2,01	0,101

B. Détermination du modèle mathématique

L'équation de régression polynomiale pour le modèle primaire (avant d'exclure les termes non significatifs), s'écrit comme suit :

$$Y_1 = 451,8 - 875,7 * X_1 - 161,68 X_2 - 289,48 X_3 + 625,56 X_1^2 + 324,98 X_2^2 + 17,7X_3^2 + 389,5 X_1 * X_2 + 143,25 X_1 * X_3 + 178,5 X_2 * X_3 \quad (\text{Eq. 5.7})$$

Dans le but d'affiner le modèle et de trouver l'équation polynomiale optimale, les termes non significatifs sont éliminés.

L'équation de régression polynomiale de second degré optimale pour le nouveau modèle du plan Box-Behnken en unités codées s'écrit comme suit :

$$Y_1 = 451,8 - 875,7 * X_1 - 161,68 X_2 - 289,48 X_3 + 625,56 X_1^2 + 324,98 X_2^2 + 389,5 X_1 * X_2 \quad (\text{Eq. 5.8})$$

C. Validation du modèle

D'après l'ANOVA (Tableau 5.6), la valeur de $p = 0,001$ indique que le modèle est significatif. Les valeurs du coefficient de détermination $R^2 = 98,38\%$ et celle de R^2 ajusté = $95,46\%$ indiquent que le modèle est relativement bien ajusté. Donc il existe une bonne corrélation entre les valeurs mesurées et les valeurs calculées. De plus, selon la table de Fisher, $F\text{-obs} > F\text{-crit} (8,6)$ qui est égal à $4,15$. De plus, la somme des carrés due à l'erreur est très faible devant la somme totale. D'autre part, la somme des carrés due aux résidus est nettement inférieure à la somme des carrés due à la régression. On conclut donc que le modèle quadratique proposé amélioré est meilleur du point de vue statistique et peut expliquer correctement le procédé d'encapsulation par double émulsion étudié.

Tableau 5.6 : Analyse de la variance pour la taille

Source	DDL	SC	CM	F	P-value
Régression	9	9569816	1063313	33,68	0,001
Linéaire	3	7014371	2338124	74,07	0,000
Carré	3	1739037	579679	18,36	0,004
Interaction	3	816408	272136	8,62	0,020
Erreur résiduelle	5	157841	31568		
Inadéq.de l'ajust	3	152942	50981	20,81	0,046
Erreur pure	2	4898	2449		
Totale	14	9727657			
R²		98,38%			
R² ajusté		95,46%			

5.3.4. Analyse statistique des résultats de potentiel zêta

A. Coefficients de régression estimés

Les valeurs de probabilité inférieures à 0,05 indiquent que les termes du modèle sont statistiquement significatifs (Tableau 5.7).

Tableau 5.7 : Coefficients de régression estimés pour le potentiel zêta

Termes	Coefficients	<i>t-Student</i>	<i>P-value</i>
Constant	-31,53	-14,35	0,000
X ₁	-8,30	-6,17	0,002
X ₂	-3,49	-2,59	0,049
X ₃	-12,36	-9,19	0,000
X ₁ ²	1,18	0,60	0,577
X ₂ ²	10,80	5,46	0,003
X ₃ ²	-2,70	-1,36	0,232
X ₁ X ₂	2,50	1,31	0,246
X ₁ X ₃	-8,05	-4,23	0,008
X ₂ X ₃	-0,73	-0,38	0,719

B. Détermination du modèle mathématique

Le modèle mathématique représentant le potentiel zêta est le suivant :

$$Y_2 = -31,53 - 8,30 X_1 - 3,48 X_2 - 12,36 X_3 + 1,18 X_1^2 + 10,80 X_2^2 - 2,69 X_3^2 + 2,50 X_1 X_2 - 8,05 X_1 X_3 - 0,73 X_2 X_3 \quad (\text{Eq. 6.9})$$

D'après l'analyse statistique précédente, les termes quadratiques X_1^2 et X_3^2 et les deux interactions $X_1 X_2$ et $X_2 X_3$, ont été éliminés dans le but de trouver l'équation polynomiale optimale. Un nouveau modèle a été obtenu avec un ajustement de bonne qualité.

$$Y_2 = -31,53 - 8,30 X_1 - 3,48 X_2 - 12,36 X_3 + 10,80 X_2^2 - 2,69 X_3^2 + 2,50 X_1 X_2 - 8,05 X_1 X_3 \quad (\text{Eq. 5.10})$$

C. Validation du modèle

Selon l'analyse de la variance du modèle, il apparaît que F_{obs} est supérieure que F_{crit} (3,79), de plus R^2 ajusté est élevée (92,52%). Ceci indique que le modèle quadratique est très bien ajusté (Tableau 5.8).

Tableau 5.8 : Analyse de la variance pour le potentiel zêta

Source	DDL	SC	CM	F	p-value
Régression	9	2635,93	292,88	20,23	0,002
Linéaire	3	1871,07	623,69	43,08	0,001
Carré	3	478,55	159,52	11,02	0,012
Interaction	3	286,31	95,44	6,59	0,034
Erreur résiduelle	5	72,39	14,48		
Inadéq.de l'ajust	3	66,94	22,31	8,19	0,111
Erreur pure	2	5,45	2,72		
Totale	14	2708,32			
R²	97,33%				
R² ajusté	92,52%				

5.3.5. Analyse statistique des résultats du taux d'encapsulation

A. Coefficients de régression

Les coefficients de régression sont donnés dans le tableau 5.9. L'ensemble des effets linéaires des facteurs X_2 et X_3 présente une valeur de $p = 0,006 (< 0,05)$, ce qui indique l'existence d'un effet linéaire significatif uniquement pour le facteur (X_1). Pour les effets quadratiques, on obtient des valeurs de $P > 0,05$ pour le carré de X_3 . Il s'ensuit en fonction de la valeur de p qu'il n'y a pas d'effet significatif pour le carré de la fraction volumique de la phase aqueuse interne. Les valeurs de P obtenues pour les interactions sont respectivement de 0,898, 0,673 et 0,259 ($> 0,05$). Il n'y a donc pas d'effet significatif.

Tableau 5.9 : Coefficients de régression estimés pour le taux d'efficacité d'encapsulation

Termes	Coefficients	t-Student	p-value
Constant	83,61	30,70	0,000
X₁	22,73	13,63	0,000
X₂	-0,69	-0,41	0,697
X₃	-0,35	-0,21	0,841
X₁²	-14,41	-5,87	0,002
X₂²	-11,80	-4,81	0,005
X₃²	0,12	0,05	0,963
X₁X₂	-0,32	-0,13	0,898
X₁X₃	1,05	0,45	0,673
X₂X₃	3,00	1,27	0,259

B. Détermination du modèle mathématique

L'équation de régression polynomiale pour le modèle primaire (avant d'exclure les termes non significatifs) s'écrit comme suit en unités codées :

$$Y_3 = 83,61 + 22,73 X_1 - 0,69 X_2 - 0,35 X_3 - 14,40 X_1^2 - 11,80 X_2^2 + 0,12 X_3^2 + 1,05 X_1 * X_3 + 3,00 X_2 * X_3 \quad (\text{Eq 6.11})$$

Après exclusion des termes non significatifs (tableau 5.7), le nouveau modèle s'écrit comme suit :

$$Y_3 = 83,61 + 0,69 X_2 - 14,40 X_1^2 - 11,80 X_2^2 \quad (\text{Eq. 6.12})$$

C. Validation du modèle

L'analyse de la variance du modèle est résumée dans le tableau 5.10. D'après l'ANOVA, F_{obs} est supérieure que F_{crit} (8,6), en plus la valeur de $p = 0,001$ indique que le modèle est significatif. Par ailleurs, la valeur du coefficient de détermination R^2 vaut 97,98% est bonne et R^2 ajusté est égale à 94,33%, ce qui indique que le modèle est relativement bien ajusté. Donc il existe une bonne corrélation entre les valeurs mesurées et les valeurs calculées, donc le modèle quadratique est accepté.

Tableau 5.10 : Analyse de la variance pour le taux d'efficacité d'encapsulation

Source	DDL	SC	CM	F	p-value
Régression	9	5384,61	598,29	26,89	0,001
Linéaire	3	4137,54	1379,18	61,99	0,000
Carré	3	1206,16	402,05	18,07	0,004
Interaction	3	40,92	13,64	0,61	0,635
Erreur résiduelle	5	111,25	22,25		
Inadéq. de l'ajustement	3	63,81	21,27	0,90	0,566
Erreur pure	2	47,44	23,72		
Totale	14	5495,85			
R²		97,98%			
R² ajusté		94,33%			

5.4. Modélisation par RSM

Pour la recherche des conditions optimales, c'est-à-dire les valeurs des facteurs permettant d'aboutir à la réponse optimale la méthode de Modélisation par RSM a été utilisée. Deux types de graphiques de surface de réponse ont été générés.

5.4.1. Optimisation de la taille par RSM

D'après les résultats obtenus de l'analyse de la surface de réponse et sa projection présentée par la courbe isoréponse (Figure 5.7), il se constate que l'augmentation de la concentration du Span 80 de son niveau bas à son niveau maximum (concentration de 15%) est suivie par une diminution de la taille. Cependant, l'augmentation du ratio de Tween 80 entraîne une diminution de la taille jusqu'à un ratio de 3%, au-delà de cette valeur l'augmentation de ce dernier est accompagnée par une augmentation de la taille. Le diagramme de surface de réponse présente à partir de sa forme parabolique une taille maximale qui se trouve en haut de la surface.

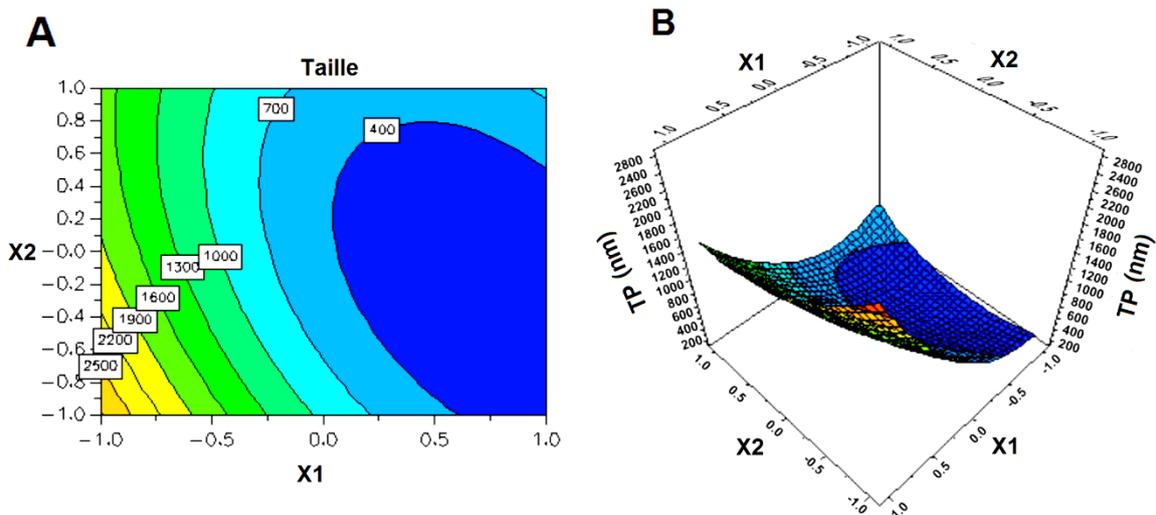


Figure 5.7 : Diagrammes (A) de contour et (B) de surface de réponse de l'effet d'interaction de X_1 - X_2 à X_3 moyen sur la taille

Les résultats de l'analyse de la surface de réponse, ainsi que la courbe isoréponse sur l'effet d'interaction X_1 - X_3 à X_2 moyen sur la taille démontrent bien qu'il existe une relation étroite entre l'augmentation de la concentration du Span 80 et de la fraction volumique de la phase aqueuse interne (Figure 5.8). Une augmentation de ces deux paramètres est suivie d'une forte diminution de la taille jusqu'à l'obtention d'une taille minimale pour une concentration volumique de 15% du Span 80 et une fraction volumique de 40 % de la phase aqueuse interne.

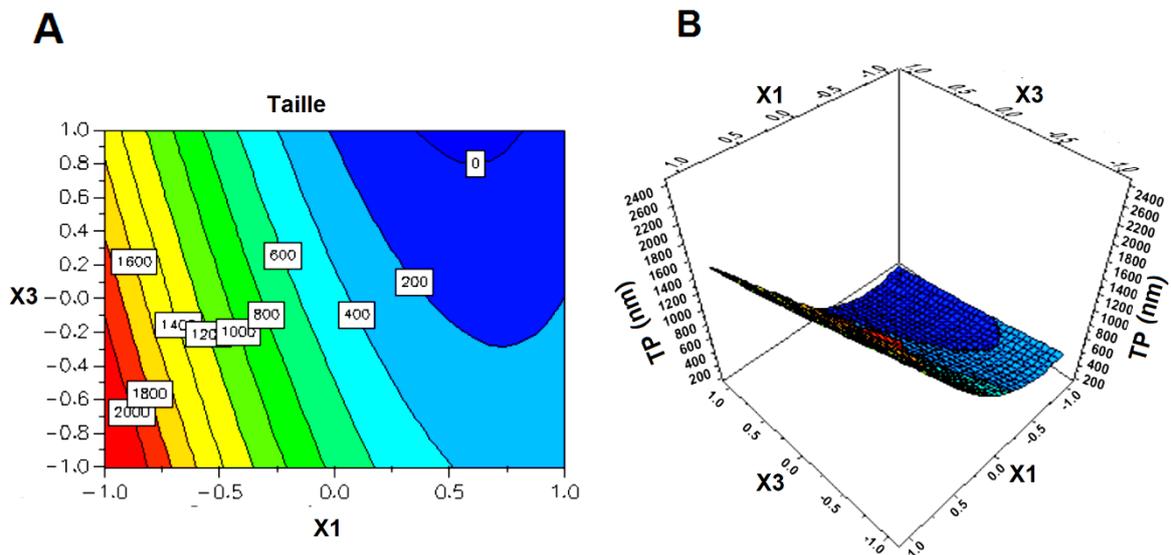


Figure 5.8 : Diagrammes (A) de contour et (B) de surface de réponse de l'effet d'interaction X_1 - X_3 à X_2 moyen sur la taille

L'analyse de la surface de réponse sur l'effet d'interaction X_2 - X_3 à X_1 moyen sur la taille (Figure 5.9), indique que l'augmentation de la fraction volumique de la phase aqueuse interne est suivie par une diminution importante de la taille, contrairement à la concentration de Tween 80. Cela est affirmé par la courbe isoréponse qui précise la région des tailles minimales pour des fractions volumiques élevées de la phase aqueuse interne (autour du niveau +1) et des concentrations centrées de Tween 80 (autour du niveau 0).

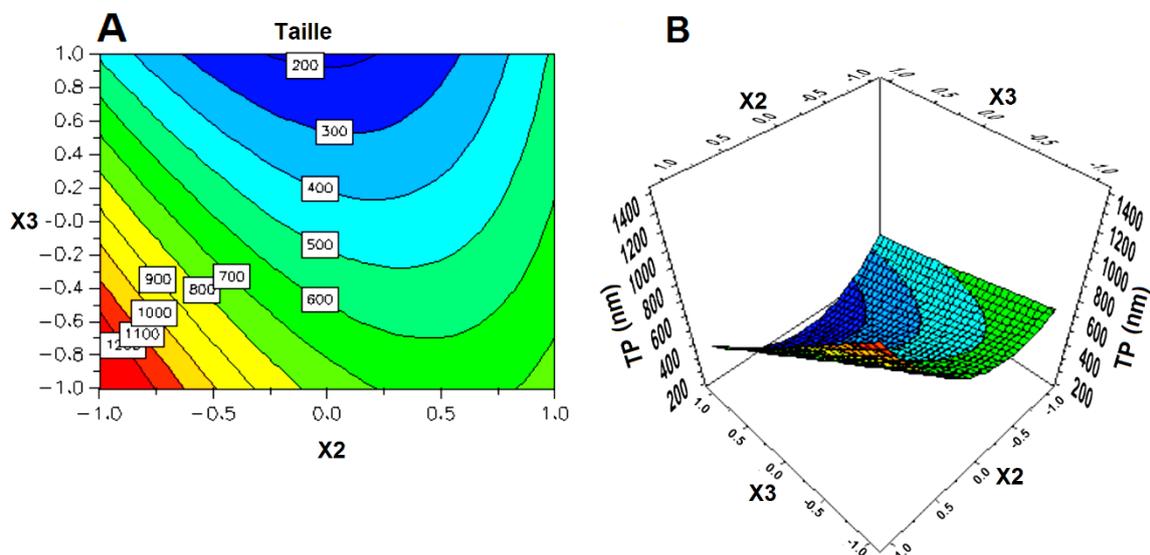


Figure 5.9 : Diagrammes (A) de contour et (B) de surface de réponse de l'effet d'interaction X_2 - X_3 à X_1 moyen sur la taille

5.4.2. Optimisation du potentiel zêta par RSM

Le graphique de la surface de réponse montre que l'augmentation de la concentration de Span 80 conduit à une importante diminution du potentiel zêta jusqu'à une valeur presque de -40 mV pour une concentration de 15%, tandis que, lors de l'augmentation de la concentration de Tween 80, le potentiel zêta diminue, mais au-dessus de la valeur de 3%, l'augmentation de ce ratio induit l'augmentation du potentiel zêta (Figure 5.10).

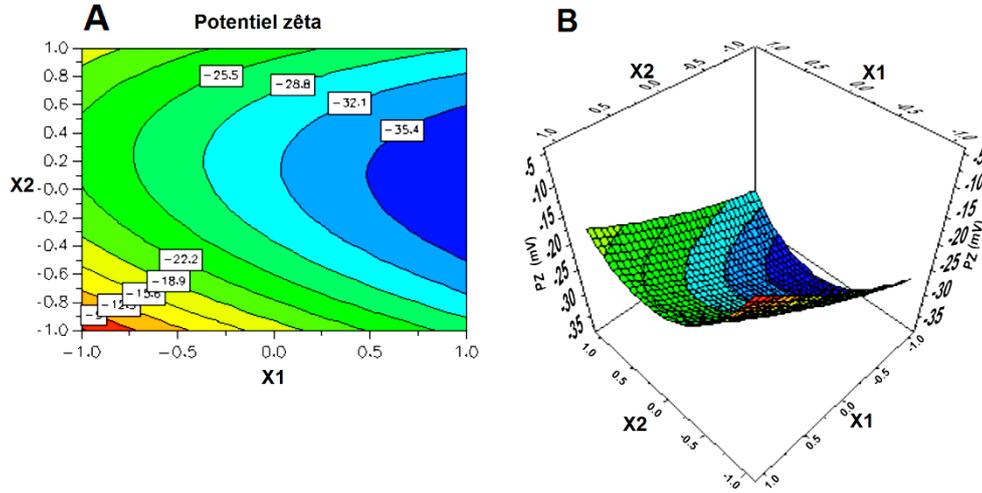


Figure 5.10 : Diagrammes (A) de contour et (B) de surface de réponse de l'effet d'interaction X_1 - X_2 à X_3 sur le potentiel zêta

D'après le diagramme de surface de réponse et de contour (Figure 5.11), il est à noter que l'augmentation la concentration de Span 80, ainsi que l'augmentation de la fraction volumique de la phase aqueuse interne amènent à une importante augmentation du potentiel zêta en valeur absolue jusqu'à l'obtention d'une valeur maximale pour une concentration de 15% de Span 80 et une fraction volumique de 40% de la phase aqueuse interne.

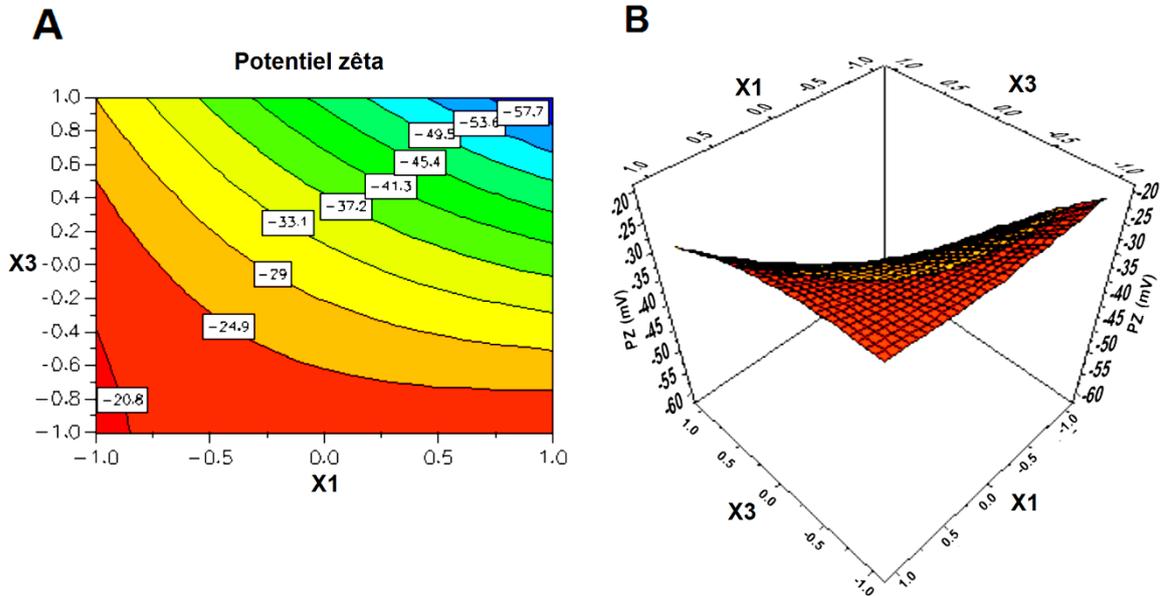


Figure 5.11 : Diagrammes (A) de contour et (B) de surface de réponse de l'effet d'interaction X_1 - X_3 à X_2 sur le potentiel zêta

D'après le diagramme de surface de réponse et de contour (Figure 5.12), il apparaît que le potentiel zêta atteint sa valeur maximale en valeur absolue, lorsque la concentration de Tween 80 est fixée à son niveau moyen (0) et la fraction volumique de la phase aqueuse interne est fixée à son niveau élevé (+1).

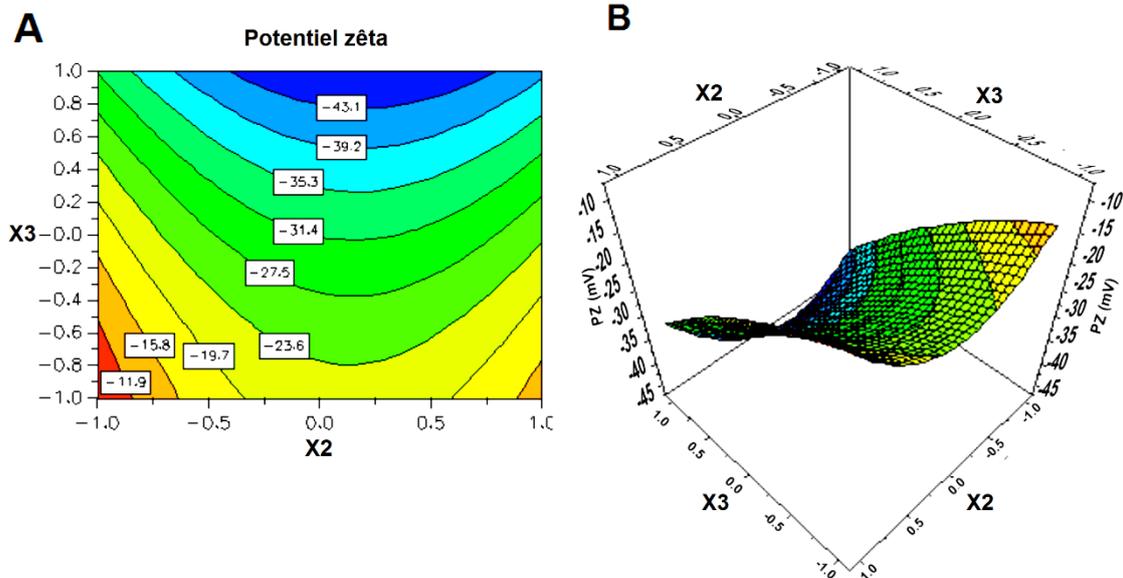


Figure 5.12 : Diagrammes (A) de contour et (B) de surface de réponse de l'effet d'interaction X_2 - X_3 à X_1 moyen sur le potentiel zêta

5.4.3. Optimisation du taux d'efficacité d'encapsulation

Le diagramme de surface de réponse et de contour (Figure 5.13) montre que le taux d'encapsulation est maximal pour une concentration maximale en surfactant lipophile (X_1) et ceci lorsque la concentration du surfactant hydrophile (X_2) prend sa valeur moyenne.

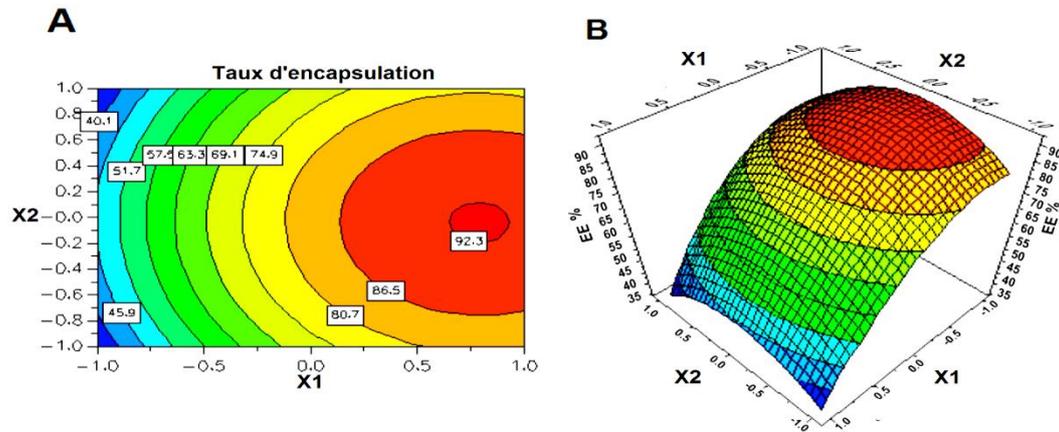


Figure 5.13 : Diagrammes (A) de contour et (B) de surface de réponse de l'effet d'interaction X_1 - X_2 à X_3 moyen sur EE

D'après ces deux graphes (Figure 5.14), il apparaît que l'augmentation de la concentration en Span 80 et celui de la phase aqueuse interne est accompagnée par une importante augmentation du taux d'encapsulation jusqu'à l'obtention d'un taux d'encapsulation maximal pour une concentration de 15% de Span 80 et une fraction volumique de 40% de la phase aqueuse interne.

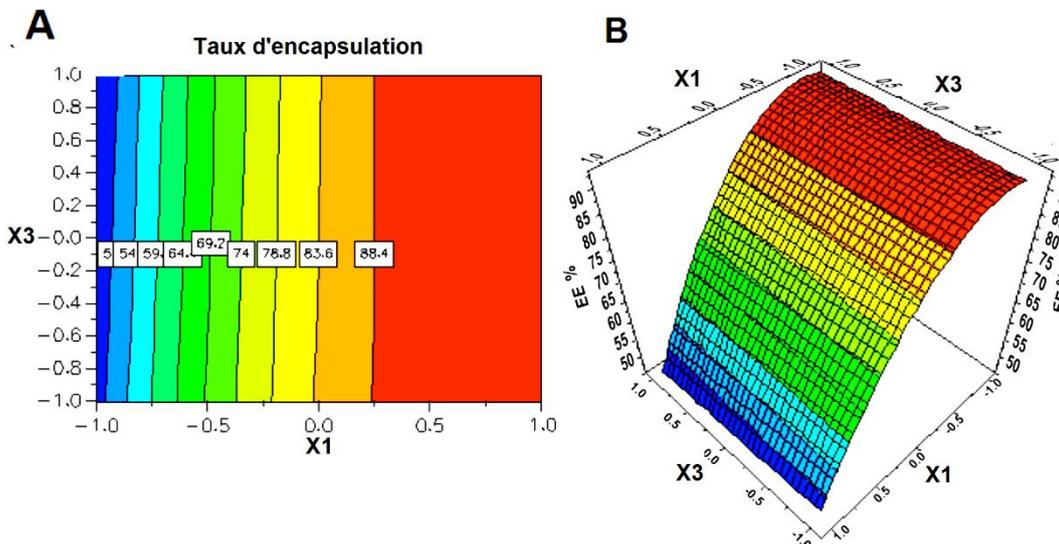


Figure 5. 14 : Diagrammes (A) de contour et (B) de surface de réponse de l'effet d'interaction X_1 - X_3 à X_2 moyen sur EE

Le diagramme de surface de réponse et de contour (Figure 5.15) montre qu'il existe une région optimale dans laquelle, le taux d'encapsulation est maximal, cette région se trouve pour une concentration de Tween 80 fixée à son niveau moyen (3%) et une concentration de la phase aqueuse interne de 30%. Au-delà de ces deux valeurs, l'augmentation ou la diminution des deux facteurs est toujours suivie par une diminution du taux d'encapsulation.

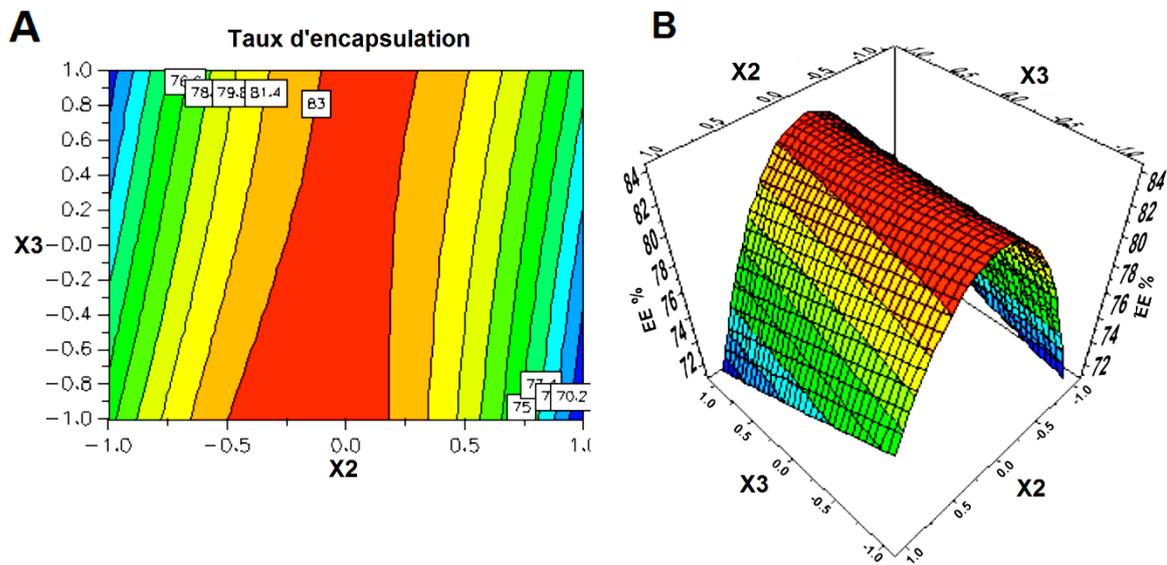


Figure 5.15 : Diagrammes (A) de contour et (B) de surface de réponse de l'effet d'interaction X₂-X₃ à X₁ moyen sur EE

5.5. Détermination et validation de l'optimum

Le but de cette partie de travail a porté sur la détermination d'une formule optimale d'une émulsion multiple à l'échelle de nano dans l'objectif est de contenir et de protéger l'insuline, préparée par le procédé de la double émulsion. Donc les critères de choix d'un optimum sont :

- Un diamètre des globules minimal ;
- Un taux d'efficacité d'encapsulation maximal ;
- Un potentiel zêta maximal (> 30 mV en valeur absolue).

En introduisant les valeurs cibles des réponses dans le modèle, une formulation optimale sera obtenue pour les variables suivants (Tableau 5.11) :

Tableau 5.11 : Les valeurs des facteurs de l'émulsion multiple

Variable	Valeur codée	Valeur réelle
X₁ : Concentration en Span 80 (% , m/m)	+1	14,9
X₂ : Concentration en Tween 80 (% , m/m)	0	3,4
X₃ : Fraction volumique de la phase aqueuse interne (% , v/v)	+1	39,9

Des essais de confirmation ont été réalisés, en utilisant les valeurs cibles (optimales) obtenues. Les résultats d'analyse de l'émulsion multiple optimale présentent les propriétés de réponses les plus importantes et qui sont conformes aux critères élaborés (Tableau 5.12).

Tableau 5.12 : Les valeurs des réponses mesurées et prédites de l'optimum de l'émulsion multiple

Réponse	Valeur réelle	Valeur prédite
TP	193,7 nm	210,9 nm
PZ	-64,58 mV	-61,84 mV
EE	91,84%	92,84%

5.6. Étude de l'effet de recouvrement de la double émulsion par PEG 4000

Afin d'étudier l'effet de recouvrement de l'émulsion multiple avec du PEG 4000, ce dernier a été ajouté avec une concentration de 0,17% (m/v) aux essais précédemment réalisés en accord avec la matrice du plan Box Behnken.

Les résultats illustrant l'effet du PEG sur les caractéristiques granulométriques, potentiel zêta et l'efficacité d'encapsulation de l'insuline par ces émulsions préparées sont représentés dans les histogrammes suivants (Figures 5.16, 5.17, 5.18) en les comparant avec celles des émulsions préparées sans PEG (Tableau 5.4).

D'après les résultats obtenus, il apparaît que le recouvrement de la surface de l'émulsion multiple avec le PEG 4000 conduit à une augmentation de la taille des particules, ainsi qu'une diminution du potentiel zêta, tout en contribuant à une amélioration du taux d'encapsulation pour tous les essais.

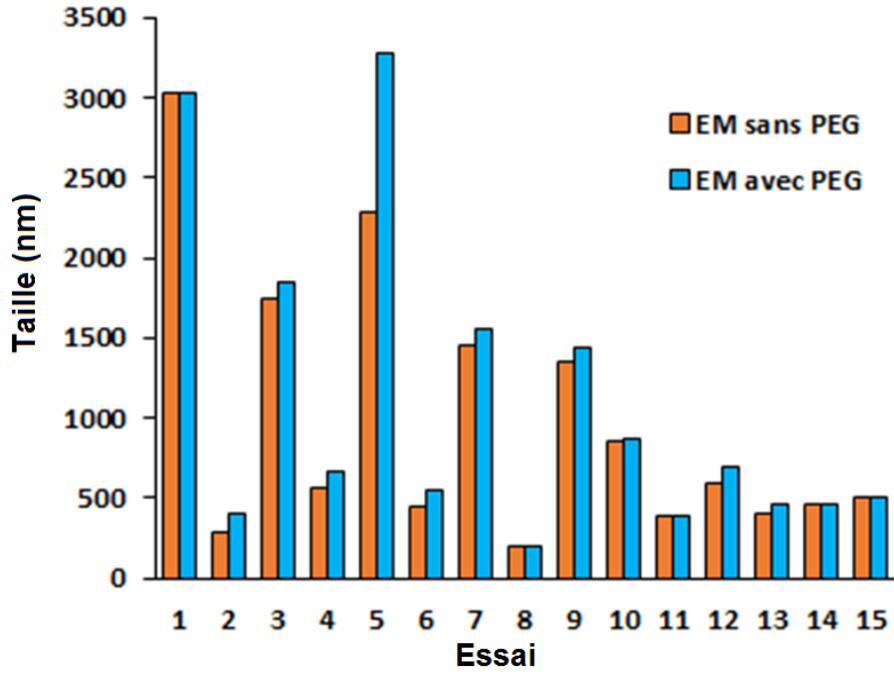


Figure 5.16 : Histogramme illustrant l'effet de recouvrement d'EM par du PEG sur TP

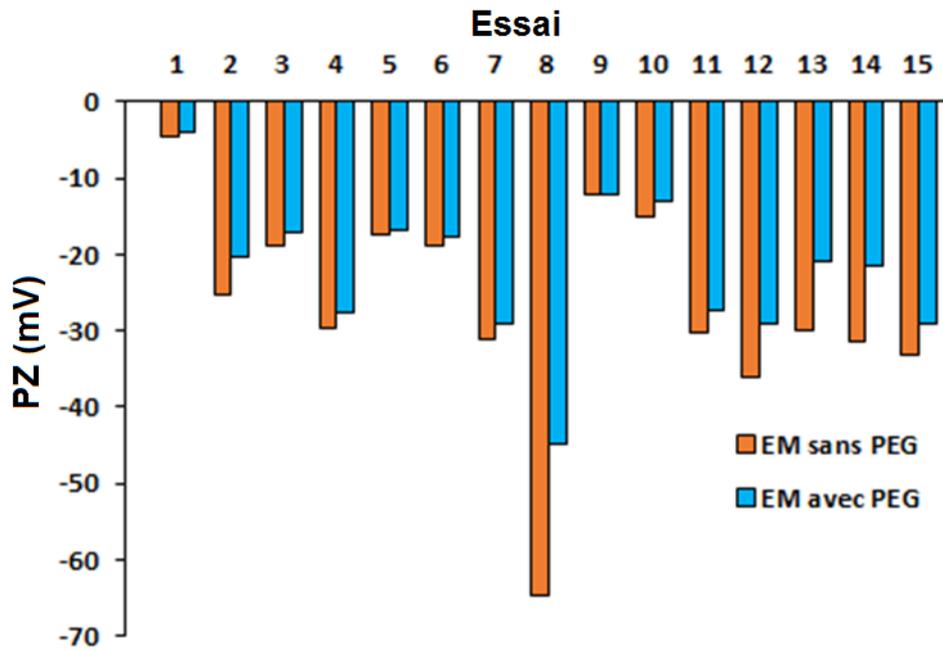


Figure 5.17 : Histogramme illustrant l'effet de recouvrement d'EM par du PEG sur PZ

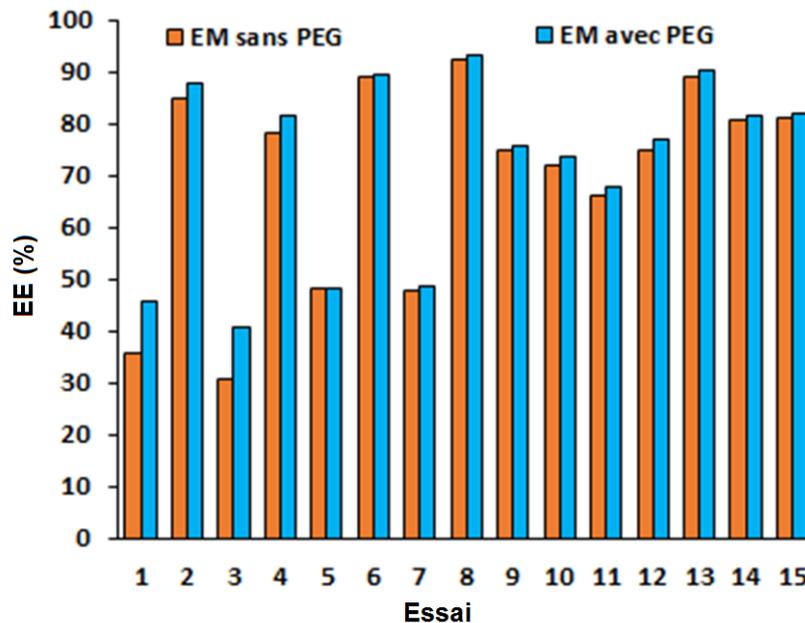


Figure 5.18 : Histogramme illustrant l'effet de recouvrement d'EM par du PEG sur EE

5.7. Étude rhéologique

Il a été constaté dans le chapitre II que les EMs pouvaient être stabilisées par des additifs polymères. L'étude de la viscosité des émulsions en présence d'additif polymère permet de déterminer si l'augmentation de stabilité est due à une augmentation de viscosité de la phase continue ou une stabilisation de l'interface, ou les deux en même temps. La Figure 5.19 montre la variation de la viscosité des EMs préparées dans les conditions optimales en fonction du taux de cisaillement.

Les résultats de l'étude du comportement rhéologique en régime d'écoulement permanent des EMs testées montrent que la viscosité des différentes formulations augmente avec l'augmentation de la concentration en chitosane de 0,05 à 0,07%. D'autre part, l'émulsion contenant le PEG 4000 (EM1) présente des viscosités newtoniennes plus élevées. Ceci est prévisible, car la viscosité des émulsions multiples E/H/E suite en générale la viscosité de la phase aqueuse externe qui est en fonction de la concentration en polysaccharide. Le polysaccharide (chitosane) et le PEG 4000 génèrent un réseau d'épaississement étendu, qui induit une viscosité élevée à faible taux de cisaillement, ce qui ralentit le mouvement des gouttelettes (Balcaen et al., 2016).

D'autre part, il a été constaté que la viscosité apparente pour les différentes émulsions diminue en fonction de la vitesse de cisaillement donc se sont de type fluide non newtonien d'un comportement rhéofluidifiants (Abu-Jdayil et Fara, 2013).

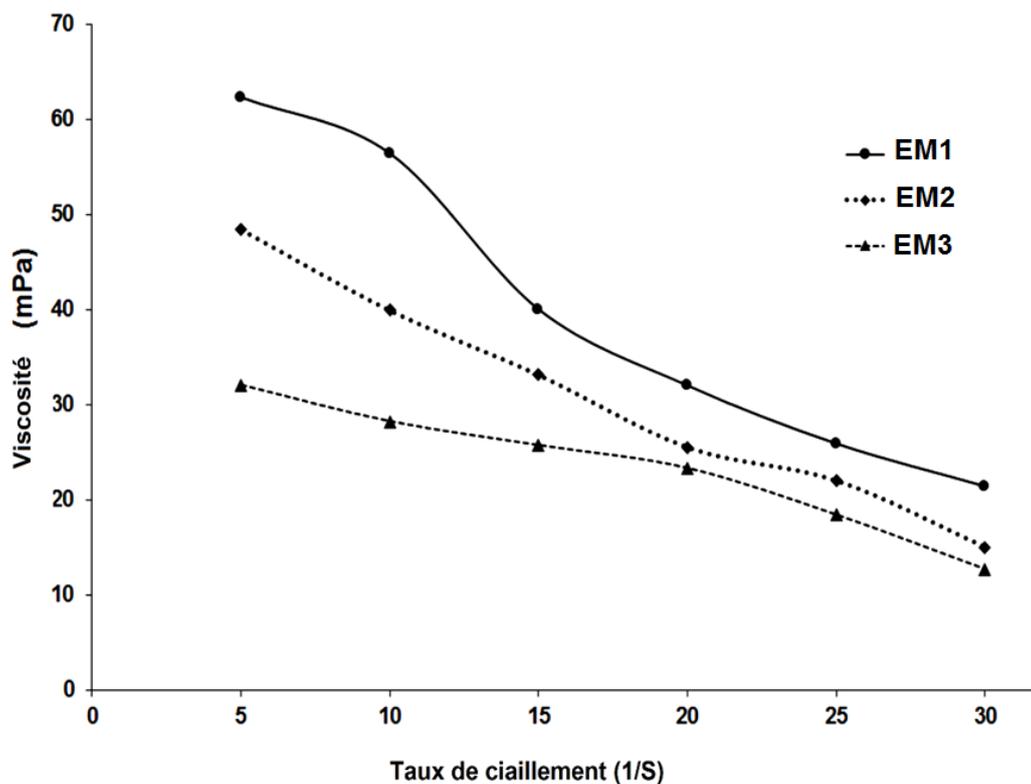


Figure 5.19 : Évolution de la viscosité des EMs en fonction du taux de cisaillement : EM1 – émulsion recouverte avec du chitosane et PEG ; EM2 – émulsion recouverte avec du chitosane 0,07% ; EM3 – émulsion recouverte avec du chitosane 0,05%

5.8. Conclusion

Un procédé d'encapsulation par double émulsion a été mis au point. L'objectif principal de cette partie de travail est l'optimisation des paramètres de la formulation d'une émulsion multiple stable de type E/H/E en vue de l'encapsulation de l'insuline. La méthodologie des plans d'expériences a été appliquée. Dans un premier lieu, une étude de criblage a été effectuée, ce qui a permis d'évaluer l'influence des facteurs étudiés à savoir la concentration en surfactant dans la première émulsion et la concentration en surfactant hydrophile dans la deuxième émulsion, ainsi la fraction volumique de la phase aqueuse interne sur les caractéristiques des particules obtenues. L'étude d'optimisation par le plan d'expériences a permis de trouver le modèle mathématique adéquat de la modélisation.

La formule optimisée de l'émulsion multiple de type E/H/E est caractérisée par une faible taille des particules (193,7 nm) avec une charge en surface élevée (-64,58) et un taux d'encapsulation élevé (91,84%) correspond à une concentration en Span 80 de 15%, une

concentration en Tween 80 de 3% et une fraction volumique de la phase aqueuse interne de 40%.

À l'optique de tous les résultats obtenus, il est à conclure que le modèle polynomial quadratique obtenu pour les trois réponses étudiées semble être un bon modèle expliquant bien et prédisant le procédé de la double encapsulation par émulsion multiple.

CHAPITRE VI : SUIVI ET CARACTÉRISATION DES NANOPARTICULES D'INSULINE OPTIMISÉES

6.1. Introduction

Ce dernier chapitre porte sur l'étude comparative des différents systèmes précédemment obtenus et caractérisés. Les nanoparticules ont été obtenues par deux méthodes d'encapsulation, notamment la gélification ionotropique et la double émulsion. Il est évident de noter que les propriétés des vecteurs formulés peuvent avoir un impact important sur les propriétés de piégeage du principe actif dans les nanoparticules furtives et également sur la cinétique de libération de ce principe actif (Abdelkader et al., 2018a; Sanusi et al., 2021). En effet, l'importance de l'étude de l'effet du recouvrement des nanoparticules par un polymère hydrophile (PEG 4000) sur les propriétés thermiques et structurelles, ainsi l'étude de libération *in vitro* a été soulignée dans l'objectif de ce chapitre.

6.2. Caractérisation de l'optimum

Différentes dispersions ont été réalisées par les deux techniques d'encapsulation étudiées précédemment, en appliquant les conditions optimales théoriques des plans d'expériences pour chaque technique. Ces formulations ont été caractérisées par microscopie optique, une mesure de taille par diffusion de lumière, une mesure de charge de surface (potentiel zêta) et par une détermination de leur efficacité d'encapsulation, c'est-à-dire la quantité d'insuline contenue dans ces systèmes nanodispersés.

6.2.1. Observation morphologique

La morphologie des nanoparticules obtenues a été examinée par un microscope optique avec des puissances de grossissement variées. Une goutte de différentes dispersions fraîchement préparées a été versée sur une lame et scellée avec un verre de couverture.

Les observations microscopiques des différentes formulations préparées par gélification ionotropique, dans les conditions optimales révèlent une forme sphérique avec une distribution de taille homogène (Figures 6.1).

Concernant les dispersions préparées par double émulsion (EMs), ces dernières étaient de couleur blanche et présentaient un aspect homogène et crémeux, observées au microscope optique, les différentes EMs obtenues montraient clairement des globules huileux remplis de nombreuses gouttelettes aqueuses de taille homogène (Figure 6.2).

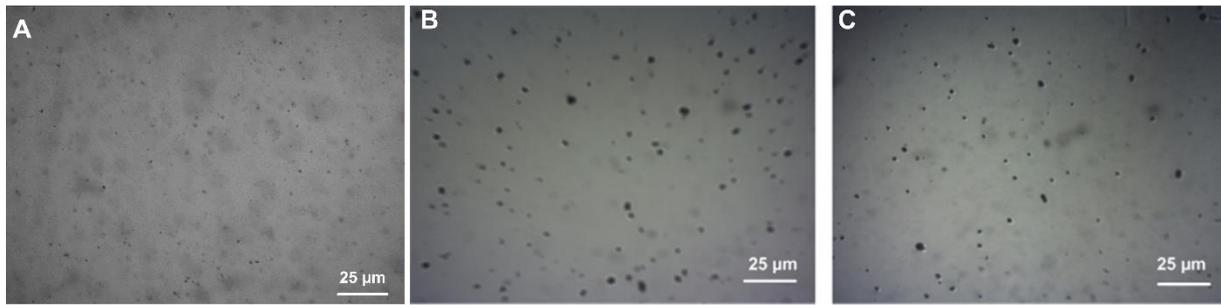


Figure 6.1 : Observations en microscopie optique des nanoparticules obtenues par gélation ionotrope (A :NPs sans insuline, B :NPs NF et C :NPsF)

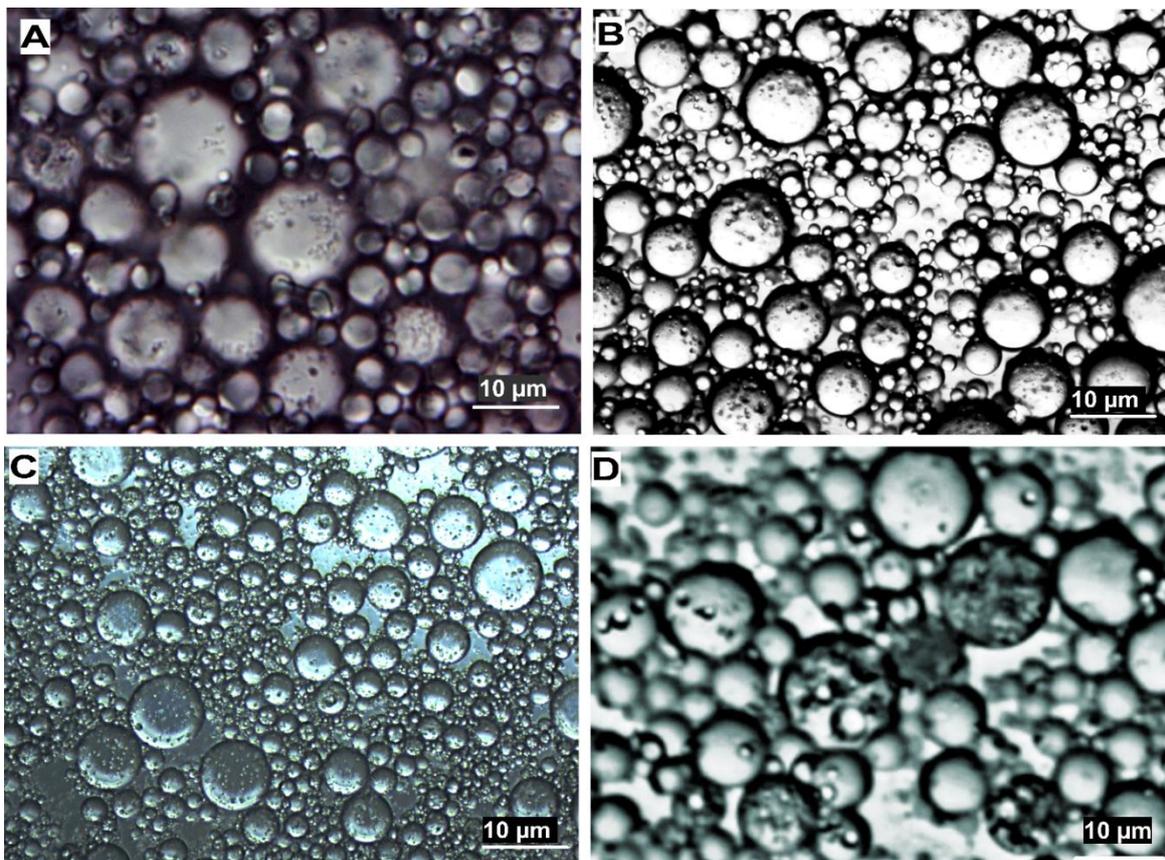


Figure 6.2 : Observations en microscopie optique des émulsions multiples (A : EM, B : EM d'insuline, C : EM recouverte avec le chitosane et D : EM recouverte de chitosane et PEG)

○ Sens de l'émulsion

Deux méthodes ont été utilisées pour déterminer le type des émulsions formulées : la mesure de la conductivité électrique et la méthode par dilution.

Les résultats de mesure de la conductivité électrique montrent que la conductivité de toutes les émulsions formulées est élevée (mS/cm) ce qui induit que la phase continue est une phase aqueuse.

Pour la méthode de dilution, une quantité de l'émulsion préparée a été introduite dans un tube à essai contenant de l'eau. Après un certain temps, une dispersion facile de l'émulsion dans l'eau a été constatée, ce qui confirme que la phase continue est aqueuse, ce test est réalisé pour toutes les formulations.

6.2.2. Caractérisation granulométrique, du potentiel zêta et taux d'encapsulation

Le tableau 6.1 résume les résultats obtenus lors de la caractérisation des différentes formulations étudiées. D'après les résultats obtenus, il est à noter que le recouvrement de la surface des nanoparticules préparées par les deux techniques étudiées avec du PEG 4000, conduit à une augmentation de la taille des particules ainsi qu'une diminution du potentiel zêta, tout en contribuant à une amélioration du taux d'encapsulation, que ce soit le procédé d'encapsulation.

Tableau 6.1 : Caractéristiques des nanoparticules d'insuline furtives et non furtives

Formulation	Taille (nm)	PZ (mV)	EE (%)
NPs-GI-NF	187±6,84	-37±0,26	81±3,21
NPs-GI-F	145±4,48	-30±0,31	85±2,21
EM-NF	193,3±4,48	-61,5±0,18	91,6±3,28
EM-F	200,1±5,58	-44,2±0,16	94,3±2,1

6.3. Caractérisation thermique et structurale

Les dispersions furtives préparées par les deux techniques d'encapsulation dans les conditions optimales sont finalement lyophilisées à l'aide d'un lyophilisateur de type Heto® DW 8 de Heto–Holten (Allerød, Danemark) en vue de récupérer et de caractériser les particules directement sous forme sèche, par analyse thermique et spectroscopie FTIR.

6.3.1. Analyse thermogravimétrique (ATG)

Afin de connaître le comportement en température de l'insuline pure et encapsulée dans les nanoparticules furtives (température de dégradation, température de désorption d'eau, et stabilité thermique), une analyse thermogravimétrique (ATG) a été conduite pour mesurer le courant ascendant de leur perte de poids dans l'intervalle de température de 20 ° à 550 °C (Figure 6.3).

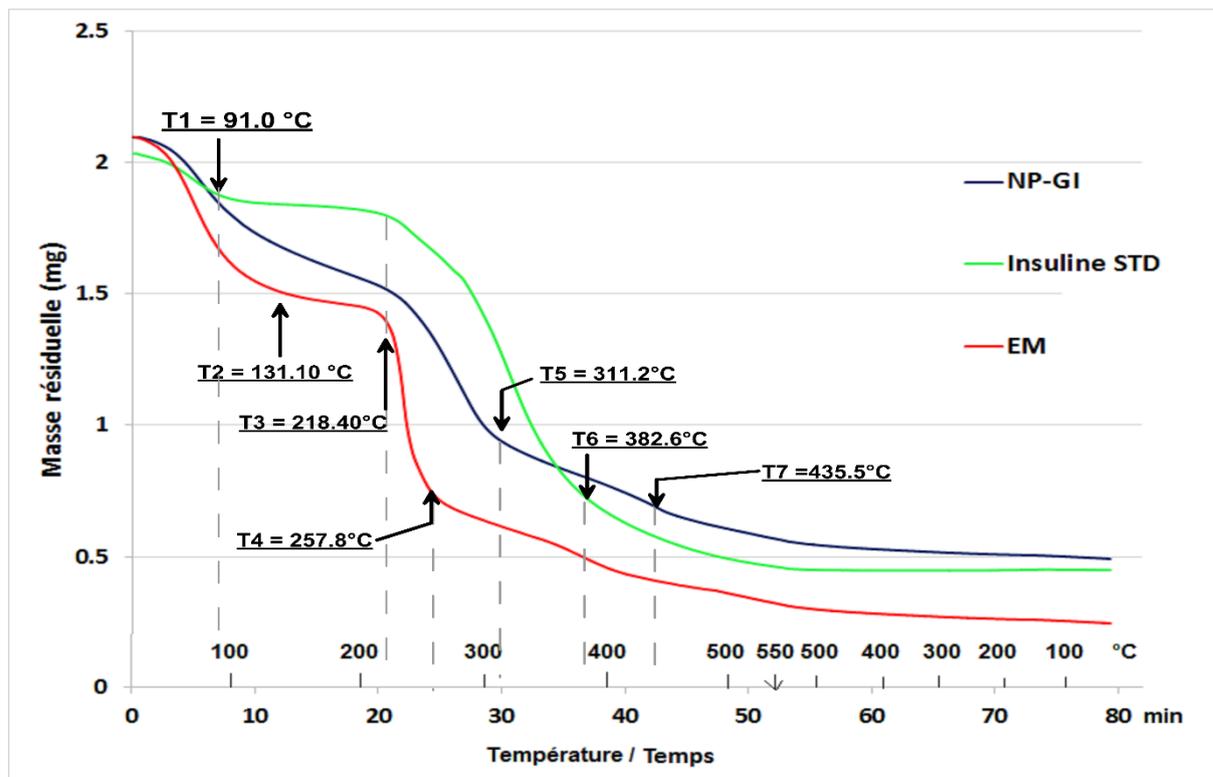


Figure 6.3 : Analyse thermogravimétrique (ATG) de l'insuline à l'état pur et nanodispersé (essai optimal)

La courbe de dégradation de l'insuline pure et les nanoparticules furtives (NPf-GI et NPf-EM) encapsulant l'insuline présente deux principales étapes de la perte en masse. Pour l'insuline, le premier stade est observé autour de 100 °C et qui est liée à la déshydratation du matériau. La deuxième étape de la perte de poids se produit dans la plage de température allant de 218 à 382 °C, cela est associé à la dégradation du squelette de l'insuline qui est à une température de 311 °C.

Néanmoins, on constate que cette perte de masse débute légèrement plus tôt pour les particules formulées par GI (Tpic à 257°C) par rapport aux autres particules formulées par EM (Tpic à 311°C). Une explication possible de cette différence de dégradation pourrait être la présence des composants lipophiles (Span 80 et tween 80) des EMs.

Entre 25 et 131 °C, toutes les nanoparticules (NPf-GI et NPf-EM) présentent une première perte de masse comprise entre 7 et 10% environ, qui est liée à la déshydratation du matériau : la présence des groupements – OH et amines sur les chaînes de chitosane, ainsi de PEG permettent la fixation de molécules d'eau avec des liaisons fortes et moins fortes respectivement, ce qui explique le début de la déshydratation pour des températures inférieures à 100 °C références. L'effondrement de la structure due à la décomposition de la partie

organique ne se produit qu'au-delà de 258 °C. En effet, l'analyse thermogravimétrique (Figure 6.3) a montré une stabilité du principe actif encapsulée au sein des nanoparticules furtives formulées dans les conditions optimales de chaque technique étudiée.

6.3.2. Propriétés thermiques par analyse enthalpique différentielle (DSC)

La calorimétrie différentielle à balayage (Differential Scanning Calorimetry, DSC) a été utilisée pour étudier l'effet de l'état colloïdal des systèmes dispersés obtenus via les deux techniques d'encapsulation utilisées sur le profil thermique de l'insuline à l'état pure et nanodispersé. Cette technique a permis également de mettre en évidence des modifications possibles du thermogramme de l'insuline après son encapsulation dans les nanoparticules furtives à base d'alginate et de chitosane. La Figure 6.4 présente les thermogrammes de l'insuline à l'état pure et nanodispersé dans les nanoparticules furtives préparées par les deux techniques d'encapsulation étudiées (GI, EM).

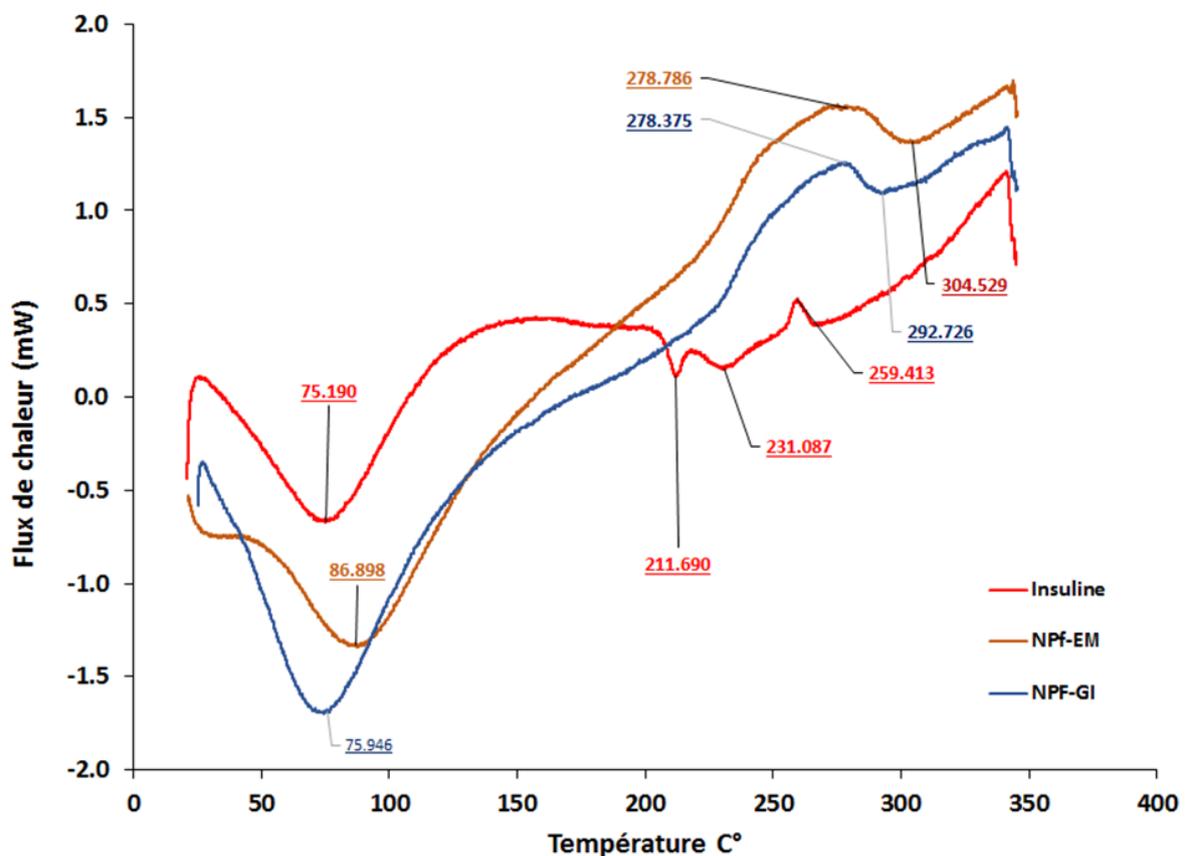


Figure 6.4 : Thermogrammes de l'insuline pure et encapsulée dans les nanoparticules furtives (essais optimaux)

Le thermogramme de l'insuline cristalline montre deux pics endothermiques à 75,1 °C et 211,6 °C et un petit pic exothermique à 259,4 °C. Ce type de thermogramme de l'insuline humaine est en accord avec d'autres rapportés dans la littérature (Mohammadpour et al., 2019).

La séquence endothermique suivie d'un pic exothermique pourrait être corrélée à la dénaturation de cette protéine suivie d'une agrégation (Sarmiento, Veiga, Ferreira, 2006). En effet, il est possible que l'insuline une fois dénaturée puisse exposer des sites d'interaction capables de produire des liaisons insuline-insuline et par conséquent, favoriser la formation d'agrégats peptidiques (Gatti et al., 2018 ; Gibson et Murphy, 2006).

Les deux pics endothermiques associés à l'insuline sont devenus indistincts et se sont transformés en un seul pic après piégeage d'insuline dans les nanoparticules furtives.

Il est évident de noter que les nanoparticules préparées par les deux techniques d'encapsulation présentent un déplacement du pic endothermique à une température plus élevée (~ 76,7 °C) et (~ 86,89 °C) pour les nanoparticules furtives préparées par gélification ionotropique (NPsf-GI) et les NPsf-EM, respectivement.

Également un déplacement et un élargissement du pic exothermique vers des températures plus élevées ~ 278,37 °C et 278,78 °C a été observé pour les NPsf-GI et NPsf-EM, respectivement. Ceci peut être expliqué par une interaction entre l'insuline et la matrice polymérique utilisée.

Ces résultats suggèrent que l'insuline a été encapsulée au sein des nanoparticules furtives quelque ce soit la technique d'encapsulation utilisée.

6.3.3. Analyse par spectrométrie FTIR

L'insuline pure, les polymères utilisés pris séparément et les nanoparticules furtives des essais optimaux, préparés par les deux techniques étudiés ont été analysés par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) à température ambiante (Figures 6.5 et 6.6).

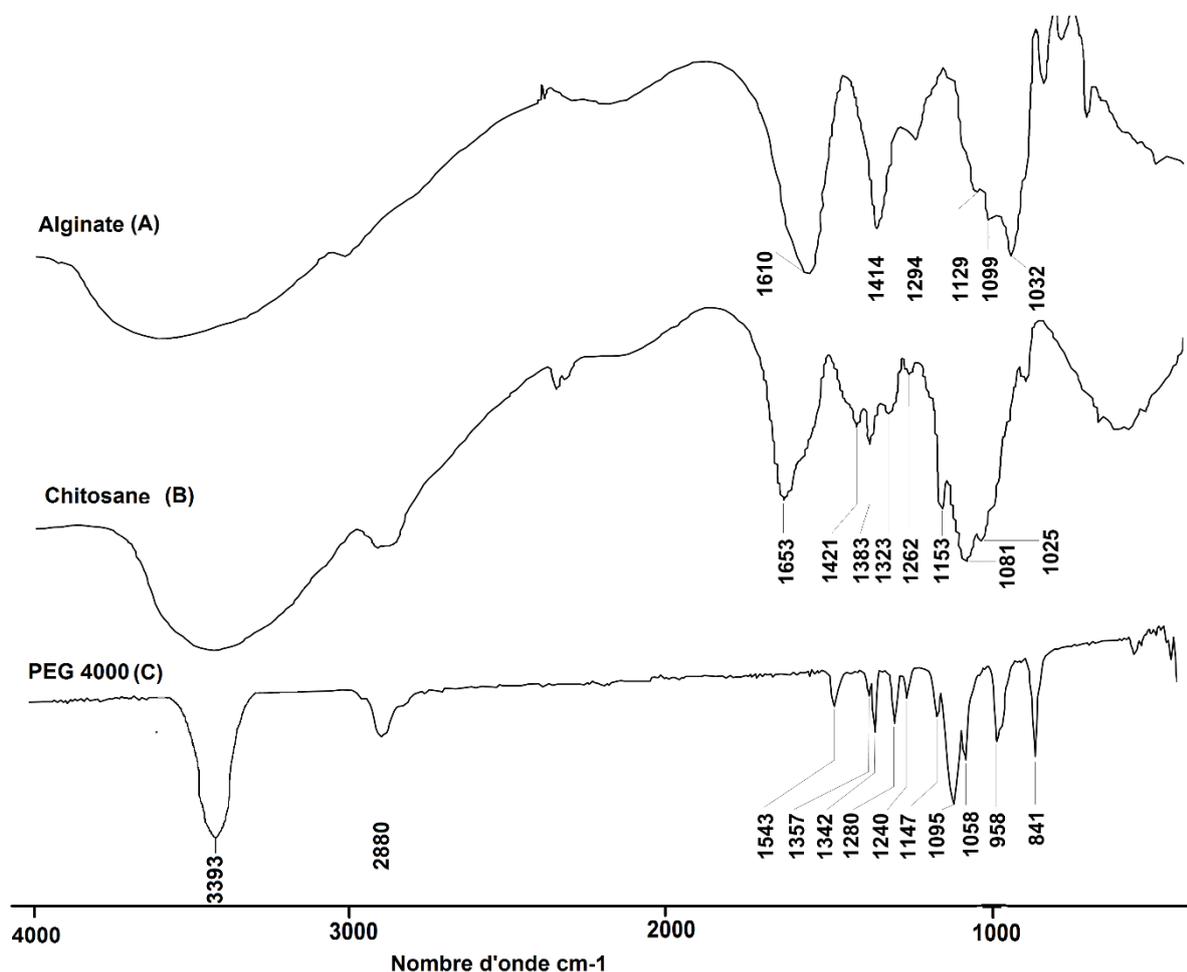


Figure 6.5 : Spectres FTIR des polymères utilisés.

En ce qui concerne l'alginate de sodium, les bandes caractéristiques d'absorption à 1610 et 1414 cm^{-1} représentent respectivement les vibrations d'élongation asymétriques et symétriques des anions carboxylate (Hadiya et al., 2021; Sarmiento et al., 2006a). La large bande à 3318 cm^{-1} est attribuée à l'élongation des groupements hydroxyles présents dans le squelette de l'alginate de sodium et à la liaison hydrogène (OH, -H), tandis que la bande à 2928 cm^{-1} est affecté à l'élongation — CH_2 (Derkach et al., 2019).

Le spectre infrarouge du chitosane fait apparaître la bande d'absorption à 3328 cm^{-1} attribuée aux vibrations d'élongation des — NH_2 et —OH. Le pic à 2917 cm^{-1} est dû aux vibrations d'élongation de la liaison C—H aliphatique. Il apparait également sur le spectre deux pics d'absorption d'intensité moyenne à 1653 cm^{-1} et 1556 cm^{-1} qui correspondent à l'élongation de la double liaison C=O des amides et à la déformation angulaire (cisaillement) de la liaison N—H des amines, respectivement (Xu et al., 2019).

Selon (Mohammadpour et al., 2019 ; Serrero et al., 2010), ces pics à 1653 et 1556 cm^{-1} sont les plus caractéristiques du chitosane. Ils sont aussi attribués aux vibrations de déformation NH_3^+ . Les deux absorptions autour 1153 cm^{-1} et 1081 cm^{-1} correspondent à la vibration d'élongation des groupements latéraux et à la bande glucosidique C–O–C du chitosane (Hadiya et al., 2021 ; Maity et al., 2017).

Le spectre FTIR du PEG 4000 présente la bande d'absorption caractéristique à 1543 cm^{-1} , attribuées aux vibrations de cisaillement des $-\text{CH}_2$. Une large bande à 2888 cm^{-1} , est attribuée à la chaîne alkyle (CH) du polymère; les bandes à 1357 et 1342 cm^{-1} sont dues respectivement aux vibrations de flexion C–H. Les bandes d'absorption de 1280 à 1147 cm^{-1} et 1095 cm^{-1} représentent respectivement les vibrations d'élongation asymétriques et symétriques des C–O–C de la liaison éther alcoolique O–H et C–O–C, tandis que la large bande à 3393 cm^{-1} est attribuée à l'élongation des groupements hydroxyles (Ahmad et al., 2011).

Le graphique des spectres FTIR de l'insuline pure et des nanoparticules furtives préparées par les deux techniques d'encapsulation étudiées (Figure 6.6) montre :

- Pour l'insuline ; les bandes d'absorptions caractéristiques se présentent à 1656 cm^{-1} et 1547 cm^{-1} correspondants aux vibrations des liaisons amide I et amide II (Hadiya et al., 2021; Sarmiento et al., 2006a).
- Le spectre FTIR des nanoparticules furtives (NPf-GI, NPf-EM) montre des changements dans l'emplacement de certaines bandes d'absorption, et l'apparition ou la disparition de nouveaux pics en comparaison à l'alginate ou au chitosane et PEG seuls.

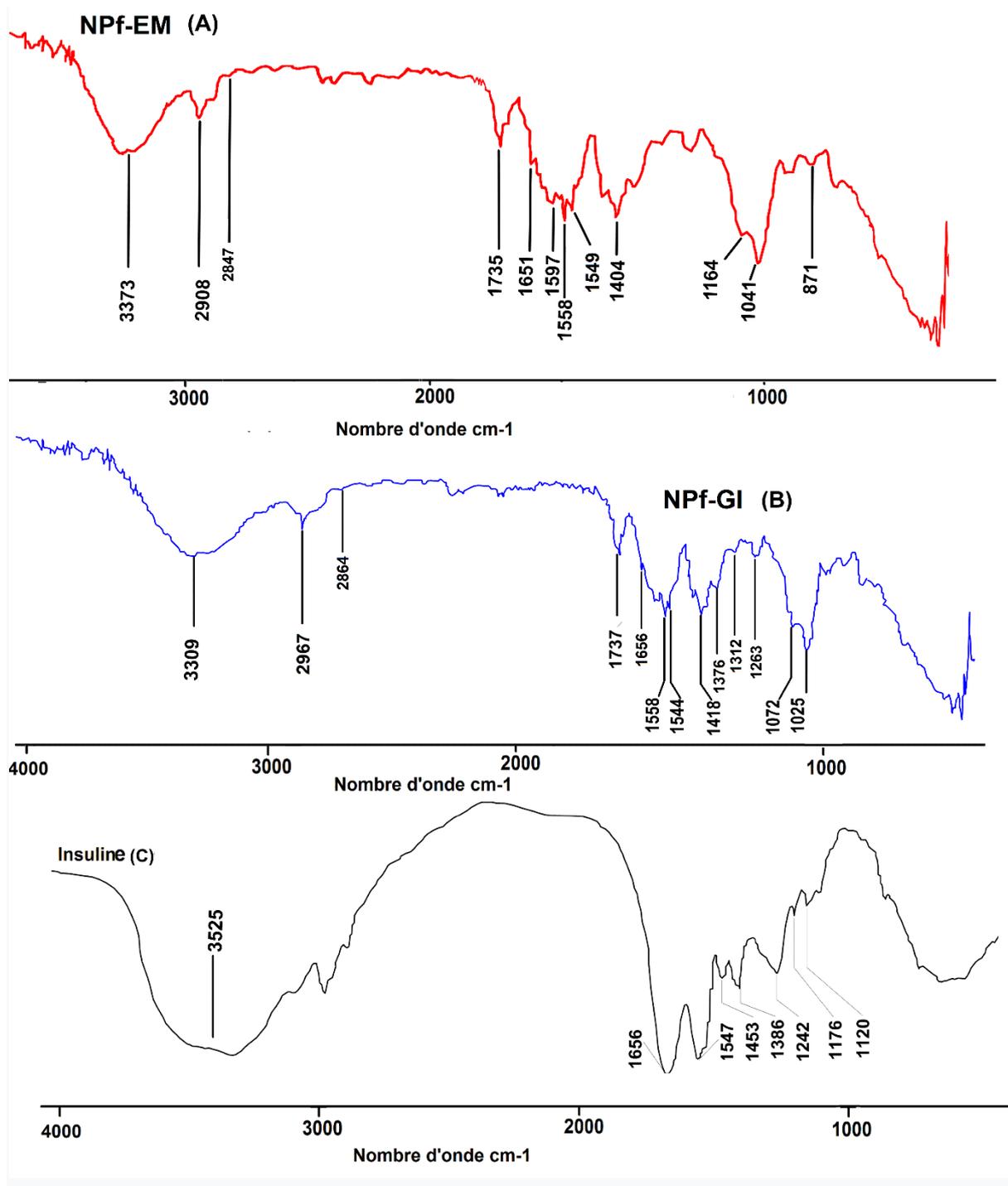


Figure 6.6 : Spectres FTIR de l'insuline pure (C) et des nanoparticules furtives encapsulant l'insuline, préparé par EM (A : Npf-EM) et GI (B : NPf-GI)

Des nouvelles bandes apparaissent en raison de la présence de PEG, comme les bandes autour de 2887, 1376 et 1263 cm⁻¹ pour les NPsf-GI. Les bandes autour de 2885, 1372 et 1298 cm⁻¹ pour les NPsF-EM correspondant respectivement aux vibrations d'étirement C–H, à la flexion C–H et à l'étirement C–O vibration. Toutes ces bandes sont décalées de leur position

d'origine dans le PEG, présentant une liaison hydrogène nature et confirmant l'interaction du PEG avec la surface des nanoparticules que ce soit le procédé d'encapsulation utilisé (León et al., 2017).

D'autre part, les changements observés dans la bande d'absorption d'OH peuvent être supposés comme une interaction possible qui se produirait entre les groupes OH des nanoparticules et OH du PEG, ainsi qu'entre les groupes OH et le carboxyle de l'alginate ou les groupes amines du chitosane (Andreani et al., 2014c ; Zhang et al., 2008).

Enfin, une bande indicative de l'amide I à 1558 cm^{-1} a été observée pour les NPsf-GI et les NPsF-EM. D'autre part, une bande indicative de l'amide II a été distinguée à 1658 cm^{-1} et 1651 cm^{-1} pour les NPsf-GI et NPsF-EM, respectivement. Ceci, se caractérise par la présence de contenu hélicoïdal, notamment l'insuline. Ainsi l'apparition de ces deux bandes caractéristiques de la protéine (amide I et amide II) dans le spectre de ces nanodispersions formulées par GI et EM est dus au fait que le monomère d'insuline contient six résidus capables d'attacher la charge positive et dix capables d'attacher une charge négative, ces propriétés lui confèrent la possibilité d'être encapsulé par la matrice Alginate/Chitosane (Sarmiento et al., 2006a). Ces résultats suggèrent une interaction efficace entre le PEG et les polymères polysaccharidiques.

6.4. Étude de libération de l'insuline en milieux simulés

Les nanoparticules furtives et non furtives obtenues par les deux techniques d'encapsulation utilisées ont été étudiées *in vitro*. Leurs comportements en milieu gastrique simulé (tampon pH 1,2) et intestinal simulé (tampon phosphate à pH 6,8 et pH 7,4) et leur capacité de relargage de l'insuline ont été étudiés dans ces conditions physiologiques simulées durant 2h, 6h et 24h, respectivement, selon le temps de transit dans le tractus gastro-intestinal.

D'après les profils de dissolution (Figures 6.7 aux 6.12), il est à noter que la libération *in vitro* de l'insuline à partir de nanoparticules furtives et non furtives présente dans tous les cas, un profil caractérisé par une libération initiale importante, suivie d'une libération plus ou moins progressive, mais incomplète atteignant un plateau en fin d'expérimentation. Cette libération initiale rapide est expliquée par la libération facile de l'insuline potentiellement adsorbée en surface des nanoparticules. Des résultats similaires ont montré la présence d'un « burst release », immédiatement après mise en contact des nanoparticules avec le milieu gastrique et intestinal simulé (Callet, 2010; Mumuni et al., 2020).

Également, dans le milieu gastrique simulé (pH 1,2), tous les profils de libération présentent la même allure, une faible cinétique et un faible taux de libération de l'insuline (taux de libération < 40%). En effet, seulement 33% et 27% du principe actif encapsulé sont libérés, respectivement à partir des nanoparticules non furtives et furtives préparées par gélation ionotrope, alors qu'au bout de 2 h, 22,7 % et 12,1% du principe actif encapsulé sont libérés, respectivement à partir des nanoparticules non furtives et furtives préparées par double émulsion (Figures 6.7 et 6.8).

La faible quantité d'insuline libérée dans tous les essais pourrait être expliquée par le rétrécissement des nanoparticules à base d'alginate/chitosane et celles à base d'alginate / chitosane / PEG dans le milieu acide, permettant un arrangement moléculaire plus compact. En conséquence, une bonne protection de l'insuline du pH acide gastrique (Maity et al., 2017).

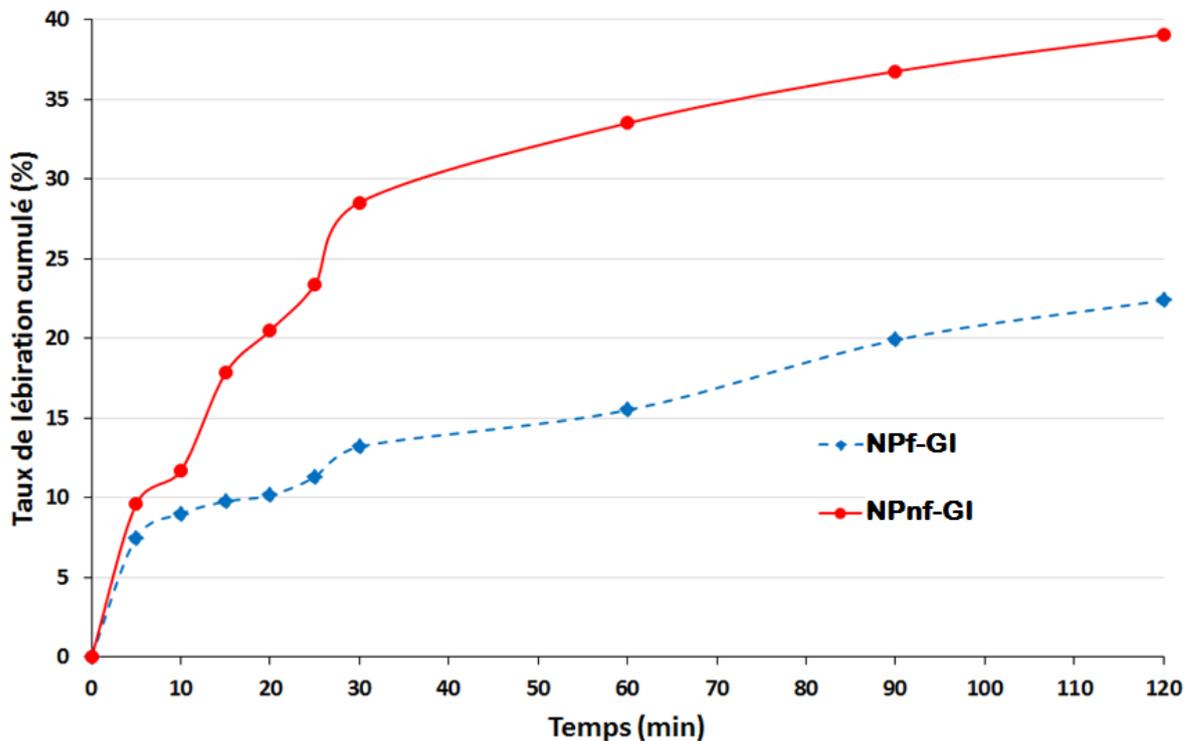


Figure 6.7 : Profil de dissolution des nanoparticules furtives (NPf-GI) et non furtives (NPnf-GI) préparées par GI à pH 1,2

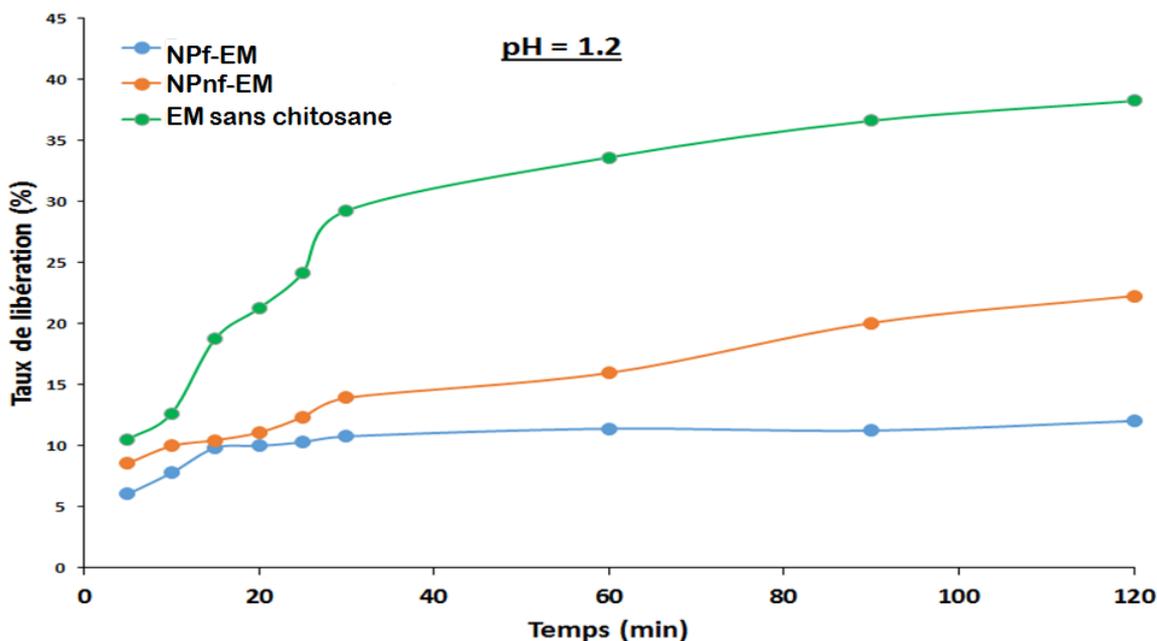


Figure 6.8 : Profil de dissolution de l'émulsion multiple à pH 1,2 : Nanoparticules furtives (NPf-EM), Nanoparticules non furtives (NPnf-EM) et EM sans chitosane

De plus, à pH 1,2, il apparaît que le taux de libération de l'insuline à partir des nanoparticules non furtives est plus élevé (33%, 22.7%) par rapport aux nanoparticules furtives (27% ; 12,1%). Ceci confirme que le recouvrement des nanoparticules avec du PEG 4000 provoque une diminution du taux de libération de l'insuline dans le milieu acide, cela est dû à l'augmentation de l'épaisseur de la couche d'enrobage polymérique qui empêche la diffusion facile de l'insuline. Cette observation est en accord avec les résultats obtenus par (Sorasitthyanukarn et al., 2020).

D'autre part, dans le milieu intestinal simulé (pH 6,8), tous les profils de libération présentent un taux de libération de l'insuline élevé par rapport au milieu acide avec une cinétique de libération lente, et avec des profils de libération différents (Figures 6.9 et 6.10). En outre, il est évident de noter que la libération de l'insuline à partir des nanoparticules soit, furtives et non furtives est incomplète. Au pH 6,8, l'acide alginique a été converti en un sel soluble d'alginate de sodium. En revanche, il ne s'est pas produit de libération rapide ou complète d'insuline, ceci est dû principalement au fait que le chitosane dans les nanoparticules était insoluble dans des conditions faiblement alcalines qui fournissaient une barrière physique supplémentaire (Mohammad et al., 2019 ; Wong et al., 2020 ; Zohri et al., 2020).

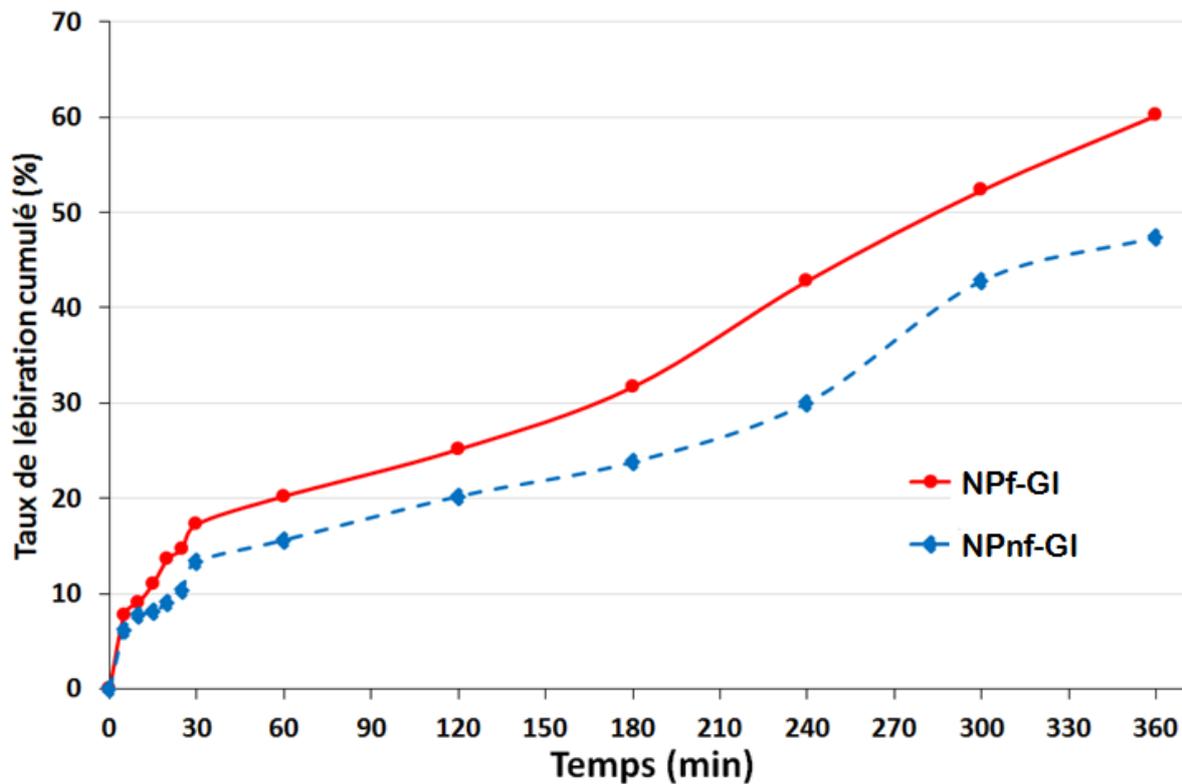


Figure 6.9 : Profil de dissolution des nanoparticules furtives (NPf-GI) et non furtives (NPnf-GI) préparées par GI à pH 6,8

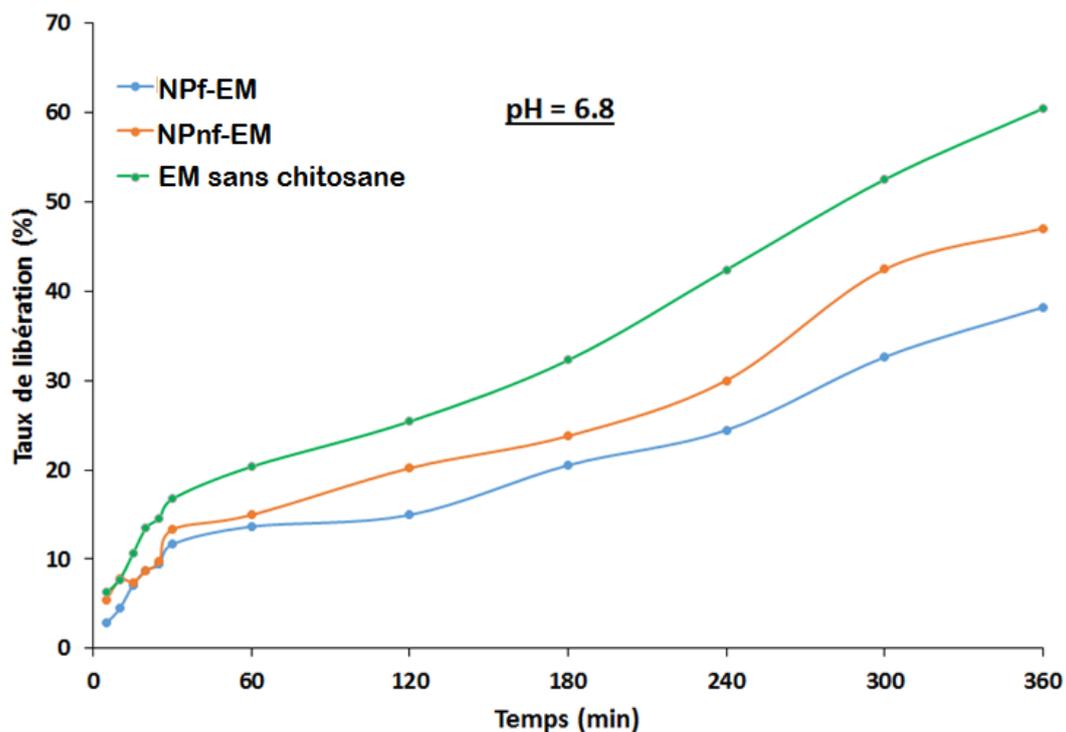


Figure 6.10 : Profil de dissolution de l'émulsion multiple à pH 6,8 : Nanoparticules furtives (NPf-EM), Nanoparticules non furtives (NPnf-EM) et EM sans chitosane

Également, en comparant les profils de dissolution dans le milieu intestinal simulé (pH 6,8), il a été constaté aussi que le taux de libération de l'insuline à partir des NPs non

furtives et furtives préparées par double émulsion est plus faible (47,7% ; 39,9%) par rapport aux essais préparés par GI (50,42% ; 64,45%) respectivement. Ceci peut être dû à la différence d'efficacité d'encapsulation étant donné que les NPs furtives préparés par double émulsion ont montré le plus haut taux d'efficacité d'encapsulation de l'insuline (Tableau 6.1), ainsi de la différence de la taille entre les différentes formules, des résultats antérieurs ont rapporté que ces propriétés semblent être un paramètre clé dans la modification de la cinétique de libération de l'insuline (Bakhaidar et al., 2019 ; Bohrey et al., 2016).

D'autre part, il est judicieux de déduire que ces nanoparticules, de par leur technique d'obtention (double émulsion), présentent la présence de l'huile, deux tensioactifs non ioniques plus difficilement dégradables, peut engendrer une barrière contre la libération de l'insuline ce qui veut dire que l'insuline au sein des globule de l'EM était difficile à diffuser à travers les pores, en conséquence le taux de libération a été significativement réduit. (Sarheed et al., 2021 ; Wen et al., 2017).

À pH 7,4, une importante libération et une libération totale ont été observées pour les différentes formulations (Figures 6.11 et 6.12). Ceci peut être expliqué par la solubilisation complète du chitosane dans le milieu de libération à ce pH. Cependant, à pH 6,8, quelques portions du groupe amine primaire du chitosane peuvent encore être protonées et conservées leur charge positive, attirant ainsi l'insuline chargée négativement et ralentissant sa libération (Venkata Siddhartha et al., 2014b).

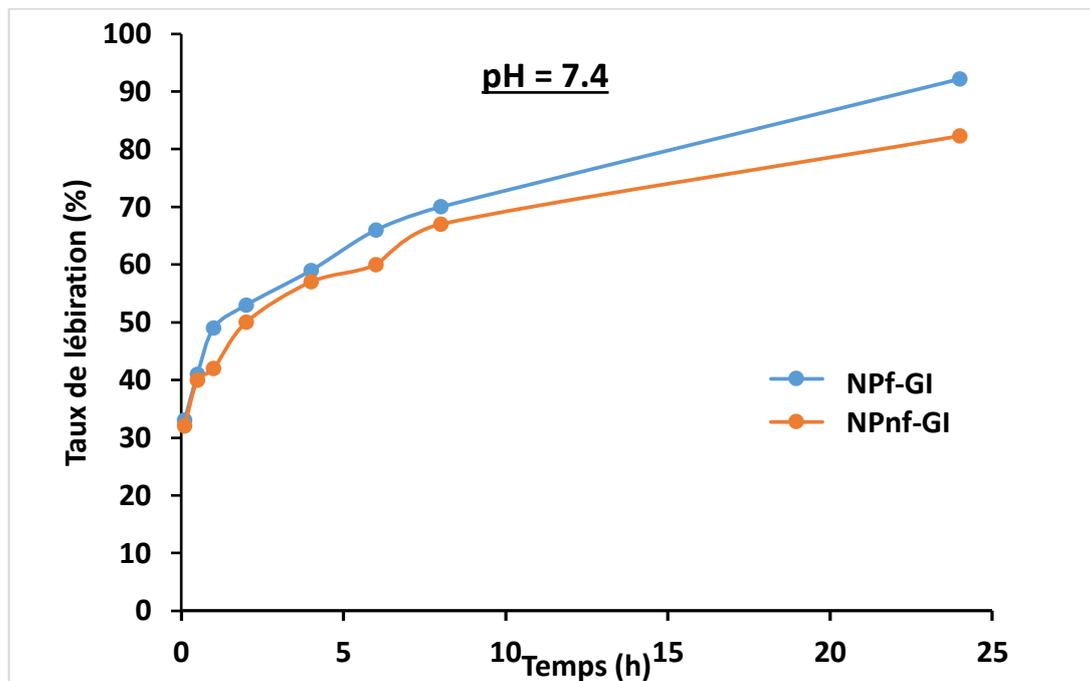


Figure 6.11 : Profil de dissolution des nanoparticules furtives (NPf-GI) et non furtives (NPnf-GI) préparées par GI à pH 7,4

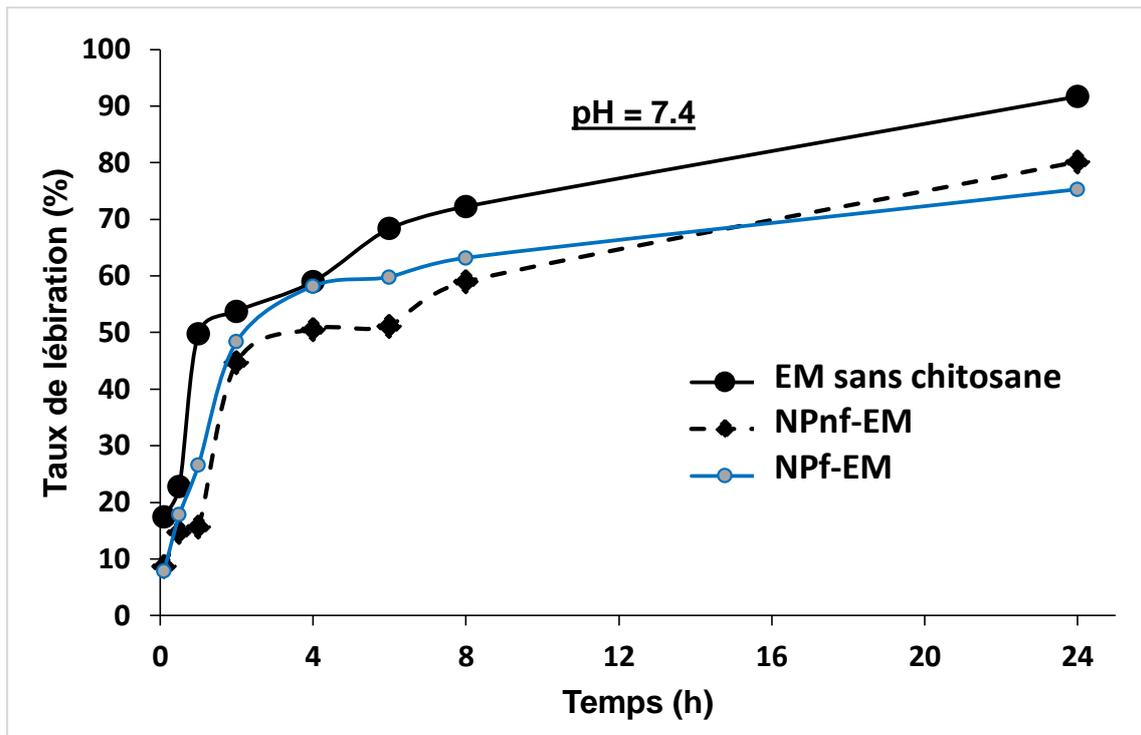


Figure 6.12 Profil de dissolution des nanoparticules préparées par émulsion multiple à pH 7,4 : EM sans chitosane ; des nanoparticules furtives (NPf-EM); des nanoparticules non furtives (NPnf-EM)

6.5. Modélisation de la cinétique de libération du principe actif

Afin d'élucider les mécanismes contrôlant la libération de l'insuline à partir des formulations réalisées, les résultats quantitatifs de libération du principe actif obtenus dans les conditions simulant l'intestin grêle (tampon phosphate pH6,8 et pH7,4) sont simulés sous forme mathématique. Les différentes équations mathématiques relatives aux modèles suscités sont représentées dans le tableau 6.2.

Tableau 6.2 : Paramètres de la modélisation du profil de dissolution (Abdelkader et al., 2018a ; Siepmann et Peppas, 2012)

Modèles	Équation	Paramètres caractéristiques
Modèle de cinétique de libération d'ordre zéro	$\frac{M_t}{M_\infty} = Q_0 + K_0 t$	K_0 : Constante de vitesse Q_0 : la masse du PA dans le véhicule à temps zéro
Modèle de cinétique de libération de premier ordre	$\ln\left[1 - \frac{M_t}{M_\infty}\right] = k_1 t$	K_1 : Constante de vitesse
Modèle d' <i>Higuchi</i>	$\frac{M_t}{M_\infty} = K_h t^{0.5}$	K_h : Constante de vitesse
Modèle d' <i>Higuchi</i> modifié ou loi puissance (<i>Korsmeyer-Peppas</i>)	$\frac{M_t}{M_\infty} = K_p t^n$	K_p : Constante incorporant les propriétés macromoléculaires des systèmes polymériques et celles du médicament.
Modèle de <i>Peppas-Sahlin</i>	$Q_t = k_1 t^m + k_2 t^{2m}$	k_1 : Constante liée à la cinétique Fickienne k_2 : Constante liée à la cinétique de relaxation du Cas II, m : is the diffusional exponent
Modèle de <i>Weibull</i>	$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - e^{-\alpha t^\beta}$	α : facteur de temps. β : Paramètre de qualité permettant de modéliser l'évolution

où :

Q: Fraction du médicament dégagé à un temps t.

Mt : La quantité du principe actif libérée au temps t (%).

M ∞ : La quantité totale du principe actif dans le véhicule.

t : Le temps du prélèvement

n : La valeur numérique de « n », l'exposant de libération, est utilisée afin de caractériser les différents mécanismes de libération. Pour les sphères, généralement si :

- $0.43 < n < 0.85$; généralement la dissolution de la matrice polymérique due à la relaxation de la chaîne de polymère et le transport anormal (non Fickien) ;
- $n < 0.45$; indique une diffusion Fickienne ;
- Pour $n > 0.85$; le mécanisme est relié à une diffusion couplée à une érosion ou à des phénomènes d'hydratation et gonflement de matrices polymériques (George et al., 2020).

Chaque modèle est appliqué à l'ensemble des résultats expérimentaux traduisant le pourcentage cumulé de PA, contenu dans les nanoparticules furtives et non furtives, à l'aide du logiciel « DDSOLVAR » en utilisant le module « estimation non linéaire ». Le choix du meilleur modèle est basé sur la valeur de R^2 , coefficient de corrélation obtenu par traçage des résultats expérimentaux selon les équations correspondantes aux modèles étudiés.

Les valeurs obtenues des coefficients de corrélation R^2 pour tous les modèles, ainsi que n , exposant caractéristique du modèle de *Korshmeier-Peppas* sont rassemblés dans le tableau 6.3.

En analysant les résultats (tableau 6.3), il a été constaté que, pour aucune des formulations testées, le modèle mathématique d'ordre zéro, de premier ordre et le modèle d'Higuchi ne peuvent être considérés comme acceptables ($R^2 < 0,90$). Le modèle qui décrit le mieux les profils de libération de l'insuline à travers la barrière gastro-résistante furtive et non furtive dans le plus part des cas est le modèle de *Peppas-Sahlin* (loi de puissance), suivi par les modèles de *Weibull* et *Korsmeyer-Peppas*.

D'autre part, les valeurs de « n » obtenues pour les nanoparticules non furtives préparées par GI et EM sont toutes inférieures à 0,45, soit à pH 6,8 ou pH 7,4, ce qui induit que le mécanisme dans ce cas-là est caractérisé comme quasi-Fickien. En revanche, les valeurs de « n » obtenues pour les nanoparticules furtives préparées par les deux techniques étudiées (GI et EM) sont supérieures à 0,45, soit à pH 6,8 ou pH 7,4, Ceci permet de conclure que leurs profils de dissolution se convergent vers un mécanisme de libération autre que la diffusion du principe actif dissous à travers la matrice des nanoparticules furtives. En effet, le mécanisme de libération de l'insuline à partir de forme des systèmes nanodispersés recouverts avec du PEG 4000 formulés est une combinaison de diffusion et d'érosion de la matrice polymérique. La dégradation du polymère et l'érosion de la particule entraînent une libération plus tardive (Horprasertkij et al., 2019 ; Paul et al., 2013).

Tableau 6.3 : Paramètres cinétiques des modèles obtenus (pour la désignation des paramètres voir Tableau 6.2)

Modèle	Paramètres du modèle	pH = 6.8				pH = 7.4			
		NP.NF-GI	NP.F-GI	NP.NF-EM	NP.F-EM	NP.NF-GI	NP.F-GI	NP.NF-EM	NP.F-EM
D'ordre zéro	R ² ajusté	0.060	0.650	0.853	0.817	-1.009	-1.195	-0.359	0.229
	K	0.168	0.143	0.139	0.112	5.139	4.682	5.158	4.328
1^{er} ordre	R ² ajusté	0.514	0.832	0.880	0.845	0.416	0.280	0.767	0.838
	K	0.003	0.002	0.002	0.001	0.281	0.228	0.274	0.142
Higuchi	R ² ajusté	0.931	0.983	0.950	0.952	0.436	0.354	0.7046	0.881
	K	3.141	2.692	2.203	1.781	23.961	22.035	23.827	19.240
Korsmeyer-Peppas	R ² ajusté	0.992	0.984	0.952	0.950	0.9915	0.993	0.956	0.934
	K	5.852	3.274	1.524	1.467	47.206	44.519	40.861	26.597
	n	0.385	0.465	0.569	0.537	0.199	0.187	0.267	0.363
Peppas-Sahlin	R ² ajusté	0.991	0.982	0.957	0.953	0.983	0.984	0.9359	0.9265
	K ₁	6.307	2.761	1.845	1.716	32.824	30.311	45.831	26.711
	K ₂	0.421	-0.018	0.131	0.121	14.220	14.079	-5.566	-2.230
	m	0.313	0.521	0.431	0.513	0.149	0.539	0.380	0.541
Weibull	R ² ajusté	0.988	0.987	0.954	0.939	0.962	0.975	0.9632	0.948
	α	36.482	82.285	7778.731	708.228	1.517	1.662	1.917	3.432
	β	0.577	0.687	1.391	0.963	0.312	0.282	0.457	0.551
	Ti	-13.149	-16.146	-89.459	-40.100	0.000	0.000	0.004	0.021

6.6. Suivi de la stabilité de la formulation optimale

Les nanoparticules furtives des essais optimaux obtenues par le biais des deux procédés d'encapsulation étudiés ont été conservées à $4\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, afin d'évaluer leur stabilité dans le temps. La stabilité des différentes dispersions a été suivie à des intervalles de temps réguliers à travers l'observation microscopique, les analyses granulométriques, potentiel zêta et du taux d'efficacité d'encapsulation.

6.6.1. Analyse morphologique

L'observation visuelle des dispersions montre qu'il n'y a pas eu d'agrégation après 6 semaines de conservation. Cette observation visuelle est confirmée par microscopie optique (Figures 6.13 et 6.14), ainsi que la mesure de la distribution de taille par DLS, du potentiel zêta et du taux d'encapsulation (Figure 6.15).

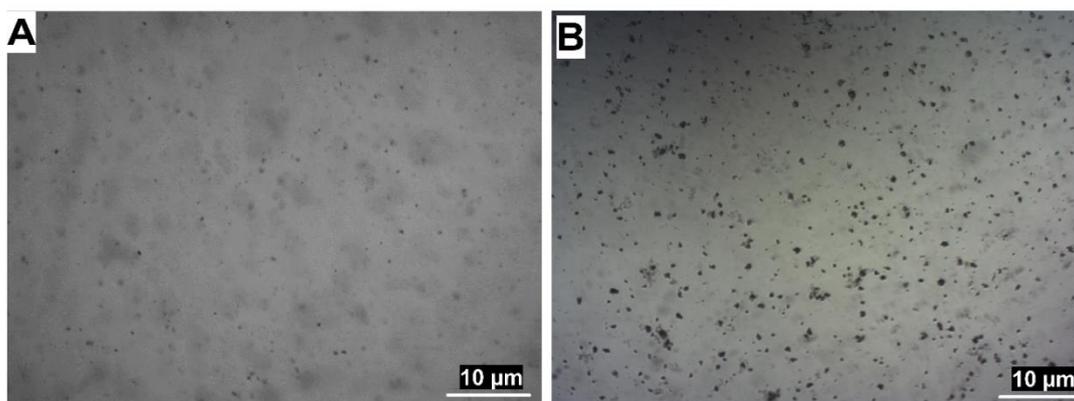


Figure 6.13 : Observations en microscopie optique des nanoparticules d'insuline furtives obtenues par GI : A – état initial ; B–après 45 jours de conservation à 4 °C

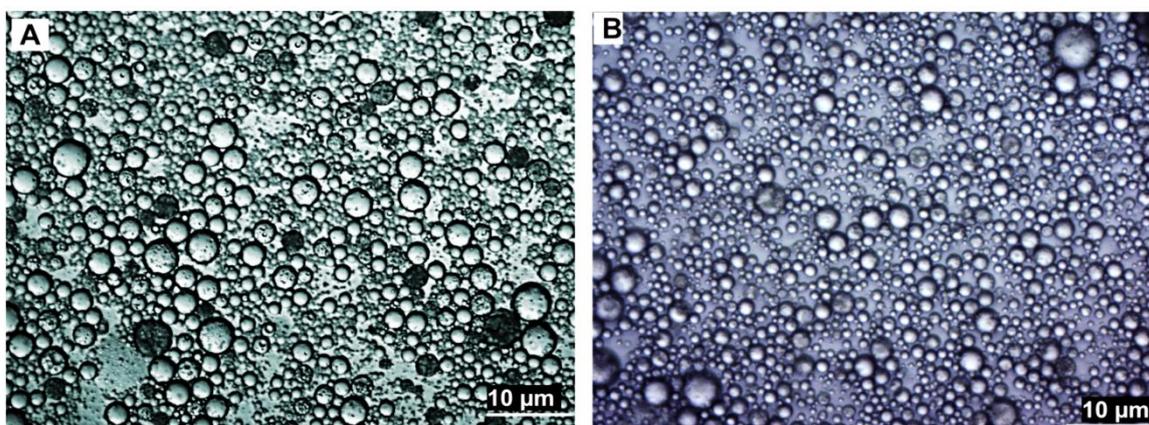


Figure 6.14 : Observations en microscopie optique des nanoparticules d'insuline non furtives obtenues par émulsion multiple : A – état initial ; B– après 45 jours de conservation à 4 °C

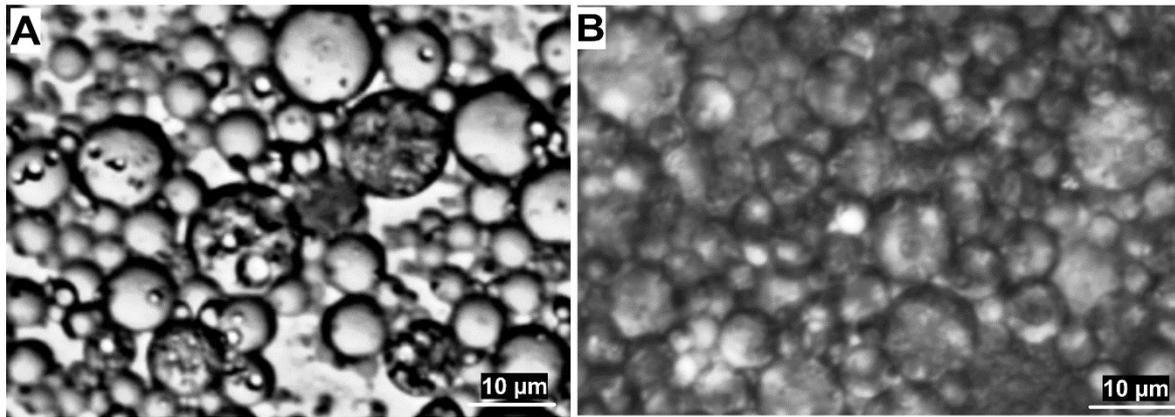


Figure 6.15 : Observations en microscopie optique des particules d'insuline furtives obtenues par émulsion multiple : A – état initial ; B– après 45 jours de conservation à 4 °C

6.6.2. Suivi granulométrique, du potentiel zêta et taux d'efficacité d'encapsulation

D'après l'étude de stabilité, il a été constaté que la formulation optimale conserve le même aspect homogène avec une légère variation de la taille des particules, du potentiel zêta et du taux d'efficacité d'encapsulation, quelque ce soit le procédé d'encapsulation utilisé (Figure 6.12). Ce qui confirme que lorsque les nanoparticules sont conservées à 4 °C, leur stabilité physique est au moins de 45 jours. Par contre, il a été démontré dans la littérature que la stabilité des nanoparticules à long terme peut être améliorée par la lyophilisation (Eliyahu et al., 2020 ; Fonte et al., 2016).

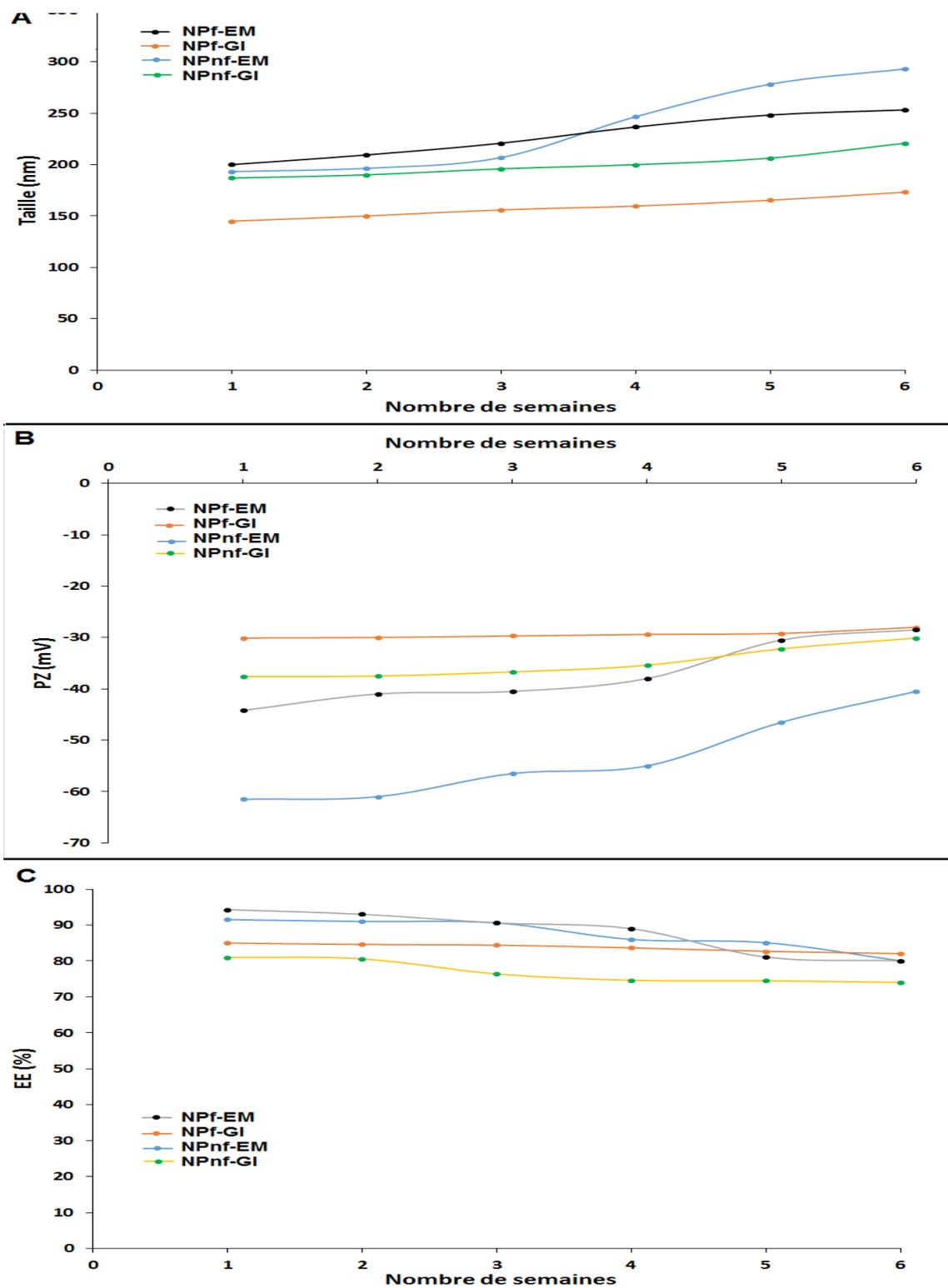


Figure 6.16 : Évolution du diamètre moyen, potentiel zêta et taux d'efficacité d'encapsulation des nanoparticules furtives (NPf) et non furtives (NPnf) préparées par EM et GI durant le stockage à $+4\pm 2$ °C

6.7. Conclusion

Afin de développer une formulation optimale des nanoparticules furtives encapsulant l'insuline, en vue d'une administration par voie orale, une étude comparative a été effectuée entre différentes formulations préparées dans les conditions optimales des différents procédés d'encapsulation optimisés (GI, et EM).

L'étude comparative des profils de dissolution a confirmé la protection du principe actif dans le milieu gastrique (taux de libération < 40%) et la libération prolongée dans le milieu intestinal. D'autre part. Les résultats obtenus montrent l'influence de recouvrement de la surface des dispersions formulées par le PEG 4000 sur la modification des profils de dissolution, traduite par la diminution du taux de libération de l'insuline à travers les NPs-furtives par rapport aux NPs non furtives, et ce dans le milieu gastrique simulé de 33% à 27% pour NP-GI, de 22,7% à 12,1% pour NP-EM avec une libération tardive dans le milieu intestinal simulé provoquée par le ralentissement de la diffusion de l'insuline vers le milieu environnant.

La double encapsulation par émulsification (EM) a montré un grand potentiel dans le développement des nanoparticules furtives, contenant également le plus haut taux d'encapsulation de l'insuline, le plus faible taux de libération dans le milieu gastrique simulé et le profil de libération le plus lent dans le milieu intestinal simulé.

Les résultats d'analyse thermique (ATG et DSC) obtenus ont montré une corrélation intéressante avec les résultats obtenus par FTIR. En effet, les nanoparticules préparées ont permis ainsi de montrer la conservation de la structure du principe actif après son encapsulation, en déduisant une interaction efficace entre le PEG et le complexe polysaccharidique, tout en améliorant le taux d'encapsulation de l'insuline. Ainsi, l'étude de stabilité a montré que les différents systèmes mis au point se caractérisent par une grande stabilité dans le temps, de 45 jours.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Face aux contraintes liées à l'administration de l'insuline par voie orale, l'encapsulation de cette protéine dans un vecteur polymérique gastro-résistant devient de plus en plus promoteurs. Dans cet axe, l'objectif de ce travail de thèse était de préparer des nanoparticules furtives susceptibles de protéger l'insuline et contrôler son profil de libération, en vue de son administration par voie orale. Notre hypothèse était d'utiliser une matrice polymérique naturelle (alginate/chitosane) et d'intégrer le PEG 4000 à la surface des particules comme agent de furtivité. Ce dernier peut se fixer de façon électrostatique à la surface des nanoparticules polymériques et ainsi former une barrière stérique hydrophile capable de limiter la fixation des opsonines et donc la dégradation des nanoparticules et de leur principe actif.

Afin de s'affranchir de l'utilisation de solvants et d'additifs, le choix s'est porté sur deux techniques d'encapsulation permettant la formation des nanoparticules, dans des conditions aqueuses douces, non dénaturantes pour les principes actifs protéiques comme l'insuline à savoir : la gélation ionotropique et la double émulsion.

Dans le but de développer les conditions optimales de formation des nanoparticules caractérisées par une taille minimale avec une charge de surface maximale et une efficacité d'encapsulation maximale, la méthodologie des plans d'expériences a été optée. Dans un premier temps, une étude de criblage a été effectuée conduisant à l'évaluation de l'influence des facteurs étudiés sur les caractéristiques des particules obtenus via les deux techniques d'encapsulation. Après, une étude d'optimisation par la méthodologie de la surface de réponse en accord avec le plan de Box-Behnken, a permis de déterminer le modèle mathématique adéquat de la modélisation de la formulation des nanoparticules furtives par les deux procédés d'encapsulation. Dans chaque technique utilisée, les différents modèles obtenus sont significatifs avec une valeur de $p < 0,05$ et $R^2 > 90\%$ pour les trois réponses.

La technique de la gélation ionotropique utilisée a permis la formation de nanoparticules de diamètre moyen avoisinant les 145 nm, présentant une charge de surface négative (-30 mV) et contenant une quantité d'insuline équivalente à 85% de la quantité initialement introduite. Cette formulation optimale a été obtenue en utilisant une vitesse d'agitation de 1636,36 rpm durant 45 min d'homogénéisation et avec une concentration en PEG 4000 de 0.17% m/V.

Concernant les nanoparticules obtenues par double émulsion, deux types de tensioactifs non ioniques Span 80 et Tween 80 ont été utilisés. Leur formulation optimale a été observée pour une fraction volumique de la phase aqueuse interne de 40%, une concentration de Span 80 de 15% et une concentration de Tween 80 de 3%, conduisant à une taille des particules de 193.3 nm avec une charge de surface fortement négative (-44.2mV) et une efficacité d'encapsulation supérieure de 94 %.

Une étude comparative des profils de dissolution a permis l'évaluation des formulations optimales des deux procédés de fabrication des nanoparticules utilisées. En effet, l'étude de la cinétique de libération *in vitro* de l'insuline, a confirmé la protection du principe actif dans le milieu gastrique simulé (taux de libération < 40%) et la libération prolongée dans le milieu intestinal simulé. En plus, le procédé de l'encapsulation de l'insuline par double émulsion a montré un grand potentiel dans le développement des nanoparticules furtives, contenant le plus haut taux d'encapsulation de l'insuline, le plus faible taux de libération dans le milieu gastrique simulé (12.1%) et le plus lent dans le milieu intestinal simulé(47.7%) au bout de 6 heures, comparativement à la gélation ionotropique.

D'autre part, le caractère de furtivité a été mis en évidence par le ralentissement de la cinétique de libération de l'insuline *in vitro* des formulations de nanoparticules furtives, comparativement à des nanoparticules simples (non furtives).

Ces nanoparticules ont montré une excellente stabilité dans le temps (45 jours à 4 °C) en terme de taille et de charge de surface, et elles ne libèrent pas d'insuline dans leur milieu de complexation.

Les résultats d'analyse thermique (ATG et DSC) ont montré une corrélation intéressante avec les résultats obtenus par FTIR. En effet, les nanoparticules préparées ont permis ainsi de montrer la conservation de la structure du principe actif après son encapsulation dans les nanoparticules greffées par un composé hydrophile (PEG), en déduisant une interaction efficace entre le PEG et le complexe polysaccharidique.

En conclusion, les résultats obtenus permettent de valider le critère d'une formulation gastro-résistante et furtive via le recouvrement de la surface des particules par du PEG 4000. Ce qui rend les techniques d'encapsulation par la gélation ionotropique et la double encapsulation par émulsion multiple des techniques efficaces pour la protection d'insuline tout en assurant le contrôle de sa cinétique de libération.

Une étude portant sur la variation d'autres paramètres est à envisager notamment des masses molaires variables des deux polysaccharides, ainsi de PEG afin de concevoir leur influence sur la complexation et le comportement *in vitro* des nanoparticules obtenues. Vu les résultats positifs obtenus, ce travail devrait être poursuivi, approfondi et complété par des essais chez l'animal afin d'ouvrir des horizons à une éventuelle mise au point d'une formulation médicamenteuse pour la voie orale

BIBLIOGRAPHIE

- Abdelkader, D.H., El-Gizawy, S.A., Faheem, A.M., McCarron, P.A., Osman, M.A., 2018a. Effect of process variables on formulation, in-vitro characterisation and subcutaneous delivery of insulin PLGA nanoparticles: an optimisation study. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 43, 160–171.
- Abdelkader, D.H., Tambuwala, M.M., Mitchell, C.A., Osman, M.A., El-Gizawy, S.A., Faheem, A.M., El-Tanani, M., McCarron, P.A., 2018b. Enhanced cutaneous wound healing in rats following topical delivery of insulin-loaded nanoparticles embedded in poly (vinyl alcohol)-borate hydrogels. *Drug delivery and translational research* 8, 1053–1065.
- Abu-Jdayil, B., Fara, D.A., 2013. Modification of the rheological behaviour of sodium alginate by chitosan and multivalent electrolytes. *Italian Journal of Food Science* 25, 196.
- Adebileje, T., Valizadeh, A., Amani, A., 2017. Effect of formulation parameters on the size of PLGA nanoparticles encapsulating bovine serum albumin: a response surface methodology. *Journal of Contemporary Medical Sciences* 3.
- Aderibigbe, B.A., Buyana, B., 2018. Alginate in wound dressings. *Pharmaceutics* 10, 42.
- Agarwal, V., Reddy, I.K., Khan, M.A., 2001. Polymethacrylate based microparticulates of insulin for oral delivery: Preparation and *in vitro* dissolution stability in the presence of enzyme inhibitors. *International journal of pharmaceutics* 225, 31–39.
- Ahmad, M.B., Tay, M.Y., Shameli, K., Hussein, M.Z., Lim, J.J., 2011. Green synthesis and characterization of silver/chitosan/polyethylene glycol nanocomposites without any reducing agent. *International journal of molecular sciences* 12, 4872–4884.
- Allouche, J., Tyrode, E., Sadtler, V., Choplin, L., Salager, J.-L., 2003. Single-and Two-Step Emulsification To Prepare a Persistent Multiple Emulsion with a Surfactant- Polymer Mixture. *Industrial & engineering chemistry research* 42, 3982–3988.
- Andreani, T., de Souza, A.L.R., Kiill, C.P., Lorenzón, E.N., Figueiro, J.F., Calpena, A.C., Chaud, M.V., Garcia, M.L., Gremião, M.P.D., Silva, A.M., 2014a. Preparation and characterization of PEG-coated silica nanoparticles for oral insulin delivery. *International journal of pharmaceutics* 473, 627–635.
- Andreani, T., de Souza, A.L.R., Kiill, C.P., Lorenzón, E.N., Figueiro, J.F., Calpena, A.C., Chaud, M.V., Garcia, M.L., Gremião, M.P.D., Silva, A.M., 2014b. Preparation and

- characterization of PEG-coated silica nanoparticles for oral insulin delivery. *International journal of pharmaceutics* 473, 627–635.
- Andreani, T., Kiill, C.P., de Souza, A.L.R., Fangueiro, J.F., Fernandes, L., Doktorovová, S., Santos, D.L., Garcia, M.L., Gremião, M.P.D., Souto, E.B., 2014c. Surface engineering of silica nanoparticles for oral insulin delivery: Characterization and cell toxicity studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 123, 916–923.
- Aserin, A., 2008. *Multiple emulsion: technology and applications*. John Wiley & Sons.
- Avadi, M.R., Sadeghi, A.M.M., Mohammadpour, N., Abedin, S., Atyabi, F., Dinarvand, R., Rafiee-Tehrani, M., 2010. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 6, 58–63.
- Azevedo, M.A., Bourbon, A.I., Vicente, A.A., Cerqueira, M.A., 2014. Alginate/chitosan nanoparticles for encapsulation and controlled release of vitamin B2. *International Journal of Biological Macromolecules* 71, 141–146. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.05.036>
- Bagre, A.P., Jain, K., Jain, N.K., 2013. Alginate coated chitosan core shell nanoparticles for oral delivery of enoxaparin: *in vitro* and *in vivo* assessment. *International journal of pharmaceutics* 456, 31–40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.08.037>
- Bakhaidar, R., Green, J., Alfahad, K., Samanani, S., Moollan, N., O'Neill, S., Ramtoola, Z., 2019. Effect of Size and Concentration of PLGA-PEG Nanoparticles on Activation and Aggregation of Washed Human Platelets. *Pharmaceutics* 11, 514. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11100514>
- Balcaen, M., Vermeir, L., Declerck, A., Van der Meeren, P., 2016. Influence of internal water phase gelation on the shear-and osmotic sensitivity of W/O/W-type double emulsions. *Food Hydrocolloids* 58, 356–363.
- Basha, S.K., Muzammil, M.S., Dhandayuthabani, R., Kumari, V.S., 2020. Development of nanoemulsion of Alginate/Aloe vera for oral delivery of insulin. *Materials Today: Proceedings*.
- Benichou, A., Aserin, A., Garti, N., 2004. Double emulsions stabilized with hybrids of natural polymers for entrapment and slow release of active matters. *Advances in Colloid and Interface Science* 108, 29–41.
- Besnard, L., Marchal, F., Paredes, J.F., Daillant, J., Pantoustier, N., Perrin, P., Guenoun, P., 2013. Multiple Emulsions Controlled by Stimuli-Responsive Polymers. *Advanced materials* 25, 2844–2848.

- Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S., Escaleira, L.A., 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76, 965–977. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>
- Bhattacharjee, A., Chakraborty, A., Mukhopadhyay, G., 2018. Double emulsions-a review with emphasis on updated stability enhancement perspective. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 7(6), 475-493
- Bianchera, A., Bettini, R., 2020. Polysaccharide nanoparticles for oral controlled drug delivery: the role of drug-polymer and interpolymer interactions. *Expert Opinion on Drug Delivery*.
- Bohrey, S., Chourasiya, V., Pandey, A., 2016. Preparation, optimization by 2³ factorial design, characterization and *in vitro* release kinetics of lorazepam loaded PLGA nanoparticles. *Polymer Science Series A* 58, 975–986.
- Bonnet, M., 2008. Libération contrôlée du magnésium par des émulsions doubles: impact des paramètres de formulation. Thèse de Doctorat, Université de Bordeaux 1, France.
- Callet, A., 2010. Administration orale d'insuline par double encapsulation: développement du système nanoparticulaire par coacervation complexe insuline/chitosane. Thèse de Doctorat, Université de Strasbourg, France, 215p.
- Cárdenas-Bailón, F., Osorio-Revilla, G., Gallardo-Velázquez, T., 2015. Microencapsulation of insulin using a W/O/W double emulsion followed by complex coacervation to provide protection in the gastrointestinal tract. *Journal of Microencapsulation* 32, 308–316.
- Chast, F., 2017. Nouvelles insulines: innovations moléculaires, galéniques et biopharmaceutiques. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine* 201, 1255–1268.
- Chávez-Páez, M., Quezada, C.M., Ibarra-Bracamontes, L., González-Ochoa, H.O., Arauz-Lara, J.L., 2012. Coalescence in double emulsions. *Langmuir* 28, 5934–5939.
- Chen, L., Subirade, M., 2006. Alginate–whey protein granular microspheres as oral delivery vehicles for bioactive compounds. *Biomaterials* 27, 4646–4654.
- Chen, M.-C., Sonaje, K., Chen, K.-J., Sung, H.-W., 2011. A review of the prospects for polymeric nanoparticle platforms in oral insulin delivery. *Biomaterials* 32, 9826–9838.
- Chen, Y., Li, P., Modica, J.A., Drout, R.J., Farha, O.K., 2018. Acid-resistant mesoporous metal–organic framework toward oral insulin delivery: Protein encapsulation, protection, and release. *Journal of the American Chemical Society* 140, 5678–5681.

- Ching, S.H., Bansal, N., Bhandari, B., 2017. Alginate gel particles—A review of production techniques and physical properties. *Critical reviews in food science and nutrition* 57, 1133–1152.
- Chowdary, K.P.R., Rao, Y.S., 2004. Mucoadhesive microspheres for controlled drug delivery. *Biological and pharmaceutical Bulletin* 27, 1717–1724.
- Cournarie, F., Rosilio, V., Chéron, M., Vauthier, C., Lacour, B., Grossiord, J.-L., Seiller, M., 2004. Improved formulation of W/O/W multiple emulsion for insulin encapsulation. Influence of the chemical structure of insulin. *Colloid and Polymer Science* 282, 562–568.
- Cui, M., Wu, W., Hovgaard, L., Lu, Y., Chen, D., Qi, J., 2015. Liposomes containing cholesterol analogues of botanical origin as drug delivery systems to enhance the oral absorption of insulin. *International journal of pharmaceutics* 489, 277–284.
- Derkach, S.R., Voron'ko, N.G., Sokolan, N.I., Kolotova, D.S., Kuchina, Y.A., 2019. Interactions between gelatin and sodium alginate: UV and FTIR studies. *Journal of Dispersion Science and Technology*.
- Dickinson, E., 2011. Double emulsions stabilized by food biopolymers. *Food Biophysics* 6, 1–11.
- Dima, C., Dima, S., 2020. Bioaccessibility study of calcium and vitamin D3 co-microencapsulated in water-in-oil-in-water double emulsions. *Food chemistry* 303, 125416.
- Ding, S., Serra, C.A., Vandamme, T.F., Yu, W., Anton, N., 2019. Double emulsions prepared by two-step emulsification: History, state-of-the-art and perspective. *Journal of Controlled Release* 295, 31–49.
- Draget, K.I., Smidsrød, O., Skjåk-Bræk, G., 2005. Alginates from Algae, in: *Biopolymers Online*. American Cancer Society.
- D'souza, A.A., Shegokar, R., 2016. Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications. *Expert Opin Drug Deliv* 13, 1257–1275. <https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1182485>
- Duggan, S., Cummins, W., O'Donovan, O., Hughes, H., Owens, E., 2017. Thiolated polymers as mucoadhesive drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 100, 64–78.
- El Leithy, E.S., Abdel-Bar, H.M., Ali, R.A.-M., 2019a. Folate-chitosan nanoparticles triggered insulin cellular uptake and improved in vivo hypoglycemic activity. *International journal of pharmaceutics* 571, 118708.

- El Leithy, E.S., Abdel-Bar, H.M., Ali, R.A.-M., 2019b. Folate-chitosan nanoparticles triggered insulin cellular uptake and improved in vivo hypoglycemic activity. *International journal of pharmaceutics* 571, 118708.
- Eliyahu, S., Almeida, A., Macedo, M.H., das Neves, J., Sarmento, B., Bianco-Peled, H., 2020. The effect of freeze-drying on mucoadhesion and transport of acrylated chitosan nanoparticles. *International journal of pharmaceutics* 573, 118739.
- ElShafei, G.M., El-Said, M.M., Attia, H.A., Mohammed, T.G.M., 2010. Environmentally friendly pesticides: Essential oil-based w/o/w multiple emulsions for anti-fungal formulations. *Industrial Crops and Products* 31, 99–106.
- Elvassore, N., Bertucco, A., Caliceti, P., 2001. Production of insulin-loaded poly (ethylene glycol)/poly (l-lactide)(PEG/PLA) nanoparticles by gas antisolvent techniques. *Journal of pharmaceutical sciences* 90, 1628–1636.
- Falkeborg, M., Guo, Z., 2015. Dodecyl succinylated alginate (DSA) as a novel dual-function emulsifier for improved fish oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids* 46, 10–18.
- Fang, Y., Al-Assaf, S., Phillips, G.O., Nishinari, K., Funami, T., Williams, P.A., Li, L., 2007. Multiple steps and critical behaviors of the binding of calcium to alginate. *The Journal of Physical Chemistry B* 111, 2456–2462.
- Fatin-Rouge, N., Dupont, A., Vidonne, A., Dejeu, J., Fievet, P., Foissy, A., 2006. Removal of some divalent cations from water by membrane-filtration assisted with alginate. *Water Research* 40, 1303–1309.
- Fonte, P., Reis, S., Sarmento, B., 2016. Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery. *Journal of controlled release* 225, 75–86.
- Gamboa, C.K., Samir, R., Wu, C., Mu, H., 2018. Solid lipid Particles as Drug Carriers—Effects of Particle Preparation Methods and Lipid Excipients on Particle Characteristics. *Pharmaceutical nanotechnology* 6, 124–132.
- Gao, W., Chan, J.M., Farokhzad, O.C., 2010. pH-responsive nanoparticles for drug delivery. *Molecular pharmaceutics* 7, 1913–1920.
- Gatti, T.H.H., Eloy, J.O., Ferreira, L.M.B., Silva, I.C. da, Pavan, F.R., Gremião, M.P.D., Chorilli, M., 2018. Insulin-loaded polymeric mucoadhesive nanoparticles: development, characterization and cytotoxicity evaluation. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 54.

- George, D., Maheswari, P.U., Begum, K.M.S., 2020. Chitosan-cellulose hydrogel conjugated with L-histidine and zinc oxide nanoparticles for sustained drug delivery: Kinetics and in-vitro biological studies. *Carbohydrate polymers* 236, 116101.
- George, M., Abraham, T.E., 2006. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan—a review. *Journal of controlled release* 114, 1–14.
- Gibson, T.J., Murphy, R.M., 2006. Inhibition of insulin fibrillogenesis with targeted peptides. *Protein Science* 15, 1133–1141.
- Gombotz, W.R., Wee, S., 1998. Protein release from alginate matrices. *Advanced drug delivery reviews* 31, 267–285.
- González-Ochoa, H., Ibarra-Bracamontes, L., Arauz-Lara, J.L., 2003. Two-stage coalescence in double emulsions. *Langmuir* 19, 7837–7840.
- Goupy, J., Creighton, L., 2006. Introduction aux plans d'expériences-3^{ème} édition. Hachette.
- Goutayer, M., 2008. Nano-émulsions pour la vectorisation d'agents thérapeutiques ou diagnostiques: étude de la biodistribution par imagerie de fluorescence in vivo. Thèse de Doctorat, Université Pierre Et Marie Curie, France.
- Graber, M., 2010. Transport phenomena in rotating membrane processed W/O/W emulsions. Thèse de Doctorat, Université ETH Zurich, Suisse
- Guidotti, G., Soccio, M., Gazzano, M., Salatelli, E., Lotti, N., Munari, A., 2020. Micro/nanoparticles fabricated with triblock PLLA-based copolymers containing PEG-like subunit for controlled drug release: Effect of chemical structure and molecular architecture on drug release profile. *Polymer Degradation and Stability* 180, 109306. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2020.109306>
- Hadiya, S., Radwan, R., Zakaria, M., El-Sherif, T., Hamad, M.A., Elsabahy, M., 2021. Nanoparticles integrating natural and synthetic polymers for in vivo insulin delivery. *Pharmaceutical Development and Technology* 26, 30–40.
- Hinds, K.D., Campbell, K.M., Holland, K.M., Lewis, D.H., Piché, C.A., Schmidt, P.G., 2005. PEGylated insulin in PLGA microparticles. In vivo and *in vitro* analysis. *Journal of controlled release* 104, 447–460.
- Horprasertkij, K., Dwivedi, A., Riansuwan, K., Kiratisin, P., Nasongkla, N., 2019. Spray coating of dual antibiotic-loaded nanospheres on orthopedic implant for prolonged release and enhanced antibacterial activity. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 53, 101102.

- Hörter, D., Dressman, J.B., 2001. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. *Advanced drug delivery reviews* 46, 75–87.
- Hsieh, M.H.-N., 2012. Mathematical modelling of controlled drug release from polymer micro-spheres: incorporating the effects of swelling, diffusion and dissolution via moving boundary problems (PhD Thesis). Queensland University of Technology.
- Huckaby, J.T., Lai, S.K., 2018. PEGylation for enhancing nanoparticle diffusion in mucus. *Advanced drug delivery reviews* 124, 125–139.
- Jain, S., Rathi, V.V., Jain, A.K., Das, M., Godugu, C., 2012. Folate-decorated PLGA nanoparticles as a rationally designed vehicle for the oral delivery of insulin. *Nanomedicine* 7, 1311–1337.
- Jiao, J., Rhodes, D.G., Burgess, D.J., 2002. Multiple emulsion stability: pressure balance and interfacial film strength. *Journal of colloid and interface science* 250, 444–450.
- Jusoh, N., Noah, N.F.M., Othman, N., 2018. Double emulsion (water-in-oil-in-water) system in succinic acid extraction-A stability study. *Chemical Engineering Transactions* 63, 523–528.
- Kabalnov, A., 2001. Ostwald ripening and related phenomena. *Journal of Dispersion Science and Technology* 22, 1–12.
- Kakita, H., Kamishima, H., 2008. Some properties of alginate gels derived from algal sodium alginate, in: *Nineteenth International Seaweed Symposium*. Springer, pp. 93–99.
- Kaklamani, G., Cheneler, D., Grover, L.M., Adams, M.J., Bowen, J., 2014. Mechanical properties of alginate hydrogels manufactured using external gelation. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 36, 135–142.
- Kamaly, N., Xiao, Z., Valencia, P.M., Radovic-Moreno, A.F., Farokhzad, O.C., 2012. Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chemical Society Reviews* 41, 2971–3010.
- Kamaly, N., Yameen, B., Wu, J., Farokhzad, O.C., 2016. Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: mechanisms of controlling drug release. *Chemical reviews* 116, 2602–2663.
- Katsuma, M., Watanabe, S., Kawai, H., Takemura, S., Sako, K., 2006. Effects of absorption promoters on insulin absorption through colon-targeted delivery. *International journal of pharmaceutics* 307, 156–162.
- Kean, T., Thanou, M., 2010. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced drug delivery reviews* 62, 3–11.

- Khafagy, E.-S., Morishita, M., Onuki, Y., Takayama, K., 2007. Current challenges in non-invasive insulin delivery systems: a comparative review. *Advanced drug delivery reviews* 59, 1521–1546.
- Khutoryanskiy, V.V., 2018. Beyond PEGylation: alternative surface-modification of nanoparticles with mucus-inert biomaterials. *Advanced Drug Delivery Reviews* 124, 140–149.
- Kim, S.-H., Weitz, D.A., 2011. One-step emulsification of multiple concentric shells with capillary microfluidic devices. *Angewandte Chemie* 123, 8890–8893.
- Knop, K., Hoogenboom, R., Fischer, D., Schubert, U.S., 2010. Poly (ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives. *Angewandte chemie international edition* 49, 6288–6308.
- Kostenko, R., 2019. Simulation d'écoulements non-newtoniens en milieu poreux macroscopique par la méthode de lattice-Boltzmann (PhD Thesis). Université Paris-Saclay (ComUE).
- Kouchakzadeh, H., Shojaosadati, S.A., Maghsoudi, A., Vasheghani Farahani, E., 2010. Optimization of PEGylation Conditions for BSA Nanoparticles Using Response Surface Methodology. *AAPS PharmSciTech* 11, 1206–1211. <https://doi.org/10.1208/s12249-010-9487-8>
- Kumari, A., Yadav, S.K., Yadav, S.C., 2010. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and surfaces B: biointerfaces* 75, 1–18.
- Lee, K.Y., Mooney, D.J., 2012. Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in polymer science* 37, 106–126.
- Lee, T.Y., Choi, T.M., Shim, T.S., Frijns, R.A., Kim, S.H., 2016. Microfluidic production of multiple emulsions and functional microcapsules. *Lab on a Chip* 16, 3415–3440.
- Leister, N., Karbstein, H.P., 2020. Evaluating the Stability of Double Emulsions—A Review of the Measurement Techniques for the Systematic Investigation of Instability Mechanisms. *Colloids and Interfaces* 4, 8.
- León, A., Reuquen, P., Garín, C., Segura, R., Vargas, P., Zapata, P., Orihuela, P.A., 2017. FTIR and Raman characterization of TiO₂ nanoparticles coated with polyethylene glycol as carrier for 2-methoxyestradiol. *Applied Sciences* 7, 49.
- Lertsutthiwong, P., Noomun, K., Jongaroonngamsang, N., Rojsitthisak, P., Nimmannit, U., 2008. Preparation of alginate nanocapsules containing turmeric oil. *Carbohydrate Polymers* 74, 209–214.

- Li, J., Wu, H., Jiang, K., Liu, Y., Yang, L., Park, H.J., 2020. Alginate Calcium Microbeads Containing Chitosan Nanoparticles for Controlled Insulin Release. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1–16.
- Li, L., Fang, Y., Vreeker, R., Appelqvist, I., Mendes, E., 2007. Reexamining the egg-box model in calcium- alginate gels with X-ray diffraction. *Biomacromolecules* 8, 464–468.
- Li, X., Qi, J., Xie, Y., Zhang, X., Hu, S., Xu, Y., Lu, Y., Wu, W., 2013. Nanoemulsions coated with alginate/chitosan as oral insulin delivery systems: preparation, characterization, and hypoglycemic effect in rats. *Int J Nanomedicine* 8, 23–32. <https://doi.org/10.2147/IJN.S38507>
- Lim, J., Yeap, S.P., Che, H.X., Low, S.C., 2013. Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. *Nanoscale research letters* 8, 381.
- Liu, L., Wu, F., Ju, X.-J., Xie, R., Wang, W., Niu, C.H., Chu, L.-Y., 2013. Preparation of monodisperse calcium alginate microcapsules via internal gelation in microfluidic-generated double emulsions. *Journal of colloid and interface science* 404, 85–90.
- Liu, X., Xue, W., Liu, Q., Yu, W., Fu, Y., Xiong, X., Ma, X., Yuan, Q., 2004. Swelling behaviour of alginate–chitosan microcapsules prepared by external gelation or internal gelation technology. *Carbohydrate Polymers* 56, 459–464.
- Liu, X.D., Bao, D.C., Xue, W.M., Xiong, Y., Yu, W.T., Yu, X.J., Ma, X.J., Yuan, Q., 2003. Preparation of uniform calcium alginate gel beads by membrane emulsification coupled with internal gelation. *Journal of Applied Polymer Science* 87, 848–852.
- Lopes, M.A., Abrahim-Vieira, B., Oliveira, C., Fonte, P., Souza, A.M., Lira, T., Sequeira, J.A., Rodrigues, C.R., Cabral, L.M., Sarmiento, B., 2015. Probing insulin bioactivity in oral nanoparticles produced by ultrasonication-assisted emulsification/internal gelation. *International journal of nanomedicine* 10, 5865.
- Lopes, M., Shrestha, N., Correia, A., Shahbazi, M.-A., Sarmiento, B., Hirvonen, J., Veiga, F., Seica, R., Ribeiro, A., Santos, H.A., 2016. Dual chitosan/albumin-coated alginate/dextran sulfate nanoparticles for enhanced oral delivery of insulin. *Journal of controlled release* 232, 29–41.
- Lutz, R., Aserin, A., Wicker, L., Garti, N., 2009. Release of electrolytes from W/O/W double emulsions stabilized by a soluble complex of modified pectin and whey protein isolate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 74, 178–185.

- Lv, G., Wang, F., Cai, W., Zhang, X., 2014. Characterization of the addition of lipophilic Span 80 to the hydrophilic Tween 80-stabilized emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 447, 8–13.
- Maity, S., Mukhopadhyay, P., Kundu, P.P., Chakraborti, A.S., 2017. Alginate coated chitosan core-shell nanoparticles for efficient oral delivery of naringenin in diabetic animals—An *in vitro* and in vivo approach. *Carbohydrate polymers* 170, 124–132.
- Martins, I.M., Barreiro, M.F., Coelho, M., Rodrigues, A.E., 2014. Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. *Chemical Engineering Journal* 245, 191–200.
- Martins, J.P., D’Auria, R., Liu, D., Fontana, F., Ferreira, M.P., Correia, A., Kemell, M., Moslova, K., Mäkilä, E., Salonen, J., 2018. Engineered Multifunctional Albumin-Decorated Porous Silicon Nanoparticles for FcRn Translocation of Insulin. *Small* 14, 1800462.
- Mohammadpour, F., Hadizadeh, F., Tafaghodi, M., Sadri, K., Mohammadpour, A.H., Kalani, M.R., Gholami, L., Mahmoudi, A., Chamani, J., 2019. Preparation, *in vitro* and in vivo evaluation of PLGA/chitosan based nano-complex as a novel insulin delivery formulation. *International journal of pharmaceutics* 572, 118710.
- Morais, J.M., Rocha-Filho, P.A., Burgess, D.J., 2009. Influence of phase inversion on the formation and stability of one-step multiple emulsions. *Langmuir* 25, 7954–7961.
- Morais, J.M., Santos, O.D., Nunes, J.R., Zanatta, C.F., Rocha-Filho, P.A., 2008. W/O/W Multiple Emulsions Obtained by One-Step Emulsification Method and Evaluation of the Involved Variables. *Journal of dispersion science and technology* 29, 63–69.
- Morris, E.R., Rees, D.A., Thom, D., Boyd, J., 1978. Chiroptical and stoichiometric evidence of a specific, primary dimerisation process in alginate gelation. *Carbohydrate research* 66, 145–154.
- Motwani, S.K., Chopra, S., Talegaonkar, S., Kohli, K., Ahmad, F.J., Khar, R.K., 2008. Chitosan–sodium alginate nanoparticles as submicroscopic reservoirs for ocular delivery: Formulation, optimisation and *in vitro* characterisation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 68, 513–525.
- Murti, T., Ibrahim, M.I.M., Asdie, A.H., 2010. Comparison of the glycemic control of insulin and triple oral therapy in type 2 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and Endocrinology* 1, 13–18.
- Mutaliyeva, B., Grigoriev, D., Madybekova, G., Sharipova, A., Aidarova, S., Saparbekova, A., Miller, R., 2017. Microencapsulation of insulin and its release using w/o/w

- double emulsion method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 521, 147–152.
- Neelam, D.P., BP, P., Bhavesh, S.B., Pragna, K.S., 2010. Novel approaches for oral delivery of insulin and current status of oral insulin products. *International Journal of pharmaceutical sciences and nanotechnology* 3, 1057–1064.
- Nollet, M., Laurichesse, E., Besse, S., Soubabère, O., Schmitt, V., 2018. Determination of formulation conditions allowing double emulsions stabilized by PGPR and sodium caseinate to be used as capsules. *Langmuir* 34, 2823–2833.
- Ozturk, B., Argin, S., Ozilgen, M., McClements, D.J., 2015. Nanoemulsion delivery systems for oil-soluble vitamins: Influence of carrier oil type on lipid digestion and vitamin D3 bioaccessibility. *Food chemistry* 187, 499–506.
- Palluault, V., 2010. Nouveaux traitements de surface respectueux de l'environnement par des gels polymères réticulables: application à la préparation des surfaces d'usage dans le secteur aéronautique (PhD Thesis). Bordeaux 1.
- Papadimitriou, S.A., Achilias, D.S., Bikiaris, D.N., 2012. Chitosan-g-PEG nanoparticles ionically crosslinked with poly (glutamic acid) and tripolyphosphate as protein delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics* 430, 318–327.
- Paquot, N., 2010. Effets néfastes du défaut d'observance hygiéno-diététique et médicamenteuse chez le patient diabétique. *Revue Médicale de Liège* 65, 326–31.
- Patil, J.S., Kamalapur, M.V., Marapur, S.C., Kadam, D.V., 2010a. Iontropic gelation and polyelectrolyte complexation: the novel techniques to design hydrogel particulate sustained, modulated drug delivery system: a review. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 5, 241–248.
- Patil, J.S., Kamalapur, M.V., Marapur, S.C., Kadam, D.V., 2010b. Iontropic gelation and polyelectrolyte complexation: the novel techniques to design hydrogel particulate sustained, modulated drug delivery system: a review. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 5, 241–248.
- Patil, P., Chavanke, D., Wagh, M., 2012. A review on ionotropic gelation method: novel approach for controlled gastroretentive gelispheres. *Int J Pharm Pharm Sci* 4, 27–32.
- Paul, S., Kumar, A., Yedurkar, P., Sawant, K., 2013. Design and development of multiple emulsion for enhancement of oral bioavailability of acyclovir. *Drug Dev Ind Pharm* 39, 1809–1817. <https://doi.org/10.3109/03639045.2012.738682>

- Pawar, D., Jaganathan, K.S., 2016. Mucoadhesive glycol chitosan nanoparticles for intranasal delivery of hepatitis B vaccine: enhancement of mucosal and systemic immune response. *Drug delivery* 23, 185–194.
- Pawar, S.N., Edgar, K.J., 2012. Alginate derivatization: a review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials* 33, 3279–3305.
- Petkar, K.C., Chavhan, S., Kunda, N., Saleem, I., Somavarapu, S., Taylor, K.M., Sawant, K.K., 2018. Development of novel octanoyl chitosan nanoparticles for improved rifampicin pulmonary delivery: optimization by factorial design. *AAPS PharmSciTech* 19, 1758–1772.
- Picard, F., Adjedj, J., Varenne, O., 2017. Le diabète, une pathologie prothrombotique, in: *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*. Elsevier, pp. 385–392.
- Pimentel-Moral, S., Ochando-Pulido, J.M., Segura-Carretero, A., Martinez-Ferez, A., 2018. Stabilization of W/O/W multiple emulsion loaded with Hibiscus sabdariffa extract through protein-polysaccharide complexes. *LWT* 90, 389–395.
- Prego, C., Torres, D., Fernandez-Megia, E., Novoa-Carballal, R., Quiñoá, E., Alonso, M.J., 2006. Chitosan-PEG nanocapsules as new carriers for oral peptide delivery: effect of chitosan pegylation degree. *Journal of Controlled Release* 111, 299–308.
- Protat, M., 2016. Formation d'émulsions multiples stimulables en une seule étape d'émulsification: effet du sel et évolution vers des architectures biocompatibles (PhD Thesis).
- Qi, X., Wang, L., Zhu, J., 2011. Water-in-oil-in-water double emulsions: an excellent delivery system for improving the oral bioavailability of pidotimod in rats. *Journal of pharmaceutical sciences* 100, 2203–2211.
- Rahmawati, R., Permana, M.G., Harison, B., Yulianto, B., Kurniadi, D., 2017. Optimization of frequency and stirring rate for synthesis of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles by using coprecipitation-ultrasonic irradiation methods. *Procedia engineering* 170, 55–59.
- Reis, C.P., Neufeld, R.J., Ribeiro, A.J., Veiga, F., 2006a. Design of insulin-loaded alginate nanoparticles: Influence of the calcium ion on polymer gel matrix properties. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly* 12, 47–52.
- Reis, C.P., Neufeld, R.J., Vilela, S., Ribeiro, A.J., Veiga, F., 2006b. Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles. *Journal of microencapsulation* 23, 245–257.

- Reis, C.P., Ribeiro, A.J., Neufeld, R.J., Veiga, F., 2007. Alginate microparticles as novel carrier for oral insulin delivery. *Biotechnology and bioengineering* 96, 977–989.
- Reis, C.P., Ribeiro, A.J., Veiga, F., Neufeld, R.J., Damgé, C., 2008. Polyelectrolyte biomaterial interactions provide nanoparticulate carrier for oral insulin delivery. *Drug delivery* 15, 127–139.
- Rekha, M.R., Sharma, C.P., 2013. Oral delivery of therapeutic protein/peptide for diabetes—future perspectives. *International journal of pharmaceutics* 440, 48–62.
- Renukuntla, J., Vadlapudi, A.D., Patel, A., Boddu, S.H., Mitra, A.K., 2013. Approaches for enhancing oral bioavailability of peptides and proteins. *International journal of pharmaceutics* 447, 75–93.
- Retnakaran, R., Hochman, J., DeVries, J.H., Hanaire-Broutin, H., Heine, R.J., Melki, V., Zinman, B., 2004. Continuous subcutaneous insulin infusion versus multiple daily injections: the impact of baseline A1c. *Diabetes care* 27, 2590–2596.
- Richard, J., Benoît, J.-P., 2000. Microencapsulation. *Techniques de l'ingénieur. Génie des procédés* 2, J2210–1.
- Rosly, M.B., Jusoh, N., Othman, N., Rahman, H.A., Sulaiman, R.N.R., Noah, N.F.M., 2020. Stability of emulsion liquid membrane using bifunctional diluent and blended nonionic surfactant for phenol removal. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification* 148, 107790.
- Sajjadi, S., Jahanzad, F., Brooks, B.W., 2002. Phase inversion in abnormal O/W/O emulsions: I. Effect of surfactant concentration. *Industrial & engineering chemistry research* 41, 6033–6041.
- Sajjadi, S., Jahanzad, F., Yianneskis, M., Brooks, B.W., 2003. Phase Inversion in Abnormal O/W/O Emulsions. 2. Effect of Surfactant Hydrophilic- Lipophilic Balance. *Industrial & engineering chemistry research* 42, 3571–3577.
- Sanatkaran, N., Masalova, I., Malkin, A.Y., 2014. Effect of surfactant on interfacial film and stability of highly concentrated emulsions stabilized by various binary surfactant mixtures. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 461, 85–91.
- Santos, A.C., Cunha, J., Veiga, F., Cordeiro-da-Silva, A., Ribeiro, A.J., 2013. Ultrasonication of insulin-loaded microgel particles produced by internal gelation: Impact on particle's size and insulin bioactivity. *Carbohydrate polymers* 98, 1397–1408.

- Sanusi, O.M., Benelfellah, A., Bikiaris, D.N., Aït Hocine, N., 2021. Effect of rigid nanoparticles and preparation techniques on the performances of poly (lactic acid) nanocomposites: A review. *Polymers for Advanced Technologies* 32, 444–460.
- Sarheed, O., Dibi, M., Ramesh, K.V., Drechsler, M., 2021. Fabrication of Alginate-Based O/W Nanoemulsions for Transdermal Drug Delivery of Lidocaine: Influence of the Oil Phase and Surfactant. *Molecules* 26, 2556.
- Sarmento, B., Ferreira, D., Veiga, F., Ribeiro, A., 2006a. Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. *Carbohydrate Polymers* 66, 1–7.
- Sarmento, B., Ribeiro, A., Veiga, F., Ferreira, D., 2006b. Development and validation of a rapid reversed-phase HPLC method for the determination of insulin from nanoparticulate systems. *Biomedical Chromatography* 20, 898–903.
- Sarmento, B., Ribeiro, A., Veiga, F., Sampaio, P., Neufeld, R., Ferreira, D., 2007a. Alginate/Chitosan Nanoparticles are Effective for Oral Insulin Delivery. *Pharm Res* 24, 2198–2206. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9367-4>
- Sarmento, B., Ribeiro, A., Veiga, F., Sampaio, P., Neufeld, R., Ferreira, D., 2007b. Alginate/chitosan nanoparticles are effective for oral insulin delivery. *Pharm. Res.* 24, 2198–2206. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9367-4>
- Sarmento, B., Ribeiro, A.J., Veiga, F., Ferreira, D.C., Neufeld, R.J., 2007c. Insulin-loaded nanoparticles are prepared by alginate ionotropic pre-gelation followed by chitosan polyelectrolyte complexation. *Journal of nanoscience and nanotechnology* 7, 2833–2841.
- Sawant, K.K., Mundada, V.P., Patel, V.J., 2017. Development and Optimization of w/o/w Multiple Emulsion of Lisinopril Dihydrate Using Plackett Burman and Box-Behnken Designs | OMICS International [WWW Document]. URL <https://www.omicsonline.org/open-access/development-and-optimization-of-wow-multiple-emulsion-of-lisinopriidihydrate-using-plackett-burman-and-boxbehnken-designs-2157-7439-1000422.php?aid=85555> (accessed 4.8.19).
- Schmidts, T., Dobler, D., Schlupp, P., Nissing, C., Garn, H., Runkel, F., 2010. Development of multiple W/O/W emulsions as dermal carrier system for oligonucleotides: effect of additives on emulsion stability. *International Journal of Pharmaceutics* 398, 107–113.
- Schneider, M., 2018. Stabilité et rhéologie des mousses d'émulsions attractives (PhD Thesis). Université Paris-Saclay (ComUE).

- Schuch, A., Deiters, P., Henne, J., Köhler, K., Schuchmann, H.P., 2013. Production of W/O/W (water-in-oil-in-water) multiple emulsions: droplet breakup and release of water. *Journal of colloid and interface science* 402, 157–164.
- Serrero, A., Trombotto, S., Cassagnau, P., Bayon, Y., Gravagna, P., Montanari, S., David, L., 2010. Polysaccharide gels based on chitosan and modified starch: Structural characterization and linear viscoelastic behavior. *Biomacromolecules* 11, 1534–1543.
- Sezer, A.D., 1999. Release characteristics of chitosan treated alginate beads: I. Sustained release of a macromolecular drug from chitosan treated alginate beads. *Journal of microencapsulation* 16, 195–203.
- Shah, R.B., Patel, M., Maahs, D.M., Shah, V.N., 2016. Insulin delivery methods: Past, present and future. *International journal of pharmaceutical investigation* 6, 1.
- Shahidi, F., Abuzaytoun, R., 2005. Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, production, applications, and health effects. *Advances in food and nutrition research* 49, 93–137.
- Shilpa, A., Agrawal, S.S., Ray, A.R., 2003. Controlled delivery of drugs from alginate matrix. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews* 43, 187–221.
- Siepmann, J., Peppas, N.A., 2012. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced drug delivery reviews* 64, 163–174.
- Silva, C.M., Ribeiro, A.J., Ferreira, D., Veiga, F., 2006a. Insulin encapsulation in reinforced alginate microspheres prepared by internal gelation. *European journal of pharmaceutical sciences* 29, 148–159.
- Silva, C.M., Ribeiro, A.J., Figueiredo, I.V., Gonçalves, A.R., Veiga, F., 2006b. Alginate microspheres prepared by internal gelation: Development and effect on insulin stability. *International journal of pharmaceutics* 311, 1–10.
- Silva, C.M., Ribeiro, A.J., Figueiredo, M., Ferreira, D., Veiga, F., 2005. Microencapsulation of hemoglobin in chitosan-coated alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation. *The AAPS Journal* 7, E903–E913.
- Sonaje, K., Chuang, E.-Y., Lin, K.-J., Yen, T.-C., Su, F.-Y., Tseng, M.T., Sung, H.-W., 2012. Opening of epithelial tight junctions and enhancement of paracellular permeation by chitosan: microscopic, ultrastructural, and computed-tomographic observations. *Molecular pharmaceutics* 9, 1271–1279.
- Sonia, T.A., Sharma, C.P., 2012. An overview of natural polymers for oral insulin delivery. *Drug discovery today* 17, 784–792.

- Sorasitthiyankarn, F.N., Muangnoi, C., Thaweeseest, W., Bhuket, P.R.N., Jantaratana, P., Rojsitthisak, P., Rojsitthisak, P., 2020. Polyethylene Glycol-Chitosan Oligosaccharide-Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: A Novel Drug Delivery System for Curcumin Diglutamic Acid. *Biomolecules* 10, 73.
- Stauffer, F., 2014. La préparation d'émulsions doubles par un système microfluidique (PhD Thesis). Université de Lorraine.
- Sun, R., Zhang, M., Xia, Q., 2019. Improved stability of (W1/O/W2) double emulsions based on dual gelation: Oleogels and hydrogels. *Journal of Food Process Engineering* 42, e13186.
- Tan, Y., Liu, J., Zhou, H., Mundo, J.M., McClements, D.J., 2019. Impact of an indigestible oil phase (mineral oil) on the bioaccessibility of vitamin D3 encapsulated in whey protein-stabilized nanoemulsions. *Food Research International* 120, 264–274.
- Tian, Y., Chen, L., Zhang, W., 2016. Influence of ionic surfactants on the properties of nanoemulsions emulsified by nonionic surfactants span 80/tween 80. *Journal of Dispersion Science and Technology* 37, 1511–1517.
- Torchilin, V.P., 2005. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature reviews Drug discovery* 4, 145–160.
- VAILLÉ, J., GOUPY, J., 2006. Construire et interpréter un Plan d'expériences factoriel complet. *Revue MODULAD* 35,
- Vasiljevic, D., Parojcic, J., Primorac, M., Vuleta, G., 2006. An investigation into the characteristics and drug release properties of multiple W/O/W emulsion systems containing low concentration of lipophilic polymeric emulsifier. *International journal of pharmaceutics* 309, 171–177.
- Venkata Siddhartha, T., Senthil, V., Sai Kishan, I., Basha Khatwal, R., V Madhunapantula, S., 2014a. Design and development of oral nanoparticulated insulin in multiple emulsion. *Current drug delivery* 11, 472–485.
- Venkata Siddhartha, T., Senthil, V., Sai Kishan, I., Basha Khatwal, R., V Madhunapantula, S., 2014b. Design and development of oral nanoparticulated insulin in multiple emulsion. *Current drug delivery* 11, 472–485.
- Vieira, A.C., Chaves, L.L., Pinheiro, S., Pinto, S., Pinheiro, M., Lima, S.C., Ferreira, D., Sarmiento, B., Reis, S., 2018. Mucoadhesive chitosan-coated solid lipid nanoparticles for better management of tuberculosis. *International journal of pharmaceutics* 536, 478–485. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.11.071>

- Wani, T.U., Raza, S.N., Khan, N.A., 2020. Nanoparticle opsonization: forces involved and protection by long chain polymers. *Polymer Bulletin* 77, 3865–3889.
- Wawrezynieck, A., Péan, J.-M., Wüthrich, P., Benoit, J.-P., 2008. Oral bioavailability and drug/carrier particulate systems. *Medecine sciences: M/S* 24, 659.
- Weiss, J., Scherze, I., Muschiolik, G., 2005. Polysaccharide gel with multiple emulsion. *Food Hydrocolloids* 19, 605–615. <https://doi.org/10.1016/j.foohyd.2004.10.023>
- Wen, J., Zhang, Q., Zhu, D., Zhang, W., 2017. Performance study on particle size variables for nano multiple emulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology* 38, 801–806. <https://doi.org/10.1080/01932691.2016.1198704>
- Whitehead, K., Karr, N., Mitragotri, S., 2008. Safe and effective permeation enhancers for oral drug delivery. *Pharmaceutical research* 25, 1782–1788. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9488-9>
- Whittingham, J.L., Scott, D.J., Chance, K., Wilson, A., Finch, J., Brange, J., Dodson, G.G., 2002. Insulin at pH 2: structural analysis of the conditions promoting insulin fibre formation. *Journal of molecular biology* 318, 479–490.
- Woitiski, C.B., Sarmiento, B., Carvalho, R.A., Neufeld, R.J., Veiga, F., 2011. Facilitated nanoscale delivery of insulin across intestinal membrane models. *International journal of pharmaceutics* 412, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.04.003>
- Wong, C.Y., Al-Salami, H., Dass, C.R., 2020a. Formulation and characterisation of insulin-loaded chitosan nanoparticles capable of inducing glucose uptake in skeletal muscle cells *in vitro*. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 57, 101738. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101738>
- Wong, C.Y., Martinez, J., Dass, C.R., 2016. Oral delivery of insulin for treatment of diabetes: status quo, challenges and opportunities. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 68, 1093–1108. <https://doi.org/10.1111/jphp.12607>
- Wong, C.Y., Martinez, J., Zhao, J., Al-Salami, H., Dass, C.R., 2020b. Development of orally administered insulin-loaded polymeric-oligonucleotide nanoparticles: statistical optimization and physicochemical characterization. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 46, 1238–1252. <https://doi.org/10.1080/03639045.2020.1788061>
- Xu, J., Xia, R., Yuan, T., Sun, R., 2019. Use of xylooligosaccharides (XOS) in hemicelluloses/chitosan-based films reinforced by cellulose nanofiber: Effect on

- physicochemical properties. *Food chemistry* 298, 125041. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125041>
- Yoneki, N., Takami, T., Ito, T., Anzai, R., Fukuda, K., Kinoshita, K., Sonotaki, S., Murakami, Y., 2015. One-pot facile preparation of PEG-modified PLGA nanoparticles: Effects of PEG and PLGA on release properties of the particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 469, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.01.011>
- Yu, M., Wu, J., Shi, J., Farokhzad, O.C., 2016. Nanotechnology for protein delivery: Overview and perspectives. *Journal of controlled release* 240, 24–37.
- Zargar, V., Asghari, M., Dashti, A., 2015. A review on chitin and chitosan polymers: structure, chemistry, solubility, derivatives, and applications. *ChemBioEng Reviews* 2, 204–226. <https://doi.org/10.1002/cben.201400025>
- Zhang, X.G., Teng, D.Y., Wu, Z.M., Wang, X., Wang, Z., Yu, D.M., Li, C.X., 2008. PEG-grafted chitosan nanoparticles as an injectable carrier for sustained protein release. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 19, 3525–3533. doi:10.1007/s10856-008-3500-8
- Zielińska, A., Ferreira, N.R., Durazzo, A., Lucarini, M., Cicero, N., Mamouni, S.E., Silva, A.M., Nowak, I., Santini, A., Souto, E.B., 2019. Development and optimization of alpha-pinene-loaded solid lipid nanoparticles (SLN) using experimental factorial design and dispersion analysis. *Molecules* 24, 2683. doi:10.3390/molecules24152683
- Zohri, M., Javar, H.A., Gazori, T., Khoshayand, M.R., Aghaee-Bakhtiari, S.H., Ghahremani, M.H., 2020. Response Surface Methodology for Statistical Optimization of Chitosan/Alginate Nanoparticles as a Vehicle for Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 Delivery. *International Journal of Nanomedicine* 15, 8345. <https://doi.org/10.2147/IJN.S250630>
- Zou, P., Yang, X., Wang, J., Li, Y., Yu, H., Zhang, Y., Liu, G., 2016. Advances in characterization and biological activities of chitosan and chitosan oligosaccharides. *Food chemistry* 190, 1174–1181. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.076>

Annexe A : Vocabulaire De Base Des Plans D'expériences

Réponse : La réponse (Y) est la grandeur mesurée à chaque essai ; le plan vise à déterminer quels facteurs l'influencent ou quelle est son évolution en fonction de ceux-ci.

- **Facteur :** Un facteur (X) est une variable qui peut éventuellement avoir une influence sur la réponse observée. Il peut être qualitatif ou quantitatif, continu ou discontinu (discret). La valeur donnée à un facteur pour réaliser un essai est appelée niveau, le niveau bas est noté par la variable codée - 1 et le niveau haut par la variable codée +1. Le domaine de variation du facteur est constitué de toutes les valeurs comprises entre le niveau bas et le niveau haut.
- **Matrice d'expériences :** Une matrice d'expériences est l'organisation de l'ensemble des expériences à réaliser exprimées avec les variables codées. Elle est sous forme de tableau dans lequel est représenté une succession d'essais (lignes) au sein desquels on fait varier différents paramètres (colonnes).
- **Plan d'expérimentation :** Le plan d'expérimentation correspond à la traduction de la matrice d'expériences en variables réelles.
- **Effet d'un facteur :** C'est la variation de la réponse quand le facteur passe du niveau -1 au niveau +1
- Lorsqu'on étudie l'influence d'un facteur, en général, on limite ses variations entre deux bornes. La borne inférieure est le niveau bas. La borne supérieure est le niveau haut.

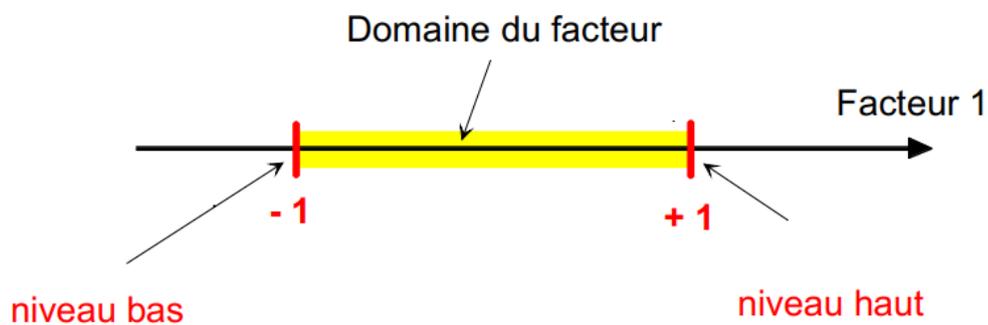


Figure A.1 : Le niveau bas du facteur est noté par - 1 et le niveau haut par +1. Le domaine de variation du facteur est constitué de toutes les valeurs comprises entre le niveau bas et le niveau haut

- **Interactions entre facteurs :** on parle d'interaction entre deux facteurs X_i et X_j quand l'effet du facteur X_i sur la réponse va dépendre de la valeur du facteur X_j .

- **Test de signification des effets** Les calculs suivants permettent de savoir si un effet principal ou d'interaction est significatif. Le test utilisé est le test de Student dont la règle est la suivante :
 - Si $t_i > t_{crit}(\alpha, v)$, l'effet est significatif.
 - \neg Si $t_i < t_{crit}(\alpha, v)$, l'effet n'est pas significatif.
- N : degré de liberté ($v = n-p$)
- α : risque (le plus souvent 5 (%))
- t_{crit} : la valeur obtenue par la table de Student pour un risque de 5 % et un certain v
- t_i : calculé comme suit :

$$- t_i = |a_i| / S_i$$

$$- S_i = \sqrt{\frac{S^2}{n}}$$

$$- S^2 = \frac{1}{n-p} \sum (Y_i - Y_{est})^2$$

- n : nombre d'expériences.
- p : nombre de coefficient du modèle.
- Y_i : Réponse expérimentale.
- Y_{est} : Réponse estimée par le modèle.

La signification des coefficients est résumée dans un diagramme de Pareto avec un risque de 5 %.

Validation d modèle

La validation du modèle est réalisée à l'aide de l'analyse de la variance, couramment

abrégée ANOVA, afin de tester de manière absolue l'influence des facteurs sur les variations, de la réponse.

Tableau 1 : Analyse de la variance

Validation due à	Somme des carrés	DDL	Carré moyen	F
Liaison	$SCEL = \sum (Y_{est} - Y_{moy})^2$	p-1	$CML = \frac{SCEL}{p-1}$	$F_{Obs} = \frac{CML}{CMR}$
Résidus	$SCER = \sum (Y_i - Y_{est})^2$	n - p	$CMR = \frac{SCER}{n-p}$	
Totale	$SCET = SCEL + SCER$	n - 1	$CMT = \frac{SCET}{n-1}$	

Avec :

-DDL :degré de liberté.

- SCEL se lit : sommes des carrés des écarts dues à la liaison.

- SCER se lit : somme des carrés des écarts des résidus.

- SCET se lit : somme totale des carrés.

- Test de Fisher- SNEDECOR (test F)

Le test F permet de comparer le Fobs calculé avec un Fcrit lu sur la table de FisherSNEDECOR avec (p-1) et (n-p) degré de liberté.

- Si Fobs < Fcrit : on rejette l'hypothèse de linéarité du modèle.

- Si Fobs > Fcrit : on accepte l'hypothèse de linéarité du modèle.

L'analyse de la variance permet de déterminer deux coefficients de détermination R² et R² (ajusté) pour évaluer la qualité descriptive du modèle.

$$R^2 = \frac{SCEL}{SCET}$$

$$R^2(\text{ajusté}) = 1 - \frac{CMR}{CMT}$$

- Plus la valeur du coefficient de détermination est proche de 1 plus les réponses calculées, par le modèle sont proches de celles mesurées par l'expérimentation. Si le modèle linéaire est rejeté, il faudrait refaire une étude avec un modèle polynomial du second degré.

- **Notion de surface de réponse**

La représentation géométrique du plan d'expériences et de la réponse nécessite un espace ayant une dimension de plus que l'espace expérimental. Un plan à deux facteurs utilise un espace à trois dimensions pour être représenté : une dimension pour la réponse, deux dimensions pour les facteurs.

- A chaque point du domaine d'étude correspond une réponse. A l'ensemble de tous les points du domaine d'étude correspond un ensemble de réponses qui se localisent sur une surface appelée la surface de réponse (Figure 1). Le nombre et de l'emplacement des points d'expériences est le problème fondamental des plans d'expériences. On cherche à obtenir la meilleure précision possible sur la surface de réponse tout en limitant le nombre d'expériences.
- Les niveaux x_i représentent les coordonnées d'un point expérimental et y est la valeur de la réponse en ce point. On définit un axe orthogonal à l'espace expérimental et on l'attribue à la réponse.

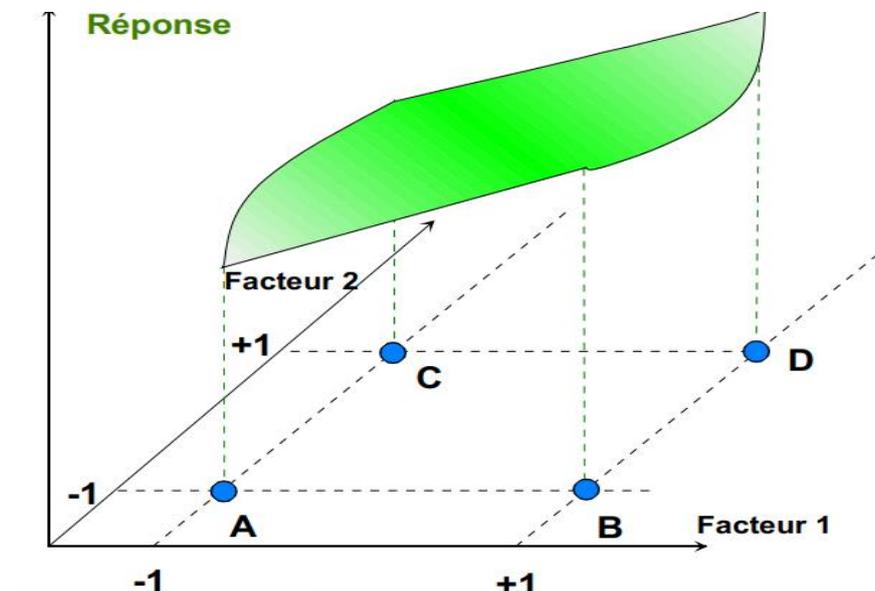


Figure A.2 : Les réponses associées aux points du domaine d'étude forment la surface de réponse. Les quelques réponses mesurées aux points du plan d'expériences permettent de calculer l'équation de la surface de réponses.

Annexe B : Protocole de préparation de la phase mobile pour la quantification de l'insuline par HPLC

-62% tampon phosphate (0.1M)

-26% Acétonitrile

-12% Méthanol.

- pH final est ajusté à 3.

- *Préparation des milieux de dissolution*

- *Protocole de préparation de la solution tampon acide pH=1.2*

NaCl 35 mmol/L, HCl 80 mmol/L à pH 1,2

- *Protocole de préparation de la solution tampon pH=6.8*

KH₂PO₄ 50 mmol/L, NaOH 15 mmol/L à pH 6,8

- *Protocole de préparation de la solution tampon phosphate saline pH=7.4*

• 8g NaCl

• 1.42g Na₂HPO₄

• 200 mg KCl

• 240mg KH₂PO₄

Dissoudre le tout dans 8 ml de l'eau distillée, ajuster le pH à 7.4, puis compléter jusqu'à 1000 ml avec de l'eau distillée.

-

Annexe C : Validation de la méthode de dosage par HPLC-Spécificité

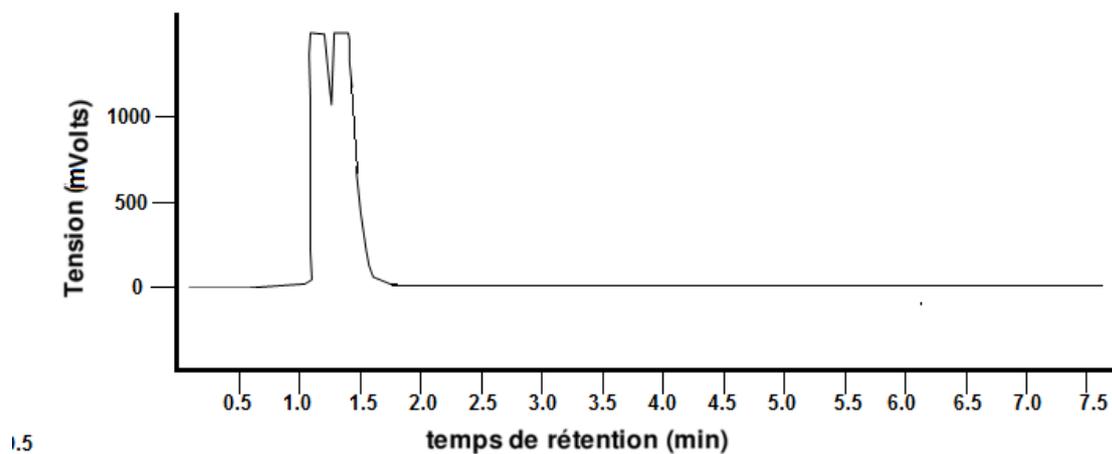


Figure A.3: Chromatogramme du solvant de la solution standard de l'insuline

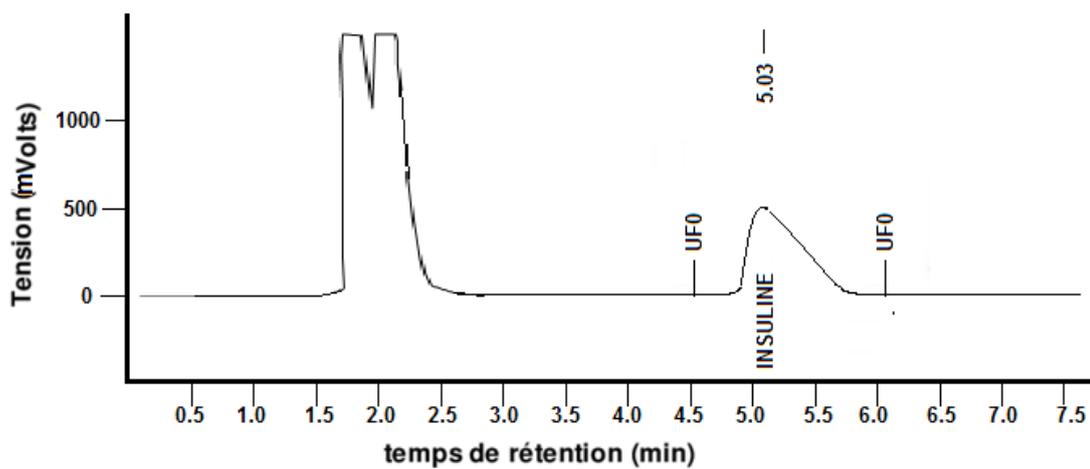


Figure A.4 : Chromatogramme de la solution standard de l'insuline

9

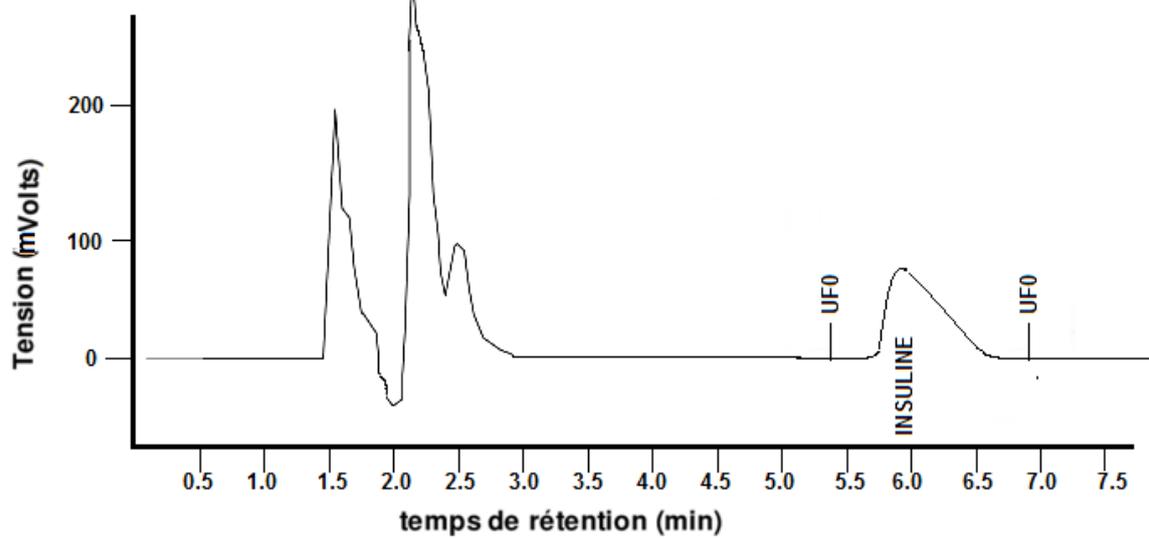


Figure A.5: Chromatogramme de la solution essai (Surnageant des nanoparticules centrifugée)

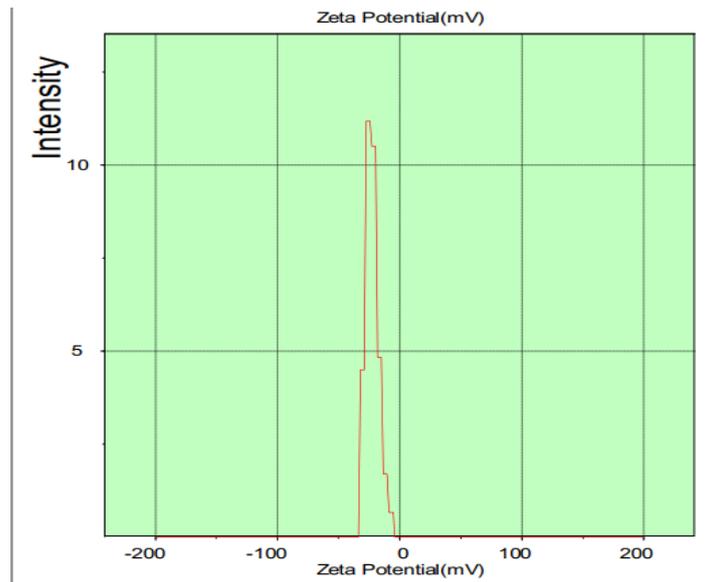


Figure A.6 : Courbe de distribution de la charge des particules de l'essai optimal

Annexe D : Courbes d'étalonnages

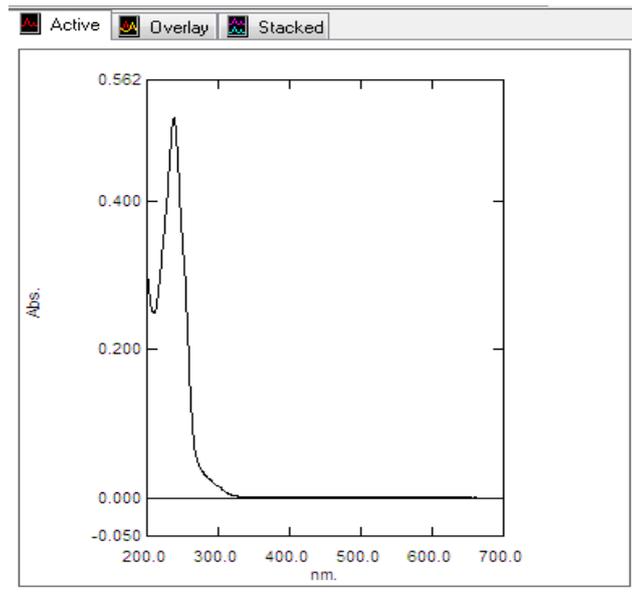


Figure A.7 : Spectre de balayage d'absorbance UV-visible de l'insuline standard.

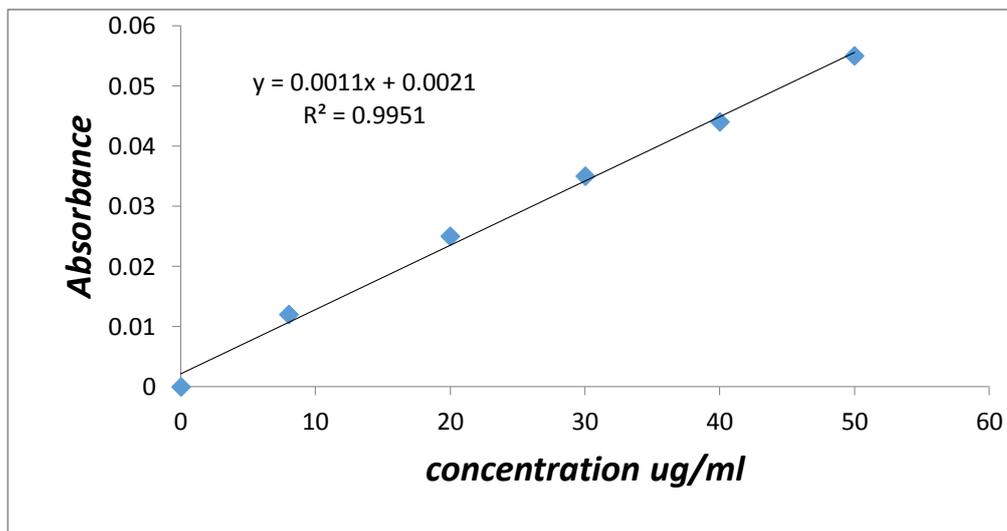


Figure A.8 Courbe d'étalonnage de l'insuline en milieu acide pH= 1.2 ($\lambda=277$ nm).

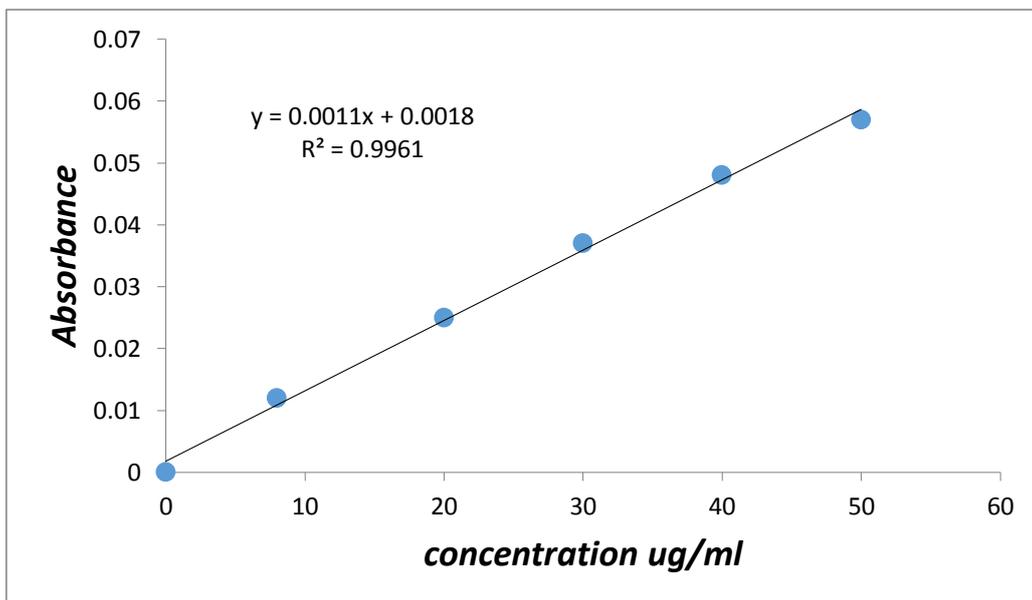


Figure A.9: Courbe d'étalonnage de l'insuline en milieu Tampon pH= 6.8 ($\lambda=277$ nm)

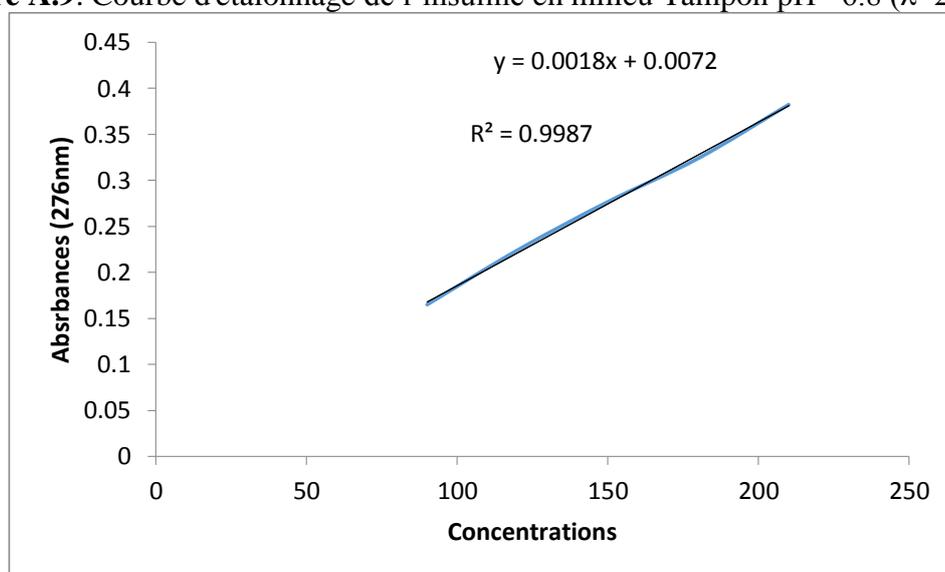


Figure A.10: Courbe d'étalonnage de l'insuline en milieu Tampon pH= 7.4 ($\lambda=277$ nm)

Annexe E : Tables de Student et Fisher

Table de Student : Loi de Student avec k degrés de liberté
Quantiles d'ordre $1 - \gamma$

k	α										
	0.25	0.20	0.15	0.10	0.05	0.025	0.010	0.005	0.0025	0.0010	0.0005
1	1.000	1.376	1.963	3.078	6.314	12.71	31.82	63.66	127.3	318.3	636.6
2	0.816	1.061	1.386	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	14.09	22.33	31.60
3	0.765	0.978	1.250	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	7.453	10.21	12.92
4	0.741	0.941	1.190	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	5.598	7.173	8.610
5	0.727	0.920	1.156	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	4.773	5.893	6.869
6	0.718	0.906	1.134	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	4.317	5.208	5.959
7	0.711	0.896	1.119	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.029	4.785	5.408
8	0.706	0.889	1.108	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	3.833	4.501	5.041
9	0.703	0.883	1.100	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	3.690	4.297	4.781
10	0.700	0.879	1.093	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	3.581	4.144	4.587
11	0.697	0.876	1.088	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	3.497	4.025	4.437
12	0.695	0.873	1.083	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.428	3.930	4.318
13	0.694	0.870	1.079	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.372	3.852	4.221
14	0.692	0.868	1.076	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.326	3.787	4.140
15	0.691	0.866	1.074	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.286	3.733	4.073
16	0.690	0.865	1.071	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.252	3.686	4.015
17	0.689	0.863	1.069	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.222	3.646	3.965
18	0.688	0.862	1.067	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.197	3.610	3.922
19	0.688	0.861	1.066	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.174	3.579	3.883
20	0.687	0.860	1.064	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.153	3.552	3.850
21	0.686	0.859	1.063	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.135	3.527	3.819
22	0.686	0.858	1.061	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.119	3.505	3.792
23	0.685	0.858	1.060	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.104	3.485	3.767
24	0.685	0.857	1.059	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.091	3.467	3.745
25	0.684	0.856	1.058	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.078	3.450	3.725
26	0.684	0.856	1.058	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.067	3.435	3.707
27	0.684	0.855	1.057	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.057	3.421	3.690
28	0.683	0.855	1.056	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.047	3.408	3.674
29	0.683	0.854	1.055	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.038	3.396	3.659
30	0.683	0.854	1.055	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.030	3.385	3.646
40	0.681	0.851	1.050	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	2.971	3.307	3.551
50	0.679	0.849	1.047	1.299	1.676	2.009	2.403	2.678	2.937	3.261	3.496
60	0.679	0.848	1.045	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	2.915	3.232	3.460
80	0.678	0.846	1.043	1.292	1.664	1.990	2.374	2.639	2.887	3.195	3.416
100	0.677	0.845	1.042	1.290	1.660	1.984	2.364	2.626	2.871	3.174	3.390
120	0.677	0.845	1.041	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617	2.860	3.160	3.373
∞	0.674	0.842	1.036	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	2.807	3.090	3.291

Table de la loi de Fisher-Snedecor, $\alpha = 5\%$

num	den 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	161.4476	18.5128	10.1280	7.7086	6.6079	5.9874	5.5914	5.3177	5.1174	4.9646
2	199.5000	19.0000	9.5521	6.9443	5.7861	5.1433	4.7374	4.4590	4.2565	4.1028
3	215.7073	19.1643	9.2766	6.5914	5.4095	4.7571	4.3468	4.0662	3.8625	3.7083
4	224.5832	19.2468	9.1172	6.3882	5.1922	4.5337	4.1203	3.8379	3.6331	3.4780
5	230.1619	19.2964	9.0135	6.2561	5.0503	4.3874	3.9715	3.6875	3.4817	3.3258
6	233.9860	19.3295	8.9406	6.1631	4.9503	4.2839	3.8660	3.5806	3.3738	3.2172
7	236.7684	19.3532	8.8867	6.0942	4.8759	4.2067	3.7870	3.5005	3.2927	3.1355
8	238.8827	19.3710	8.8452	6.0410	4.8183	4.1468	3.7257	3.4381	3.2296	3.0717
9	240.5433	19.3848	8.8123	5.9988	4.7725	4.0990	3.6767	3.3881	3.1789	3.0204
10	241.8817	19.3959	8.7855	5.9644	4.7351	4.0600	3.6365	3.3472	3.1373	2.9782
11	242.9835	19.4050	8.7633	5.9358	4.7040	4.0274	3.6030	3.3130	3.1025	2.9430
12	243.9060	19.4125	8.7446	5.9117	4.6777	3.9999	3.5747	3.2839	3.0729	2.9130
13	244.6898	19.4189	8.7287	5.8911	4.6552	3.9764	3.5503	3.2590	3.0475	2.8872
14	245.3640	19.4244	8.7149	5.8733	4.6358	3.9559	3.5292	3.2374	3.0255	2.8647
15	245.9499	19.4291	8.7029	5.8578	4.6188	3.9381	3.5107	3.2184	3.0061	2.8450
16	246.4639	19.4333	8.6923	5.8441	4.6038	3.9223	3.4944	3.2016	2.9890	2.8276
17	246.9184	19.4370	8.6829	5.8320	4.5904	3.9083	3.4799	3.1867	2.9737	2.8120
18	247.3232	19.4402	8.6745	5.8211	4.5785	3.8957	3.4669	3.1733	2.9600	2.7980
19	247.6861	19.4431	8.6670	5.8114	4.5678	3.8844	3.4551	3.1613	2.9477	2.7854
20	248.0131	19.4458	8.6602	5.8025	4.5581	3.8742	3.4445	3.1503	2.9365	2.7740
21	248.3094	19.4481	8.6540	5.7945	4.5493	3.8649	3.4349	3.1404	2.9263	2.7636
22	248.5791	19.4503	8.6484	5.7872	4.5413	3.8564	3.4260	3.1313	2.9169	2.7541
23	248.8256	19.4523	8.6432	5.7805	4.5339	3.8486	3.4179	3.1229	2.9084	2.7453
24	249.0518	19.4541	8.6385	5.7744	4.5272	3.8415	3.4105	3.1152	2.9005	2.7372
25	249.2601	19.4558	8.6341	5.7687	4.5209	3.8348	3.4036	3.1081	2.8932	2.7298
26	249.4525	19.4573	8.6301	5.7635	4.5151	3.8287	3.3972	3.1015	2.8864	2.7229
27	249.6309	19.4587	8.6263	5.7586	4.5097	3.8230	3.3913	3.0954	2.8801	2.7164
28	249.7966	19.4600	8.6229	5.7541	4.5047	3.8177	3.3858	3.0897	2.8743	2.7104
29	249.9510	19.4613	8.6196	5.7498	4.5001	3.8128	3.3806	3.0844	2.8688	2.7048
30	250.0951	19.4624	8.6166	5.7459	4.4957	3.8082	3.3758	3.0794	2.8637	2.6996

Annexe F : Modélisation mathématiques des profils de dissolution

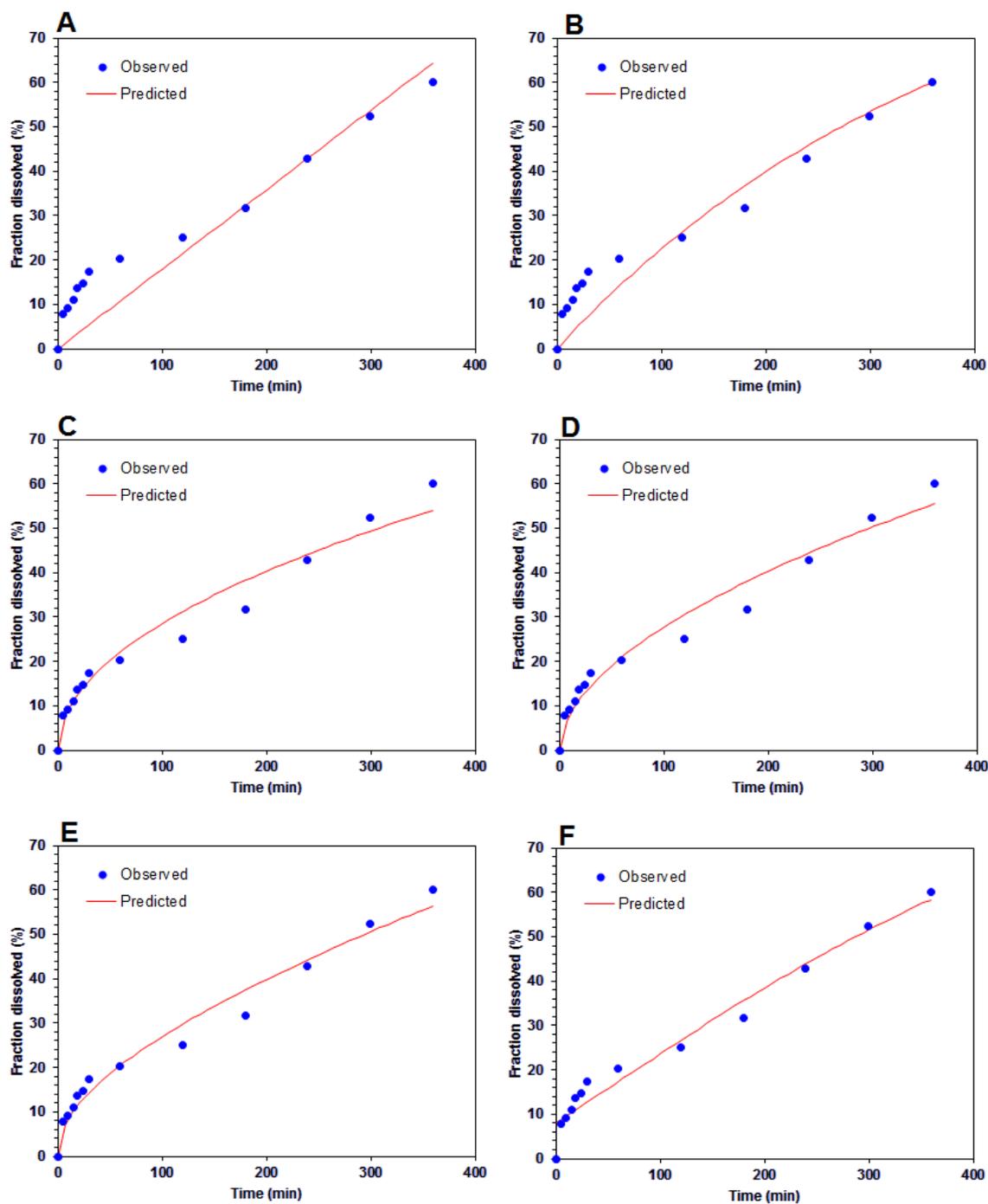


Figure A.11 : Simulation mathématique du profil de dissolution des nanoparticules non furtives- GI à pH 6,8 ajusté par les modèles : de 1^{er} ordre (A), d'ordre zéro (B), de Higuchi (C), de Korsmeyer-Peppas (D), de Peppas-Sahlin (E) et de Weibull (F)

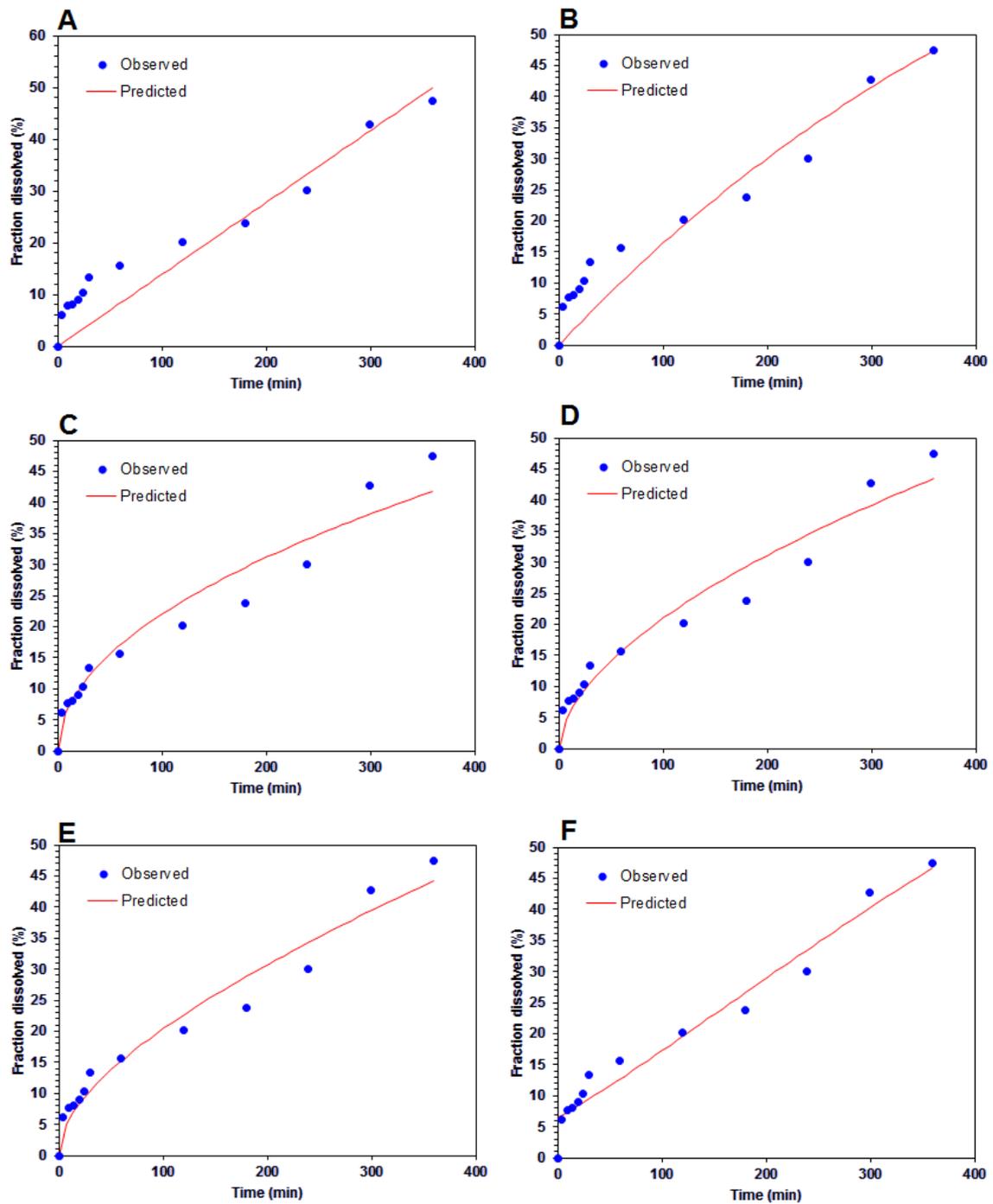


Figure A.12 : Simulation mathématique du profil de dissolution des nanoparticules furtives- GI à pH 6,8 ajusté par les modèles : de 1^{er} ordre (A), d'ordre zéro (B), de Higuchi (C), de Korsmeyer-Peppas (D), de Peppas-Sahlin (E) et de Weibull (F)

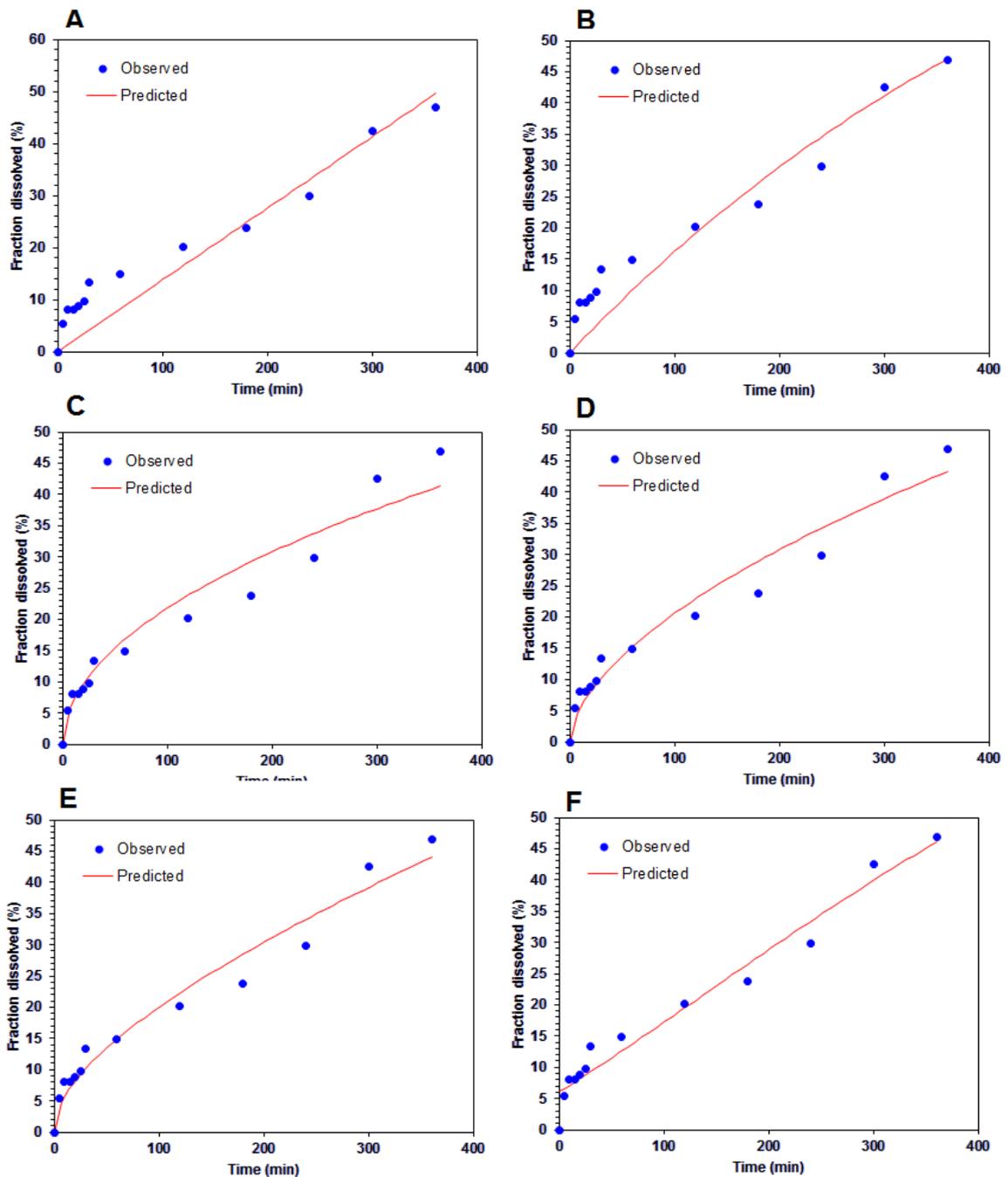


Figure A.13 : Simulation mathématique du profil de dissolution des émulsions multiples non furtive (EM sans PEG) à pH 6,8 ajusté par les modèles : de 1^{ier} ordre (A), d'ordre zéro (B), de Higuchi (C), de Korsmeyer-Peppas (D), de Peppas-Sahlin (E) et de Weibull (F)

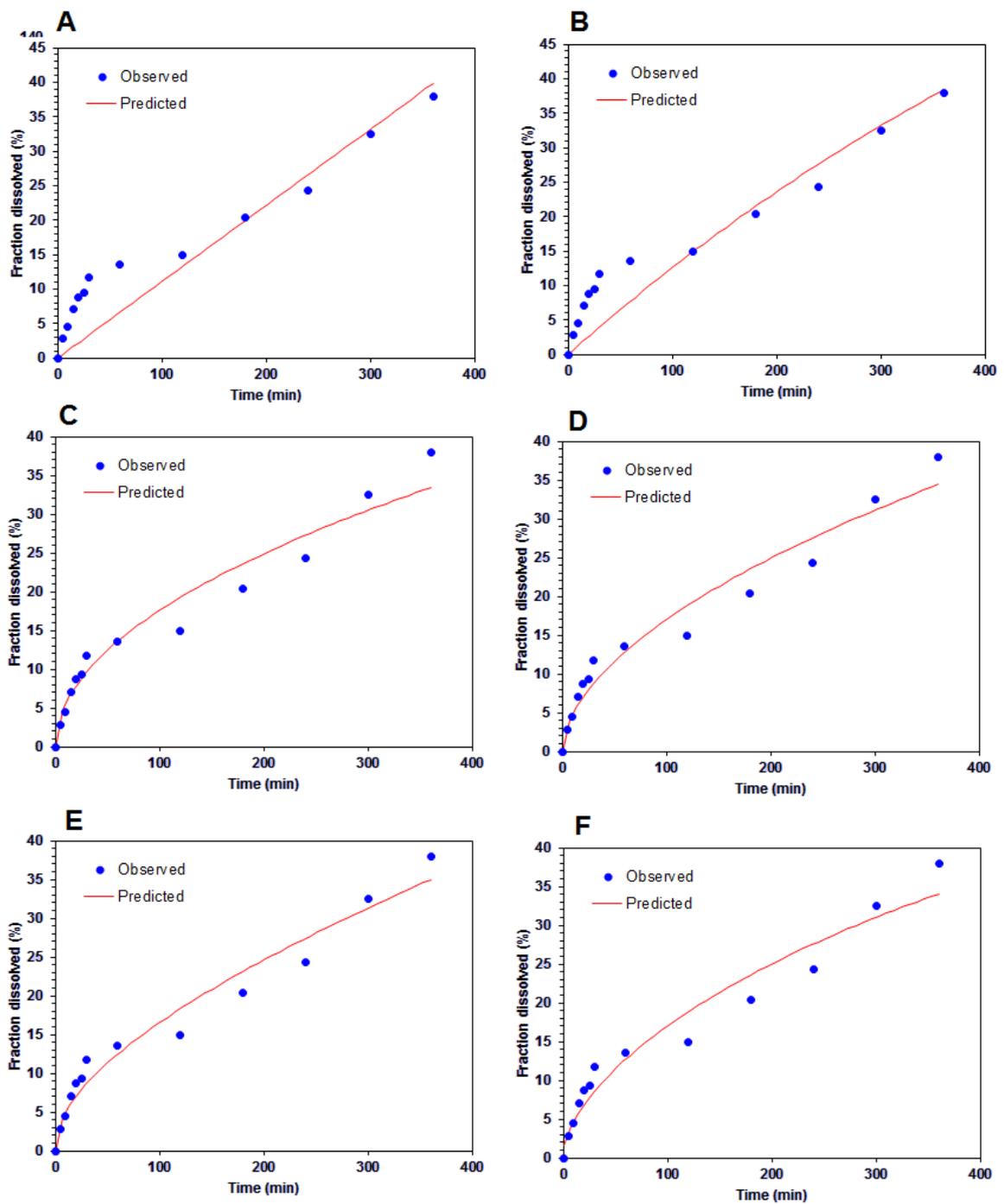


Figure A.14 : Simulation mathématique du profil de dissolution des émulsions multiples furtive (EM sans PEG) à pH 6,8 ajusté par les modèles : de 1^{er} ordre (A), d'ordre zéro (B), de Higuchi (C), de Korsmeyer-Peppas (D), de Peppas-Sahlin (E) et de Weibull (F)

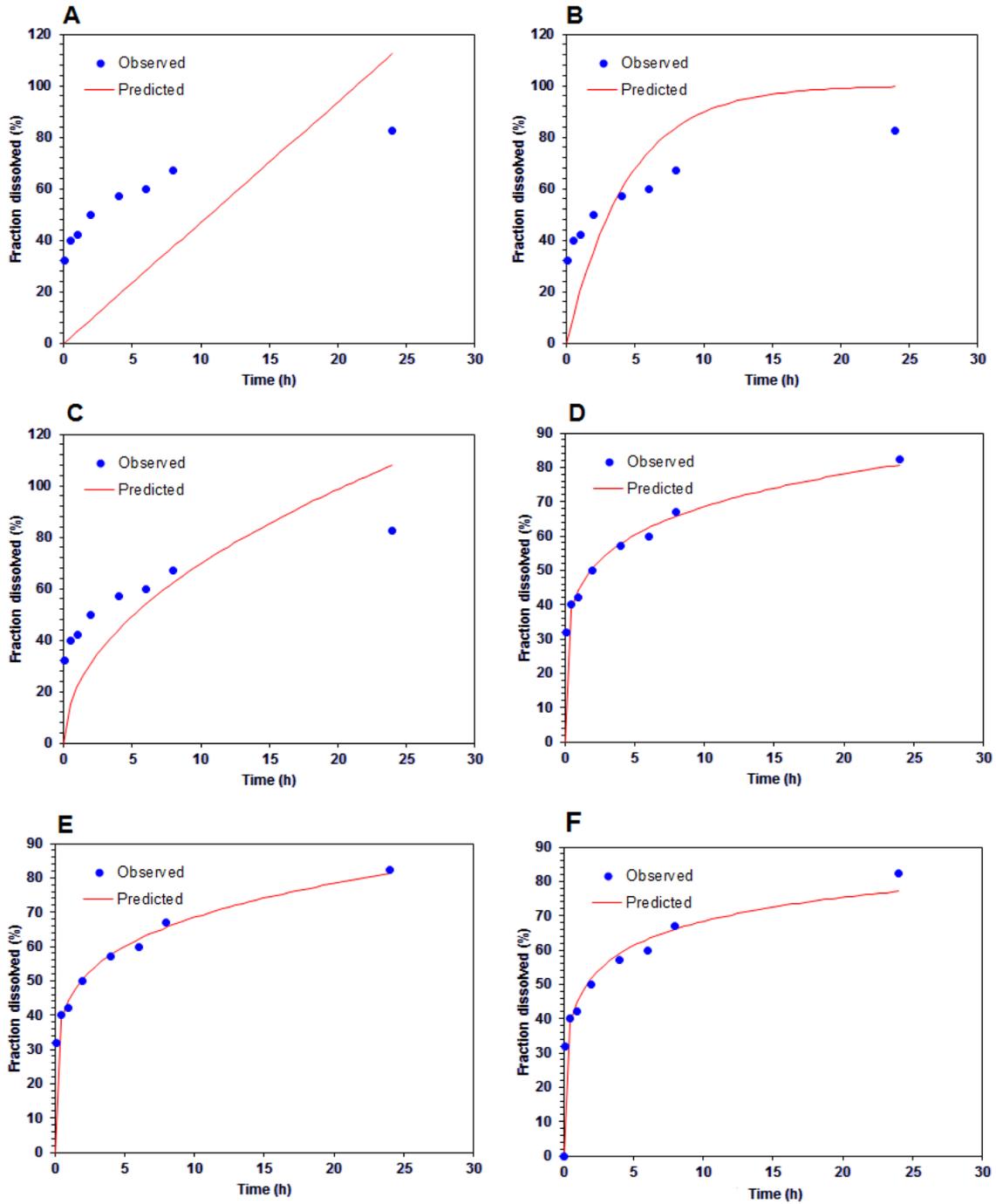


Figure A.15 : Simulation mathématique du profil de dissolution des nanoparticules furtives- GI à pH 7,4 ajusté par les modèles : de 1^{er} ordre (A), d'ordre zéro (B), de Higuchi (C), de Korsmeyer-Peppas (D), de Peppas-Sahlin (E) et de Weibull (F)

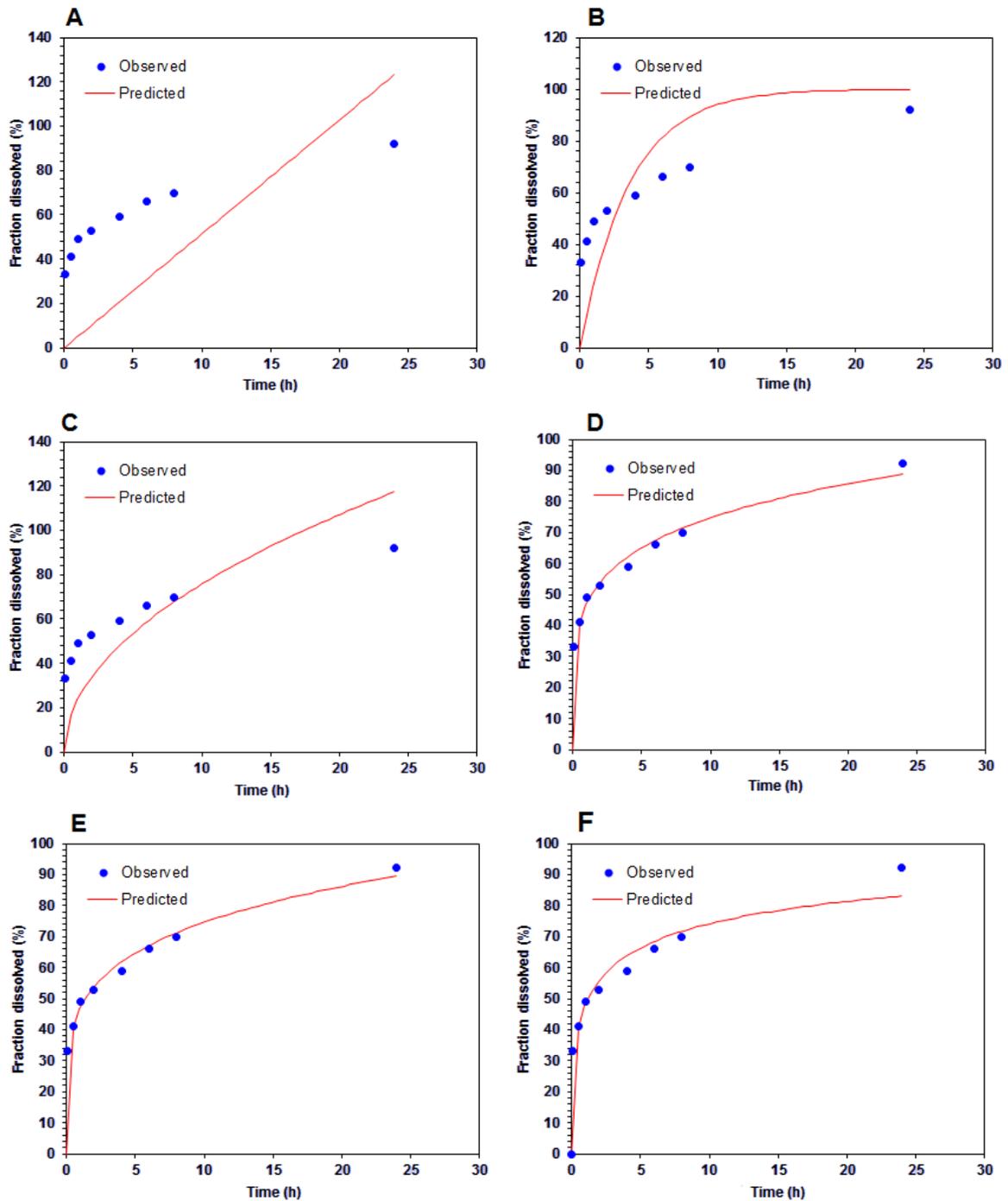


Figure A.16 : Simulation mathématique du profil de dissolution des nanoparticules non furtives- GI à pH 7,4 ajusté par les modèles : de 1^{er} ordre (A), d'ordre zéro (B), de Higuchi (C), de Korsmeyer-Peppas (D), de Peppas-Sahlin (E) et de Weibull (F)

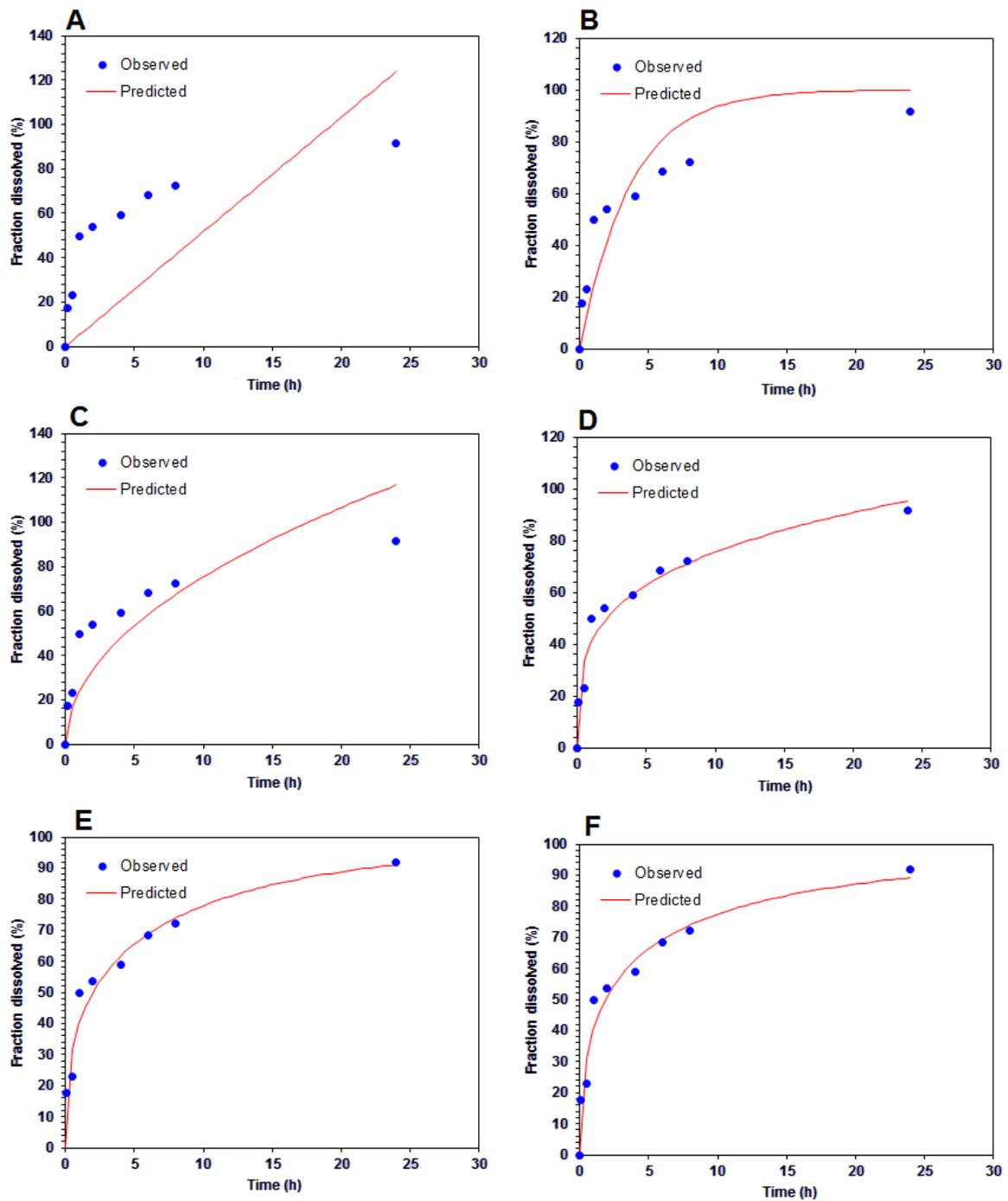


Figure A.17 : Simulation mathématique du profil de dissolution des émulsions multiples (EM) sans PEG à pH 7,4 ajusté par les modèles : de 1^{ier} ordre (A), d'ordre zéro (B), de Higuchi (C), de Korsmeyer-Peppas (D), de Peppas-Sahlin (E) et de Weibull (F)

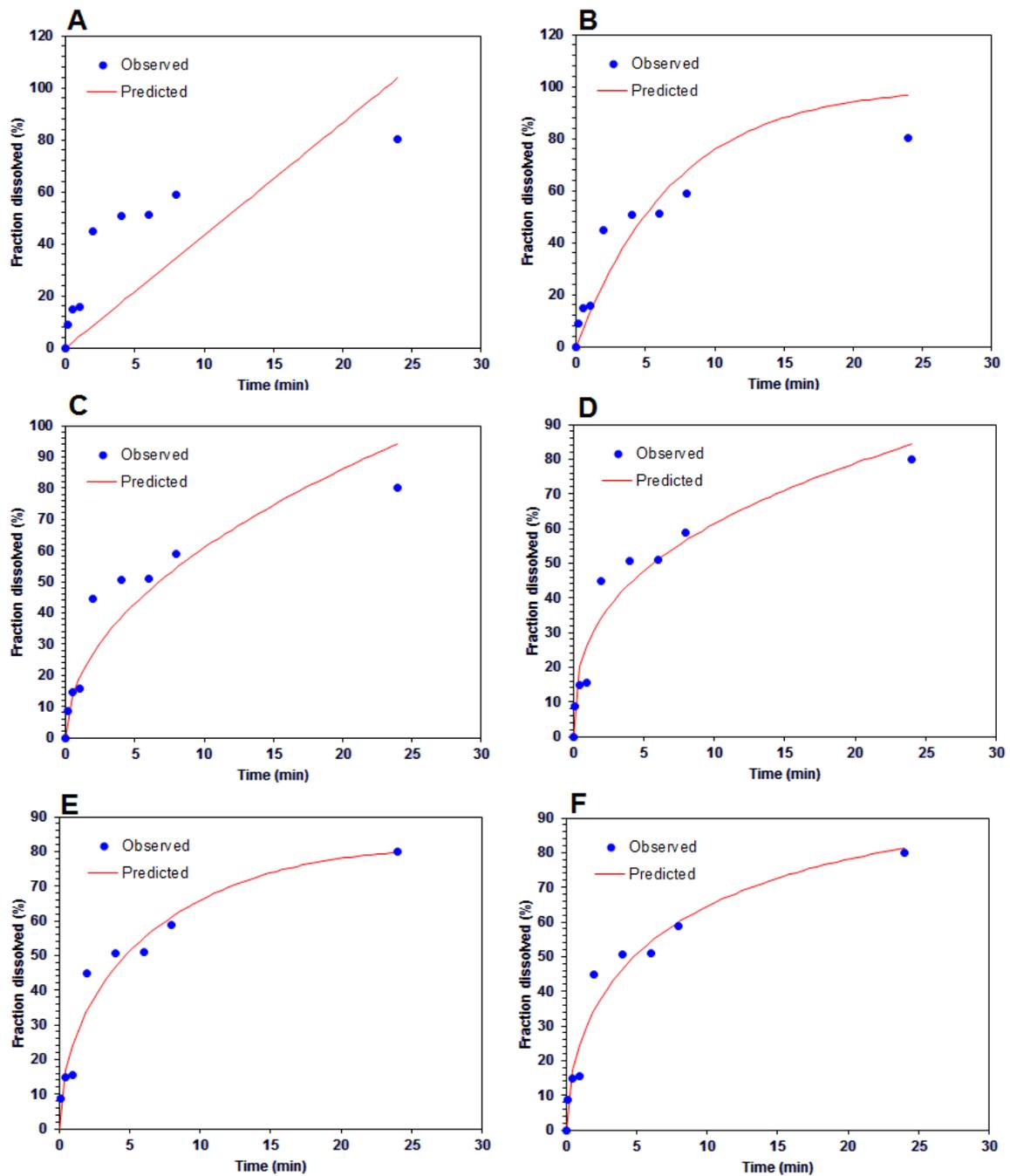


Figure A.18 : Simulation mathématique du profil de dissolution des émulsions multiples avec PEG à pH 7,4 ajusté par les modèles : de 1^{ier} ordre (A), d'ordre zéro (B), de Higuchi (C), de Korsmeyer-Peppas (D), de Peppas-Sahlin (E) et de Weibull (F)

/



Optimization of chitosan-coated W/O/W multiple emulsion stabilized with Span 80 and Tween 80 using Box–Behnken design

Naima Faghmous, Djallel Bouzid, Marwa Boumaza, Asma Touati & Olivier Boyron

To cite this article: Naima Faghmous, Djallel Bouzid, Marwa Boumaza, Asma Touati & Olivier Boyron (2020): Optimization of chitosan-coated W/O/W multiple emulsion stabilized with Span 80 and Tween 80 using Box–Behnken design, Journal of Dispersion Science and Technology, DOI: [10.1080/01932691.2020.1774387](https://doi.org/10.1080/01932691.2020.1774387)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/01932691.2020.1774387>



Published online: 16 Jun 2020.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



Optimization of chitosan-coated W/O/W multiple emulsion stabilized with Span 80 and Tween 80 using Box–Behnken design

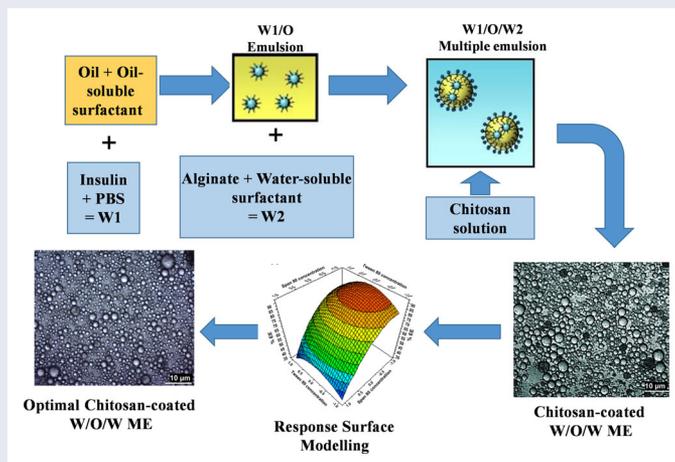
Naima Faghmous^{a,b} , Djallel Bouzid^{a,c}, Marwa Boumaza^c, Asma Touati^c, and Olivier Boyron^d

^aProcess Engineering Laboratory for Sustainable Development and Health Products, National Polytechnic School of Constantine, Constantine, Algeria; ^bDepartment of Pharmaceutical Engineering, Faculty of Process Engineering, Salah Boubnider Constantine 3 University, Constantine, Algeria; ^cDepartment of Process Engineering, National Polytechnic School of Constantine Malek Bennabi, Constantine, Algeria; ^dChemistry, Catalysis, Polymers and Processes, Villeurbanne Cedex, France

ABSTRACT

The present study aimed to optimize insulin-loaded chitosan-coated W/O/W multiple emulsions (MEs) by investigating the effect of process variables on the response using Box–Behnken design. Effect of three independent factors, which are, the concentration of the lipophilic surfactant (Span 80) in the primary emulsion, the concentration of the hydrophilic surfactant (Tween 80) in the secondary emulsion, and phase volume ratio (W/O) in the primary emulsion, was studied on three dependent responses, which are particle size, zeta potential, and entrapment efficiency. The optimized ME showed particle size of 193.7 nm and -64.58 mV zeta potential with maximum entrapment efficiency of 91.84%. The *in vitro* drug release profile from W/O/W ME was studied under two simulated physiological conditions. *In vitro* drug release behavior followed the Peppas–Sahlin model and showed an initial and rapid release followed by a slower release. The results of the present investigation suggest the potential of the chitosan-coated W/O/W MEs as a promising oral drug delivery system for insulin.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE HISTORY

Received 28 January 2020
Accepted 26 April 2020

KEYWORDS

Insulin; chitosan; optimization; multiple emulsion; Box–Behnken design

Introduction

Insulin therapy remains indispensable to the treatment of type 1 diabetes mellitus (T1DM) and is essential in advanced type 2 diabetes mellitus (T2DM).^[1] To achieve a higher bioavailability, insulin is usually administered by the parenteral route via the subcutaneous injection. To avoid the discomfort of insulin injections, the oral formulation is preferred. However, the oral delivery of insulin has some limitations, which include the low bioavailability, due to enzymatic and/or metabolic degradation

in the gastrointestinal tract, poor intrinsic permeability across biological membranes, rapid post-absorptive clearance, and chemical and physical instability.^[2]

Several attempts have been proposed to deliver insulin orally and hence protect the formulation in gastric conditions of gastrointestinal tract, among them lipid emulsions such as water-in-oil (W/O) microemulsions and multiple emulsions (MEs).^[3,4] In fact, emulsion systems can protect peptides or proteins that are introduced into the internal phase.^[4]

MEs are complex and heterogeneous dispersion systems in which the dispersed phase is itself an emulsion.^[5] These emulsions are also called emulsion of emulsion or double emulsions.^[6,7] Two major types of MEs can be distinguished: water-oil-water (W/O/W) emulsions and oil-water-oil (O/W/O) emulsions.^[8,9] W/O/W MEs are polydisperse vesicular systems in which the dispersed oil drops contain even smaller dispersed droplets, which consist of a liquid identical to the continuous phase.^[10]

Because of the presence of a reservoir phase inside droplets of another phase that can prolong the release of active ingredients, MEs find many applications in various fields, such as cosmetics, food, and pharmaceuticals.^[11,12] Furthermore, W/O/W ME is thought to be an efficient drug carrier because it can protect peptides against proteolysis.^[3,13] Several researchers have reported that the enteral bioavailability of drugs, including peptides, was successfully promoted using the W/O/W ME, due to their protective ability; improving the fluidity of the membrane and transient opening of the tight junctions induced by lipid constituents or surfactants.^[14,15] In addition, MEs show a better stability in gastric juices compared with W/O microemulsions.^[16]

MEs are often stabilized using a combination of hydrophilic or high HLB and hydrophobic surfactants or low HLB.^[17] The ratio of these surfactants is important in achieving stable MEs.^[18] When preparing a bilayer emulsion, it is important to remove the excess of the first emulsifier before adding the next emulsifier to reduce the rate of flocculation.^[19,20]

The coating of W/O/W ME with polyelectrolyte polymers such as polysaccharides has received increased attention during the past few years.^[21] That is because of its role in the stability of MEs by balancing the osmotic pressure between the internal and external aqueous phases or by forming the rigid interfacial layer between the oil and internal aqueous phase.^[22]

Alginate (Alg) and chitosan (CS) are polyelectrolyte biopolymers; the first is a natural anionic polysaccharide and can be extracted from marine brown algae. It is a linear binary copolymer that consists of α -L-guluronic and 1,4-linked- β -D-mannuronic acids. Alg gels in mild conditions in the presence of divalent ions, where CS is a cationic polysaccharide obtained by chitin deacetylation.^[23]

When Alg is mixed with CS, strong ionic interactions occur between the carboxyl residues of Alg and the amino terminals of CS, forming a polyelectrolyte complex.^[24] Owing to their favorable properties, such as biodegradability, biocompatibility, non-toxicity, these two biopolymers are used for the encapsulation of a wide variety of biologically active agents including proteins.^[25,26]

Recently, the response surface methodology (RSM), utilizing the proper experimental designs, has become widely used for formulation optimization. The Box–Behnken designs (BBD) are a class of rotatable or nearly rotatable second-order designs based on three-level incomplete factorial designs.^[27] The BBD is still considered to be more efficient and most powerful than other designs such as the central composite design (CCD), Doehlert design, and three-level full factorial design. Moreover, it requires fewer

experimental runs than CCD and three-level full factorial design, and is consequently less expensive. It has been successfully used to optimize the preparation of many drug delivery systems and formulations including tablets, microparticles, self-nano-emulsifying drug delivery systems and nanoparticles.^[28]

The aims of the present study were, first, to prepare and optimize CS-coated W/O/W MEs of insulin, using RSM based on BBD; and, second, to evaluate the effect of CS-coating on the *in vitro* and rheological behaviors of resulting MEs, for improving the protein stability and hence illustrating the protective capability of the CS-coated MEs in gastric conditions of the gastrointestinal tract.

Therefore, polyelectrolyte coated W/O/W micro and nanoemulsions containing insulin were developed. The ME stability was achieved by gelling the inner aqueous phase using sodium Alg in the presence of nonionic surfactants of Tween and Span type.

Coating of MEs was carried out using the ionic gelation method. Hence, calcium cations, first, cross-linked with negatively charged Alg through ionic gelation to form the first shell, and then, CS interacted with Alg to form a tighter coating.

In this study, experiments used for modeling globule size, charge surface, and entrapment efficiency of MEs were performed on three levels of three factors, using BBD.

Materials and methods

Components

Recombinant human insulin was obtained as regular human insulin of recombinant DNA origin from Sanofi Aventis (Tours, France). Sodium Alg (Medium molecular weight), CS (medium molecular weight) with 74% degree of deacetylation, Span[®] 80, Tween[®] 80, and paraffin oil with a purity of 99.5% (RT25HC) were purchased from Sigma-Aldrich. High-performance liquid chromatography (HPLC) grade acetonitrile (ACN) and methanol (MeOH) were supplied by JTBaker[®] (USA). Monobasic potassium phosphate (KH₂PO₄) was obtained from Sigma-Aldrich. Ultrapure water obtained from Millipore Milli-Q Plus apparatus (Millipore, RJ, Brazil) was used for all analyses. Other chemical reagents and solvents used were of analytical grade and all other solvents were of HPLC grade.

Multiple W/O/W emulsion preparations

The W/O/W emulsions were prepared by means of two-step emulsification method according to Ito et al.^[29] and based on an adapted protocol initially described by Li et al.^[21] with some modifications.

Primary emulsification

In the first step, the internal aqueous phase was prepared by dissolving 150 mg of insulin into phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) and adding 8 g of the oil phase (paraffin oil). The lipophilic emulsifier, Span80[®], was added to the oil phase as the emulsifier. A single-phase W/O emulsion was prepared through homogenization (Polytron PT2100) at 800 rpm for 15 minutes.

Table 1. Codes and levels of independent variables.

Code	Factors (independent variables)	Levels		
		Low (-1)	Medium (0)	High (+1)
X_1	Concentration of Span 80 in the primary emulsion (%) (w/v)	5	10	15
X_2	Concentration of Tween 80 in the secondary emulsion (%) (w/v)	1	3	5
X_3	Phase volume ratio (W/O) in the primary emulsion	20	30	40

Secondary emulsification

The W/O emulsion was then used as the disperse phase for the second step of emulsification. This primary emulsion was dropped into 18 g of an aqueous solution containing Tween 80 as the hydrophilic emulsifier and 0.067% (w/v) sodium Alg. The pH of Alg solution was adjusted initially to 4.9 using hydrochloric acid. The W/O/W ME was formed after continuous stirring at 600 rpm for 15 minutes.

Preparation of CS-coated multiple W/O/W emulsion

The CS-coated multiple W/O/W emulsion was prepared based on polyelectrolyte cross-linking. The process was executed as follows: 0.5 ml calcium chloride solution was dropped into 12 ml of the above-mentioned MEs, with stirring at 600 rpm for 30 minutes, then, 2 ml of the CS solution (0.06% w/v) was added dropwise, while stirring at 600 rpm, over 90 minutes. The pH of the CS solution was adjusted initially to 4.6 using 0.1 N NaOH solution.

Experimental design

BBD was used to statistically optimize the formulation parameters and test the effects of formulation ingredients on globule size (PS), particle surface charge (zeta potential: ZP), and entrapment efficiency (% EE). The concentration of Span 80 in the primary emulsion (X_1), the concentration of Tween 80 in the secondary emulsion (X_2), and the phase volume ratio (W/O) in the primary emulsion (X_3) were chosen as the independent variables (factors) selected in preparing insulin-loaded MEs, while PS, ZP, and % EE, were taken as the dependent variables (Y_1 , Y_2 , and Y_3 respectively). The experimental range of X_1 , X_2 , and X_3 used to prepare the ME formulations is given in Table 1.

For each factor, the experimental range based on the result of the preliminary experiment and screening study was selected. Process variables were studied by conducting the runs at different levels of all factors. Data collected for responses in each run was analyzed using Minitab[®] 19 statistical software (trial version) and fitted into multiple linear regression models.

The optimized formulation was selected by Minitab[®] 19 (trial version). It was based on set criteria of minimum PS, optimum value for ZP (>30 mV), and maximum % EE. Hence, the corresponding dependent variables were predicted based on the previous modeling made by the software. This optimized formulation was then prepared and all dependent variables were measured practically. Based on the predicted responses and the observed ones, the error percent was calculated.

Characterization and evaluation of MEs

Globule size analysis (PS)

The mean size of the inner droplets of the ME, size distribution, and polydispersity index (PDI) were determined in freshly prepared samples by the dynamic laser light scattering technique using a particle size analyzer (Horiba Scientific's SZ-100). PS measurements were carried out at 90° scattering angle. The samples were freshly diluted with distilled water before analysis. Each measurement was performed in triplicate.

Zeta potential (ZP)

ZP of insulin-loaded MEs was determined by the laser Doppler electrophoretic mobility measurement technique using a Zetasizer (HORIBA Scientific's SZ-100) at 25 °C, after suitable dilution with filtered ultrapure water (0.22 μm). All measurements were carried out in triplicate.

Entrapment efficiency (% EE)

Entrapment efficiency was calculated by using the indirect method. It was determined by measuring the leakage ratio, after destroying the coated ME.^[21] Briefly, 4 ml of methanol was added to solubilize 1 ml of the ME. Then, 100 μl of HCl (pH 1.0) was added to adjust the final pH to 3.0. Distilled water was added to reach 10 ml and mixed well. The destroyed ME was centrifuged at 16,000 rpm for 10 min at 4 °C. The amount of insulin encapsulated in the ME was calculated as the difference between the total amount used to prepare the formulation and the amount of free insulin present in the outer aqueous phase after centrifugation. The clear supernatant was used to determine the presence of the free insulin by HPLC (as described below). % EE was calculated as (Equation (1)).^[30]

$$\% EE = \frac{\text{total amount of insulin} - \text{free insulin in supernatant}}{\text{total amount of insulin}} \times 100 \quad [1]$$

Human insulin was determined by isocratic RP-HPLC/UV based on the validated protocol of Najjar et al.^[31] A column type RP-C8 (Shim-pack VP-ODS/-C8/-Phenyl, 150 × 4.6 mm, 4.6 μm particle size, and pore size 12 nm) was used. The mobile phase consisted of 62% KH₂PO₄ buffer (0.1 M), 26% ACN, and 12% MeOH. The final pH was adjusted to 3.1. The mobile phase was pumped at a flow rate of 1.0 mL/min and a detection wavelength of 214 nm was employed.^[32]

Microscopic evaluation

The morphological characteristics (shape, appearance, and homogeneity) of ME formulations were observed microscopically at 100× magnification after suitable dilutions with distilled

Table 2. Design matrix for BBD for CS-coated MEs.

Batch	X1	X2	X3	Y1 (nm)	PDI	Y2 (mV)	Y3 (%)
1	-1	-1	0	3022.9 ± 6.85	0.52 ± 0.015	-4.5 ± 0.06	35.87 ± 6.68
2	+1	-1	0	284.7 ± 3.37	0.36 ± 0.044	-25.2 ± 0.96	84.72 ± 5.30
3	-1	+1	0	1741.0 ± 6.17	0.37 ± 0.017	-18.9 ± 0.28	30.72 ± 2.92
4	+1	+1	0	560.8 ± 2.73	0.45 ± 0.035	-29.6 ± 0.45	78.30 ± 5.09
5	-1	0	-1	2283.3 ± 4.56	0.34 ± 0.026	-17.4 ± 0.23	48.28 ± 5.70
6	+1	0	-1	443.2 ± 2.53	0.55 ± 0.040	-18.8 ± 0.18	88.87 ± 3.54
7	-1	0	+1	1450.4 ± 5.56	0.36 ± 0.017	-31.2 ± 0.08	47.67 ± 5.11
8	+1	0	+1	193.3 ± 2.61	0.26 ± 0.006	-64.8 ± 0.38	92.48 ± 4.06
9	0	-1	-1	1350.7 ± 4.71	0.52 ± 0.020	-12.1 ± 0.21	74.87 ± 4.31
10	0	+1	-1	820.8 ± 2.05	0.33 ± 0.031	-15.2 ± 0.16	71.90 ± 4.01
11	0	-1	+1	382.1 ± 2.24	0.18 ± 0.026	-30.2 ± 0.61	65.96 ± 3.61
12	0	+1	+1	495.3 ± 3.75	0.36 ± 0.035	-36.2 ± 0.36	75.00 ± 4.33
13	0	0	0	400.0 ± 2.34	0.44 ± 0.015	-29.9 ± 0.23	89.23 ± 4.30
14	0	0	0	456.8 ± 2.06	0.35 0.031	-31.5 ± 0.30	80.56 ± 3.00
15	0	0	0	498.6 ± 2.38	0.47 0.017	-33.2 ± 0.46	81.05 ± 3.08

Values expressed as mean ± S.D, $n = 3$.

water using Euromex-Oxion optical microscope equipped with a Nikon camera.

Rheological analysis

Rheological analyzes were carried out on Anton Paar MCR-102 Rheometer using a cone plate (CP25-1; diameter: 24.982 mm) at 20 ± 0.1 °C. All the measurements were carried out in triplicate. The rheological behavior of each ME was evaluated by plotting the viscosity (mPa) versus shear rate (1/s).

In vitro release studies

To evaluate the influence of pH on the drug release, in vitro drug release studies were carried out in acidic buffer (pH 1.2) and phosphate buffered saline (PBS/pH 6.8 and PBS/pH 7.4). These buffer systems were selected based on the normal variations of pH and general transit time along the gastrointestinal tract from the stomach (pH 1.2, 2 hours) and small intestine (pH 6.8, 6 hours) to the colon region (pH 7.4, 24 hours), as reported by Venkata Siddhartha et al.^[33] The in vitro release test was carried out using the dialysis bag technique.^[34] Dialysis bags with a molecular weight cutoff 12 kDa and pore size 2.4 nm (Hi-media) were washed with distilled water and soaked in both simulated gastric medium (SGM: acidic buffer, pH 1.2); and simulated intestinal medium (SIM: PBS/pH 6.8 and PBS/pH 7.4) overnight before use. 5 ml of freshly prepared MEs were introduced into the dialysis bag and was tightly sealed at each end with thread. The dialysis bag was placed in the beaker USP dissolution apparatus II (Distek 2500) that contained 500 ml of both dissolution medium (acidic buffer and phosphate buffer saline) at 37 ± 0.5 °C. Aliquots of 5 ml each were withdrawn at specified time intervals, and replaced with an equal volume of the fresh medium to maintain sink conditions.^[35]

The withdrawn aliquots were filtered and analyzed after suitable dilutions by a UV double beam visible spectrophotometer (Shimadzu UV-1800) for quantification of released insulin using a published and validated spectroscopic method at 280 nm (λ_{\max}).^[36] After an absorbance reading, the solution concentration was calculated using the calibration curve. The study was done in triplicate. Drug concentration was calculated and expressed as the cumulative percent of the drug released.

Release kinetics

To identify the mechanism and kinetics of drug release from formulated MEs, in vitro release study data were fitted to different kinetic models including zero-order (Equation (2)),^[37] first-order (Equation (3)),^[38] Higuchi equation (Equation (4)),^[39] Korsmeyer-Peppas (Equation (5)),^[40] and Peppas-Sahlin model (Equation (6)).^[41]

$$Q_t = Q_0 + k_0.t \quad [2]$$

where Q_t is the amount of drug dissolved in time t , Q_0 is the initial amount of drug in solution, which is zero, and k_0 is the zero-order release constant expressed in units of concentration/time.

$$\ln Q_t = \ln Q_0 - k_1.t \quad [3]$$

where k_1 is the first-order release constant, Q_t is the amount of drug dissolved in time t , and Q_0 is the initial amount of drug.

$$Q_t = k_H.t^{1/2} \quad [4]$$

where Q_t is the amount of drug released in time t , and k_H is the Higuchi release constant.

$$\frac{\ln Q_t}{Q_0} = k_k.\ln t \quad [5]$$

where k_k is the Korsmeyer-Peppas release constant, Q_t is the amount of drug remaining in solution after time t , and Q_0 is the initial amount of drug.

$$Q_t = k_1.t^m + k_2.t^{2m} \quad [6]$$

where k_1 is the constant related to the Fickian kinetics, k_2 is the constant related to Case-II relaxation kinetics, and m is the diffusional exponent for a device of any geometric shape which inhibits controlled release.

The best-fitting mathematical model was selected based on the comparisons of several statistical parameters including the standard deviation (SD) and the adjusted determination coefficient ($Ad-R^2$). All calculations were carried out according to the following kinetics equations using a validated software, DDSolver for Microsoft Excel 2007.^[42]

Stability tests

The optimized formulations were subjected to stability testing. Optimized MEs were sealed in Type-I transparent glass vials and stored at refrigerated conditions ($2-8$ °C) for 45 days. Samples were analyzed for PS, ZP, and % EE and observed regarding changes in color, liquefaction, and phase separation.

Results and discussion

Experimental design

Variance analysis (ANOVA)

Using BBD, fifteen batches of insulin-loaded MEs were prepared by varying the three independent variables, X_1 , X_2 , and X_3 . Experimental runs and observed responses were given in Table 2. The results show that the PS varied from

Table 3. Analysis of variance (ANOVA) for PS.

Quadratic model	Df	SS	MS	F	p-value	R ²	Adjusted R ²	Predicted R ²
Regression	9	9.6909E + 6	1.07677E + 6	38.9694	0.000	0.986	0.961	0.782
Residual	5	138,155	27,631.1					
Lack of fit	3	133,257	44,418.9	18.1358	0.053			
Pure error	2	4898.48	2449.24					

193.3 nm to 3022.9 nm with an acceptable PDI, ZP from -4.5 mV to -64.5 mV, and % EE from 30.72% to 92.48%.

F-value and *p*-value are two statistical terms, which determine the significance of the model developed by RSM. The *p*-value less than 0.05 implies that the model terms are statistically significant.^[43]

The results of ANOVA of the second-order polynomial equations of PS, ZP, and % EE are given in Tables 3–5, respectively. As can be seen the quadratic model was significant for PS, ZP, and % EE of all MEs with *F*-value of 38.96, 20.22, and 26.89, respectively. In addition, values of regression coefficient ($R^2 = 0.986$ for PS, $R^2 = 0.973$ for ZP, and $R^2 = 0.980$ for % EE) signified a good correlation between the responses and the chosen variables.

The *F*-value of the lack-of-fit test implies that the lack of fit is not significant relative to the pure error and the developed model is in good agreement with experimental data.

The resultant equations for responses are shown in Equations (7)–(9). The *p*-value demonstrates the significance of each coefficient (Table 6).

$$Y_1 = 451.8 - 876.95X_1 - 177.81X_2 - 297.11X_3 + 640.43 X_1^2 + 310.11X_2^2 + 389.5 X_1X_2 \quad [7]$$

$$Y_2 = -31.53 - 8.30 X_1 - 3.48 X_2 - 12.36 X_3 + 10.80 X_2^2 - 8.05 X_1X_3 \quad [8]$$

$$Y_3 = 83.61 + 22.73 X_1 - 14.40 X_1^2 - 11.80 X_2^2 + 1.05 X_1 X_3 \quad [9]$$

For PS, coefficients X_1 , X_2 , X_3 , X_1^2 , X_2^2 , X_1X_2 were significant while X_3^2 , X_1X_3 , and X_2X_3 were least contributing and therefore were neglected from the full model. The reduced polynomial equation obtained after model reduction is shown in Equation (7).

For ZP, coefficients X_1 , X_2 , X_3 , X_2^2 , and X_1X_3 were significant while X_1^2 , X_3^2 , X_1X_2 , and X_2X_3 were least contributing and therefore were neglected from the full model. The reduced polynomial equation obtained after model reduction is shown in Equation (8).

Similarly, for % EE, coefficients X_1 , X_1^2 , and X_2^2 were significant while X_3^2 , X_1X_2 , X_1X_3 , and X_2X_3 were least contributing and therefore were neglected from the full model. The reduced polynomial equation obtained after model reduction is shown in Equation (9).

Effect of independent process variables on PS, ZP, and % EE

The effect of the surfactant concentrations (X_1 and X_2) and the phase volume ratio (X_3) in the primary emulsion on PS, % EE, and ZP of MEs were evaluated by RSM based on the designed experiment of BBD. Figure 1 illustrates the relative effect of each factor.

Figures 1A and B show that the increase of Span 80 concentrations (X_1) may have led to the smaller PS and both greater % EE and ZP values, while, at the middle value of Tween 80 concentrations (X_2), the ME showed a decrease in size, better drug entrapment (% EE) and the largest value of ZP. Although, at the maximum value of this hydrophilic surfactant concentration, the PS increased and the % EE was smallest, which correlates with the observations reported in the work of Aziz et al.,^[44] which show that interfacial film strength at the oil/water interface decreases as the Tween 80 concentration increases and higher concentrations of Tween 80 has a destructive effect on W/O/W emulsion stability. It has been reported in another study that the stability of W/O/W ME is sensitive to the mixed HLB numbers and concentration of the emulsifiers.^[45] In fact, the nonionic surfactants, Span 80 and Tween 80, contained in the emulsion as emulsifiers are located at the interface of the oil phase and outer aqueous phase, and the dispersion of inner droplets in the outer aqueous phase occurs due to the interaction between emulsifiers,^[46] which contributes to the strength of the interfacial film and stabilizes the emulsion system against globule coalescence.^[47,48]

Figure 1C shows that the phase volume ratio of W/O in the primary emulsion (X_3) affects significantly the inner droplet diameter (i.e., W/O emulsion dispersed in the outer aqueous phase). Therefore, the increase in the phase volume ratio in the primary emulsion from 20 to 40% led to a decrease in the inner droplet diameter of MEs and an increase in drug entrapment, whereas the decrease in the phase volume ratio of W/O in the primary emulsion causes the rise of the inner droplet diameter of W/O/W MEs. This was probably due to the aggregation of inner droplets, which is related to the frequency of collisions during primary and secondary emulsification resulting in the formation of aggregates.

This result is in agreement with other studies,^[17,49] where it was verified that a higher proportion of the inner droplet in the continuous phase of the primary emulsion produces an overall increase in PS of both W/O emulsion and W/O/W MEs. These results showed that a stable primary emulsion (W/O) is a fundamental and significant step for preparing a stable W/O/W ME.

Contour plots and response surface analysis

Two-dimensional contour plots and three-dimensional response surface plots are useful in the study of the effects

Table 4. Analysis of variance (ANOVA) for ZP.

Quadratic model	Df	SS	MS	F	p-value	R ²	Adjusted R ²	Predicted R ²
Regression	9	2635.94	292.882	20.2297	0.002	0.973	0.925	0.6
Residual	5	72.3892	14.4778					
Lack of fit	3	66.9425	22.3142	8.19369	0.111			
Pure error	2	5.44667	2.72334					

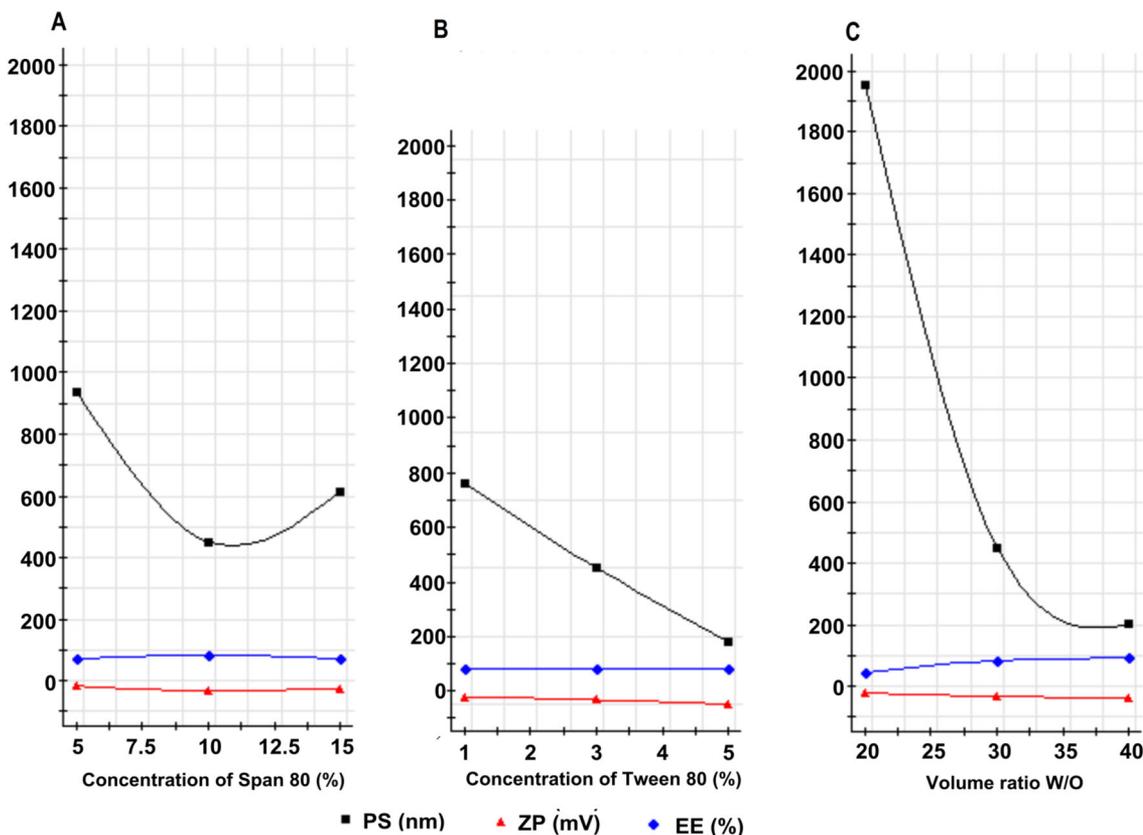
Table 5. Analysis of variance (ANOVA) for % EE.

Quadratic model	Df	SS	MS	F	p-value	R ²	Adjusted R ²	Predicted R ²
Regression	9	5384.58	598.287	26.8902	0.001	0.98	0.943	0.795
Residual	5	111.246	22.2492					
Lack of fit	3	63.8057	21.2686	0.896642	0.566			
Pure error	2	47.4405	23.7202					

Table 6. Regression coefficients and their p-values for PS, ZP, and % EE.

Source	PS			ZP			% EE		
	Coefficients	p-value	t-value	Coefficients	p-value	t-value	Coefficients	p-value	t-value
Model	–	< 0.0001	10.62	–	< 0.0001	1.90	–	< 0.0001	–2.72
Intercept	451.8	<i>0.0053</i>	–5.15	–31.53	<i>2.96E – 05</i>	–4.60	83.61	<i>6.8 E – 07</i>	1.56
X ₁	–876.95	<i>2.44e – 005</i>	–2.48	–8.30	<i>0.0016</i>	1.76	22.73	<i>3.81E – 05</i>	–0.33
X ₂	–177.81	<i>0.0292</i>	–8.46	–3.49	<i>0.0487</i>	–1.02	–0.69	0.6972	4.09
X ₃	–297.11	<i>0.0039</i>	2.78	–12.36	<i>0.0003</i>	4.71	–0.35	0.8415	–2.12
X ₁ ²	640.43	<i>0.0007</i>	0.33	1.18	0.5774	–0.71	–14.41	<i>0.0020</i>	–0.23
X ₂ ²	310.11	<i>0.0157</i>	6.14	10.80	<i>0.0028</i>	1.01	–11.80	<i>0.0049</i>	–3.57
X ₃ ²	0.31	0.9972	1.83	–2.70	0.2315	–0.35	0.12	0.9625	0.74
X ₁ X ₂	389.5	<i>0.0054</i>	4.00	2.50	0.2459	1.19	–0.32	0.8982	–0.08
X ₁ X ₃	145.75	0.1398	1.47	–8.05	<i>0.0082</i>	–3.84	1.06	0.6734	0.26
X ₂ X ₃	160.77	0.1108	10.62	–0.73	0.7188	1.90	3.00	0.2590	–2.72

Significant terms having p-value <0.05 were represented in italics.

**Figure 1.** Effect of independent process variables on dependent responses: (A) effect of concentration of Span 80 on PS, ZP, and % EE; (B) effect of concentration of Tween 80 on PS, ZP, and % EE; (C) effect of volume ratio W/O on PS, ZP, and % EE.

of two factors/variables on the response at once.^[27] From two-dimensional contour plots, a nearly linear relationship

can be distinguished between X₁ and X₂, X₁ and X₃, and X₂ and X₃. For PS, % EE, and ZP, contour plots were generated

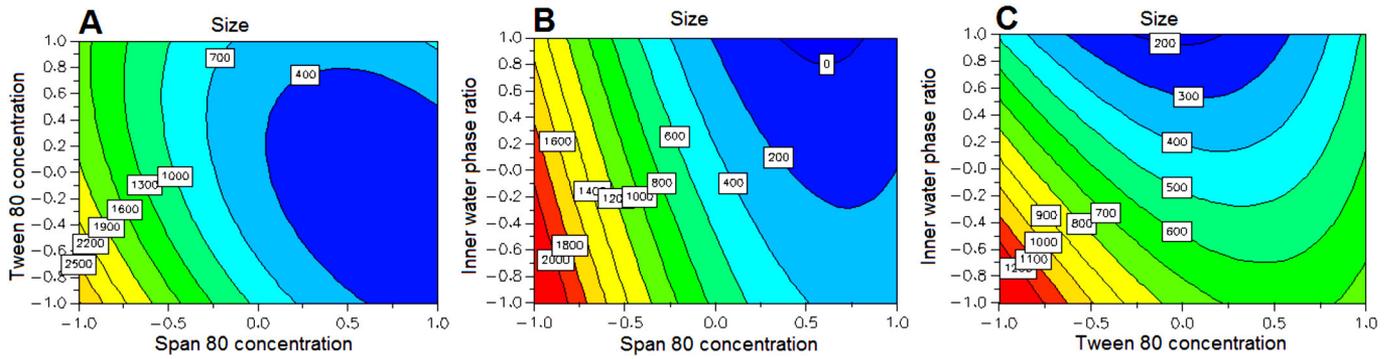


Figure 2. Contour plots showing the effect of X_1 versus X_2 at 0 level of X_3 (A), X_1 versus X_3 at 0 level of X_2 (B), and X_2 versus X_3 at 0 level of X_1 (C) on PS of MEs.

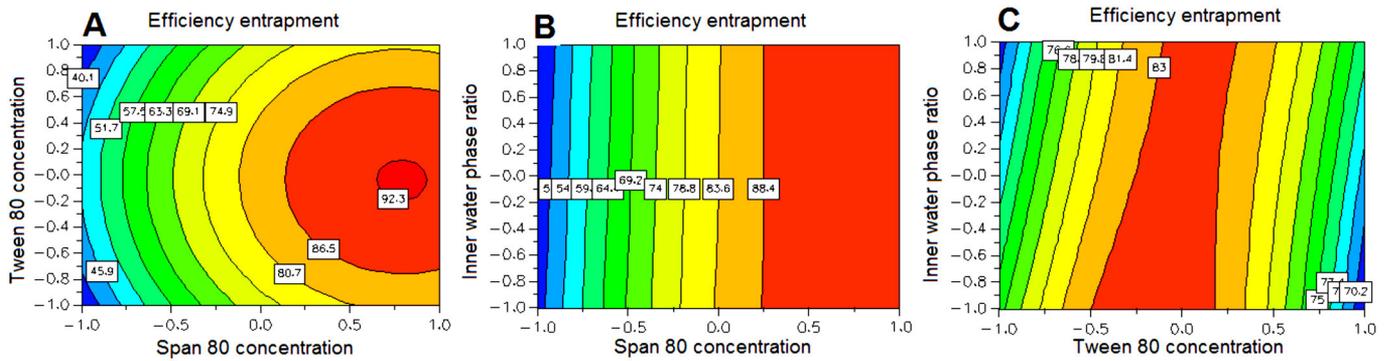


Figure 3. Contour plots showing the effect of X_1 versus X_2 at 0 level of X_3 (A), X_1 versus X_3 at 0 level of X_2 (B), and X_2 versus X_3 at 0 level of X_1 (C) on % EE of MEs.

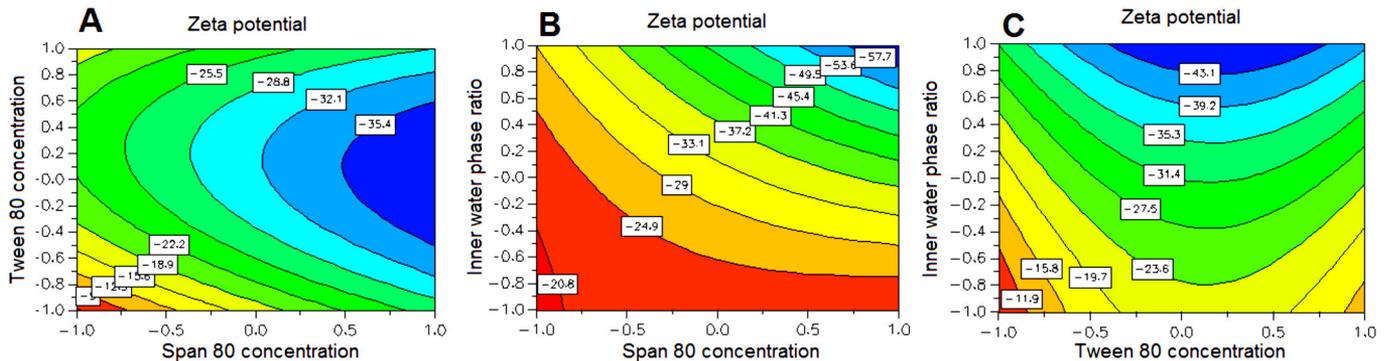


Figure 4. Contour plots showing the effect of X_1 versus X_2 at 0 level of X_3 (A), X_1 versus X_3 at 0 level of X_2 (B), and X_2 versus X_3 at 0 level of X_1 (C) on ZP of MEs.

between X_1 versus X_2 , X_1 versus X_3 , and X_2 versus X_3 at a fixed level (0) of the third variable as shown in Figures 2–4, respectively.

For PS (Figure 2A–C), plots have a parabolic shape and show that the increase in X_1 and X_3 increases PS, whereas the X_2 mid-value of 3% gives the minimum PS value. On either side of this mid-value, PS increases. Lowest PS of 193.3 nm was observed with the highest values of X_1 and X_3 .

For % EE, the maximum entrapment was observed at the high level of X_1 and the middle range of X_2 (Figure 3A–C). The % EE's highest value of 92.48% was observed with the highest value of X_1 .

For ZP (Figure 4A–C), it was found to be increasing with increase in X_1 and X_3 . Large negative ZP was observed at high levels of X_1 and X_3 . However, the contour plot of the lipophilic surfactant concentration in the primary emulsion (X_1) against the concentration of the hydrophilic surfactant

in the secondary emulsion (X_2) confirmed the maximum ZP at the middle value.

Response surface plots (Figures 5–7) show the relationship between these variables even more clearly when plotted between X_1 and X_2 , X_1 and X_3 , and X_2 and X_3 at a constant level (0) of X_3 , X_2 and X_1 , respectively for PS, ZP, and % EE.^[50] Hence, it was concluded from the contours that high concentration of the lipophilic surfactant in the primary emulsification ($X_1 = 15\%$), middle range of concentration of the hydrophilic surfactant in the secondary emulsion ($X_2 = 3\%$), and high phase volume ratio (W/O) in the primary emulsion ($X_3 = 40\%$) were required to attain the minimum PS, maximum % EE and optimum value of ZP.

Optimization results for MEs

To obtain the best formulation based on the two-step emulsification process, we applied the optimization tool of the

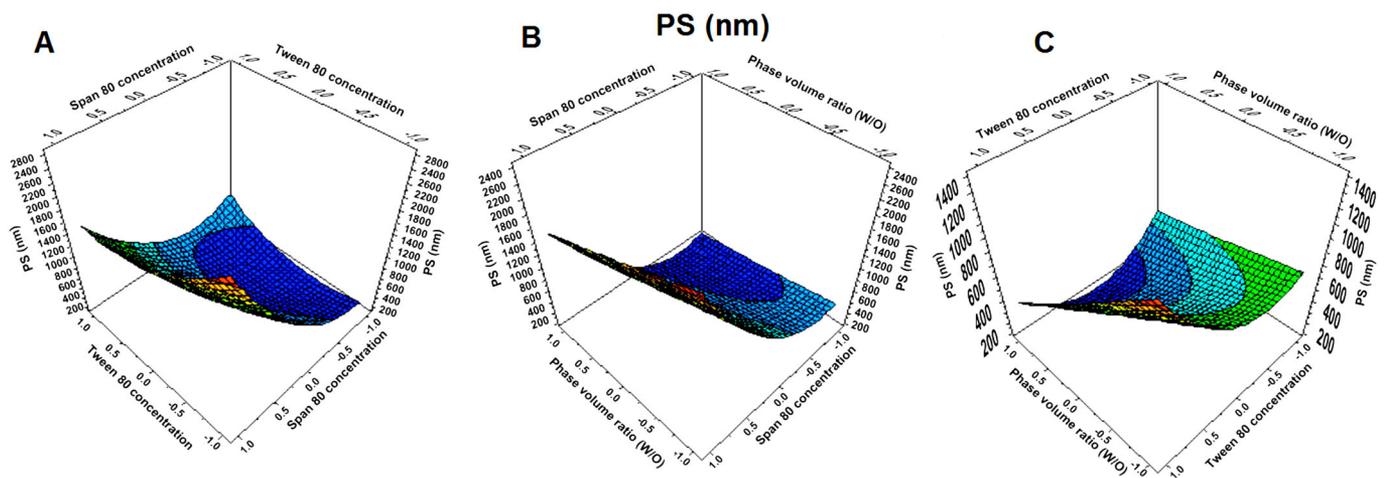


Figure 5. Response surface plots showing the effect of X_1 versus X_2 at 0 level of X_3 (A), X_1 versus X_3 at 0 level of X_2 (B), and X_2 versus X_3 at 0 level of X_1 (C) on PS of MEs.

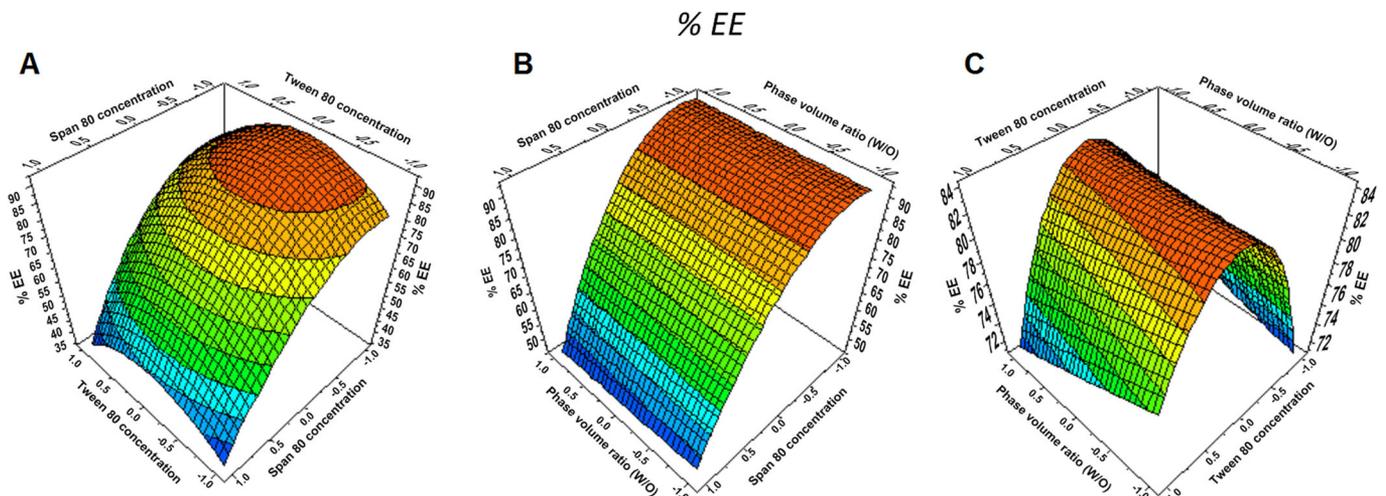


Figure 6. Response surface plots showing the effect of X_1 versus X_2 at 0 level of X_3 (A), X_1 versus X_3 at 0 level of X_2 (B), and X_2 versus X_3 at 0 level of X_1 (C) on % EE of MEs.

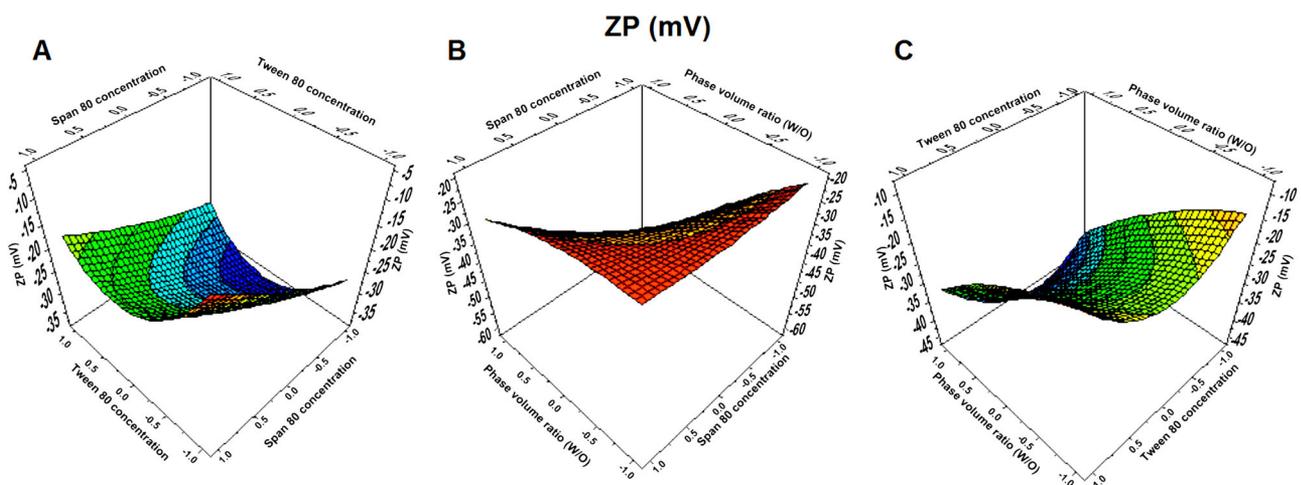


Figure 7. Response surface plots showing effect of X_1 versus X_2 at 0 level of X_3 (A), X_1 versus X_3 at 0 level of X_2 (B), and X_2 versus X_3 at 0 level of X_1 (C) on ZP of MEs.

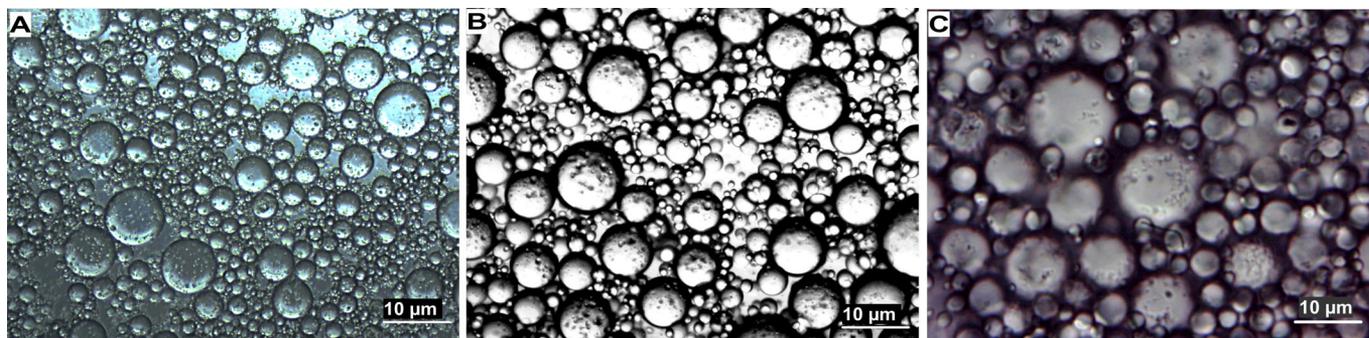
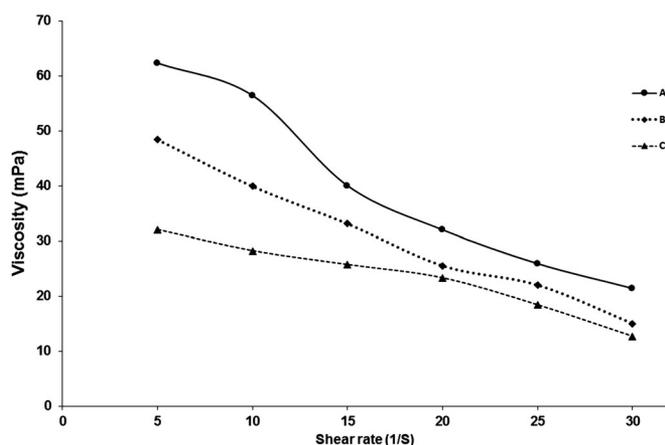
RSM. It was found that a nanoemulsion formulated with 40% of phase volume ratio of W/O in the primary emulsion, 15% of Span 80, and 3% of Tween 80, could be suggested to have the optimum conditions (Table 7). For validation, a

test was carried out with the attained optimal values. The results for PS, % EE, and ZP were not significantly ($p < 0.05$) different from those values predicted by the software, and the error percent was negligible. By this, the validation

Table 7. Optimum values of process variables predicted and observed responses.

Batch No	X_1	X_2	X_3	PS (nm)		EE (%)		ZP (mV)	
				Predicted	Observed (mean)	Predicted	Observed (mean)	Predicted	Observed (mean)
1	14.9	3.4	39.9	210.9	193.7	92.84	91.84	-61.84	-64.58
Absolute error (%)				0.081		0.010		0.044	

Error % = (observed value-predicted value) \times 100/predicted value.

**Figure 8.** Optical photographs (100 \times) of CS-coated ME (A), uncoated ME containing insulin (B), and blank ME (C) formulations freshly prepared.**Figure 9.** Apparent viscosity curves of optimized MEs as a function of the shear rate: (A) CS-coated MEs coated with 0.07% w/w, (B) CS-coated MEs 0.05% w/w of CS, and (C) uncoated ME.

of all the models, as well as their adequate precision for the prediction of optimized conditions in the domain of levels chosen for the independent variables, was proven.

Characterization and evaluation of the optimized W/O/W ME

Morphology of multiple W/O/W emulsions

Microscopic analysis of the optimized formulations revealed that many small droplets were presented in the internal phase of the multiple globules indicating the type C of W/O/W MEs according to Pal.^[51,52] The microscopic images of CS-coated ME, uncoated ME containing insulin, and blank ME formulations are as shown in Figure 8.

Rheological analysis

To evaluate the polyelectrolyte coating on rheological properties of MEs, three formulations of the optimized MEs were prepared; two CS-coated MEs formulations (ME1 and ME2

coated with 0.07% w/w and 0.05% w/w of CS, respectively) and uncoated ME formulation (ME3).

All the prepared MEs displayed non-Newtonian, shear thinning behavior, in which the apparent viscosity decreased with an increase in shear rate (Figure 9). This behavior may be expected as the breakdown of structural units in MEs due to the hydrodynamic forces generated during shear.^[17,53,54] Furthermore, it was observed that CS-coated MEs (ME1 and ME2) were more viscous as compared to uncoated MEs (ME3). This may be attributed to the formation of a polyelectrolyte complex, which had substantially increased the viscosity.^[55] Further, it was found that increasing the CS concentration from 0.05% w/w to 0.07% w/w increased the viscosity of the coated MEs.

It has been reported, that the viscosity of an emulsion is strongly dependent on the concentration of the dispersed phase,^[56] and the relative amounts of polymer became a key development issue in influencing the rheological properties of a nanoemulsion.^[57,58]

In vitro release studies

To study the effect of pH and CS coating on insulin release behavior from MEs, two formulations: uncoated ME and CS-coated ME (F1 and F2, respectively) were prepared under optimized conditions.

The percentage of insulin released into SGM (acidic buffer, pH 1.2), SIM (small intestine: PBS/pH 6.8) and the colon region (PBS/pH 7.4) was plotted against time (Figure 10). It shows that both formulations (F1, F2) prepared using the matrix design and the optimal formulation, exhibit biphasic release profiles; an initial burst release phase followed by a slower release phase. In SGM more than 10% of the drug was released during the first few minutes for both formulations, and approximately 39.2% and 22.7% of insulin loaded into uncoated and CS-coated MEs, respectively, was released within 120 min, as shown in Figure 10A. On the other hand, in SIM (small intestine: PBS/pH 6.8), 60.8% and 47% of insulin was released from MEs (F1 and F2,

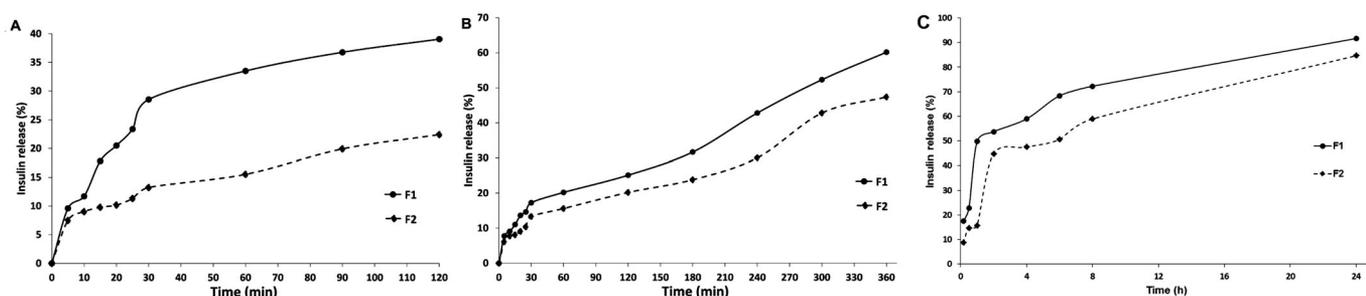


Figure 10. Release profiles of insulin from uncoated ME (F1) and CS-coated ME (F2) formulations: (A) in SGM, (B) in SIM at pH 6.8, and (C) in SIM at pH 7.4 through dialysis bag.

respectively), within 6 h, as shown in Figure 10B. While, under the pH conditions of colon region (pH 7.4), the MEs allowed rapid and complete drug release. The values within 24 hours were 84.74% and 91.69% for CS-coated ME and uncoated ME, respectively, as shown in Figure 10C.

The first phase of release profiles (the burst release) might be due to insulin existence in the external aqueous phase during the formulation of the second emulsification, insulin molecules probably leaked out of the internal aqueous phase.^[17]

Although the slower release in the second phase can be attributed to the slow transport of the hydrophilic drug from the inner aqueous phase to the outer aqueous phases of MEs in which, it was governed by the interfacial barrier of the oil phase.^[17] The lower release in SGM seems to indicate gastric protection against insulin release from the inner phase, which can be attributed to the tight network of the viscosity enhancer (Alg pre-gel) that forms at low pH,^[59] contributing to prevent the emulsion inversion and enhancing the immobilization of insulin.^[21] Whereas, at high pH media (pH 6.8 and pH 7.4) Alg swells to form an ionic state,^[60] caused a prolonged release of insulin, where a maximum amount of insulin released from CS-coated ME and uncoated ME of $\sim 85\%$ and $\sim 92\%$, respectively, was noticed after 24 h in the PBS at pH 7.4 (corresponding to the pH of the colon region), This suggests that the drug release properties of MEs are pH sensitive.^[33] The results of in vitro release study in SIM are in agreement with the findings by Zhang et al.^[61]

Furthermore, it was found that the CS-coating also affects the release behavior of the resulting MEs. Indeed, as shown in Figure 10, the highest release rate was observed in uncoated ME at both pH 6.8 and pH 7.4 with the value of (60.84% and 91.69%, respectively), as compared to drug released from CS-coated ME (47% and 84.74% total release of the encapsulated amount at pH 6.8 and pH 7.4, respectively). The lowest release seen with F2 formulation could be attributed to the dense matrix of the external phase due to the electrostatic interactions between the polysaccharide-based polyion complexes (polyelectrolyte complex) of MEs and their chains entanglement, caused a more tortuous structure and low permeability to entrapped protein, which leads to a decreased release rate of insulin.^[62]

Release kinetics

In vitro release data of the two formulations (F1 and F2) were fitted with various release kinetic models for

determining the best-fit release model. Hence, the function of the cumulative release rate as a function of time was tested using zero-order, first-order, Higuchi, Korsmeyer–Peppas, Peppas–Sahlin. The release kinetic data analysis and adjusted R^2 ($\text{adj-}R^2$) are shown in Table 8. For both formulations F1 and F2, the release model with the best fit was the one proposed by Peppas–Sahlin, which showed the highest $\text{adj-}R^2$: (i) 0.970 and 0.957, respectively in PBS/pH 6.8, and (ii) 0.931 and 0.927, respectively in PBS/pH 7.4. In literature, The diffusional exponent (m) of this model is related to the coefficient n of the power law, which is given for any shape including spheres, cylinders, and films, where $n \leq 0.5$ indicates a classical Fickian diffusion-controlled release; $0.5 < n < 1.0$ indicates a non-Fickian diffusion release, which refers to the diffusion of drug and mechanism for relaxation of polymer.^[63] At pH 6.8, the coefficient (m) of this model was less than 0.5 ($m_{F1} = 0.431$, $m_{F2} = 0.412$), It suggests that insulin release from both uncoated and CS-coated ME through the oil film was Fickian diffusion; therefore, it was influenced by drug diffusion. On the other hand, at pH 7.4, the release kinetics from uncoated ME obeyed Fickian diffusion mechanism, m_{F1} (0.402) was less than 0.5. However, m_{F2} was more than 0.5 ($m_{F2} = 0.541$), indicating non-Fickian diffusion release from CS-coated ME, which in turn indicates drug diffusion and polymer relaxation. This result is in agreement with the study of Paul et al.^[30]

Stability tests

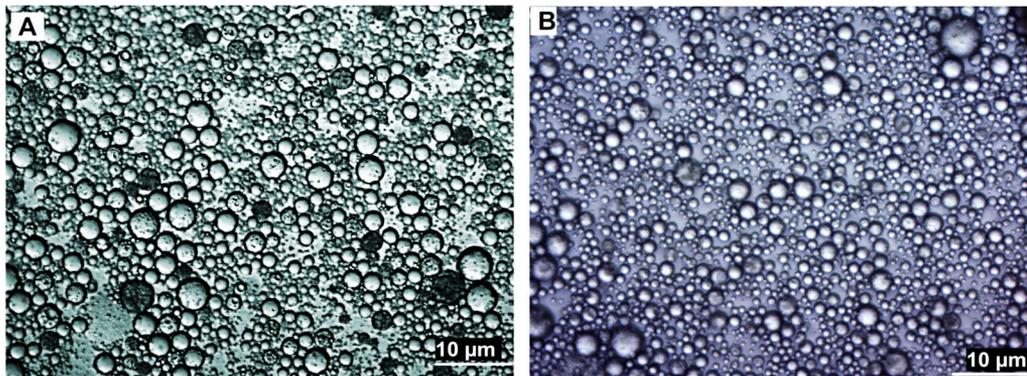
The freshly prepared CS-coated nanoemulsion (optimized ME) was creamy white in color. As shown in Figure 11, there was no change in color, no liquefaction, and no phase separation in the sample kept in storage conditions (in the refrigerator, at 8 °C for 45 days).

PS of the freshly prepared formulation was 210.3 nm, while for the ME sample kept at refrigerated conditions, it increased to 234.5 nm. This increase may be due to the swelling of globules, which is probably related to the water migration from the external aqueous phase to the internal aqueous phase.^[17] On the other hand, the % EE of the stored ME decreased from 92.48% to 91.06%, while a decrease in ZP from -64.5 mV to -69.5 mV was also observed during storage time.

By using the two-way ANOVA test at a 5% significance level, it was found that the variation in PS, % EE, and ZP of

Table 8. Release kinetic models for the two formulations, uncoated MEs and CS-coated MEs (F1 and F2, respectively) at pH 6.8 and 7.4.

Formulation	Zero-order kinetics		First-order kinetics		Higuchi model		Korsmeyer–Peppas model			Peppas–Sahlin model				
	Ad-R ²	K	Ad-R ²	K	Ad-R ²	K	Ad-R ²	K	n	Ad-R ²	K ₁	K ₂	m	
pH 6.8	F1	0.853	0.139	0.880	0.002	0.950	2.203	0.952	1.524	0.569	0.957	1.845	0.131	0.431
	F2	0.838	0.179	0.883	0.003	0.966	2.852	0.966	2.256	0.544	0.970	2.664	0.205	0.412
pH 7.4	F1	-1.188	5.158	0.624	0.274	0.524	23.827	0.917	40.182	0.274	0.931	44.768	-5.417	0.402
	F2	0.135	4.465	0.834	0.140	0.891	19.572	0.929	25.283	0.392	0.927	25.418	-1.849	0.541

**Figure 11.** Optical photographs (100 \times) of optimized MEs: (A) freshly prepared MEs (initial conditions), (B) MEs under refrigerated conditions (2–8 °C) after 45 days stability.

the stored sample after 45 days was insignificant ($p > 0.05$). Further, from microscopic analysis, it can be clearly seen, as shown in Figure 11, there was no phase separation. Hence, it was concluded that the CS-coated ME formulation was stable at storage conditions (in the refrigerator) for up to 45 days.

Conclusions

The present research revealed the optimum conditions for preparing W/O/W nanoemulsion containing insulin. Using of BBD statistical technique for optimization of process parameters helps in reaching an optimum level with minimum experiments in the shortest time. Statistical analysis revealed the relationships between the formulation factors and the individual characteristics. The optimum conditions of W/O/W nanoemulsion were selected as the lipophilic surfactant concentration in the primary emulsification (15% w/w), hydrophilic surfactant concentration in the secondary emulsion (3% w/w), and high phase volume ratio (W/O) in the primary emulsion ($X_3 = 40\%$). The optimal nanoemulsion had more perfect properties, including small size (193.7 nm) with homogenous distribution (PDI = 0.2), high % EE (91.84%), strong negative ZP (-64.58 mV), and higher physical stability for up to 45 days, at refrigerator storage conditions, which is important for an industrial and economic perspective. Besides, the release study revealed an initial rapid release followed by a much slower rate of release. Further, the release rate was affected by the CS coating. Hence, it was concluded that CS-coated ME systems can be utilized as potential prolonged-release of oral insulin dosage forms. Based on the results, the present study could offer useful information and guidelines on optimizing the conditions for producing insulin-based CS-coated W/O/W

nanoemulsion, improving the ability of these systems to protect insulin in the gastric environment.

ORCID

Naima Faghmous  <http://orcid.org/0000-0001-7613-8039>
Olivier Boyron  <http://orcid.org/0000-0002-0386-5814>

References

- [1] Cleary, P. A.; Orchard, T. J.; Genuth, S.; Wong, N. D.; Detrano, R.; Backlund, J.-Y. C.; Zinman, B.; Jacobson, A.; Sun, W.; Lachin, J. M.; et al. Intensive Diabetes Treatment and Cardiovascular Disease in Patients with Type 1 Diabetes. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *55*, 3556–2653. DOI: [10.1056/NEJMoa052187](https://doi.org/10.1056/NEJMoa052187).
- [2] Sood, A.; Panchagnula, R. Peroral Route: An Opportunity for Protein and Peptide Drug Delivery. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3275–3303. DOI: [10.1021/cr000700m](https://doi.org/10.1021/cr000700m).
- [3] Goyal, A. K.; Garg, T.; Bhandari, S.; Rath, G. Chapter 22 – Advancement in Pulmonary Drug Delivery Systems for Treatment of Tuberculosis. In *Nanostructures for Drug Delivery. Micro and Nano Technologies*; Andronescu, E., Grumezescu, A. M., Eds.; Elsevier: Amsterdam, **2017**; pp 669–695.
- [4] Hino, T.; Shimabayashi, S.; Tanaka, M.; Nakano, M.; Okochi, H. Improvement of Encapsulation Efficiency of Water-in-Oil-in-Water Emulsion with Hypertonic Inner Aqueous Phase. *J. Microencapsul.* **2001**, *18*, 19–28. DOI: [10.1080/026520401750038575](https://doi.org/10.1080/026520401750038575).
- [5] Jena, A. K.; Nayak, A. K.; De, A.; Mitra, D.; Samanta, A. Development of Lamivudine Containing Multiple Emulsions Stabilized by Gum Odina. *Future J. Pharm. Sci.* **2018**, *4*, 71–79. DOI: [10.1016/j.fjps.2017.10.002](https://doi.org/10.1016/j.fjps.2017.10.002).
- [6] Morais, J. M.; Santos, O. D.; Friberg, S. E. Some Fundamentals of the One-Step Formation of Double Emulsions. *J. Dispers. Sci. Technol.* **2010**, *31*, 1019–1026. DOI: [10.1080/01932690903224656](https://doi.org/10.1080/01932690903224656).
- [7] Schuch, A.; Wrenger, J.; Schuchmann, H. P. Production of W/O/W Double Emulsions. Part II: Influence of Emulsification Device on Release of Water by Coalescence. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2014**, *461*, 344–351. DOI: [10.1016/j.colsurfa.2013.11.044](https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.11.044).
- [8] Sharma, S.; Shukla, P.; Misra, A.; Mishra, P. R. Chapter 8 – Interfacial and Colloidal Properties of Emulsified Systems:

- Pharmaceutical and Biological Perspective. In *Colloid and Interface Science in Pharmaceutical Research and Development*; Ohshima, H., Makino, K., Eds.; Elsevier: Amsterdam, **2014**; pp 149–172.
- [9] Kim, S.; Kim, K.; Choi, S. Q. Controllable One-Step Double Emulsion Formation via Phase Inversion. *Soft Matter*. **2018**, *14*, 1094–1099. DOI: [10.1039/c7sm02134h](https://doi.org/10.1039/c7sm02134h).
- [10] Perez-Moral, N.; Watt, S.; Wilde, P. Comparative Study of the Stability of Multiple Emulsions Containing a Gelled or Aqueous Internal Phase. *Food Hydrocoll.* **2014**, *42*, 215–222. DOI: [10.1016/j.foodhyd.2014.05.023](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.05.023).
- [11] Carlotti, M. E.; Gallarate, M.; Sapino, S.; Ugazio, E.; Morel, S. W/O/W Multiple Emulsions for Dermatological and Cosmetic Use, Obtained with Ethylene Oxide Free Emulsifiers. *J. Dispers. Sci. Technol.* **2005**, *26*, 183–192. DOI: [10.1081/DIS-200045584](https://doi.org/10.1081/DIS-200045584).
- [12] Wen, J.; Zhang, Q.; Zhu, D.; Zhang, W. Performance Study on Particle Size Variables for Nano Multiple Emulsions. *J. Dispers. Sci. Technol.* **2017**, *38*, 801–806. DOI: [10.1080/01932691.2016.1198704](https://doi.org/10.1080/01932691.2016.1198704).
- [13] Silva-Cunha, A.; Grossiord, J. L.; Puisieux, F.; Seiller, M. W/O/W Multiple Emulsions of Insulin Containing a Protease Inhibitor and an Absorption Enhancer: Preparation, Characterization and Determination of Stability towards Proteases In Vitro. *Int. J. Pharm.* **1997**, *158*, 79–89. DOI: [10.1016/S0378-5173\(97\)00249-4](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(97)00249-4).
- [14] Singh, S.; Singh, R.; Vyas, S. P. Multiple Emulsion-Based Systems Carrying Insulin: Development and Characterization. *J. Microencapsul.* **1995**, *12*, 609–615. DOI: [10.3109/02652049509006791](https://doi.org/10.3109/02652049509006791).
- [15] Çilek, A.; Çelebi, N.; Tirnaksiz, F. Lecithin-Based Microemulsion of a Peptide for Oral Administration: Preparation, Characterization, and Physical Stability of the Formulation. *Drug Deliv.* **2006**, *13*, 19–24. DOI: [10.1080/10717540500313109](https://doi.org/10.1080/10717540500313109).
- [16] Dogru, S. T.; Calis, S.; Öner, F. Oral Multiple W/O/W Emulsion Formulation of a Peptide Salmon Calcitonin: In Vitro-in Vivo Evaluation. *J. Clin. Pharm. Ther.* **2000**, *25*, 435–443. DOI: [10.1046/j.1365-2710.2000.00306.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2710.2000.00306.x).
- [17] Sawant, K. K.; Mundada, V. P.; Patel, V. J. Development and Optimization of W/O/W Multiple Emulsion of Lisinopril Dihydrate Using Plackett Burman and Box-Behnken Designs | OMICS International. <https://www.omicsonline.org/open-access/development-and-optimization-of-wow-multiple-emulsion-of-lisinopriidihydrate-using-plackett-burman-and-box-behnken-designs-2157-7439-1000422.php?aid=85555> (accessed Apr 8, 2019).
- [18] Yildirim, M.; Sumnu, G.; Sahin, S. The Effects of Emulsifier Type, Phase Ratio, and Homogenization Methods on Stability of the Double Emulsion. *J. Dispers. Sci. Technol.* **2017**, *38*, 807–814. DOI: [10.1080/01932691.2016.1201768](https://doi.org/10.1080/01932691.2016.1201768).
- [19] Damodaran, S. Protein Stabilization of Emulsions and Foams. *J. Food Sci.* **2006**, *70*, R54–R66. DOI: [10.1111/j.1365-2621.2005.tb07150.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07150.x).
- [20] McClements, D. J. Advances in Fabrication of Emulsions with Enhanced Functionality Using Structural Design Principles. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2012**, *17*, 235–245. DOI: [10.1016/j.cocis.2012.06.002](https://doi.org/10.1016/j.cocis.2012.06.002).
- [21] Li, X.; Qi, J.; Xie, Y.; Zhang, X.; Hu, S.; Xu, Y.; Lu, Y.; Wu, W. Nanoemulsions Coated with Alginate/Chitosan as Oral Insulin Delivery Systems: Preparation, Characterization, and Hypoglycemic Effect in Rats. *Int. J. Nanomed.* **2013**, *8*, 23–32. DOI: [10.2147/IJN.S38507](https://doi.org/10.2147/IJN.S38507).
- [22] Harnsilawat, T.; Pongsawatmanit, R.; McClements, D. J. Characterization of β -Lactoglobulin–Sodium Alginate Interactions in Aqueous Solutions: A Calorimetry, Light Scattering, Electrophoretic Mobility and Solubility Study. *Food Hydrocoll.* **2006**, *20*, 577–585. DOI: [10.1016/j.foodhyd.2005.05.005](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.05.005).
- [23] Kyzioł, A.; Mazgala, A.; Michna, J.; Regiel-Futryra, A.; Sebastian, V. Preparation and Characterization of Alginate/Chitosan Formulations for Ciprofloxacin-Controlled Delivery. *J. Biomater. Appl.* **2017**, *32*, 162–174. DOI: [10.1177/0885328217714352](https://doi.org/10.1177/0885328217714352).
- [24] Wang, G.; Wang, X.; Huang, L. Feasibility of Chitosan-Alginate (Chi-Alg) Hydrogel Used as Scaffold for Neural Tissue Engineering: A Pilot Study In Vitro. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2017**, *31*, 1–773. DOI: [10.1080/13102818.2017.1332493](https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1332493).
- [25] Koppolu, B.; Prasanth Smith, S. G.; Ravindranathan, S.; Jayanthi, S.; Kumar, T. K. S.; Zaharoff, D. A. Controlling Chitosan-Based Encapsulation for Protein and Vaccine Delivery. *Biomaterials* **2014**, *35*, 4382–4389. DOI: [10.1016/j.biomaterials.2014.01.078](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.01.078).
- [26] Mazutis, L.; Vasiliauskas, R.; Weitz, D. A. Microfluidic Production of Alginate Hydrogel Particles for Antibody Encapsulation and Release. *Macromol. Biosci.* **2015**, *15*, 1641–1646. DOI: [10.1002/mabi.201500226](https://doi.org/10.1002/mabi.201500226).
- [27] Bezerra, M. A.; Santelli, R. E.; Oliveira, E. P.; Villar, L. S.; Escaleira, L. A. Response Surface Methodology (RSM) as a Tool for Optimization in Analytical Chemistry. *Talanta* **2008**, *76*, 965–977. DOI: [10.1016/j.talanta.2008.05.019](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019).
- [28] Abdel-Hafez, S. M.; Hathout, R. M.; Sammour, O. A. Towards Better Modeling of Chitosan Nanoparticles Production: Screening Different Factors and Comparing Two Experimental Designs. *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, *64*, 334–340. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2013.11.041](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.11.041).
- [29] Ito, T.; Tsuji, Y.; Aramaki, K.; Tonooka, N. Two-Step Emulsification Process for Water-in-Oil-in-Water Multiple Emulsions Stabilized by Lamellar Liquid Crystals. *J. Oleo Sci.* **2012**, *61*, 413–420. DOI: [10.5650/jos.61.413](https://doi.org/10.5650/jos.61.413).
- [30] Paul, S.; Kumar, A.; Yedurkar, P.; Sawant, K. Design and Development of Multiple Emulsion for Enhancement of Oral Bioavailability of Acyclovir. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2013**, *39*, 1809–1817. DOI: [10.3109/03639045.2012.738682](https://doi.org/10.3109/03639045.2012.738682).
- [31] Najjar, A.; Alawi, M.; AbuHeshmeh, N.; Sallam, A. A Rapid, Isocratic HPLC Method for Determination of Insulin and Its Degradation Product. <https://www.hindawi.com/journals/ap/2014/749823/cta/> (accessed Apr 8, 2019). DOI: [10.1155/2014/749823](https://doi.org/10.1155/2014/749823).
- [32] Sarmento, B.; Ribeiro, A.; Veiga, F.; Ferreira, D. Development and Validation of a Rapid Reversed-Phase HPLC Method for the Determination of Insulin from Nanoparticulate Systems. *Biomed. Chromatogr.* **2006**, *20*, 898–903. DOI: [10.1002/bmc.616](https://doi.org/10.1002/bmc.616).
- [33] Venkata Siddhartha, T.; Senthil, V.; Sai Kishan, I.; Basha Khatwal, R.; V Madhunapantula, S. Design and Development of Oral Nanoparticulated Insulin in Multiple Emulsion. *Curr. Drug Deliv.* **2014**, *11*, 472–485. DOI: [10.2174/156720181166614041415259](https://doi.org/10.2174/156720181166614041415259).
- [34] Yadav, K. S.; Sawant, K. K. Modified Nanoprecipitation Method for Preparation of Cytarabine-Loaded PLGA Nanoparticles. *AAPS PharmSciTech* **2010**, *11*, 1456–1465. DOI: [10.1208/s12249-010-9519-4](https://doi.org/10.1208/s12249-010-9519-4).
- [35] Tirnaksiz, F.; Kalsin, O. A Topical W/o/w Multiple Emulsions Prepared with Tetronic 908 as a Hydrophilic Surfactant: Formulation, Characterization and Release Study. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2005**, *8*, 299–315.
- [36] Farahani, B. V.; Ghasemzaheh, H.; Afraz, S. Intelligent Semi-IPN Chitosan-PEG-PAAm Hydrogel for Closed-Loop Insulin Delivery and Kinetic Modeling. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 26590–26598. DOI: [10.1039/C5RA28188A](https://doi.org/10.1039/C5RA28188A).
- [37] Möckel, J. E.; Lippold, B. C. Zero-Order Drug Release from Hydrocolloid Matrices. *Pharm. Res.* **1993**, *10*, 1066–1070. DOI: [10.1023/A:1018931210396](https://doi.org/10.1023/A:1018931210396).
- [38] Zheng, S.; Beissinger, R. L.; Sehgal, L. R.; Wasan, D. T. Ketamine-in Oil-in-Water Multiple Emulsion for Prolonged Drug Release. *J. Dispers. Sci. Technol.* **1999**, *20*, 235–245. DOI: [10.1080/01932699908943789](https://doi.org/10.1080/01932699908943789).
- [39] Higuchi, T. Rate of Release of Medicaments from Ointment Bases Containing Drugs in Suspension. *J. Pharm. Sci.* **1961**, *50*, 874–875. DOI: [10.1002/jps.2600501018](https://doi.org/10.1002/jps.2600501018).
- [40] Korsmeyer, R. W.; Gurny, R.; Doelker, E.; Buri, P.; Peppas, N. A. Mechanisms of Solute Release from Porous Hydrophilic Polymers. *Int. J. Pharm.* **1983**, *15*, 25–35. DOI: [10.1016/0378-5173\(83\)90064-9](https://doi.org/10.1016/0378-5173(83)90064-9).
- [41] Peppas, N. A.; Sahlin, J. J. A Simple Equation for the Description of Solute Release. III. Coupling of Diffusion and Relaxation. *Int. J. Pharm.* **1989**, *57*, 169–172. DOI: [10.1016/0378-5173\(89\)90306-2](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90306-2).
- [42] Zhang, Y.; Huo, M.; Zhou, J.; Zou, A.; Li, W.; Yao, C.; Xie, S. DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison

- of Drug Dissolution Profiles. *AAPS J.* **2010**, *12*, 263–271. DOI: [10.1208/s12248-010-9185-1](https://doi.org/10.1208/s12248-010-9185-1).
- [43] Glickman, M. E.; Rao, S. R.; Schultz, M. R. False Discovery Rate Control Is a Recommended Alternative to Bonferroni-Type Adjustments in Health Studies. *J. Clin. Epidemiol.* **2014**, *67*, 850–857. DOI: [10.1016/j.jclinepi.2014.03.012](https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2014.03.012).
- [44] Aziz, A.; Jusoh, A.; Mamat, R.; Abdullah, A. A. Effect of Water Content and Tween 80 to the Stability of Emulsified Biodiesel. *Appl. Mech. Mater.* **2013**, *465–466*, 191–195. DOI: [10.4028/www.scientific.net/AMM.465-466.191](https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.465-466.191).
- [45] Wei, H.; Zhong, F.; Ma, J.; Wang, Z. Formula Optimization of Emulsifiers for Preparation of Multiple Emulsions Based on Artificial Neural Networks. *J. Dispers. Sci. Technol.* **2008**, *29*, 319–326. DOI: [10.1080/01932690701716010](https://doi.org/10.1080/01932690701716010).
- [46] Zhao, J.; Wei, T.; Wei, Z.; Yuan, F.; Gao, Y. Influence of Soybean Soluble Polysaccharides and Beet Pectin on the Physicochemical Properties of Lactoferrin-Coated Orange Oil Emulsion. *Food Hydrocoll.* **2015**, *44*, 443–452. DOI: [10.1016/j.foodhyd.2014.10.025](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.10.025).
- [47] Onuki, Y.; Morishita, M.; Takayama, K. Formulation Optimization of Water-in-Oil-Water Multiple Emulsion for Intestinal Insulin Delivery. *J. Control Release* **2004**, *97*, 91–99. DOI: [10.1016/j.jconrel.2004.03.010](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.03.010).
- [48] Liu, L.; Zhao, Q.; Liu, T.; Kong, J.; Long, Z.; Zhao, M. Sodium Caseinate/Carboxymethylcellulose Interactions at Oil–Water Interface: Relationship to Emulsion Stability. *Food Chem.* **2012**, *132*, 1822–1829. DOI: [10.1016/j.foodchem.2011.12.014](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.014).
- [49] Silva, C. M.; Ribeiro, A. J.; Figueiredo, M.; Ferreira, D.; Veiga, F. Microencapsulation of Hemoglobin in Chitosan-Coated Alginate Microspheres Prepared by Emulsification/Internal Gelation. *AAPS J.* **2006**, *7*, E903–E913. DOI: [10.1208/aapsj070488](https://doi.org/10.1208/aapsj070488).
- [50] Kumar, A.; Sawant, K. K. Application of Multiple Regression Analysis in Optimization of Anastrozole-Loaded PLGA Nanoparticles. *J. Microencapsul.* **2014**, *31*, 105–114. DOI: [10.3109/02652048.2013.808280](https://doi.org/10.3109/02652048.2013.808280).
- [51] Pal, R. Viscosity Models for Multiple Emulsions. *Food Hydrocoll.* **2008**, *22*, 428–438. DOI: [10.1016/j.foodhyd.2006.12.012](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.12.012).
- [52] Pal, R. Rheology of Simple and Multiple Emulsions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2011**, *16*, 41–60. DOI: [10.1016/j.cocis.2010.10.001](https://doi.org/10.1016/j.cocis.2010.10.001).
- [53] Vasiljević, D.; Parojčić, J.; Primorac, M.; Vuleta, G. Rheological and Droplet Size Analysis of W/O/W Multiple Emulsions Containing Low Concentrations of Polymeric Emulsifiers. *J. Serb. Chem. Soc.* **2009**, *74*, 801–816. DOI: [10.2298/JSC0907801V](https://doi.org/10.2298/JSC0907801V).
- [54] Gulão, E. D. S.; Souza, C. J. F. D.; Costa, A. R. D.; Rocha-Leão, M. H. M. D.; Garcia-Rojas, E. E. Stability and Rheological Behavior of Coconut Oil-in-Water Emulsions Formed by Biopolymers. *Polímeros* **2018**, *28*, 413–421. DOI: [10.1590/0104-1428.08017](https://doi.org/10.1590/0104-1428.08017).
- [55] Abu-Jdayil, B.; Fara, D. A. Modification of the Rheological Behaviour of Sodium Alginate by Chitosan and Multivalent Electrolytes. *Ital. J. Food Sci.* **2013**, *25*, 196.
- [56] Cofelice, M.; Cuomo, F.; Lopez, F. Rheological Properties of Alginate–Essential Oil Nanodispersions. *Colloids Interfaces* **2018**, *2*, 48. DOI: [10.3390/colloids2040048](https://doi.org/10.3390/colloids2040048).
- [57] İbanoglu, E. Rheological Behaviour of Whey Protein Stabilized Emulsions in the Presence of Gum Arabic. *J. Food Eng.* **2002**, *52*, 273–277. DOI: [10.1016/S0260-8774\(01\)00115-7](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(01)00115-7).
- [58] Perugini, L.; Cinelli, G.; Cofelice, M.; Ceglie, A.; Lopez, F.; Cuomo, F. Effect of the Coexistence of Sodium Caseinate and Tween 20 as Stabilizers of Food Emulsions at Acidic pH. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **2018**, *168*, 163–168. DOI: [10.1016/j.colsurfb.2018.02.003](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.02.003).
- [59] Coppi, G.; Iannucelli, V.; Leo, E.; Bernabei, M. T.; Camerini, R. Protein Immobilization in Crosslinked Alginate Microparticles. *J. Microencapsul.* **2002**, *19*, 37–44. DOI: [10.1080/02652040110055621](https://doi.org/10.1080/02652040110055621).
- [60] Sarmento, B.; Ribeiro, A.; Veiga, F.; Sampaio, P.; Neufeld, R.; Ferreira, D. Alginate/Chitosan Nanoparticles Are Effective for Oral Insulin Delivery. *Pharm. Res.* **2007**, *24*, 2198–2206. DOI: [10.1007/s11095-007-9367-4](https://doi.org/10.1007/s11095-007-9367-4).
- [61] Zhang, X. G.; Teng, D. Y.; Wu, Z. M.; Wang, X.; Wang, Z.; Yu, D. M.; Li, C. X. PEG-Grafted Chitosan Nanoparticles as an Injectable Carrier for Sustained Protein Release. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2008**, *19*, 3525–3533. DOI: [10.1007/s10856-008-3500-8](https://doi.org/10.1007/s10856-008-3500-8).
- [62] Yang, Y. Y.; Chung, T. S.; Ng, N. P. Morphology, Drug Distribution, and In Vitro Release Profiles of Biodegradable Polymeric Microspheres Containing Protein Fabricated by Double-Emulsion Solvent Extraction/Evaporation Method. *Biomaterials* **2001**, *22*, 231–241. DOI: [10.1016/S0142-9612\(00\)00178-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00178-2).
- [63] Horprasertkij, K.; Dwivedi, A.; Riansuwan, K.; Kiratisin, P.; Nasongkla, N. Spray Coating of Dual Antibiotic-Loaded Nanospheres on Orthopedic Implant for Prolonged Release and Enhanced Antibacterial Activity. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2019**, *53*, 101102. DOI: [10.1016/j.jddst.2019.05.051](https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.05.051).

RÉSUMÉ

Ce travail s'articule autour de l'optimisation et la modélisation de la formulation des micro et nanoparticules furtives contenant l'insuline par deux procédés d'encapsulations à savoir la gélation ionotropique (GI) et la double émulsion (EM) en utilisant une matrice polymérique naturelle (Alginate/Chitosane). Cette matrice est rendue furtive par l'ajout du PEG 4000 à la surface des particules. L'optimisation de la formulation est entreprise en utilisant la méthodologie des surfaces de réponse (RSM) en accord avec le plan de Box-Behnken, afin de déterminer les conditions optimales pour une taille minimale des particules avec une charge de surface maximale et une efficacité d'encapsulation maximale. Dans les différents cas le modèle obtenu est significatif avec une valeur de $p < 0,05$ et $R^2 > 90\%$. La formulation optimale préparée par GI et EM, est caractérisée par une taille des particules de 145 nm, 193nm, avec une charge de surface négative de -30 mV, -64.9 mV, et une efficacité d'encapsulation de 85%, 92,09%, respectivement.

Les résultats d'analyse thermique (ATG et DSC) et structurale (FTIR) ont montré la conservation de la structure de l'insuline après son encapsulation dans les nanoparticules furtives. L'étude comparative des profils de dissolution a confirmé la protection du principe actif dans le milieu gastrique simulé (taux de libération $< 40\%$) et la libération prolongée dans le milieu intestinal simulé. Le caractère de furtivité a été mis en évidence par le ralentissement de la cinétique de libération in vitro de l'insuline encapsulée, dans les deux milieux physiologiques simulés comparativement à des nanoparticules simples (non furtives). L'EM a montré un grand potentiel dans le développement des nanoparticules furtives, contenant le plus haut taux d'encapsulation de l'insuline, le plus faible taux de libération dans le milieu gastrique simulé et le plus lent dans le milieu intestinal simulé en la comparant avec la GI. Les résultats obtenus suggèrent l'efficacité des nanoparticules furtives à base d'alginate/chitosane/PEG pour l'administration de l'insuline par voie orale tout en assurant le contrôle de sa cinétique de libération.

Mots clés : Plans d'expériences, RSM, nanoparticules furtives, gélation ionotropique, double émulsion.

ABSTRACT

This work aimed both at optimization and modeling of stealth nanoparticle formulation containing insulin by two encapsulation processes, namely ionotropic gelation (IG) and Double emulsion (ME) using a natural polymer matrix (Alginate/Chitosan). This matrix is made stealthy by addition the PEG 4000 to the nanoparticle surface. The synthesis optimization is obtained by the RSM response surfaces methodology in agreement with the Box-Behnken design to determine the optimal conditions for minimum particle size with maximum surface charge and maximum efficiency encapsulation. In the different cases, the model obtained is significant with a p-value < 0.05 and $R^2 > 90\%$. Optimal formulations prepared by GI and EM are characterized by a particle size of 145 nm and 193 nm, a negative surface charge of -30 mV and -64.9 mV, and encapsulation efficiency of 85% and 92.09%, respectively.

Thermal (ATG and DSC) and structural (FTIR) analysis results showed the structural retention of insulin after its encapsulation in stealth nanoparticles. The comparative study of dissolution profiles confirmed the protection of the active substance in the simulated gastric environment (release rate $< 40\%$) and the sustained release in the simulated intestinal environment. The stealth character was improved by in vitro release kinetic slowing of encapsulated insulin in the two simulated physiological media compared to simple (non-stealth) nanoparticles. EM has shown great potential in stealth nanoparticles development with the highest rate of insulin encapsulation, the lowest rate of release in the simulated gastric medium, and the slowest in the simulated intestinal medium compared to GI. The results suggest the effectiveness of alginate/chitosan/PEG-based stealth nanoparticles for oral administration of insulin while ensuring the control of its release kinetics.

Keywords: Design of experiments, RSM, stealth nanoparticles, Ionotropic gelation, Double emulsion.