



Inserm



Université de Lille

Ecole doctorale Biologie-Santé de Lille

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Discipline : Physiologie, Physiopathologie et Biologie systémique médicale

Présentée et soutenue publiquement par

Norhane SALAH

Le 01 Décembre 2022

Etude de la potentialisation de la curcumine par des nanoparticules pour traiter les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Composition du jury :

Président : Dr Laurent DUBUQUOY – Université de Lille - INFINITE

Rapporteurs : Dr Rachel MARION-LETELLIER – Université de Rouen - INSERM UMR 1073
Dr Frederico PERCHE – CBM - CNRS Orléans

Examineurs : Dr Laurent DUBUQUOY – Université de Lille - INFINITE

Directeur de Thèse : Pr Didier BETBEDER - Université de Lille - VAXINANO

Table des matières

Table des matières	3
Remerciement	7
Liste des articles	9
Liste des abréviations	10
Liste des figures et tableaux	12
Préambule - Objectifs	14
Partie 1. INTRODUCTION	16
1. Généralité sur l'intestin	17
2. Fonctions de l'intestin	19
2.1. Sécrétion /Absorption	20
2.2. Fonction barrière	21
- Les composants extracellulaire	21
- Le Mucus.....	22
2.3. L'épithélium intestinal sain.....	23
- Entérocytes.....	24
- Cellules caliciforme.....	25
- Cellules M	26
- Cellules de Paneth	27
- Les jonctions serrées	29
- Les jonctions communicantes	30
2.4. Perméabilité intestinale.....	31
- La régulation de la perméabilité intestinale.....	31
- Les signaux PPR dans un épithélium sain	32
3. Immunité intestinale	33
3.1. Perméabilité intestinale.....	34
3.2. Cellules immunitaires innées.....	36
- Macrophages.....	37
- Cellules dendritiques	38

3.2. Cellules immunitaires adaptatives.....	39
- Lymphocytes T.....	39
- Lymphocytes B.....	42
4. Dysfonctionnement du système immunitaire dans le contexte MICI	43
4.1. Dysfonctionnement génétiques	47
- Gènes de susceptibilités	47
- Agrégation familiales	48
4.2. Facteurs environnementaux.....	49
4.3. Etiologie des MICI	50
5. Les traitements standards	51
5.1. 5-Aminosalicylate	52
5.2. Glucocorticostéroïdes.....	53
5.3. Thiopurines	53
6. Les traitements récents	54
6.1. Inhibiteurs de JAK	55
- SMAD7	56
6.2. Sphingosine 1-phosphate	57
6.3. Agents biologiques	59
6.3.1 Anticorps monoclonaux	60
- Anti cytokines IL12/IL23	60
- Anti intégrine.....	61
- Anti MadCAM	61
7. Les traitements innovants	62
7.1. Transplantation fécale	62
7.2. Transplantation de cellule souche.....	63
7.3. Combo-thérapies	64
8. Les traitements naturels.....	65
8.1. Acides phénoliques.....	66
8.2. Stilbènes	67
8.3. Flavonoïdes.....	68
8.3.1 Curcumine.....	68

9. Les Nanoparticules	73
9.1. Les nanoparticules inorganiques	74
9.2. Les nanoparticules organiques	75
9.2.1 Les nanoparticules lipidiques.....	76
- Liposomes.....	77
- Liposomes Like.....	79
- SNL.....	80
9.2.2 Les nanoparticules polymériques.....	81
9.2.2.1 Les nanoparticules polymériques naturelles.....	81
- Chitosan	81
- Pectine	82
- Maltodextrine	84
9.2.2.2 Les nanoparticules polymériques synthétiques	85
- PLGA.....	86
- Autres nanoparticules polymériques synthétiques.....	88
9.3. Caractérisation des nanoparticules	90
9.3.1 La taille	90
9.3.2 La composition.....	91
9.3.3 La forme	92
9.3.4 La charge de surface	93
9.4. Endocytose des nanoparticules.....	94
9.4.1 La voie des clathrines.....	95
9.4.2 La voie des cavéoles.....	96
9.4.3 La macropinocytose	97
9.4.4 La phagocytose	98
 Partie 2. RESULTAT	 99
1. Résultat préliminaire	100
1.1. Synthèse et caractérisation des particules.....	101
1.2. Efficacité de l'encapsulation de la curcumine	102
1.3. Analyse de l'effet antioxydant de la curcumine	103
2. Article 1	104

3. Article 2	115
Partie 3. DISCUSSION GENERALE	146
1. L'importance de l'amélioration des traitements contre les MICI	147
2. Quel est l'intérêt d'utiliser des molécules naturelles non toxiques pour traiter l'inflammation et quelle est l'importance du ciblage des principes actifs pour améliorer l'accès aux cellules	149
3. Perspectives	158
Partie 4. CONCLUSION GENERALE	159
Bibliographies.....	161

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord mon directeur de thèse, le **Professeur Didier BETBEDER**, pour son accompagnement, sa présence, sa compréhension et pour tous les enseignements apportés durant ma thèse, je le remercie également de m'avoir donnée l'opportunité d'effectuer une thèse au sein de son équipe.

Je remercie **Rodolphe CARPENTIER**, pour son écoute, son soutien et son aide au quotidien au cours de ces 3 années, je le remercie également pour tous nos échanges constructifs et bienveillants, sans oublier son soutien moral grâce à son humour bien à lui.

Je remercie **Laurent DUBUQUOY** pour sa disponibilité et sa gentillesse. Je remercie l'INFINITE de m'avoir accueilli dans ses équipes. Merci à **Virginie CHAMEROY** pour sa gestion et présence durant les animations scientifiques.

Je remercie **Mathilde BODY-MALAPEL** et **Guillaume GARÇON** pour leur soutien dans les expériences ex vivo. Je remercie également **Mike HOWSAM** pour la relecture critique de mon article.

Je remercie les membres de l'INIFITE qui m'ont aidé durant ma thèse, **Madjid DJOUINA**, **Marie DELBECK**, **François MAGGIOTTO**, **Ségolène PLET**.

Je remercie **Nathalie JOUY** et **Antonino BONGIOVANNI** pour les formations en cytométrie et microscopie, pour leur aide et disponibilité durant ma thèse.

Je tiens à remercier particulièrement, l'école doctorale et notamment **François DELCROIX**, pour son écoute, son soutien et sa présence surtout durant cette fin de thèse.

Je remercie les techniciens de Vaxinano, **Amélie**, **Clément** et **Hafssa** pour leur aide, et les bons moments passés à leur côté que ce soit au labo ou à la cueillette de cèpes.

Merci à mes collègues et amis **Clément**, **François**, **Ludivine** et **Béatrice** pour ces moments riches en émotions, pour les fous rires, les larmes et surtout leur soutien.

Je remercie mes amis pour tout ce qu'ils m'ont apporté.

Merci à vous **Marine**, **Alexandra**, **Hugo**, **Salima**, **Nizar** et ma petite **Eva**, mes amis, mes piliers, merci pour votre force, votre soutien, tous les moments passés ensemble qu'ils soient joyeux ou parfois un peu moins, armés de votre humour noir et votre autodérision, vous avez su dédramatiser chaque moment difficile et angoissant que j'ai pu traverser durant cette thèse, merci à vous.

Merci enfin aux membres de ma famille, Sofiane, Nahid, Amar, Khodja, Syhem et Sidi Mohammed, mes frères et sœurs qui m'ont transmis ténacité, humour, et autodérision, merci pour votre soutien, merci de m'avoir toujours encouragée.

Merci à mes parents, Mohamed et Latifa, à qui je dois tout, merci d'être venus en France, parce que sans ce point de départ je n'en serai pas là, merci pour votre aide financière sans laquelle je n'en serai pas là non plus et surtout merci d'avoir toujours cru en moi. Merci à toi papa de m'avoir transmis ta curiosité et à toi maman pour ton sens aiguisé de la critique, je ne pouvais pas rêver mieux comme exemple de réussite dans la vie que de vous avoir eu comme parent. Et malgré la maladie horrible qui te fait oublier à quel point je faisais aussi tout ça pour te rendre fière maman, j'espère que tu le ressentiras dans ton cœur.

*« Dans la vie rien n'est à craindre, tout est à comprendre »
Marie Curie*

LISTE DES PUBLICATIONS

*Carpentier R, Platel A, **Salah N**, Nessler F, Betbeder D. Porous Maltodextrin-Based Nanoparticles: A Safe Delivery System for Nasal Vaccines. Journal of Nanomaterials. 2018; 2018:9067195.*

***Salah N**, Dubuquoy L, Carpentier R, Betbeder D. Starch nanoparticles improve curcumin-induced production of anti-inflammatory cytokines in intestinal epithelial cells. Int J Pharm X. 2022 Mar 8;4:100114. doi: 10.1016/j.ijpx.2022.100114.*

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN - Acide désoxyribonucléique

AuNPs - Nanoparticules d'or

CD - Cellules Dendritiques

CME - Clathrin-mediated Endocytosis

CMH - Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA - Cellules Présentatrices d'Antigènes

CS - Chitosan

DPPG - Dipalmitoyl-phosphatidylglycérol

FAE - Follicular Associated Epithelium

FDA - Food and Drug Administration

GALT - Gut Associated Lymphoid Tissue

GFM - Gel-Forming Mucins

GP2 - Glycoprotéines 2

GPI - Glycosyl-Phosphatidyl Inositol

GSK - GlaxoSmithKline

HMPA - N-(2-hydroxypropyl)-methacrylamide

IFR - Interfollicular Regions

IgG - Immunoglobuline G

IONP - Iron Oxide Nanoparticles

IRM - Imagerie par Résonance Magnétique

ISCOM - Immune Stimulating Complex

IV - Intraveineuse

LB - Lymphocyte B

LPS - Lipopolysaccharide

LT - Lymphocyte T

MALT - Mucosal Associated Lymphoid Tissue

NK - Cellules Natural Killer

NLC - Nanostructured Lipid Carrier

NLR - Nod-like Receptors

NP+ - Nanoparticules de maltodextrine cationiques

NPL - Nanoparticules de maltodextrine cationiques lipidées

NPs - Nanoparticules

ODN - Oligodéoxynucléotides

OMS - Organisation Mondiale de la Santé

PAA - Polyacrylates

PAMAM - Polyamidoamine

PAMP - Pathogen-Associated Molecular Pattern

PEG - Polyéthylène glycol

PLGA - Acide poly-lactique-co-glycolique

PP - Plaques de Peyer

PRR - Pattern Recognition Receptors

PS-NP - Nanoparticule de polystyrène

QD - Quantum Dots

SDS - Sodium Dodecylsulfate

siRNA - Small Interfering Ribonucleic Acid

SUV - Small Unilamellar Vesicles

TLR - Toll Like Receptors

TGI - Tractus Gastro-Intestinal

TCR - T-cell Receptor

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

(Sauf publications)

Figure 1 : Représentation du système digestif

Figure 2 : Structure de la couche de mucus le long de l'intestin et sécrétion des peptides antimicrobiens par les entérocytes et les cellules de Paneth

Figure 3 : Représentation d'un épithélium sain : A gauche l'intestin grêle (Small intestine), A droite le côlon (colon)

Figure 4 : Structure et composition d'un entérocyte formant un épithélium

Figure 5 : Structure et composition d'une cellule caliciforme

Figure 6 : Rôle d'une cellule M

Figure 7 : Localisation des cellules de Paneth

Figure 8 : Les jonctions serrées

Figure 9 : Les jonctions communicantes

Figure 10 : Les structures organisées du tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT)

Figure 11 : Les cellules du système immunitaires

Figure 12 : La mesalazine

Figure 13 : Le fonctionnement d'un inhibiteur de JAK

Figure 14 : Le fonctionnement de Smad7

Figure 15 : Le fonctionnement de S1P

Figure 16 : Les principaux Anti-TNF α

Figure 17 : La composition du curcuma

Figure 18 : La dimension des nanoparticules

Figure 19 : Les nanoparticules inorganiques

Figure 20 : Les nanoparticules organiques

Figure 21 : Les Liposomes

Figure 22 : Les Liposomes Like (LNP)

Figure 23 : Les nanoparticules lipidiques solides (SLN)

Figure 24 : Le chitosan

Figure 25 : *La pectine*

Figure 26 : *Représentation schématique des nanoparticules de maltodextrine lipidées (NPL)*

Figure 27 : *Représentation schématique des nanoparticules de PLGA*

Figure 28 : *Les caractéristiques des nanoparticules*

Figure 29 : *Les différentes voies d'endocytose*

Figure 30 : *Représentation schématique des générations de nanoparticules appliquées aux liposomes*

Figure 31 : *Évaluation du taux d'encapsulation de la curcumine*

Figure 32 : *Évaluation de l'effet antioxydant de la curcumine associé à la NPL*

Figure 33 : *Illustration générale des expérimentations*

Figure 34 : *Illustration générale des expérimentations*

Figure 35 : *Représentation des différentes nanoparticules synthétisées*

PREAMBULE - OBJECTIFS

Cette thèse de Doctorat a été réalisée dans le laboratoire de nanomédecine de l'équipe INSERM INFINITE 1286, sous la direction du Professeur Didier BETBEDER.

Ce manuscrit présente les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse et qui ont pour objet de comprendre les mécanismes permettant à des nanoparticules de maltodextrine lipidées (NPL) de potentialiser l'effet de la curcumine aux propriétés anti-inflammatoire dans deux modèles cellulaires différents.

L'un représente un épithélium intestinal et le second une lignée cellulaire immunitaire que sont les macrophages. A partir de ces deux modèles nous avons construit un protocole imitant deux possibilités de traitements, soit un traitement sur un temps court ou un traitement sur un temps long. Les cellules furent pré-exposées à un agent pro-inflammatoire qu'est le TNF- α afin d'induire une réponse inflammatoire cellulaire traité avec nos formulations nanoparticules/curcumine. A la suite de quoi les mécanismes permettant d'améliorer l'efficacité de la curcumine ont été étudiés, afin de déterminer si ces particules constituent un système de délivrance pertinent pour ce type de molécule hydrophobe.

Le document se décompose en quatre parties :

La PARTIE 1 est une introduction générale situant le contexte scientifique. Elle se décompose en trois parties : la première présente l'intestin et la pathologie des maladies inflammatoires chroniques, la deuxième présente les traitements utilisés : classiques, récents, innovants ou naturels dans le contexte des MICI et enfin la troisième partie présente l'intérêt de l'utilisation des nanoparticules dans le domaine de la vectorisation.

La PARTIE 2 présente les résultats des travaux effectués durant la thèse, sous forme d'articles publiés ou encore de soumission. Le premier article montre l'intérêt d'associer la curcumine à la NPL (nanoparticule de maltodextrine), afin d'améliorer la délivrance de la curcumine dans les cellules épithéliales intestinale Caco-2, cette association induit une diminution des cytokines pro-inflammatoires. Le second article démontre que l'association NPL/Cur est tout aussi efficace sur les macrophages.

Dans la PARTIE 3, nous discutons les résultats de nos travaux et leur importance par rapport aux données de la littérature.

La PARTIE 4 est une conclusion générale.

PARTIE 1.

INTRODUCTION

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

De L'organe à la pathologie

1. Généralités sur l'intestin

Le corps humain affronte quotidiennement des substances potentiellement nocives et infectieuses, qui perturbe l'homéostasie et menacent l'équilibre entre physiologie et physiopathologie. Le tractus gastro-intestinal (GI) est l'une des régions les plus soumises aux contacts de ces exogènes, en raison de son rôle et de sa grande surface de contact avec l'environnement extérieur. Pour assurer l'homéostasie interne, le tractus gastro-intestinal a un rôle digestif mais aussi d'absorption des nutriments : transport de l'eau, des électrolytes, sécrétion d'eau et de protéines dans la lumière intestinale. Un rôle défensif est également nécessaire pour empêcher les substances nocives, tels que les agents pathogènes, les antigènes et les facteurs pro-inflammatoires, d'atteindre l'environnement interne à travers la lumière intestinale, tout en préservant le passage sélectif de substances favorisant le développement du système immunitaire intestinal et la tolérance immunitaire. En effet, la muqueuse intestinale a la particularité de s'adapter à la présence des bactéries commensales qui jouent un rôle dans les processus digestifs et influencent de manière décisive le développement et le fonctionnement du système immunitaire intestinal. Ces deux fonctions, digestive et défensive, œuvrent sur la base de l'anatomie particulière de la muqueuse intestinale et, plus particulièrement, sur la fonction barrière intestinale, où divers mécanismes immunitaires et non-immuns convergent et agissent de manière coordonnée pour assurer le bon fonctionnement au sein du tractus gastro-intestinale. Le système digestif est divisé en deux parties, le système digestif supérieur comprenant l'œsophage et le système digestif inférieur comprenant l'estomac, l'intestin, le côlon, le rectum et l'anus (Figure 1).

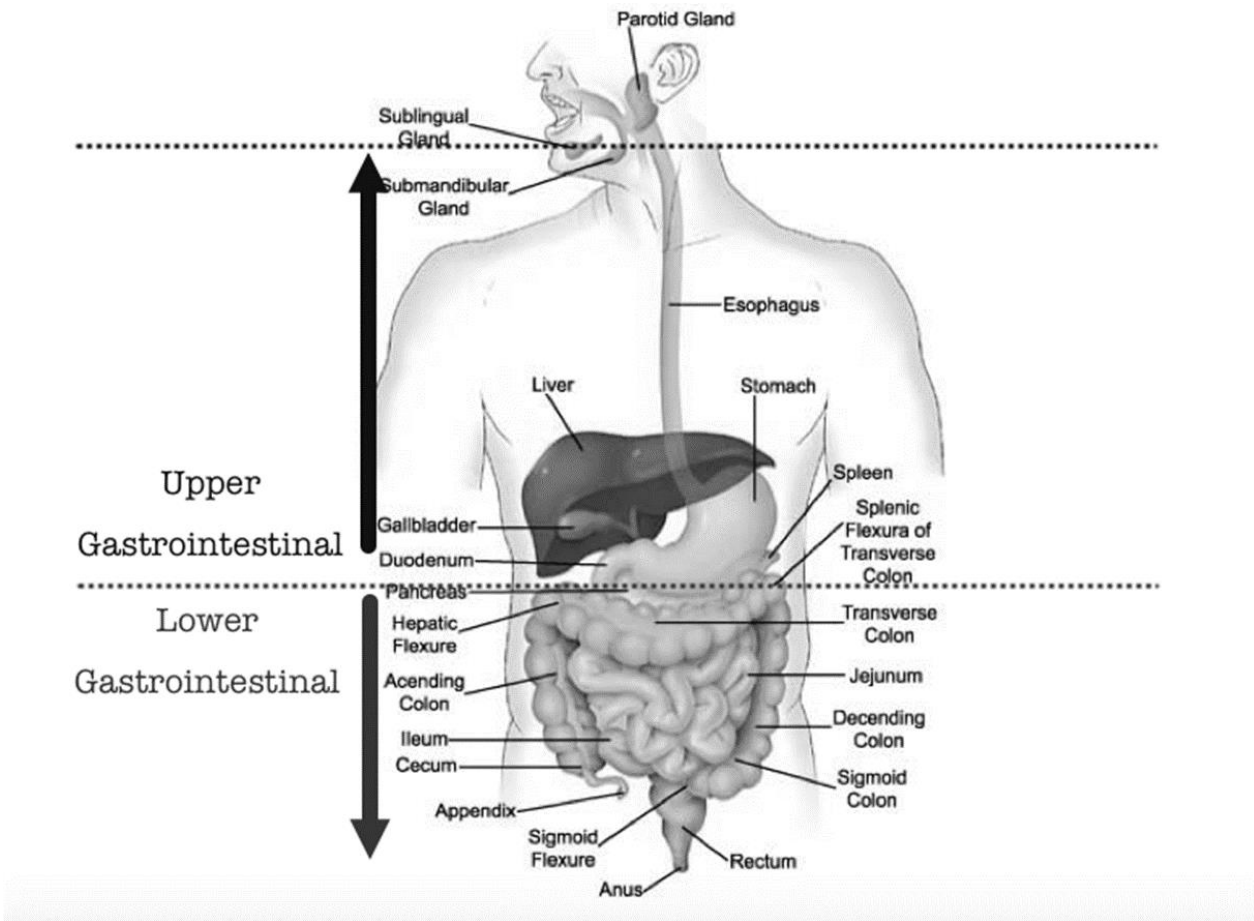


Figure 1. Représentation du système digestive (GASTROINTESTINAL HEALTH. February, 9, 2020)

2. Les fonctions de l'intestin

2.1 Sécrétion / absorption

Le tractus gastro-intestinal sécrète jusqu'à 9 L de liquide par jour contenant des enzymes digestives, de la bile, des ions, de l'eau et du mucus. Les cellules épithéliales dont la structure et la fonction diffèrent en fonction de leur emplacement dans le tractus gastro-intestinal sont importantes pour la sécrétion et l'absorption des fluides, des électrolytes et des solutés. Les cellules pariétales gastriques dans les glandes du corps gastrique sont importantes pour la sécrétion d'acide gastrique et de facteur intrinsèque, tel que le pepsinogène qui est sécrété par les cellules principales également du corps gastrique de l'estomac (1). Tandis que les hormones (gastrine, histamine, sérotonine et somatostatine) sont libérées par les cellules entéro-endocrines dans tout l'estomac. La majeure partie du processus digestif et de l'absorption intestinale des aliments et des électrolytes se produit dans le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Les protéines, les graisses et les glucides sont décomposés par l'action des enzymes digestives en unités plus petites en vue de leur absorption dans le réseau de capillaires et de vaisseaux lymphatiques en passant par les petites cellules épithéliales intestinales situées sur les villosités intestinales. Tout matériau restant qui n'est pas absorbé par l'intestin grêle passe par la valve iléo-caecale dans le côlon. La muqueuse intestinale est responsable de l'absorption d'eau, de la solidification du contenu du côlon en matières fécales, puis du stockage des matières fécales avant l'expulsion (2).

2.2 Fonction barrière

Les composants extracellulaires

La première ligne de défense du tractus gastro-intestinal se trouve au niveau de la lumière intestinale, où les micro-organismes et les aliments sont dégradés de manière non spécifique par le pH et les sécrétions gastriques, pancréatiques et biliaires. Les enzymes digestives, principalement les protéases, les lipases, les amylases et les nucléases, exercent une action sur les microorganismes via la destruction de leur paroi cellulaire (3), et parviennent ainsi à éliminer dans un premier temps une grande partie des organismes exogènes. L'épithélium intestinal est composé d'un microenvironnement. Le mucus sécrété par des cellules caliciformes possède des propriétés hydrophobes et tensioactives qui empêchent les bactéries entériques d'adhérer à l'épithélium intestinal (4). Au sein de la couche muqueuse externe on peut retrouver des immunoglobulines A sécrétoire (IgAs) (5). Ces IgAs sont synthétisées par les plasmocytes de la lamina propria. On retrouve également dans cette couche externe des produits antimicrobiens sécrétés par les cellules de Paneth, notamment des phospholipides, des mucines chargées négativement et des peptides actifs dirigés contre les bactéries, les levures, les champignons, les virus et même les tumeurs. Les peptides antimicrobiens induisent une lyse bactérienne suite à la formation de pores membranaires, bien que certains d'entre eux, y compris les cryptidines 2 et 3, puissent induire une augmentation de la sécrétion d'eau dans la lumière intestinale, emportant ainsi les bactéries vers la surface épithéliale (6, 7). Les défensines jouent également un rôle dans la modulation du microbiote, et par conséquent dans la mise en place de la réponse immunitaire adaptative (8). De plus, la sécrétion de chlore et d'eau dans la lumière intestinale principalement par les entérocytes bloque la colonisation bactérienne et ralentit la translocation de l'antigène vers la lamina propria via un effet de dilution sur le contenu intestinal. Enfin, le péristaltisme, induit par les couches musculaires de l'intestin, évacue le contenu luminal et réduit le temps de rétention, raccourcissant ainsi le temps de contact entre les substances toxiques ou substances pathogènes au sein de la lumière intestinale.

Mucus

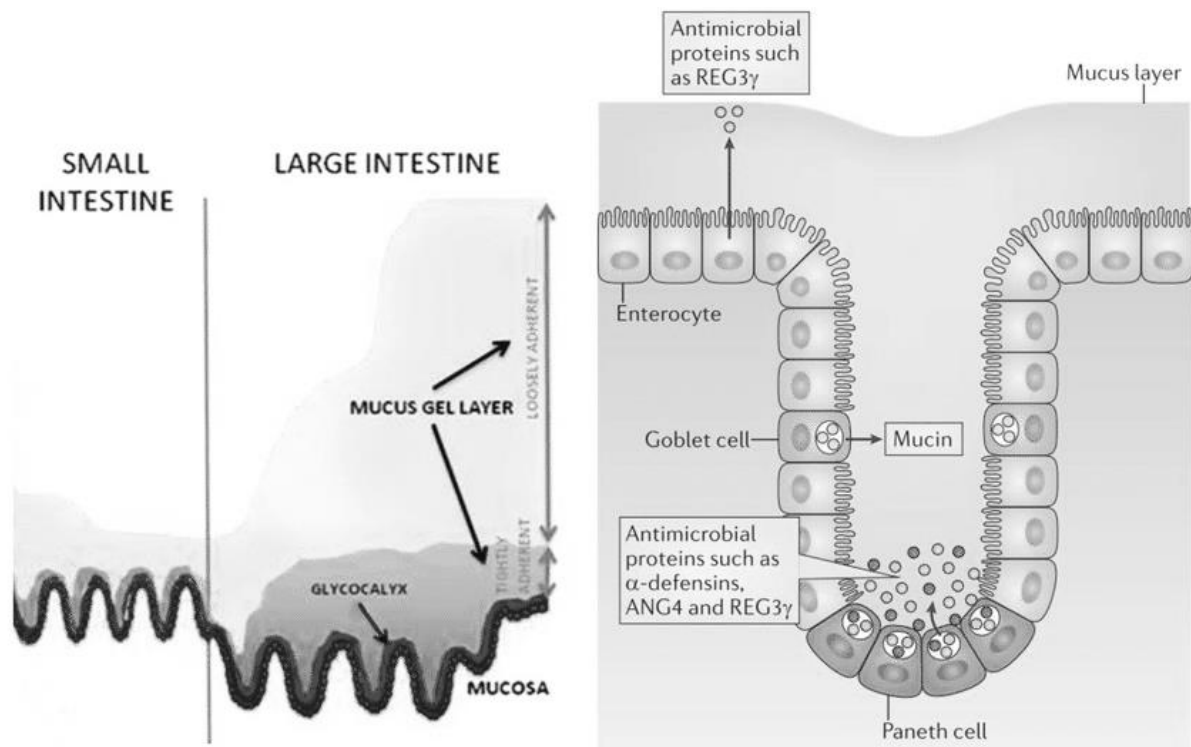


Figure 2. Structure de la couche de mucus le long de l'intestin et sécrétion des peptides antimicrobiens par les entérocytes et les cellules de Paneth (Moran et al. 2011 / Gallo and Hooper, 2012)

Le mucus intestinal est un composant structurel de l'intestin, il sert à protéger, lubrifier et transporter le contenu lumenale et les cellules épithéliales, via la clairance mucosale (9). Les constituants principaux du mucus sont les mucines sécrétées qui forment un gel (10). Les mucines en forme de filet ont des propriétés différentes dans l'intestin grêle et le gros intestin. La régulation de la sécrétion de mucus est contrôlée par le système neural, hormonal et paracrine ainsi que par le système immunitaire (11). L'intestin grêle à une seule couche de mucus dit « non attaché » et le côlon est composé de deux couches de mucus (12). Dans l'intestin grêle, les pores de grande taille permettent aux bactéries ou aux particules/biofilms bactériens de pénétrer dans le mucus. Le mucus remplit l'espace entre les villosités

et recouvre les pointes des villosités, mais les bactéries ne se trouvent pas en contact avec l'épithélium, sauf à la pointe des villosités.

La mucine polymérique riche en glucides lie l'eau, ce qui limite et ralentit la diffusion des bactéries et autres éléments exogènes. Les peptides et protéines antibactériens sécrétés par les cryptes des cellules de Paneth et des entérocytes dans le mucus sont d'une importance majeure pour maintenir les bactéries à distance. Cette pénétrabilité du mucus de l'intestin grêle peut-être la raison pour laquelle les bactéries pathogènes infectent principalement cette région de l'intestin. Le mucus du côlon est organisé en deux couches: une couche de mucus interne, stratifiée, fermement adhérente aux cellules épithéliales, et une couche externe « non attachée » (13) (Figure 2). La couche de mucus interne subit des modifications progressives en allant vers la couche externe, qui est l'habitat de la flore commensale. La couche de mucus externe a un volume élargi en raison des activités protéolytiques fournies par l'hôte mais probablement aussi causées par les protéases et glycosidases bactériennes commensales. Les nombreux O-glycanes de la mucine MUC2 servent non seulement de nutriments pour les bactéries mais aussi de sites de fixation et, en tant que tels, contribuent probablement à la sélection du microbiote du côlon spécifique à l'espèce. Ceci contraste avec l'intestin grêle, où le mucus est discontinu et est sécrété au sommet des cryptes puis remonte entre les villosités (13, 14).

Les propriétés viscoélastiques et polymères du mucus sont dérivés des principaux composants glycoprotéiques (15). Dans l'estomac MUC5AC et dans l'intestin MUC2 sont les deux mucines gélifiantes sécrétées (10). Les autres composants du mucus intestinal sont la protéine Fcgbp, Clca3, Zg16, Agr2, les immunoglobulines et bien d'autres protéines. Le mucus contient également des protéines cellulaires car les cellules sont continuellement expulsées dans la lumière et piégées dans le mucus. Les mucines se présentent sous la forme de longs filaments avec une large gamme de longueurs allant de 200 à plus de 1000 nm, les molécules polydispersées et

Entérocytes

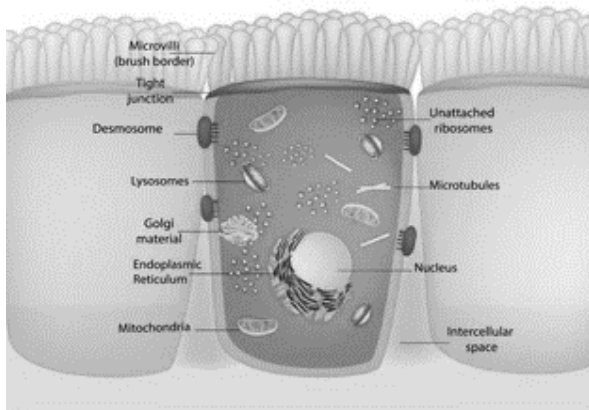


Figure 4. Structure et composition d'un entérocyte formant un épithélium

(Image vectorielle. DepositPhotos.com)

Les entérocytes sont le type cellulaire le plus abondant dans l'intestin grêle et le gros intestin. Leur fonction principale est d'absorber les nutriments. Leurs surfaces apicales ont des microvillosités caractéristiques de bordure en brosse.

Cette bordure striée proéminente comporte jusqu'à 3000 microvillosités étroitement parallèles et compactes qui améliorent considérablement la surface. Chaque microvillus mesure 1 μm de long et 0,1 μm de diamètre, avec une surface riche en glycoprotéines (ou glycocalyx). Les entérocytes synthétisent des enzymes telles que des disaccharidases, des peptidases, des entérokinases et des lipases, qui sont des protéines membranaires intégrales du glycocalyx. Sous les microvillosités on retrouve un réseau de filaments d'actine associé à la myosine et à d'autres ainsi que des protéines du cytosquelette dans la cellule. Un paquet de 20 à 40 filaments d'actine parallèles s'étendent dans le noyau dans chaque microvillosité pour fournir une stabilité. Les jonctions intercellulaires ancrent les cellules adjacentes en leurs bords latéraux et fournissent une barrière d'imperméabilité aux macromolécules. Les entérocytes expriment en leur surface des pompes à ions, telles que H^+ , K^+ - ATPase, pour le transport des ions et l'absorption des nutriments. Les mitochondries, les lysosomes, les éléments du réticulum endoplasmique rugueux et

lisse et le complexe de Golgi supra-nucléaire des entérocytes jouent un rôle essentiel dans le traitement des lipides terminaux lors de l'absorption des graisses (16-18).

Cellules caliciformes

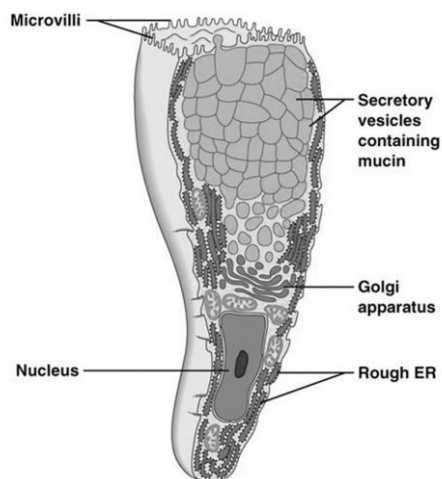


Figure 5. Structure et composition d'une cellule caliciforme

(Knoop, K.A et al. Mucosal Immunol 11.2018)

Les cellules caliciformes produisent des quantités abondantes de mucus protecteur qui recouvre la muqueuse de l'intestin grêle et du gros intestin. Ces cellules ressemblent à un gobelet parce que leur cytoplasme apical est distendu et contient des grandes vésicules de sécrétion allant de 1 à 3 μm (ou granules de mucine). Les cellules caliciformes ont un ou deux cycles de sécrétion dans une durée de vie de 2 à 4 jours. Ils synthétisent, stockent et déchargent le mucus par exocytose, par laquelle la fusion aléatoire de vésicules séparées se produit avant la libération. Chez l'homme, les granules de mucine nouvellement synthétisés passent du Golgi à la surface apicale en 12 à 24 heures. Les cellules caliciformes se mêlent aux entérocytes dans l'épithélium via des jonctions serrées. Les membranes cellulaires apicales présentent des microvillosités courtes qui se projettent dans la lumière. Les cellules précurseurs des cellules caliciformes sont des cellules souches

indifférenciées, capables de division cellulaire, qui résident profondément dans les cryptes et migrent vers la surface. Les cellules caliciformes sécrètent divers types de mucus. Les sialomucines prédominent dans l'intestin grêle ; contrairement aux sulfomucines plus présent dans le gros intestin. A noter qu'une stimulation cholinergique, ainsi que l'exposition aux bactéries et aux endotoxines, provoque une libération massive des mucines par les cellules caliciformes.

Cellules M

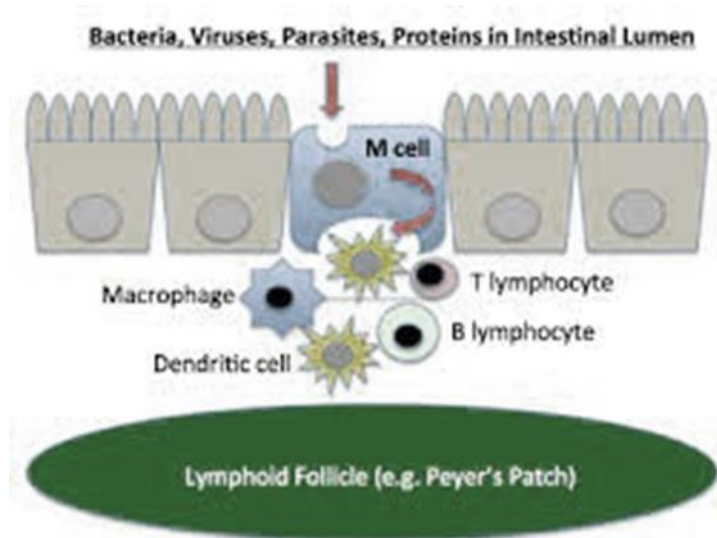


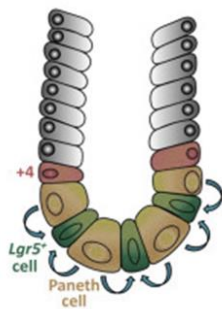
Figure 6. Rôle d'une cellule M (Mabbott NA, et al. *Mucosal Immunol.* 2013)

Les cellules M (microfold ou micropliées) se trouvent principalement dans l'épithélium associé aux follicules (EAF) recouvrant les plaques de Peyer et les follicules lymphoïdes, ce sont des cellules qui participent aux passages d'éléments microbiens. Les cellules M contiennent des structures membranaires inhabituelles qui facilitent la présentation des microbes aux lymphocytes, macrophages et cellules dendritiques sous-jacents (Figure 6). La compréhension de la différenciation des cellules M n'est pas encore complètement connue. Certains modèles suggèrent que

les cellules M résultent d'un programme de différenciation unique à partir des cellules souches intestinales, ou par trans différenciation des entérocytes matures. Une relation étroite entre les cellules M en développement et les lymphocytes adjacents (en particulier les cellules B) a été observée. Récemment, la protéine apparentée au TNF RANK Ligand s'est avérée nécessaire et suffisante pour la formation de cellules M fonctionnelles. Le récepteur RANK a été trouvé dans les petites villosités intestinales, la crypte et les cellules épithéliales FAE, ce qui confirme le concept selon lequel les cellules M pourraient dériver d'entérocytes matures (19-21).

Cellules de Paneth

Homeostasis



Paneth cells provide niche support to *Lgr5*⁺ stem cells by secreting EGF, Wnt3a, and Dll4.

Figure 7. Localisation des cellules de Paneth (Mark Schmitt et al. *Cell Reports*, 2018)

Les cellules de Paneth se trouvent à la base des cryptes de l'intestin grêle (Figure 7). Elles sont plus nombreuses dans l'iléon. Elles sont issues de cellules souches indifférenciées des cryptes intestinales et leur durée de vie est d'environ 20 à 30 jours, ce qui est plus long que la plupart des cellules épithéliales intestinales (22). Lorsqu'elles sont exposées à des bactéries ou à des antigènes bactériens elles sécrètent du lysozyme, qui régule le microenvironnement bactérien des cryptes, mais également du zinc, un activateur et stabilisateur de lysozyme. Les cellules de

Paneth phagocytent les bactéries et les immunoglobulines. Elles peuvent également servir à la défense de l'hôte en tant que cellules présentatrices d'antigène pour Lymphocytes T. Les cellules de Paneth sont des cellules pyramidales avec un noyau basal et un cytoplasme apical rempli de grandes vésicules sécrétoires bien visibles et denses. Ces vésicules sphériques font un diamètre de 1 à 2 μm , la densité augmente à mesure qu'ils s'approchent de la surface cellulaire apicale. Le contenu des vésicules est déchargé par exocytose dans la lumière de la crypte par fusion des membranes. Les cellules de Paneth sont uniques par rapport aux autres cellules sécrétoires de l'intestin. Contrairement aux autres cellules sécrétoires, les cellules de Paneth apparaissent d'abord après la naissance lors de l'émergence des cryptes. Les cellules de Paneth achèvent leur maturation à la base des cryptes.

Jonctions serrées

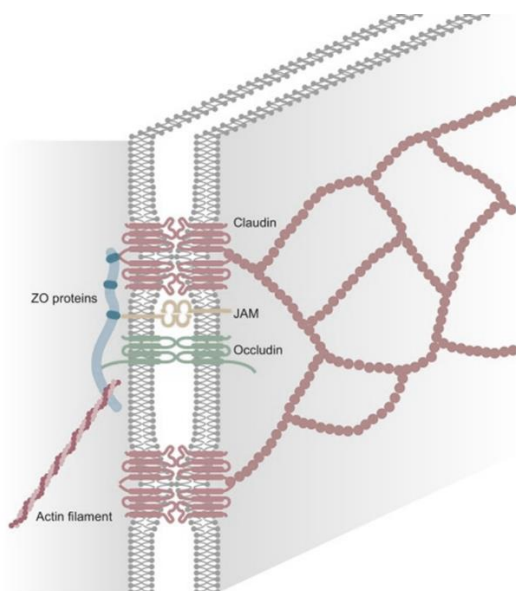


Figure 8. Les jonctions serrées (Tetsuhisa Otani et al. *Trends in Cell Biology*, 2020)

Le passage de petites molécules solubles dans l'eau à travers l'épithélium s'effectue à travers des jonctions serrées, qui scellent les espaces entre les cellules épithéliales. Les jonctions serrées (JS) sont les jonctions intercellulaires les plus apicales et leur fonction est essentielle au maintien de la barrière et de la polarité épithéliale,

limitant la diffusion des ions et la translocation des antigènes luminaux (23, 24). Ils sont constitués de complexes multiprotéiques impliquant quatre classes de protéines transmembranaires : l'occludine, les claudines, les molécules d'adhésion jonctionnelles (JAM) et la tricelluline, et sont majoritairement exprimés dans les cellules épithéliales et endothéliales, mais peuvent également se retrouver dans les astrocytes, les neurones, macrophages, cellules dendritiques et/ou des leucocytes (25, 26) (Figure 8).

L'occludine joue un rôle dans l'assemblage et le désassemblage des JS, et sa localisation membranaire est régulée par la phosphorylation des résidus Ser, Thr et Tyr.

Les claudines sont le principal facteur déterminant de la fonction barrière, elles contrôlent le passage des ions à travers l'espace paracellulaire (27) et sont également régulées par la phosphorylation spécifique des résidus Ser et Thr. La composition de la claudine est variable en raison de leur fonction physiologique, avec une perméabilité globalement réduite dans les parties distales du tractus gastro-intestinal (28).

Les JAM sont une sous-famille d'immunoglobulines exprimées par les cellules épithéliales et endothéliales, ainsi que les leucocytes et les plaquettes. Les protéines JAM dans les jonctions serrées épithéliales comprennent JAM-A, JAM-C, CAR, ESAM et JAM4, toutes associées latéralement à d'autres protéines dans les contacts intercellulaires afin de faciliter l'assemblage et la formation des jonctions serrées fonctionnels et polarisés (29).

Et enfin la tricelluline, se trouve aux contacts intercellulaires entre les trois autres types de cellules adjacentes où elle facilite la stabilité et la formation de la barrière épithéliale (30, 31). Les protéines JS transmembranaires, les claudines, l'occludine et les JAM, sont liées aux fibres d'actomyosine du cytosquelette par des membres de la famille des protéines de la zonula occludens - ZO-1, ZO-2 et ZO-3. Ces protéines

jouent un rôle fondamental dans la perméabilité cellulaire ainsi que dans la régulation de l'adhésion, la formation et la stabilisation des JS.

Jonctions communicantes

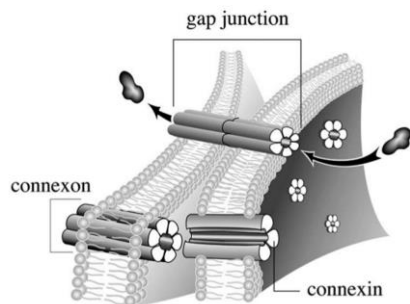


Figure 9. Les jonctions communicantes (Chong, Antony Chung You. Physics, 2019)

Les jonctions communicantes (jonctions GAP) permettent la communication entre les cytoplasmes des cellules voisines en créant un canal à travers leurs membranes. Ils sont composés de 6 protéines transmembranaires, appelées connexines, qui assurent l'échange réciproque d'ions et de petites molécules (> 1 KDa). Les connexines jouent un rôle crucial dans le développement, la croissance et la différenciation des cellules épithéliales en plus de leur rôle dans les jonctions JS et jonction adhérentes (32) (Figure 9).

2.4 Perméabilité intestinale

Le passage des nutriments et l'absorption d'eau et d'ions à travers l'épithélium intestinal résultent de processus à la fois actifs (transporteurs) et passifs (diffusion) entre la lumière intestinale et la muqueuse, d'où ils peuvent atteindre la circulation sanguine. Les entérocytes sont très actifs dans le rôle de transport en raison de leurs canaux ioniques, transporteurs et pompes au niveau de la membrane apicale et basolatérale. Le transport net résulte d'une absorption et d'une sécrétion équilibrée. Il s'agit d'un processus sélectif utilisant deux voies principales - les voies paracellulaire et trans-cellulaire.

– La voie paracellulaire permet 85 % du flux trans-épithélial passif total de molécules à travers l'espace entre deux cellules épithéliales adjacentes, et est régulée par des jonctions serrées, qui présentent des pores de tailles différentes pour limiter l'entrée des particules. Cette voie est une barrière efficace contre les antigènes luminaux et un déterminant de la perméabilité intestinale (33).

– La voie trans-cellulaire permet le transport du soluté à travers la membrane de l'entérocyte. Divers mécanismes interviennent dans le passage des molécules par la voie trans-cellulaire. Des composés hydrophiles et lipophiles plus petits diffusent par des moyens passifs à travers la bicouche lipidique de la membrane des entérocytes. De plus, la perméabilité épithéliale est conditionnée par des mécanismes de transport actifs médiés par des transporteurs et divers mécanismes d'endocytose, de transcytose et d'exocytose pour les ions, les acides. Les substances plus grosses telles que les protéines et les sous-produits bactériens sont endocytosés et/ou transportées activement par transcytose vésiculaire à travers le cytoplasme pour un traitement et une présentation ultérieure aux cellules présentatrice d'antigène, qui font partie de la réponse immunitaire intestinale (34). Les bactéries, virus et autres particules profitent de ces mécanismes d'entrée dans l'hôte par endocytose ou phagocytose, impliquant la liaison de molécules à la membrane cellulaire via des récepteurs (35).

Régulation de la perméabilité intestinale

La barrière intestinale n'est pas une structure statique mais est régulée par divers stimuli physiologiques, liés aux médicaments et à la maladie. La perméabilité des particules dépend de la taille, de la charge et de la nature des particules. Alors que la perméabilité varie entre les régions proximales et distales, ainsi qu'entre les cryptes et les villosités, les mécanismes moléculaires régulant le passage des substances à travers l'épithélium sont similaires le long de l'intestin et incluent les

interactions protéiques intercellulaires, le cytosquelette d'actine, l'endocytose et la signalisation intracellulaire. Des changements rapides de perméabilité se produisent via le cytosquelette et sont régulés par la phosphorylation de la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCK) (36). Le contrôle des barrières résulte des interactions entre le microbiote, les cellules épithéliales, le système immunitaire. Ainsi, par exemple, dans des conditions homéostatiques, l'activation apicale du PRR par les bactéries commensales favorise également la prolifération et la survie des cellules épithéliales (37). Le système immunitaire, via diverses cytokines telles que le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α), l'interféron gamma (IFN- γ), l'IL-8 ou l'IL-10, régule également la barrière intestinale via des modifications structurel des jonctions serrées (38). Un profil de cytokine accru ou inapproprié augmentera la perméabilité (39, 40).

Les signaux PRR dans un épithélium sain

De plus en plus de preuves indiquent que la détection microbienne via les récepteurs de reconnaissance de formes (PRR) entraîne des fonctions complémentaires dans les cellules épithéliales intestinales et les cellules hématopoïétiques, qui contrôlent ensemble l'homéostasie intestinale (41-43). Le contexte de l'activation du PRR est crucial. Dans l'intestin sain, l'activation basale du PRR maintient la fonction barrière et la composition commensale, mais une signalisation aberrante du PRR peut être précurseur de la physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Ce dernier point est souligné par des études d'association génétique liant les gènes PRR, y compris NOD2, NLRP3 et divers gènes du récepteur Toll-like (TLR), avec la susceptibilité de développer des MICI (43).

L'importance de la signalisation PRR/TLR dans la régulation de la fonction de barrière épithéliale a été démontrée par des études utilisant le modèle murin DSS-colite,

dans lequel l'administration de DSS entraîne la destruction chimique de la couche de cellules épithéliales intestinales permettant la pénétration de bactéries commensales et conduisant à une colite aiguë suivie d'une rupture de la barrière épithéliale. Les souris dépourvues de TLR spécifiques, tels que TLR2, TLR4, TLR5 ou TLR9, ou déficientes en la protéine adaptatrice de signalisation TLR MyD88, présentent une sensibilité accrue à la colite DSS, caractérisée par une réparation tissulaire défectueuse et/ou une mortalité accrue (41, 43). Les signaux TLR entraînent des effets protecteurs intrinsèques dans les cellules épithéliales intestinales en induisant plusieurs facteurs prolifératifs anti-apoptotiques, tout en favorisant la régénération épithéliale et en fortifiant les jonctions serrées intercellulaires (43). Les signaux TLR intrinsèques ont également un rôle central dans la limitation de la colonisation et de la translocation bactérienne en stimulant la production d'AMP, telles que les défensines (44). Des études récentes ont également indiqué que l'activation de l'inflammasome médiée par le NLR contribue à la protection après une lésion de l'épithélium, par exemple sur un modèle murin déficient en NLRP3, on a observé que des défauts sur la formation du complexe ASC ou caspase-1 entraînant une colite et une mortalité accrues après administration de DSS (45, 46). Les inflammasomes sont des complexes multimoléculaires qui activent la caspase-1. Ils se forment après l'activation des NLR cytosoliques, qui s'associent ensuite à la caspase-1, souvent par le biais d'interactions avec des protéines adaptatrices telles que l'ASC. Ensuite la caspase-1 activée joue un rôle central dans le traitement et la sécrétion de deux cytokines pro-inflammatoires clés, l'IL-1 β et l'IL-18, qui à leur tour se lient aux récepteurs qui utilisent MyD88.

3. Immunité intestinale

Le système immunitaire a évolué comme une protection contre un large éventail d'agents infectieux. Chez les vertébrés, le système immunitaire est divisé en deux

classes efficaces, les réponses immunitaires innées et adaptatives. Le système immunitaire inné est la première ligne de défense et fournit une réponse protectrice immédiate contre les infections et aide également à initier la réponse immunitaire adaptative. Le système immunitaire inné n'est pas spécifique et ne confère pas une immunité durable (mémoire). Le système immunitaire inné comprend la barrière épithéliale, les macrophages, les monocytes, les neutrophiles, les cellules dendritiques (CD), les cellules tueuses naturelles (cellules NK), les éosinophiles et les basophiles. Ces cellules agissent ensemble pour initier une réponse. Pour cela les différentes cellules sécrètent soit des cytokines, des chimiokines et des agents antimicrobiens. Dans le but est la phagocytose des cellules infectées et des microorganismes, puis la présentation de l'antigène et enfin l'activation du système immunitaire adaptatif si besoin. La réponse immunitaire adaptative quant à elle, est composée de lymphocytes (cellules T et B) qui, lorsqu'ils sont activés génèrent des réponses efficaces (cytokines et anticorps). Contrairement au système immunitaire inné, le système immunitaire adaptatif est hautement spécifique et confère une immunité de longue durée (mémoire).

3.1 Structures lymphoïdes dans l'intestin

Les structures organisées du tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT) et les ganglions lymphatiques drainants sont les principaux emplacements pour amorcer les réponses des cellules immunitaires adaptatives dans l'intestin. Inversement, les cellules immunitaires effectrices sont distribuées de manière diffuse dans toute la lamina propria et l'épithélium sus-jacent. Le GALT comprend des agrégats lymphoïdes sous-épithéliaux qui se trouvent dans la muqueuse et la sous-muqueuse, et ils sont caractérisés par un épithélium associé aux follicules sus-jacents. Celui-ci contient les cellules microfold (cellules M) qui sont spécialisées dans l'absorption et le transport des antigènes particuliers de la lumière vers une région

du dôme sous-épithélial (SED) riche en cellules dendritiques (CD) sous-jacentes, où elles peuvent être présentées aux cellules immunitaires adaptatives. Les cellules M sont également des portes d'entrée majeures pour de nombreux agents pathogènes intestinaux (47). Les tissus les mieux caractérisés du GALT sont les plaques de Peyer visibles macroscopiquement, qui sont situées du côté anti-mésentérique de l'intestin grêle (Figure 10). La taille et la densité des plaques de Peyer augmentent du jéjunum à l'iléon, elles sont particulièrement concentrées dans l'iléon distal et sont rares dans le duodénum. Les plaques de Peyer sont constituées de nombreux follicules lymphoïdes de cellules B (jusqu'à dix chez la souris et plusieurs centaines chez l'homme (48), qui sont flanqués de zones de cellules T plus petites. Contrairement aux ganglions lymphatiques, les plaques de Peyer ne sont pas encapsulées et contiennent toujours des centres germinatifs, ce qui indique une stimulation immunitaire continue, vraisemblablement en réponse à la présence continue d'antigène luminaire. Des structures macroscopiques équivalentes contenant des cellules M se trouvent dans le gros intestin, dans les plaques caecales autour de la valve iléo-caecale et dans les plaques coliques à travers le côlon et le rectum (49, 50).

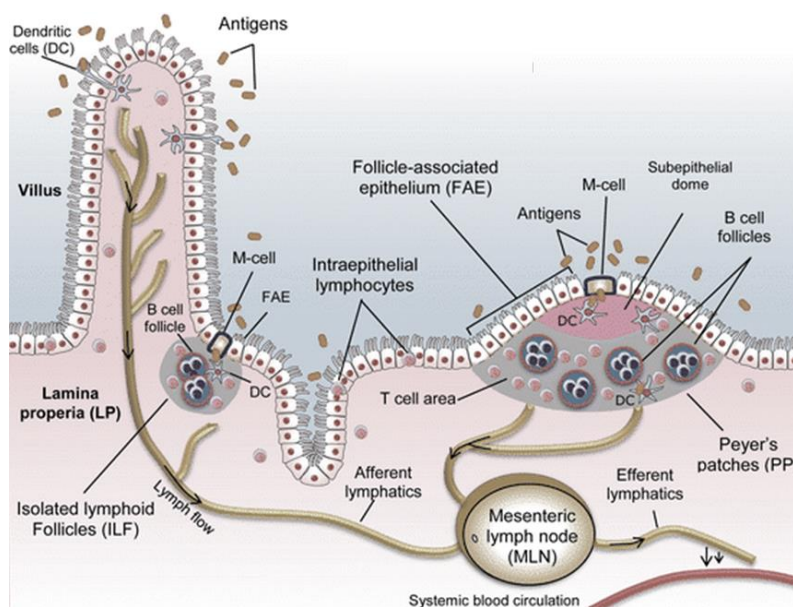


Figure 10. Les structures organisées du tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT)

(Zgair A et al. *Neuro-Immuno-Gastroenterology*, 2016)

3.2 Cellules immunitaires innées

Les cellules du système immunitaire inné, contrairement au système immunitaire adaptatif, ont une réponse rapide et moins spécifique aux micro-organismes envahisseurs ou aux macromolécules toxiques. Cette réponse est médiée par des récepteurs de reconnaissance d'agents pathogènes (PRR), qui sont liés à la membrane. Ces récepteurs sont codés dans la lignée germinale, invariables et prédéterminés pour reconnaître un répertoire de structures glucidiques et lipidiques associées de manière bactérienne/virale conduisant à la rapidité de la réponse. Les molécules microbiennes reconnues par ces récepteurs sont appelées motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMP) (par exemple, lipopolysaccharide et peptidoglycane). Les PAMP sont des molécules hautement conservées sur les microbes car elles sont essentielles à leur survie. Ces récepteurs reconnaissent également les signaux endogènes ou d'auto-danger (par exemple, les protéines de choc thermique, l'acide urique), qui sont connus sous le nom de modèle moléculaire associé aux dommages moléculaires (DAMP). Les cellules phagocytaires (macrophages, cellules dendritiques et neutrophiles), les éosinophiles et les cellules lymphoïdes ont une activité bactéricide immédiate.

Macrophages

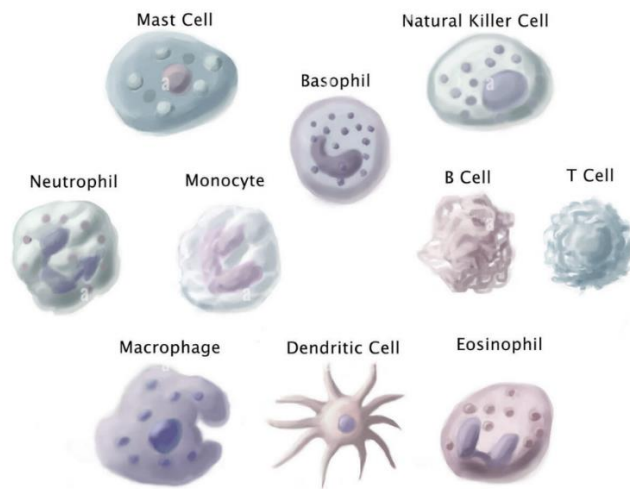


Figure 11. Les cellules du système immunitaires (Base de données, Fineartamerica)

Les macrophages sont des cellules phagocytaires présentes dans toute la muqueuse gastro- intestinale. Les macrophages sont dérivés de monocytes sanguins périphériques et sont recrutés à l'intestin par l'action d'agent chimio-attractants, chimiokines et produits de dégradation bactérienne (Figure 11). Les macrophages sont matures après avoir migré vers la muqueuse intestinale (51), contrairement aux neutrophiles produites et perdues en grand nombre chaque jour. Dans la muqueuse non inflammée, les macrophages diffèrent des monocytes périphériques dans leur fonction pro-inflammatoire réduite, caractérisée par une faible expression des ligands TLR, malgré la capacité diminuée de réponses immunitaires appropriées, ils ont néanmoins déjà la capacité de phagocytose (51). Cependant, dans le cadre d'une muqueuse enflammée les macrophages intestinaux recrutés fraîchement à partir de monocytes sanguins se convertissent rapidement en un phénotype pro-inflammatoire par modifications d'expression des ligands PRR. Ce phénotype pro-inflammatoire est marqué par une production de cytokine abondante (interleukine IL1 β , IL6, IL8 et facteur de nécrose tumorale TNF α) et une fois activé, les macrophages expriment des récepteurs spécifiques aux particules et agents

pathogènes opsonisés. Les agents pathogènes sont reconnus par ces récepteurs, qui conduisent à leur phagocytose. En outre, Les macrophages activés sécrètent des cytokines qui sont des protéines qui affectent la fonction d'autres cellules en l'absence de contact cellulaire. Le facteur transformant de croissance bêta (TGF β) est une cytokine produite par les macrophages activés, c'est un puissant agent chimio attractant qui va agir sur d'autres macrophages et neutrophiles. Le TGF β va augmenter le recrutement de ces cellules sur des sites d'inflammation (52). La sécrétion de cytokine n'augmente pas uniquement l'activité intracellulaire phagocytaire, mais sert également de lien critique entre les deux bras du système immunitaire (c'est-à-dire inné et adaptatif) et joue un rôle important dans l'homéostasie de l'intestin (53). Pour la simplifier, les macrophages avaient été divisés en deux catégories agissant lors d'évènement inflammatoire dit macrophage M1 et d'autres intervenant lors des phases de régénération tissulaires, guérison dit macrophage M2. Mais récemment, cette vue est remplacée par une plasticité considérable de macrophages dans laquelle ils acquièrent des fonctions distinctes de la défense hôte, de la cicatrisation des plaies et de la régulation immunitaire fondée sur des signaux environnementaux qu'ils rencontrent. Ils sont donc considérés comme une population hautement hétérogène de cellules avec un continuum d'états d'activation (54, 55).

Cellules dendritiques

Les CD sont des cellules phagocytaires qui, comme les macrophages, proviennent de monocytes sanguins ou d'un progéniteur de CD commun dans la moelle osseuse (Figure 11). Les CD ont la capacité la plus puissante d'initier des réponses immunitaires adaptatives contre les agents pathogènes. Les données actuelles soutiennent que les CD intestinales migrent continuellement dans un état immature

ou tolérogène, pour former des cellules apoptotiques piègeuses et qui acquièrent des antigènes prélevés soit directement à partir de la lumière, soit transférés de la lumière vers les cellules M (56). Après un contact avec l'antigène, les CD chargent le peptide antigénique sur des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II et affichent ce complexe sur sa surface cellulaire. Les CD migrent ensuite vers les ganglions lymphatiques mésentériques drainants où elles présentent un complexe MHC-peptide particulier aux cellules T portant le récepteur des cellules T (TCR) spécifique de l'antigène présenté. Dans un état physiologique normal, ces CD chargées en antigène (CD intestinales) expriment de faibles niveaux de molécules co-stimulatrices et cytokines mais, au contact des cellules T, ils stimulent préférentiellement leur différenciation en cellules T régulatrices (Tregs) qui vont produire des cytokines anti-inflammatoires IL4, IL10 et TGF β . En revanche, lorsque les CD intestinales sont activés dans un microenvironnement pro-inflammatoire, elles migrent vers les zones des cellules T du GALT, où elles induisent des réponses effectrices plutôt que tolérogènes. Les CD isolées de ces sites expriment des niveaux élevés de molécules de co-stimulation et de molécules d'adhésion et produisent de grandes quantités de cytokines (57). Les CD intestinales peuvent alors induire l'expression de récepteur muqueux $\alpha 4\beta 7$ et le récepteur de chimiokine CCR9 sur les cellules T, suggérant qu'elles peuvent orienter une cellule T vers le site d'origine de l'activation des CD (58, 59).

3.3 Cellules immunitaires adaptatives

Cellules T

Dans les modèles humains et expérimentaux de MICI, les cellules T CD4⁺ TCR $\alpha\beta$ activées jouent un rôle essentiel dans la pathogenèse de la maladie. Lors de la maturation dans le thymus, les cellules T naïves (cellules qui n'ont pas encore été

exposées à un antigène) circulent dans les tissus lymphatiques à la recherche du complexe CMH-peptide apparenté. Les cellules T naïves expriment constitutivement la sélectine CD62L (L-sélectine) et le récepteur de chimiokine 7 (CCR7), tandis que les cellules endothéliales des veinules endothéliales hautes (VHE) dans les ganglions lymphatiques expriment des adhésines vasculaires comme CD34, cellule dépendante de la molécule d'adhésion (GlyCAM-1) (60). L'interaction de CD62L et CD34 (parmi d'autres molécules endothéliales glycosylées) favorise une action de roulement de la cellule T à travers la surface endothéliale. Les chimiokines présentes au niveau de la surface luminale des veinules endothéliales hautes (VHE) activent les molécules d'adhésion de surface comme l'antigène 1 associé à la fonction leucocytaire (LFA-1) sur les cellules T. La liaison de LFA-1 (sur les cellules T) aux récepteurs des molécules d'adhésion intercellulaire (ICAM-1 et ICAM-2) sur les cellules endothéliales favorise l'adhésion des cellules T et leur permet de traverser la muqueuse endothéliale vers le tissu lymphoïde. Dans le tissu lymphoïde sous-jacent se trouvent des CD chargées d'antigènes qui sécrètent également des chimiokines comme le ligand de chimiokine (motif C-C) 19 (CCL19, un ligand pour CCR7 sur les cellules T) qui retiennent les cellules T dans les ganglions lymphatiques. Les cellules T naïves, après avoir pénétré dans le tissu lymphoïde, scannent les surfaces des CD à la recherche d'un complexe CMH-peptide reconnaissable. Si aucune n'est trouvée, les cellules quittent le ganglion lymphatique, retournent dans la circulation et rentrent dans d'autres ganglions pour répéter le processus. Une fois qu'une cellule T naïve rencontre un antigène apparenté via son TCR, elle est activée. L'activation complète des lymphocytes T nécessite 2 signaux : le signal 1 est médié par la stimulation du TCR et le signal 2 est un signal de co-stimulation. La co-stimulation via CD28 (sur cellules T) et B7.1 ou B7.2 (sur CPA) entraîne l'activation des cellules T, tandis que la co-stimulation médiée par l'antigène cytotoxique des lymphocytes T 4 (CTLA-4) (sur les cellules T) par B7.1 ou B7.2 entraîne une inhibition des lymphocytes T. Si l'activation des lymphocytes T n'est faite que via le signal 1 du TCR/antigène apparenté il et qu'il ne se produit aucune co-stimulation, il

en résulte des cellules T anergiques (c'est-à-dire un manque de réponse lors d'une réexposition au même antigène dans le futur). Lors de l'activation, les cellules T CD4⁺ sécrètent un ensemble particulier de cytokines qui déterminent le type de réponse immunitaire qui s'ensuit et le phénotype des cellules T effectrices matures. Les données les plus récentes suggèrent que les cellules T CD4⁺ activées en présence d'IL12 et en l'absence d'IL4 acquièrent un phénotype T auxiliaire 1 (Th1), résultant en des cellules productrices d'interféron- γ (IFN γ) efficaces dans le contrôle des agents pathogènes intracellulaires. Les cellules T CD4⁺ activées en présence d'IL-4 acquièrent un phénotype Th2, générant des cellules productrices d'IL4, IL5 et IL13 efficaces dans l'élimination des infections parasitaires et des réponses allergiques. L'activation en présence d'IL6, de TGF β et d'IL23 donne des cellules exprimant le phénotype Th17 (recrutement de granulocytes) (61, 62). L'activation des cellules T et leur expansion clonale dans le tissu lymphoïde prend 4 à 5 jours. Dans le tissu intestinal, la reconnaissance de l'antigène apparenté par les cellules T effectrices entraîne la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α . Le TNF α stimule à son tour les cellules endothéliales pour réguler positivement les molécules d'adhésion telles que la sélectine E (recrute des monocytes et des neutrophiles) et VCAM-1 et ICAM-1 (qui recrutent toutes deux des cellules T activées). De plus, le TNF α et l'IFN γ modifient le flux sanguin, la forme des cellules endothéliales et la perméabilité vasculaire pour améliorer la migration des cellules inflammatoires dans le tissu. Les cascades inflammatoires déclenchées par les cellules T activées entraînent des altérations structurelles importantes dans le tissu enflammé, y compris une ulcération, qui déclenchent éventuellement les signes et symptômes caractéristiques de la MICI active.

Cellules B

Une cellule B totalement différenciée appelée plasmocyte sécrète une immunoglobuline de la même spécificité antigénique (appelée anticorps). Dans le GALT, les cellules B travaillent en collaboration avec l'épithélium pour exporter les IgA sécrétoires (IgAs) et, dans une certaine mesure, les IgM sécrétoires pour renforcer la défense muqueuse contre les agents pathogènes intestinaux. Les cellules B de la muqueuse présentent un changement de classe IgA prédominant et, lors de la différenciation en cellules plasmatiques matures, produisent environ 3 g d'IgAs par jour (63). Plus de 80 % des plasmocytes se trouvent dans l'intestin, et presque toutes ces cellules produisent des IgA (64). Les plasmocytes de la muqueuse produisent principalement les formes dimères ou polymères d'IgA. Une fois dans la lumière, les IgAs fonctionnent principalement pour inhiber l'adhésion des virus et bactéries à l'épithélium en agglutinant les bactéries et autres antigènes, en les piégeant dans la couche muqueuse et en facilitant leur élimination de l'hôte (64). Les IgAs favorisent également l'absorption bactérienne à médiation par les cellules M et la présentation de la cible aux CD intestinales et aux macrophages pour fournir une boucle de rétroaction positive pour améliorer l'immunité sécrétoire (65).

4. Dysfonctionnement du système immunitaire

Il est maintenant largement admis que les maladies inflammatoires de l'intestin résultent d'une réponse inappropriée d'un système immunitaire muqueux défectueux à la flore indigène et à d'autres antigènes luminaux. Comment et pourquoi les antigènes microbiens pourraient-ils provoquer une réponse inflammatoire inappropriée ? Des preuves expérimentales provenant d'études *in vitro*, sur des animaux et chez l'homme suggèrent que plusieurs voies, non exclusives pourraient entraîner des cascades inflammatoires.

Tout d'abord, la barrière épithéliale présente des dysfonctionnements chez les personnes atteintes d'une maladie inflammatoire de l'intestin. Plusieurs études ont montré une diminution de la résistance épithéliale et une augmentation de la perméabilité de la muqueuse enflammée et non enflammée dans la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse (66). Le défaut précède l'apparition clinique de la maladie chez les personnes à risque familial (67). Des défauts de perméabilité ont également été rapportés. ***Chez des parents sains au premier degré de patients atteints d'une maladie inflammatoire de l'intestin avec une mutation CARD15, impliquant un défaut génétique.*** Plusieurs mécanismes d'augmentation de la ***perméabilité ont été proposés, allant de la perturbation médiée par les lymphocytes T de la protéine des jonctions serrées au dysfonctionnement des neurones entériques*** (68, 69).

Deuxièmement, les personnes atteintes d'une maladie intestinale inflammatoire ont une modification de l'expression des mécanismes immunitaires innés au niveau de la couche épithéliale. Chez ces personnes, les cellules épithéliales muqueuses ont un schéma différent d'expression du TLR. Alors que les cellules épithéliales intestinales saines expriment constitutivement TLR3 et TLR5 basolatéralement, TLR2 et TLR4 sont généralement à peine détectables. TLR3 est significativement diminué dans la maladie de Crohn active, mais pas dans la colite ulcéreuse. En revanche, TLR4 est fortement augmenté dans les deux maladies (70). Les cellules épithéliales intestinales expriment également TLR9, ce qui leur permet d'interagir directement au contact d'ADN bactérien, entraînant ainsi la sécrétion d'interleukine 8, qui est un chimioattractant des granulocytes (71). Probablement en raison

de son expression basolatérale le TLR5, voit son expression fortement diminuée voire supprimée, cependant lorsque la muqueuse est lésée, la flagelline qui est un composant bactérien et un puissant ligand du TLR5 peut se lier à celui-ci et aggraver l'inflammation (72). Une augmentation de NOD2 dans les cellules épithéliales, lorsque la cascade NFκB est activée pourrait compromettre la capacité de l'hôte à éliminer les microbes invasifs et pathogènes entraînant une inflammation chronique (73, 74).

Troisièmement, la reconnaissance et le traitement de l'antigène par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) sont perturbés chez les personnes atteintes d'une maladie inflammatoire de l'intestin. Des études suggèrent que les cellules dendritiques reconnaissent incorrectement les bactéries commensales et induisent des réponses immunitaires pro- inflammatoires Th1 et éventuellement Th17, normalement dirigées contre les agents pathogènes. Cela pourrait être dû à des réponses dysfonctionnelles ou exagérées des récepteurs de reconnaissance TLRs (75). Une expression accrue de TLR4 par les cellules dendritiques myéloïdes dans les maladies inflammatoires de l'intestin a été rapportée (76, 77). Des études sur les maladies inflammatoires de l'intestin chez des modèles animaux ont montré des cellules dendritiques activées, qui prolonger leur survie, maintenant ainsi l'inflammation. Cette hypothèse est indirectement étayée par des données animales qui impliquent l'activateur du récepteur du système facteur nucléaire-κ B (RANK)-ligand RANK (RANKL) dans ce processus (78). Les populations de cellules dendritiques intestinales humaines dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin sont insuffisamment caractérisées, principalement en raison de la rareté des anticorps hautement spécifiques et de leur faible nombre. Il a été montré une fréquence accrue de cellules dendritiques matures, c'est-à-dire activées, dans la muqueuse enflammée de patients atteints d'une maladie intestinale inflammatoire active (57, 79). ***Les patients atteints d'une maladie inflammatoire de l'intestin, qui est en corrélation frappante avec l'étendue de l'inflammation*** (79). Les cellules dendritiques humaines des MICI expriment des marqueurs de localisation intestinale et ont également montré une réponse aberrante aux stimuli microbiens de substitution comme l'ADN-CpG et le lipopolysaccharide (79). Cette absence de capacité de régulation des cellules dendritiques pourrait également contribuer à l'activation répétée de certaines cellules T mémoire (gut homing) ou à l'échec de la

suppression de ces populations de cellules T surréactives (absence de tolérance périphérique), perpétuant ainsi l'inflammation (80-82).

Quatrièmement, les cellules présentatrices d'antigène atypique deviennent de puissants activateurs des lymphocytes T effecteurs chez les personnes atteintes de MICI. Les cellules présentatrices d'antigènes non spécifiques, telles que les cellules épithéliales, qui induisent normalement une anergie dans les lymphocytes T CD4+, peut-être en raison de leur manque de molécules B7 (CD80, CD86), acquièrent un phénotype activé avec une expression accrue des molécules d'histocompatibilité en présence des cytokines telles que l'interféron γ et le $\text{TFN}\alpha$ (83). Les cellules épithéliales pourraient également activer les cellules T via des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité non classique, telle que CD1d, si les antigènes accèdent à cette molécule exprimée basolatéralement dans la muqueuse lésée (84). Les cellules épithéliales expriment également des molécules co-stimulatrices alternatives, qui pourraient les transformer en cellules présentatrices d'antigène fonctionnelles (85). De plus, les cellules épithéliales pourraient activer directement les lymphocytes T CD4 par l'expression de lectines et d'autres glucides.

Cinquièmement, les personnes atteintes des MICI ont une clairance perturbée des populations de lymphocytes T hyperactifs ou auto réactifs. En raison d'un échec de la tolérance centrale (thymique) et périphérique, les lymphocytes T activés persistent et ne subissent pas d'apoptose. Cette persistance a été démontrée chez des patients atteints de la maladie de Crohn et est exploitée dans **les thérapies biologiques actuelles** qui brisent ce cycle d'activation (86, 87).

Sixièmement, l'équilibre des cellules T régulatrices et effectrices est perturbé dans les MICI. Lorsque la maladie est active, les lymphocytes T effecteurs (Th1 et Th2) prédominent sur les lymphocytes T régulateurs en conséquence des lymphocytes T naïfs (Th0) qui se différencient de préférence en Th1 (dans la maladie de Crohn) (88). Le phénotype Th1 dans la maladie de Crohn est médié par le facteur de transcription T-bet (89) la cytokine interleukine 23 (90). Les cellules T activées dans la maladie de Crohn produisent et libèrent des cytokines inflammatoires, telles que l'interleukine 12, l'interleukine 18, le TNF-like 1A et l'interféron γ , qui stimulent les macrophages à libérer l'interleukine 1, $\text{TNF}\alpha$, et interleukine 6 (91). De plus,

un nombre accru de lymphocytes T NK activés produisant de l'interleukine 13 et de l'interleukine 5 a été signalé dans la colite ulcéreuse (92), ce qui pourrait encore augmenter et perpétuer l'inflammation. L'identification des cellules T auxiliaires qui produisent l'interleukine 17 (Th17) et peuvent favoriser les réponses inflammatoires à médiation immunitaire dans divers tissus, y compris l'intestin, souligne la complexité et l'importance du maintien de l'homéostasie immunitaire. Des études récentes suggèrent que le facteur de croissance transformant β est essentiel pour déterminer l'équilibre entre les réponses des cellules T auxiliaires pro-inflammatoires (Th17) et anti-inflammatoires (Treg) qui fonctionnent normalement ensemble pour déclencher ou limiter l'inflammation intestinale (93). Des facteurs endogènes ou exogènes qui modifient l'expression du facteur de croissance transformant β ou d'autres cytokines clés (interleukine 4, interleukine 6 et interleukine 22 et interféron γ) qui maintiennent ou arrêtent l'activité Th17 ou Tr seraient d'une importance majeure pour le développement de l'inflammation intestinale chronique et des maladies inflammatoires de l'intestin (94).

Septièmement, le stress psychosocial pourrait déclencher ou augmenter la cascade inflammatoire par interaction neuroimmunologique. En l'absence de stress, le système nerveux, par l'intermédiaire du nerf vague, peut avoir un effet inhibiteur important et atténuer rapidement les réponses inflammatoires systémiques par la voie anti-inflammatoire cholinergique. La sous-unité $\alpha 7$ du récepteur nicotinique de l'acétylcholine, nécessaire à l'inhibition par l'acétylcholine de la libération de TNF α par les macrophages, qui est une source majeure de cette cytokine pro-inflammatoire dans les MICI, n'a été identifiée que récemment (95). D'autres preuves qui identifient l'implication du nerf vague dans le contrôle de l'inflammation proviennent d'études d'échantillons de tissus de colite ulcéreuse qui montrent un passage d'une innervation principalement cholinergique à une innervation plus positive à la substance P (96) impliquant la dégranulation des mastocytes, la surproduction d'interféron γ et altérant l'expression des protéines des jonctions serrées (97, 98).

4.1 Dysfonctionnement génétiques

Gènes de susceptibilité

La colite ulcéreuse et la maladie de Crohn sont des maladies polygéniques. 12 analyses pangénomiques réalisées à ce jour ont identifié des régions de susceptibilité sur 12 chromosomes. Conformément à l'hétérogénéité génétique des maladies inflammatoires de l'intestin, aucun locus unique n'a été signalé de manière cohérente dans toutes les analyses du génome. Selon leur date initiale de notification, les régions des chromosomes 16, 12, 6, 14, 5, 19, 1, 16 et 3 ont été renommées IBD1–9, respectivement. Dernièrement, davantage de gènes ont été rapportés avec des techniques de clonage positionnel et une cartographie fine des régions de susceptibilité identifiées à partir de scans du génome (99). Dans quelques cas, le ou les gènes sous-jacents aux différents locus chromosomiques qui sont liés à une maladie inflammatoire de l'intestin ont été identifiés : CARD15 (NOD2) est l'haplotype gène sur le chromosome 16 dont 30 polymorphismes non conservateurs ont été identifiés. Les substitutions d'acides aminés dans l'homologue humain des disques du gène de la drosophile le grand homologue 5, qui est un membre de la famille des guanylate kinases associées à la membrane (MAGUK) des protéines d'échafaudage, qui sont importantes dans la transduction du signal et l'intégrité des cellules épithéliales, sous-tendent le chromosome 10 région de liaison, le gène sous-jacent au locus IBD5 a été identifié comme les nouveaux gènes transporteurs cationiques organiques 1 et 2 (OCTN1 et OCTN2) qui sont membres d'une famille de protéines de transport de cations organiques qui pourraient également transporter la carnitine, un cofacteur essentiel du métabolisme de lipides (100, 101). Tous les locus n'ont pas été reproduits dans toutes les études. Cela pourrait indiquer une faible puissance statistique en raison de la taille de l'échantillon et de la variation phénotypique. Selon deux grandes méta-analyses, la preuve la plus convaincante d'un lien avec les maladies inflammatoires de l'intestin dans toutes les populations et toutes les maladies se situe sur le chromosome 6 (IBD3), qui code le complexe majeur d'histocompatibilité (102-104). Certaines mutations dans ces locus pourraient être associées à certaines maladies phénotypes ou cours

de la maladie. Par exemple, le domaine 2 d'oligomérisation de liaison aux nucléotides (NOD2, CARD15), qui est exclusivement associé à la maladie de Crohn dans les populations blanches, a été associé à la sténose de la maladie de Crohn de l'intestin grêle. Le HLA sous-jacent DRB*0103 a été associé à une évolution particulièrement agressive de la colite ulcéreuse et à la nécessité d'une intervention chirurgicale et de la maladie de Crohn colique. Les complications des maladies extra-intestinales, telles que l'arthropathie ou l'uvéite, ont été associées à HLA-B27 ou HLA-B35, et HLAB44 ou HLA-DRB*0103, respectivement (105). D'autres mutations, telles que les mutations récemment décrites dans le gène IL23R, pourraient protéger contre la maladie de Crohn.

Agrégation familiale

L'agrégation familiale des maladies inflammatoires de l'intestin a été signalée pour la première fois dans les années 1930 (106). Des antécédents familiaux positifs demeurent le principal facteur de risque indépendant de la maladie. Le plus grand risque pour les proches est de développer la même maladie que le proche atteint. Les personnes atteintes de la maladie de Crohn ont un parent au premier degré atteint de la maladie de Crohn dans 2,2 à 16,2 % des cas et d'une maladie inflammatoire de l'intestin dans 5,2 à 22,5 % des cas. Le risque de maladie de Crohn chez un frère ou une sœur d'un candidat à la maladie de Crohn est plus élevé que le risque moyen chez un parent au premier degré. Les personnes atteintes de rectocolite hémorragique ont un parent au premier degré atteint de rectocolite hémorragique dans 5,7 à 15,5 % des cas et de maladie intestinale inflammatoire dans 6,6 % à 15,8 %. Le risque estimé à vie de développer une maladie inflammatoire de l'intestin pour un parent au premier degré d'un candidat à la maladie de Crohn est de 4,8 à 5,2 % pour les non-juifs et de 7,8 % pour les juifs. Les chiffres équivalents pour les parents au premier degré avec un probant de colite ulcéreuse sont de 1,6 % pour les non-juifs et de 5,2 % pour les juifs. La concordance pour le type de maladie, le schéma de la maladie et la présence de manifestations de maladie extra-intestinale est de 75– 80 %, 64 % et 70 %, respectivement (107).

4.2 Facteurs environnementaux

En Amérique du Nord et en Europe du Nord on retrouve les taux d'incidence et de prévalence les plus élevés pour la RCH et la MC. Les taux d'incidence les plus faibles sont retrouvés en Amérique du Sud, en Asie du Sud-Est, en Afrique (à l'exception de l'Afrique du Sud) et en Australie (108). Bien que ces données suggèrent qu'il existe un gradient du nord au sud, elles pourraient également indiquer une variation dans l'accès et la qualité des soins de santé ainsi que différents degrés d'industrialisation, d'assainissement et d'hygiène. De nombreuses régions où les taux d'incidence sont faibles comprennent les pays en développement. Des taux d'incidence différents pourraient également résulter des antécédents génétiques différents des résidents de ces parties du monde. L'augmentation des taux d'incidence des MICI chez les immigrants des régions à faible incidence qui se déplacent vers les pays développés et une corrélation des taux d'incidence avec l'industrialisation à Hong Kong et en Chine continentale a également été identifiées (109). Plusieurs grandes études épidémiologiques en Amérique du Nord et en Europe ont montré une accumulation de cas des MICI dans les communautés urbaines par rapport aux communautés rurales. Comme pour le gradient nord-sud, ce modèle n'implique probablement pas autant la géographie que d'autres facteurs environnementaux, tels que l'industrialisation, l'assainissement des eaux et l'hygiène, ou les différences d'accès aux soins de santé spécialisés. Les premières études épidémiologiques menées aux États-Unis et en Scandinavie ont suggéré que la RCH est plus fréquente pendant les saisons d'automne et d'hiver (110, 111). Ces données sont contredites par des études plus récentes menées aux États-Unis et en Italie (112, 113).

4.3 Etiologie des MICI

En Europe du Nord, au Royaume-Uni et en Amérique du Nord, on retrouve les taux d'incidence et la prévalence les plus élevés de la RCH et de la MC, cependant les taux commencent à se stabiliser. Les taux continuent d'augmenter dans les zones à faible incidence telles que le sud de l'Europe, l'Asie et la plupart des pays en développement. En Amérique du Nord, les taux de prévalence de la maladie de Crohn chez les Hispaniques (4 pour 100 000) et les Asiatiques (5 pour 100 000) sont bien inférieurs à ceux des Blancs (43 pour 100 000) et des Afro-Américains (29 pour 100 000) (114). L'importance de l'origine ethnique dans le risque des MICI est étayée par une étude montrant des différences ethniques dans la localisation de la maladie et les complications des maladies extra-intestinales (115).

L'émergence des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) est directement liée à l'apparition de dysfonctionnement entraînant des troubles gastro-intestinaux chroniques, notamment une inflammation incontrôlée. Il en existe deux formes cliniques principales: la maladie de Crohn (MC), qui peut affecter n'importe quelle partie du tractus gastro-intestinal, et la rectocolite hémorragique (RCH), dans laquelle la pathologie est limitée à la muqueuse colique (82). L'étiologie précise des MICI n'est pas encore définie, mais plusieurs facteurs contribuent de manière majeure à la pathogenèse de ces maladies ont été identifiés. Ceux-ci se répartissent en trois catégories distinctes : le dysfonctionnement du système immunitaire de l'hôte, les facteurs génétiques, les facteurs environnementaux, précédemment décrit. Au niveau cellulaire, la diaphonie dynamique entre les cellules épithéliales intestinales, les microbes intestinaux et les cellules immunitaires locales représente l'une des caractéristiques fondamentales de l'homéostasie intestinale (116).

PARTIE 1.

INTRODUCTION

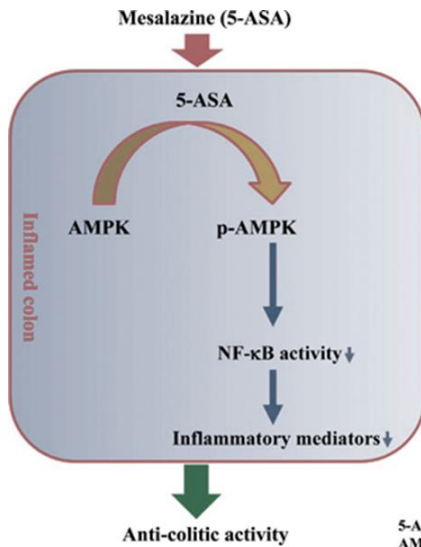
Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Des traitements classiques, récents, innovants ou naturels ?

Étant donné que les progrès dans la compréhension de la pathogénèse des MICI n'ont pas été entièrement élucidés, identifier des cibles thérapeutiques curatives ou préventives efficaces contre les MICI reste un défi à relever. Les traitements classiques des MICI se concentrent sur la réduction de l'activité inflammatoire en atténuant la prolifération et l'activité pro-inflammatoire des cellules immunitaires. Cet arsenal thérapeutique comprend les corticoïdes, le 5-ASA, les thiopurines et bien d'autres molécules. Dans cet arsenal plus récemment on observe le développement d'agents biologiques tel que des anticorps monoclonaux dirigés contre des cytokines ou des molécules d'adhésion cellulaires. Ces différents médicaments ou thérapies ne cessent d'évoluer dans le but d'améliorer les effets thérapeutiques de ces produits en revanche il est nécessaire de maintenir un contrôle suffisant des effets secondaires induits à court ou long termes par ces différentes méthodes de médication qui sont parfois combinés. Afin de réduire le risque d'événements indésirables à un niveau acceptable les chercheurs étudient également les thérapies alternatives naturelles à base de probiotiques qui pourraient permettre une meilleure prévention des MICI.

5. Les traitements standards

5.1 5-Aminosalicylate



5-ASA: 5-Aminosalicylic acid
AMPK: Adenosine monophosphate-
activated protein kinase

(Park Heejung et al. Current Molecular Pharmacology, 2019)

Figure 12. La mesalazine

Dans les années 1930, Nana Swartz a étudié l'activité thérapeutique de la sulfasalazine (SASP), attribuée à l'action anti-inflammatoire du fragment 5-ASA. Au cours de ses travaux cliniques Nana Swartz a constaté une amélioration significative des symptômes chez les patients atteints de MICI avec un traitement au 5-ASA (117). De nos jours, le 5-ASA compte parmi les médicaments les plus importants dans le traitement des stades actifs de la maladie et dans le maintien de la rémission de la RCH et est toujours disponible sous plusieurs formes posologiques. (Les formes galéniques orales établies de 5-ASA sont enrobées de polymères sensibles au pH tel que le Claversal[®], Salofalk[®], Asacol[®] et Pentasa[®]).

Le 5-ASA induit une réduction de la production locale de cytokines dans la muqueuse intestinale notamment des cytokines IL-1 β , l'IL-2 et de l'IFN γ . Il inhibe la transcription du NF κ B épithélial en modulant sa phosphorylation (Figure 12). De plus, le 5-ASA bloque l'effet pro-inflammatoire du TNF- α sur les cellules immunitaires de la muqueuse et réduit la production locale de prostaglandines et de leucotriènes(118, 119). En 2005, il a été rapporté que le 5-ASA est un puissant agoniste de la famille des récepteurs PPAR- γ (119, 120).

5.2 *Glucocorticostéroïdes*

Les effets anti-inflammatoires des glucocorticostéroïdes (GCS) sont médiés par le récepteur intracellulaire des glucocorticoïdes, qui migre vers le noyau cellulaire dans les 20 minutes suivant la liaison ligand/récepteur. Dans le noyau, le complexe glucocorticoïde/récepteur se lie aux éléments réactifs positifs aux glucocorticoïdes dans l'ADN et induit la synthèse de protéines anti-inflammatoires (121, 122).

Le complexe récepteur des glucocorticoïdes se lie également aux éléments réactifs aux glucocorticoïdes négatifs dans l'ADN, inhibant l'expression génique des cytokines telles que l'IL1 β et l'IL2 (122). De plus, la répression trans, qui implique l'interaction du complexe récepteur des corticostéroïdes avec des facteurs de transcription pro-inflammatoires dans le génome, réduit la transcription de la protéine activatrice 1 et du facteur NF κ B (123).

Le complexe récepteur corticostéroïde inhibe également de manière compétitive les co-activateurs pro-inflammatoires dans le noyau cellulaire. Tous ces mécanismes de régulation négative conduisent à une expression réduite de cytokines telles que l'IFN γ et le TNF α (122, 124).

5.3 *Thiopurines*

L'effet anti-inflammatoire des thiopurines (azathioprine et 6-mercaptopurine) et leurs effets secondaires sont principalement attribuables aux actions du métabolite mutuel 6-thioguanine, qui remplace la guanine dans la réplication de l'ADN des cellules immunitaires proliférantes, supprimant ainsi la prolifération des leucocytes et les lymphocytes. De plus, la thiopurine méthyltransférase (TPMT) méthyle les thiopurines en méthylmercaptopurines ribonucléotides qui exercent une inhibition immédiate de la synthèse des purines dans les leucocytes. Le méthyl nitroimidazole qui est un sous-produit du métabolisme de l'azathioprine (mais pas de la 6-mercaptopurine), et possède des caractéristiques immunosuppressives dont le mécanisme n'est pas encore complètement connu (125, 126). L'effet immunosuppresseur des thiopurines est lié directement au métabolite 6-thioguanine-triphosphosphate (6-TGTP) qui bloque la signalisation de Racl médiée par la stimulation CD28 par les lymphocytes, toute cette cascade conduit à l'apoptose des lymphocytes T spécifiques de l'antigène et donc une diminution des lymphocytes activés. Cet effet est exécuté par l'inhibition de STAT3 et de NF κ B et peut expliquer les réponses tardives chez les patients atteints de MICI, car après l'initiation

des thiopurines, une réponse immunosuppressive complète ne peut être attendue avant deux à trois mois de traitement (127). Des études animales ont montré que l'apoptose induite par la thiopurine nécessite une exposition répétée des lymphocytes T activés à l'antigène. Cette mort cellulaire programmée prolongée dans le temps dans les cellules T activées en combinaison avec la substitution de la guanine par la 6-thioguanine dans la réplication de l'ADN entraîne finalement une déplétion des cellules T et l'abrogation du processus inflammatoire (128).

6. Les Traitements récents

Les aminosalicylates, les thiopurines et les stéroïdes sont des molécules utilisées depuis longtemps. Cependant, il existe d'autres molécules administrées par voie orale qui sont plus récentes sans pour autant être innovantes, néanmoins ces molécules ont le potentiel de remplacer ces médicaments préexistants. Les nouvelles petites molécules comprennent les **inhibiteurs de Janus kinase (JAK)**, les oligonucléotides anti sens homologues décapentaplégiques **SMAD7** (ou Mothers against decapentaplegic homolog) ou les modulateurs des récepteurs de la **sphingosine-1-phosphate (S1P)**. Ces molécules ont pour rôle de bloquer la surexpression des signaux de communication et/ou de la migration des cellules immunitaires lors d'une réponse inflammatoire.

6.1 Inhibiteur de signalisation

Inhibiteur de JAK

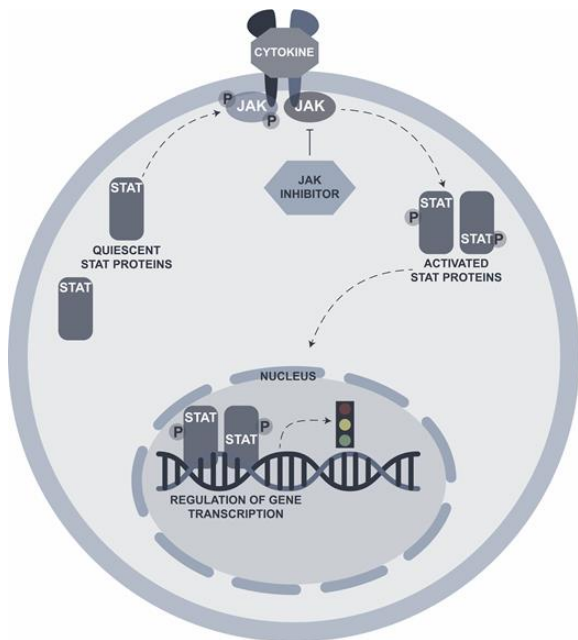


Figure 13. Le fonctionnement d'un inhibiteur de JAK (Stephanie Chapman et al. JAAD, 2021)

La famille Janus kinase (JAK) comprend quatre tyrosines kinases intracellulaires - JAK1, JAK2, JAK3 et la tyrosine-protéine kinase non réceptrice 2 - celles-ci activent les transducteurs de signaux et les activateurs de la transcription (STAT) (129). Cette voie JAK-STAT régule l'expression de multiples médiateurs impliqués dans les voies inflammatoires des MICI (Figure 13).

Le tofacitinib, un inhibiteur pan-JAK est une molécule administré par voie orale, qui s'est révélé efficace dans deux études de phase 3 de la RCH.

Ces essais cliniques de phase 3 appelés (OCTAVE-1/2) et OCTAVE-S (130), qui avaient pour objectif d'induire une phase de rémission et de la maintenir. Le tofacitinib a démontré dans ces études son efficacité à la fois dans l'induction et le maintien de la rémission chez les patients atteints de la RCH modérée à sévère. Les essais d'induction OCTAVE-1 et OCTAVE-2 ont réuni respectivement 598 et 541 patients. Dans OCTAVE-1/2, une rémission de 18,5 % / 16.6% à la semaine 8 a été observée respectivement chez les patients du groupe tofacitinib 10 mg, contre 8,2 %/ 3.6% respectivement dans le groupe placebo. Ensuite les patients qui avaient pu terminer les essais d'induction avec une réponse clinique positive, ont participé à l'essai OCTAVE-S. À la semaine 52, une amélioration de la rémission

clinique a été observée chez les patients atteignant les 40,6 % contre 11,1 % des patients du groupe placebo. Cependant le tofacitinib cible plusieurs voies de cytokines, ce qui pourrait augmenter le risque d'infection. Dans les études OCTAVE, les infections sont survenues à des taux plus élevés avec le tofacitinib qu'avec le placebo (130, 131). L'innocuité et l'efficacité à long terme du tofacitinib sont en cours d'évaluation dans une étude à long terme qui est en cours (OCTAVE Open, NCT01470612). En attendant les résultats de cette étude le tofacitinib a été approuvé pour le traitement des patients atteints de RCH modérée à sévère par la FDA américaine en juin 2018. D'autre part, dans un essai pour la MC de phase 2 de 4 semaines (132) puis d'une phase 2b d'induction et de maintenance d'une rémission (133), le tofacitinib n'a eu aucun effet clinique positif d'efficacité par rapport au placebo.

- **SMAD7**

Mongersen (oligonucléotide anti sens SMAD7)

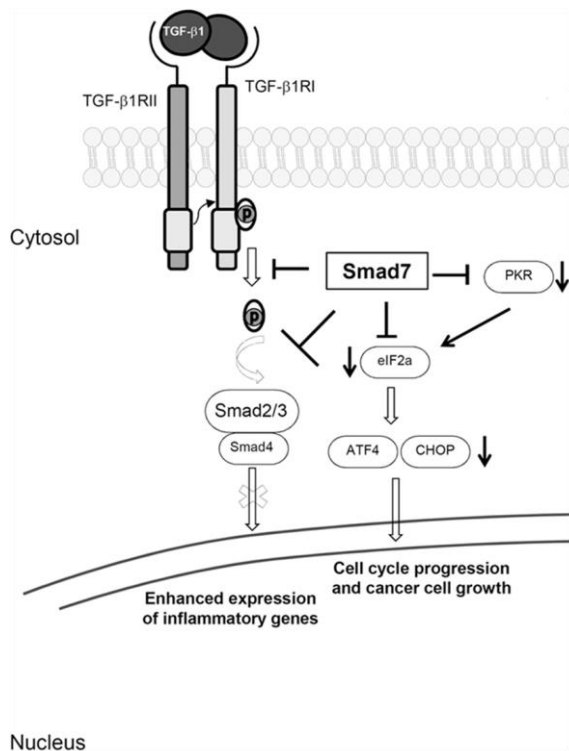


Figure 14. Le fonctionnement de Smad7 (Edoardo Troncone et al. *Front Immunol*, 2018)

Le facteur de croissance transformant $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) est une cytokine pléiotrope qui possède des propriétés anti-inflammatoires et joue un rôle important dans l'homéostasie cellulaire. Dans les MICI, le TGF- $\beta 1$ est fortement produit mais son activité est bloquée par la voie SMAD associée à son récepteur TGF- β . Une activité anormalement réduite du TGF- $\beta 1$ dans les MICI est liée à des niveaux accrus de SMAD7, une protéine intracellulaire qui se lie aux récepteurs TGF- β (Figure 14). Par conséquent, SMAD7 est une cible potentielle pour la suppression de l'inflammation associée aux MICI (134). Mongersen qui est le médicament oral contenant le SMAD7 est un oligonucléotide anti sens qui va se fixer sur l'ARN messager du SMAD7 et induire sa dégradation (135, 136). Un essai de phase 2 a été mené auprès de 166 patients atteints de MC modérée à sévère, ils ont reçu différentes doses de Mongersen (10, 40 ou 160 mg/jour) ou un placebo pendant 2 semaines (137). L'étude révèle des taux de rémission clinique de 55 % et 65 % au jour 15 les doses 40 et 160 mg/jour respectivement, contre 10 % dans le groupe placebo. Cependant la dose de 10 mg de Mongersen n'a pas montré d'efficacité significative avec seulement 12% de rémission. La plupart des effets indésirables étaient liés soit aux symptômes soit aux complications de la MC (137).

6.2 Inhibiteur de la migration des cellules immunitaires

- Sphingosine 1-phosphate

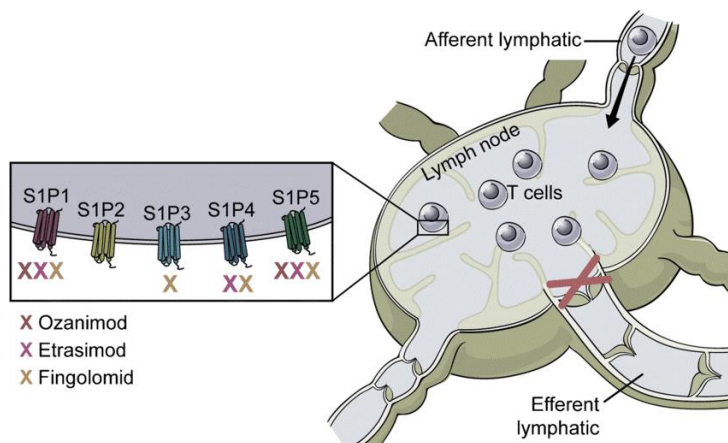


Figure 15. Le fonctionnement de S1P (Tushar Shukla et al. Current Gastroenterology Reports, 2019)

S1P est un sphingolipide bioactif qui régule les réponses cellulaires dans différents types de cellules via l'activation extracellulaire du récepteur S1P 1 (S1P₁) à S1P₅ (138). S1P₁, S1P₄ et S1P₅ sont impliqués dans la régulation du système immunitaire et exprimés sur les lymphocytes et les cellules endothéliales des ganglions lymphatiques (Figure 15). Les lymphocytes migrent des ganglions lymphatiques vers les vaisseaux sanguins selon le gradient de concentration de S1P.

La signalisation du phosphate de shingosine-1 (S1P) sur les lymphocytes T à mémoire centrale facilite leur sortie des ganglions lymphatiques. L'internalisation du récepteur S1P induit la rétention des lymphocytes dans le ganglion lymphatique, inhibant ainsi leur recrutement dans les tissus enflammés (138, 139). L'immunité protectrice est généralement préservée car les lymphocytes T effecteurs mémoire ne circulent pas dans les ganglions lymphatiques. L'ozanimod est un modulateur S1P qui régule négativement le sous type 1 et 5 des récepteurs S1P (140, 141). Un essai de phase 2 nommé TOUCHSTONE a évalué l'induction et de maintien d'une rémission après traitement au ozanimod chez 197 patients atteints de RCH modérée à sévère (142). Les patients ont reçus un placebo, ou 0,5 ou 1 mg d'ozanimod par jour. À la semaine 8, une rémission clinique de 16% chez les patients ayant reçu 1 mg d'ozanimod et 14 % chez ceux ayant reçu 0,5 mg d'ozanimod, contre 6 % pour ceux qui ont reçu un placebo. A la semaine 32, la rémission clinique était de 21 % dans le groupe ayant reçu 1 mg d'ozanimod, de 26 % dans le groupe ayant reçu 0,5 mg d'ozanimod et de 6 % dans le groupe ayant reçu le placebo. L'ozanimod a été bien toléré et les effets indésirables les plus fréquents étaient l'anémie et les maux de tête. Les résultats intermédiaires d'un essai ouvert à long terme de phase 3 ont indiqué que la dose de 1 mg d'ozanimod semble être bien tolérée, avec des preuves d'efficacité rapide et durable jusqu'à la semaine 104 sans saignement rectal chez 88,2 % des patients analysés (142).

6.3 Agent biologiques

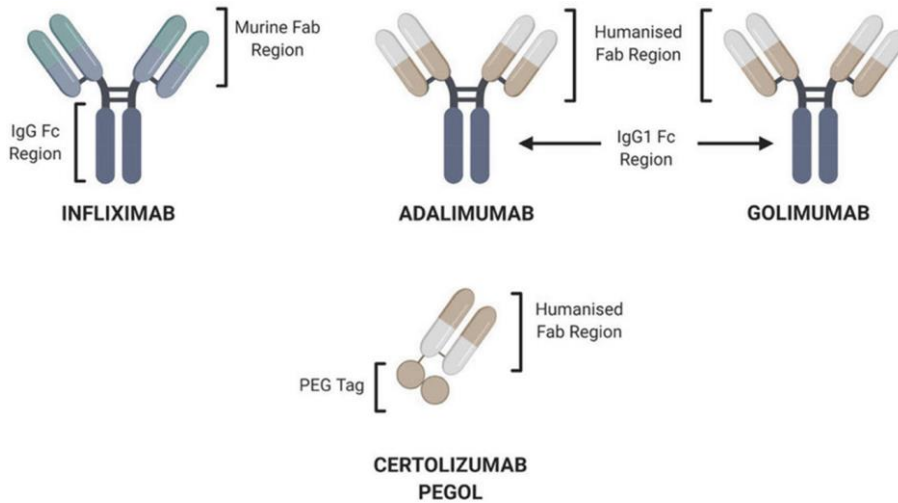


Figure 16. Les principaux Anti-TNF α . (Akram MS, et al. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2020)

Les thérapies biologiques qui utilisent des anticorps monoclonaux ciblant le facteur de nécrose tumorale α (TNF α), comme l'infliximab, l'adalimumab, le golimumab et le certolizumab pegol, ont été introduits à la fin des années 1990 pour induire et maintenir la rémission des patients atteints de MICI (143-148) (Figure 16). Ces produits biologiques prometteur au départ n'ont pas permis le contrôle des symptômes, ni l'amélioration de la qualité de vie des patients sur le long terme, car un tiers des patients atteints de MICI ne répondent pas aux traitements des inhibiteurs du TNF α (147-150) et un autre tiers le deviendra dans un second temps au cours des traitements visant à maintenir la rémission par les inhibiteurs du TNF α (151-153). De plus, bien que le profil de tolérance de l'anti TNF α soit généralement acceptable, ces médicaments présentent des effets indésirables liés aux infections et aux tumeurs malignes (154-156).

C'est pourquoi, au fur et à mesure que notre compréhension des mécanismes pathologiques des MICI a progressé, certains nouveaux agents biologiques ont montré un potentiel plus intéressant dans les essais cliniques sur les MICI et sans effets indésirables conséquent pour les patients.

Ces agents biologiques comprennent les anti-intégrines, les anti-cytokines et la molécule d'adhésion cellulaire anti-muqueuse vasculaire addressin-1 (MAdCAM-1) et peuvent également offrir une opportunité de traitement chez les patients qui ont déjà échoué avec les inhibiteurs du TNF α .

6.3.1 Anticorps monoclonaux :

- Anti cytokines

L'interleukine IL12 (p35/p40) et IL23 (p19/p40) sont des cytokines hétérométriques pro inflammatoires qui partagent une sous-unité p40 commune et induisent la différenciation des lymphocytes T auxiliaires TH-1 et TH-17, respectivement, conduisant ainsi à des réponses immunitaires des lymphocytes T (157). Ces cytokines sont exprimées par les cellules dendritiques et les macrophages. Leur expression est augmentée dans la muqueuse intestinale lors d'une réponse inflammatoire telle que celle qu'on retrouve chez les patients atteints de MICI (91). L'ustekinumab, reconnaît la sous-unité p40 commune aux cytokines pro-inflammatoires IL-12 et IL-23, c'est un traitement établi du psoriasis et du rhumatisme psoriasique. Depuis 2016, il est également enregistré pour le traitement de la MC, régulant l'inflammation en inhibant les deux cytokines responsables de la réponse Th1 et Th17, observées dans les MICI (158).

L'ustekinumab est un anticorps monoclonal IgG1k entièrement humain dirigé contre la sous-unité p40 commune des cytokines l'IL12 et de l'IL23, et il réduit l'activation des lymphocytes T. L'ustekinumab a démontré une efficacité d'induction de la rémission chez les patients présentant un échec à la thérapie anti TNF α et aux patients n'ayant pas reçu de thérapie préalable ou présentant des réponses fortes d'effets indésirables aux thérapies conventionnelles (158, 159). Dans un essai nommé UNITI-1 de phase 3 sur des patients atteints de MC modérée à sévère il a été démontré que les taux de réponse positive à la semaine 6, chez les patients recevant de l'ustekinumab à la dose de 130 mg/kg (34,3 %) ou de 6 mg/kg (33,7 %) étaient significativement plus élevés que le taux chez les patients recevant le placebo (21,5 %). L'efficacité de l'ustekinumab sur les symptômes semble être similaire à celle des inhibiteurs du TNF α , et un bénéfice clinique a été observé dès la semaine 3. Ainsi, contrairement au vedolizumab, l'ustekinumab pourrait être le choix préféré dans la MC sévère. De plus, comme l'ustekinumab inhibe les cytokines pro-inflammatoires, il pourrait être le meilleur choix pour les patients présentant des manifestations extra-intestinales telles que la pyodermite, la spondylarthrite ankylosante ou l'uvéite (160-162).

- ***Anti intégrine***

Une partie importante du maintien de l'inflammation intestinale chronique est due au recrutement continu de lymphocytes T activés dans l'intestin. Le vedolizumab est un anticorps monoclonal IgG1 sélectif contre l'intégrine $\alpha 4\beta 7$. Il a été démontré que le vedolizumab induit efficacement la rémission et la maintient. Le vedolizumab n'interagit qu'avec l'hétérodimère intégrine $\alpha 4\beta 7$, cette spécificité le rend intéressant pour le traitement des maladies inflammatoires chroniques (163). En plus des lymphocytes, les monocytes CD16+ circulants expriment $\alpha 4\beta 7$, ce qui peut expliquer la réduction des macrophages muqueux M2 (observée chez les souris traitées aux anti- $\alpha 4\beta 7$) (164). Dans l'étude GEMINI 1, les résultats de 374 patients atteints de RCH modérée à sévère ont été analysés, et révèle un taux de réponse positive de 47,1 % des patients ayant reçu un traitement d'induction à la semaine 6, contre 25,5 % de ceux du groupe placebo. Dans GEMINI 2, qui avait la même conception que GEMINI 1, des données correspondantes ont été obtenues chez des patients atteints de MC modérée à sévère. L'action sélective sur les intestins du vedolizumab a des implications cliniques importantes pour son profil d'innocuité. Après plus de 5 ans et sur 2 800 patients exposés au vedolizumab, aucun risque accru n'a été trouvé pour aucune infection. Il est important de noter que le vedolizumab n'augmente pas le risque d'infections opportunistes, et le taux d'induction de cancer est compatible avec celui naturellement observé chez les patients atteints de MICI. Pour cette raison, le vedolizumab pourrait être un bon choix pour les patients atteints de MICI présentant des contre-indications, telles qu'une insuffisance cardiaque congestive, un lymphome. Récemment, le vedolizumab a été approuvé par la FDA américaine et l'Agence européenne des médicaments (EMA) pour la colite modérée à sévère ou les patients atteints de MC qui ne répondent pas aux traitements conventionnels ou au traitement par inhibiteur du TNF α (165).

- ***Anti MAdCAM***

Les MICI sont caractérisés par le recrutement persistant de grandes quantités de leucocytes du sang vers la muqueuse intestinale. Des interactions entre plusieurs molécules de surface sur les lymphocytes T appelées intégrines ($\alpha 4\beta 7$) et des molécules d'adhésion spécifiques aux tissus appelées ligands (MAdCAM 1), qui sont exprimés principalement dans les veinules endothéliales, sont responsables du recrutement des lymphocytes dans l'intestin observé dans l'inflammation intestinale

chronique. Les ligands MAdCAM 1 dans l'intestin permettent la compartimentation de la réponse immunitaire, limitant l'extravasation des lymphocytes au site d'action prévu (166).

Le traitement SHP-647 est un anticorps monoclonal anti MAdCAM IgG2 entièrement humanisé dirigé contre la molécule d'adhésion endothéliale spécifique à l'intestin MAdCAM 1 (167). Les essais de phase 2 ont été menés séparément chez des patients atteints de RCH et de MC. Dans l'étude nommé TURANDOT, 357 patients atteints de RCH modérée à sévère ont été sélectionnés pour recevoir 7,5 / 22,5 / 75 ou 225 mg de SHP-647 ou un placebo. À la semaine 12, les taux de rémission clinique étaient de 11,3 %, 16,7 % et 15,5 % et 5,7 % pour les doses 7,5, 22,5, 75 et 225 mg/kg respectivement, contre 2, 7 % dans le groupe placebo (168).

7. Les traitements innovants

7.1 Transplantation fécal

La TMF peut être une de traitement dans la RCH associée à la présence/ dysbiose induite par la bactérie *Clostridium difficile* (169, 170).

Bien que la TMF ait également été proposée comme méthode de traitement des MICI il y a environ 30 ans (171), l'intérêt et les recherches porté à ce domaine n'ont augmenté que récemment. Une méta-analyse de 53 études, 41 sur la RCH, 11 sur la MC, comprenant 661 patients atteints de MICI, a montré que 36 % des patients atteints de RCH et 50,5 % des patients atteints de MC subissant une TMF ont obtenu une rémission clinique (172). Dans une sous-analyse de 24 études, les analyses du microbiote ont montré une diversité accrue et un déplacement du profil du microbiote receveur vers le donneur. Dans toutes ces études aucune augmentation significative d'effets indésirables graves n'a été observée. La TMF s'est révélée prometteuse comme traitement des MICI, en particulier de la RCH (173). La TMF en tant que traitement est une alternative prometteuse, du fait de la délivrance d'un microbiote sain proche du site inflammatoire, et notamment grâce aux perfusions multiples administrées via le tractus gastro-intestinal inférieur. Le rôle de la TMF dans la MC reste encore flou.

La plupart des patients dans les études réalisées jusqu'à présent avaient une RCH légère à modérée, et il n'est pas clair si l'efficacité sera similaire, meilleure ou pire chez les patients atteints d'une maladie grave.

7.2 Transplantation *cellules souches*

La recherche ayant démontré l'importance la cicatrisation des muqueuses dans les MICI (174), apporter une réponse clinique est devenu nécessaire pour réparer les tissus inflammés. Une nouvelle thérapie à base de cellules souches pouvant favoriser la régénération des tissus muqueux a été mise en évidence dans les MICI (175). La biologie des cellules souches peut être appliquée en utilisant deux méthodes différentes.

Premièrement, la greffe de cellules souches hématopoïétiques (TCSH) a été envisagée pour le traitement de la MC réfractaire. La myéloablation du patient sujet, suivie d'une TCSH, pourrait rétablir l'état immunologique du patient avant le développement de la maladie. Un essai de phase 3 nommé ASTIC a étudié 45 patients atteints de MC mais a été interrompu car aucune amélioration significative n'a été constatée dans la rémission durable de la maladie à 1 an par rapport au traitement conventionnel (176).

Deuxièmement, la greffe de cellules souches mésenchymateuses (TSCM) fait l'objet d'essais cliniques pour traiter la RCH et la MC luminale (administration intraveineuse, allogénique) ou la MC fistuleuse (injection intra lésionnelle, autologue). La TSCM peut présenter à la fois des fonctions immunorégulatrices et des fonctions de régénération tissulaire lors de la transplantation et peut être largement utilisée pour la transplantation allogénique en raison de sa faible immunogénicité. Un essai de phase 3 de 212 patients atteints de la MC a démontré que la TSCM autologue injectable intra lésionnelle est un traitement efficace et sûr par rapport au placebo pour les fistules péri anales complexes chez les patients qui n'ont pas répondu aux traitements conventionnels ou biologiques (133). À la semaine 24, la rémission des fistules externes traitées a été obtenue dans 50 % et 34 % des groupes TSCM et placebo, respectivement. Actuellement, la TSCM autologue intra lésionnelle a été commercialisée pour la MC avec fistule péri anale et des essais liés aux cellules souches sont en cours.

7.3 Combo Thérapies

Les combinaisons de médicaments, telles que celles couramment utilisées dans le traitement du diabète ou de l'hypertension, pourraient être un moyen de tirer parti des forces et de compenser les faiblesses des agents biologiques et des molécules thérapeutiques. Les essais cliniques nommés SONIC et SUCCESS ont associés l'infliximab et l'azathioprine pour évaluer le potentiel de la combo thérapie (177, 178). De même, les essais GEMINI 1 et 2 avaient également démontré qu'un traitement immunosuppresseur concomitant avec le vedolizumab permettait une diminution de l'immunogénicité induite (179). Néanmoins d'autres études sont nécessaires pour déterminer si la thérapie combinée avec des immunosuppresseurs offre les mêmes avantages cliniques pour le vedolizumab que ceux observés avec la thérapie combinée infliximab/azathioprine (158).

La multitude d'agents biologiques pour le traitement des MICI offre la possibilité de les combiner pour optimiser les effets antagoniste de l'inflammation en agissant simultanément sur différentes voies, ce qui pourrait produire des effets additifs ou synergiques pour les personnes résistantes aux traitements conventionnelles.

En 2007, une étude a mené un essai randomisé sur l'efficacité et l'innocuité du natalizumab chez des patients atteints de la MC qui n'était pas en rémission mais qui recevait de l'infliximab (180). Cette étude a montré que les symptômes avaient tendance à s'améliorer dans le cas des patients traités au natalizumab/infliximab par rapport aux patients traités au placebo/infliximab avec des effets indésirables comparables. Depuis lors, plusieurs études évaluent les combinaisons d'agent biologique tel que l'infliximab avec le vedolizumab, l'étanercept et le vedolizumab ou encore l'ustekinumab et l'infliximab ou l'adalimumab (181).

Un essai ouvert de phase 4 est en cours évaluant la trithérapie vedolizumab, adalimumab et méthotrexate nommé EXPLORER, a recruté des patients atteints de MC à haut risque. Cependant, cette thérapie combinée est confrontée à certains problèmes, tels que le blocage de voies opposées et l'augmentation des effets secondaires qui en résultent, en plus de l'augmentation des coûts d'une telle thérapie.

8. Les traitements naturels

Les substances phytochimiques sont définies comme des composés végétaux bioactifs et non nutritifs provenant de fruits, de légumes, de céréales et d'autres aliments végétaux qui possèdent une utilité potentielle dans de nombreuses maladies. Les composés phytochimiques peuvent être classés en polyphénols, flavonoïde, terpénoïdes, composés organosoufrés, phytostérols et alcaloïdes.

De nombreuses études ont rapporté que les régimes contenant des composés phénoliques peuvent être considérés comme des traitements complémentaires possibles pour les MICI (182-184). Les effets bénéfiques sur la santé intestinale ont été démontrés par différentes classes de composés, en particulier les flavonoïdes, par des tests *in vitro*, sur des animaux et des essais cliniques (185). Les avantages sont principalement dus à leurs propriétés antioxydantes agissant directement comme piègeurs de radicaux libres, ou interférant indirectement avec des protéines spécifiques dans les voies de signalisation redox qui sont impliquées dans différentes fonctions biologiques (186, 187). Spécifiquement pour les MICI, les polyphénols peuvent agir en inhibant les voies de signalisation NFκB et les protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK), en réduisant la transcription de la cyclooxygénase-2 (COX-2) et en supprimant la production de médiateurs pro-inflammatoires, tels que TNFα, IL6 et IL1β (188). De plus, il a été démontré que ces molécules augmentent l'activité des enzymes antioxydantes, telles que la superoxyde dismutase (SOD) et la glutathion peroxydase (GPx), et éliminent les espèces actives d'oxygène et d'azote générées dans le tissu intestinal lésé, notamment le superoxyde, l'hydroxyl radical et oxyde nitrique (NO) (186, 187). Des études récentes utilisant des polyphénols de différentes origines végétales, y compris des sous-produits alimentaires, tels que des pépins de raisin, le fruit de la passion etc... Soutiennent ses bienfaits anti-inflammatoires et antioxydants potentiels.

Les polyphénols sont les composés naturels les plus couramment trouvés avec des caractéristiques structurales phénoliques. Ils constituent un grand groupe de composés phytochimiques avec plus de 8000 composés identifiés (189). Ils agissent comme de puissants antioxydants qui complètent et renforcent les fonctions des vitamines et des enzymes antioxydantes en tant que défense contre le stress oxydatif causé par un excès d'espèces réactives de l'oxygène. Les sources riches de polyphénols

comprennent des fruits comme la fraise, la framboise, la myrtille, la cerise, le noir et le raisin ; les légumes comme le chou, les haricots, les radis et les graines entières; et les boissons de type : à savoir le thé et le vin (190). Les polyphénols sont classés en **acides phénoliques** (par exemple, l'acide vanillique et l'acide férulique), **Les stilbènes** (par exemple, le resvératrol) et **les flavonoïdes** (par exemple, la génistéine, l'apigénine et la curcumine). De nombreuses études ont révélé l'efficacité des polyphénols dans des troubles comme le diabète, des conditions inflammatoires comme l'arthrite, les MII, les troubles neurodégénératifs comme la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, le cancer et les antimicrobiens (191).

8.1 Les acides phénoliques

Les acides phénoliques simples sont des composés phénoliques non flavonoïdes conjugués à d'autres produits chimiques naturels tels que les flavonoïdes, les alcools, les acides gras hydroxylés, les stérols et les glucosides. Ce sont des dérivés de l'acide benzoïque (par exemple, les acides p-coumarique, caféique et férulique) et de l'acide cinnamique (par exemple, l'acide ellagique, p-hydroxybenzoïque et gallique). L'acide vanillique (acide 4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque) est un dérivé de l'acide benzoïque utilisé comme agent aromatisant. C'est une forme anoxydée de vanilline et on la trouve en fortes concentrations dans les gousses de vanille. L'acide vanillique a un effet bénéfique sur la colite ulcéreuse induite par le DSS en inhibant l'expression de la cyclooxygénase-2 et l'activation de NFκB, et en réduisant les niveaux de TNF-α et d'IL-6, indiquant ainsi son utilité dans la régulation de l'inflammation intestinale chronique. Un autre acide phénolique, l'acide caféique (acide 3,4-dihydroxycinnamique), est structurellement lié aux flavonoïdes et est un composant biologiquement actif de la propolis des ruches d'abeilles. Il possède des propriétés antivirales, anti mitogènes, anti-inflammatoires et immunomodulatrices. L'acide caféique a empêché la perte de poids corporel dans le modèle de colite DSS et a amélioré la longueur du côlon, l'apport alimentaire et l'activité MPO. L'expression colique de l'IL17 et de la NO synthase inductible (iNOS) a été inhibée, tandis que l'expression de l'IL4 et du CYP4B1 a été augmentée. L'acide ellagique (2, 3, 7,8-tétrahydroxy chromeno [5, 4,3-] chromène-5,10-dione) est un phénol végétal naturel présent dans les fruits comme la grenade, les baies, les noix et les légumes. Diverses études ont fourni des preuves de ses propriétés pharmacologiques comme antioxydant, anti-inflammatoire et anti cancérigène. Dans un modèle de rat de la maladie de Crohn, l'acide ellagique a augmenté la production de mucus dans les cellules caliciformes et diminué l'infiltration des neutrophiles et des protéines pro-inflammatoires comme la

COX-2, l'iNOS et réduit l'activation des protéines kinases activées par les mitogènes p38, JNK et ERK1/2 (MAPK), empêchant la dégradation de l'IkB.

8.2 Les stilbènes

Le resvératrol, trans-3, 5,4-trihydroxy-trans-stil-bene, est un phytochimique produit par les plantes. Il a été identifié dans 70 espèces végétales, y compris les raisins, les arachides, les baies et les pins. Il est retrouvé en grande quantité dans la peau des raisins rouges, et donc en concentration élevée dans le vin rouge et le jus de raisin. De nombreux mécanismes anti inflammatoire antioxydant ont été proposés pour le resvératrol, via par exemple des actions directes et indirecte sur l'activité et la métabolisation de la cyclooxygénase (COX), de l'hydro peroxydase, de la protéine kinase C, de la Bcl 2 phosphorylation, de l'Akt (une kinase anti-apoptique), de la kinase d'adhérence focale, du facteur nucléaire NFkB, de la métalloprotéase matricielle 9, et de régulation du cycle cellulaire (192). En ce qui concerne le mécanisme exact par lequel le resvératrol agit, il n'a pas été clairement établi pour les effets anti-inflammatoires et immunomodulateurs. Néanmoins, un intérêt significatif a été porté à ce rôle potentiel, étant donné que les inhibiteurs de la COX sont couramment utilisés comme anti-inflammatoires et que le resvératrol est un puissant inhibiteur de l'activité de la COX *in vivo*. Cependant, l'effet du resvératrol sur le système immunitaire ne semble pas être mécaniquement aussi simple que l'inhibition non spécifique de l'inflammation, Le resvératrol semble renforcer la réponse immunitaire des souris traitées aux dinitrofluorobenzène et empêche l'immunosuppression par l'éthanol (193). Les mécanismes exacts par lesquels le resvératrol inhibe et renforce de manière différentielle le système immunitaire n'ont pas été clairement élucidés non plus. Dans les modèles de colite inflammatoire chez les rongeurs, il a été démontré que le resvératrol administré avant et après une lésion du côlon inverse la perte de poids, augmente la consistance des selles, améliore l'apparence des muqueuses, améliore le score histopathologique, diminue l'infiltrat inflammatoire et diminue les interleukines (IL1 β , COX-2 et prostaglandine (PG2) au niveau muqueuses (194).

8.3 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un grand groupe de polyphénols hétérogènes présents dans les fruits, les légumes, les légumineuses, les herbes, les épices, les tiges, les fleurs et le thé ainsi que le vin rouge. Ce sont des composants importants des agrumes et, dans de nombreux pays, ils sont quotidiennement consommés (195). Ils sont divisés en six classes, à savoir les flavonols (par exemple, le kaempférol, la quercétine et la curcumine), les flavanols (par exemple, les catéchines et les proanthocyanidines), les flavones (par exemple, la lutéoline et l'apigénine), les anthocyanes (par exemple, la cyanidine), les flavanones (par exemple, l'hespéridine et la naringénine) et les flavanonols (par exemple, la taxifoline) (196). Les flavonoïdes possèdent diverses activités pharmacologiques anti inflammatoires, anti cancer, les antimicrobiens et antiparasitaires (197). Parmi les flavonoïdes, les flavonols sont les plus abondants et les plus répandus dans la nature. Les sources les plus riches en flavonols comprennent les oignons, les pommes, le cidre, les raisins, le vin, le brocoli et le thé. Les flavonols abondants dans les plantes également avec la quercétine, le kaempférol, la myricétine, l'isorhamnétine, la tamarixétine, la morine la fisétine et la curcumine.

Dans le cadre de mon projet de thèse notre intérêt s'est porté sur les propriétés anti-inflammatoires de la curcumine.

Qu'est-ce que la curcumine ?

8.3.1 La curcumine

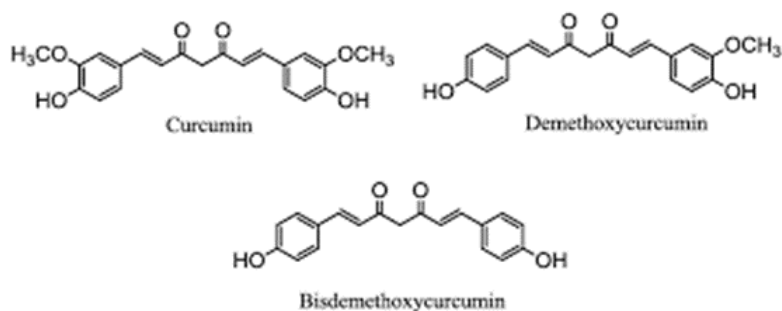


Figure 17. La composition du curcuma (Ya-Kun Cao et al. Molecules, 2014)

Curcuma longa Linn. (Zingiberaceae) est la principale source de curcumine. C'est une plante originaire d'Inde et d'Asie du Sud-Est (198, 199). Le curcuma est une plante herbacée vivace pouvant atteindre 1,0 m de hauteur. Son rhizome principal est ovale, d'environ 3 cm de diamètre et 4 cm de long, et se compose d'une chair orange. Le plus grand producteur de curcuma est l'Inde (200). Les curcuminoïdes présents dans les racines de la plante, constituent 1 à 6% de, selon son origine et les conditions dans lesquelles il est cultivé. La curcumine est le curcuminoïde majeur (50 à 60%) présent dans la plante et se décompose en deux autres composants majeurs, à savoir la déméthoxycurcumine (DMC) 20 à 30%, et la bisdéméthoxycurcumine (BDMC) 7 à 20% (201-204) (Figure 17). Actuellement, de nombreux pays, dont les États-Unis, l'Europe, l'Inde, le Japon, la Corée, la Thaïlande, la Chine, la Turquie, l'Afrique du Sud, le Népal et le Pakistan commercialisent la curcumine comme complément alimentaire (205) sous forme de gélules (206), de pommades médicinales, de crèmes, de savons et de produits alimentaires, comme les boissons énergisantes (207).

Sa formule chimique est $C_{21}H_{20}O_6$, avec un poids moléculaire de 368,38 g/mol, la structure chimique a été identifiée en 1910 par Milobedzka et la particularité de la curcumine est sa fonctionnalité dicétone qui peut subir une tautomérisation réversible entre deux formes dites céto et énol. Ces formes sont dépendantes du pH, d'ailleurs la forme énol existe dans les solutions alcalines et la forme céto dans les solutions acides et neutres (202, 208). La forme céto domine à pH 3 à 7 et la forme énol prédomine à pH > 8 (209). Cependant, dans des conditions physiologiques, les formes céto et énol de la curcumine jouent un rôle important dans son activité antioxydante en piégeant les radicaux libres par un échange d'atomes H et un transfert d'électron (203). La curcumine existe principalement sous forme d'énol dans les solvants (210, 211). La forme énol est plus stable que la forme céto, en raison de la présence de fortes liaisons hydrogène intramoléculaires (212). Cependant, toutes les fonctionnalités présentes dans la molécule de curcumine jouent un rôle crucial dans ses activités biologiques.

La curcumine est le plus souvent dégradé après son absorption par voie orale. Les métabolites prédominants issue de son hydrolyse sont des conjugués de glucuronide et/ou de sulfate (84). Une étude a caractérisé les métabolites de la curcumine après l'injection IP et ont montré que 99 % étaient constitués de conjugués glucuronide (213). Une autre étude *in vivo* a examiné le métabolisme de la curcumine chez le rat, qui ont reçu de la curcumine soit par gavage oral (500 mg/kg) ou IV (40 mg/kg ; volume de dose 1 mL/kg) et la concentration de curcumine dans le plasma était proche de la limite de détection et elle disparaissait rapidement, alors que la curcumine conjuguée était plus détectable (214). Les principaux conjugués de curcumine étaient le glucuronide de curcumine et le sulfate de

curcumine (214). Le métabolisme de la curcumine a également été examiné dans les tissus intestinaux et/ou hépatiques de rats et d'humains *ex vivo*. Les métabolites observés de la curcumine étaient là aussi le glucuronide de curcumine, le sulfate de curcumine mais également la tétrahydrocurcumine et l'hexahydrocurcumine (215). Les métabolites de la curcumine ont moins de bioactivité que la curcumine. Une étude de délivrance de curcumine dans les cellules de carcinome hépatocellulaire humain (HepG2) a démontré que la délivrance des métabolites glucuronide de curcumine présente une bioactivité et une absorption cellulaire inférieure à la curcumine (216-218).

La curcumine est un candidat prometteur pour réduire l'inflammation présente dans les MICI car elle est multifactoriels et va donc agir sur différentes voies simultanément. Ceci a été rapporté par de nombreuses études qui ont montré l'efficacité de la curcumine dans le traitement des MICI principalement en raison de ses propriétés anti-inflammatoires et antioxydants. La curcumine diminue efficacement l'infiltration des neutrophiles vers les sites inflammatoires en perturbant le développement d'un gradient de chimiokine ainsi que par les effets directs du composé sur la polarisation des neutrophiles, la chimiotaxie et la chimiocinèse. Ces mécanismes sont principalement impliqués dans l'effet protecteur de la curcumine au moment de l'inflammation intestinale (219, 220). La curcumine contrôle l'inflammation en diminuant l'expression des gènes liés au stress oxydatif et aux voies de la fibrogenèse. L'activité de PI3K et la phosphorylation d'AKT aident à diminuer la mort cellulaire. Dans le même temps, la curcumine obstrue l'activité et le recrutement des neutrophiles en modifiant la phosphorylation de PI3K et AKT (219). La curcumine diminue efficacement l'activité des cytokines pro-inflammatoires (IFN γ , TNF α , IL1 et IL8) en inhibant l'activation d'inflammasomes notamment l'inflammasome NLRP3, qui est nécessaire à la maturation de la cytokine IL1, mais également en interférant avec de nombreux facteurs de transcriptions et molécules de signalisation notamment tel que le facteur NF κ B, et les voies de signalisations JAK/STAT, MAPK et β caténine (221-223). La curcumine bloque l'expression de NF κ B en modulant la voie NF κ B/I κ B. La phosphorylation d'I κ B au niveau des sérines 32 et 36 est nécessaire à sa dégradation et à l'activation ultérieure de NF κ B. La curcumine empêche la dégradation de l'I κ B, bloquant ainsi l'activation de NF κ B et perturbe la signalisation en amont de la kinase induisant NF κ B et de la kinase I κ B (224). Les résultats expérimentaux d'une étude ont montré que le niveau de NF κ B p65 était plus élevé dans les biopsies du côlon des patients (225). La sévérité de l'inflammation intestinale semble être lié à la quantité de NF κ B p65 exprimé, un niveau élevé d'expression de NF κ B a augmenté la capacité à sécréter des cytokines pro inflammatoire (TNF α , IL1 β , IL6, IL12 et IL23). La curcumine diminue le niveau

d'expression du TNF α , et réduit efficacement le stress oxydatif initié par le TNF α (225). Des études ont également démontré que la curcumine joue le rôle d'un inhibiteur de la signalisation IFN γ dans les cellules épithéliales du côlon avec un mécanisme d'action biphasique (226). La curcumine a des effets sur la réduction de la stimulation de la voie Th1 et la production d'oxyde nitrique. Ayant également un impact sur l'activation des macrophages, et l'amélioration de leur activité de phagocytose (227, 228). Il a été démontré que la curcumine supprime l'inflammation en inhibant sélectivement les récepteurs COX2 (229). Ses activités anti-inflammatoires sont souvent corrélées à une diminution de l'activité Th1, contribuant à la suppression de l'iNOS et de la peroxydation lipidique et éventuellement à la diminution des lésions tissulaires. L'augmentation des espèces réactives à l'oxygène (ROS) dans le côlon suggère une implication significative dans la physiopathologie des espèces réactives de l'azote (RNS). Plusieurs études ont montré que le traitement à la curcumine diminue efficacement les anions malondialdéhyde, oxyde d'azote, sérine protéase et superoxyde dans la muqueuse colique, confirmant les effets bénéfiques de la curcumine à diminuer l'inflammation en agissant également sur le stress oxydatif généré dans les MICI (230).

L'utilisation traditionnelle de la curcumine dans les traitements est limitée en raison de sa faible absorption dans le tractus gastro-intestinal, de sa faible solubilité, stabilité, de sa faible biodisponibilité et de son élimination systémique rapide (231).

Au cours des trois dernières décennies, des études animales ont montré que la curcumine est instable au pH intestinal, rapidement métabolisé, conjugué dans le foie et excrété dans les matières fécales. D'ailleurs plusieurs essais cliniques ont démontré la faible efficacité de la curcumine en tant que traitement des MICI ou d'autres maladies inflammatoires. Par exemple un essai clinique de phase 1 a mené auprès de 25 patients présentant diverses lésions précancéreuses a démontré que des doses orales de 4, 6 et 8 g de curcumine administrées quotidiennement pour trois mois ont donné des concentrations sériques de curcumine de seulement 0,19, 0,20 et 0,60 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivement. Cette découverte indique que la curcumine est mal absorbée et peut avoir une biodisponibilité systémique limitée. Les taux sériques ont culminé entre une et deux heures après l'administration et ont diminué rapidement par la suite (232). Les effets d'une biodisponibilité réduite entraînent une faible activité intrinsèque, une mauvaise absorption, un taux élevé de métabolisme, l'inactivité des produits métaboliques et/ou une élimination et une clairance rapides du corps (233, 234).

En raison de ces limites l'utilisation thérapeutique de nouvelles méthode de délivrance et ou de formulation sont apparues dans le but d'améliorer l'absorption orale de la curcumine Pour cela les

chercheurs ont combiné de la curcumine à de nombreux vecteur différents tel que des : nano-formulations avec de l'albumine, de l'histone, des lipides solides, du polylactide-coglycolide, des liposomes et du polybutylcyanoacrylate. Grace à l'émergence de ces nouvelles formulations de la curcumine, de nombreuses études ont pu démontrer une optimisation de sa délivrance en fonction de la pathologie et du site de délivrance. Et les résultats apportés sont la preuve d'une biodisponibilité augmenté, d'une solubilité et stabilité maîtrisé, ce qui a et va renforcer ses effets thérapeutiques (235, 236).

PARTIE 1.

INTRODUCTION

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Qu'est-ce que les nanoparticules ?

Les nanoparticules (NP) ont le potentiel d'améliorer la stabilité, la solubilité et l'efficacité des médicaments encapsulés, de favoriser leur transport à travers les membranes et/ou de prolonger leur temps de circulation ou de résidence en fonction des objectifs prédéfinie, et cela en toute sécurité (237, 238). Pour ces raisons, la recherche sur les NP s'est développée, générant des résultats prometteurs *in vitro* et *in vivo* (239). Cependant, malgré ces recherches approfondies, le nombre de nano médicaments disponibles pour les patients est considérablement inférieur aux perspectives attendues pour ce domaine, ceci est due en partie à cause de l'écart entre les études animales et humaines (239, 240). Cet écart provient d'un manque de compréhension des différences de physiologie et de pathologie entre les modèles animales et les humains, mais plus en particulier entre le comportement et les fonctionnalités des nano formulations suivant les modèles (241).

9. Les nanoparticules

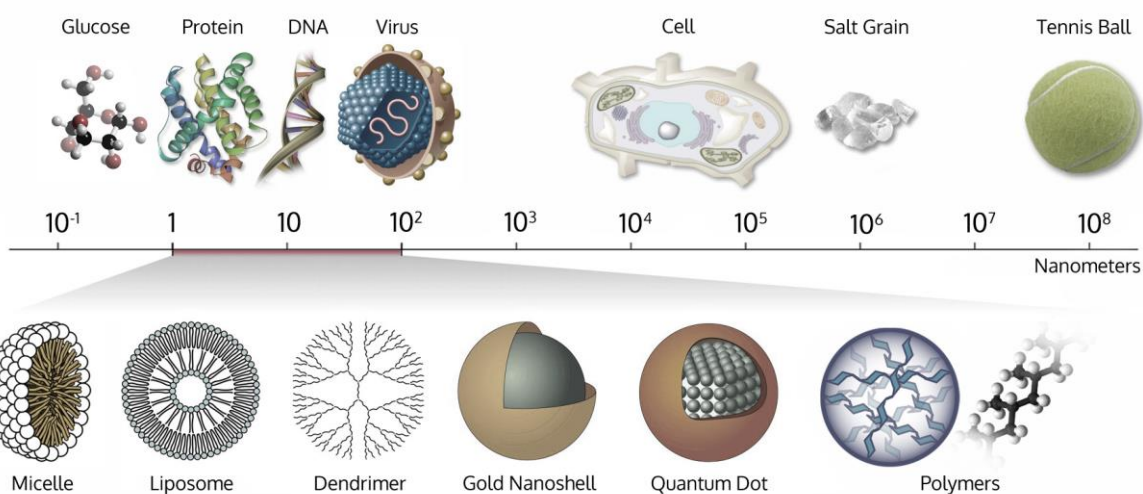


Figure 18. La dimension des nanoparticules (Base de données, WichLab)

En 2021, l'Organisation internationale de normalisation (ISO) nous présente une définition des nanoparticules qui a subi plusieurs révisions depuis la 1ère norme de 2008 les définissant. Actuellement selon la norme ISO/TS 80004-6:2021, une nanoparticule est un nano-objet dont « toutes les dimensions externes sont à l'échelle nanométrique et dont les longueurs du plus grand et du plus petit axes ne diffèrent pas de façon significative. Si les dimensions diffèrent de façon significative (généralement d'un facteur supérieur à 3), des termes tels que nano fibre ou nano plaque peuvent être préférés au terme nanoparticule. »

Le préfixe "nano" désigne donc des nanostructures d'une échelle allant de 1 à 1000 nanomètres (242). Les nanoparticules aux services de la médecine, c'est en revanche l'utilisation des caractéristiques à l'échelle nanométrique pour augmenter l'administration d'agent thérapeutique, réduire leur doses et fréquence d'administration grâce à une optimisation de leur délivrance (243). De plus, la nanotechnologie offre plusieurs possibilités dans la conception de nouvelle formulation nano-médicament jouant sur des critères précis de type : libération contrôlée et de délivrance ciblé (244).

Néanmoins dans la nanomédecine entre 2004 et aujourd'hui toutes les particules utilisées à des fins médicales n'était pas conformes à la définition proposée et maintenant généralement acceptée d'une

taille ≤ 100 nm (245) (Figure 18). Cependant, cela n'a pas nécessairement d'impact sur leur fonctionnalité dans les applications médicales. La raison pour laquelle ces nanoparticules sont intéressantes à des fins médicaux, est basée sur leurs caractéristiques importantes et uniques, telles que leur rapport surface/masse qui est beaucoup plus grand que celui des autres particules, leurs propriétés quantiques et leur capacité à adsorber et à transporter d'autres composés. Les nanoparticules peuvent être classées en différents types, en fonction de leur taille, de leur forme et de leur composition. Certaines classifications distinguent dans un premiers temps les nanoparticules organiques des nanoparticules inorganiques, le premier groupe comprenant les NP lipidiques et les NP polymériques. Parmi les NP inorganique on peut avoir les NP fullerènes, les nanoparticules d'or, d'oxyde de fer, de silice ou encore les quantum dots.

9.1 Les nanoparticules inorganiques

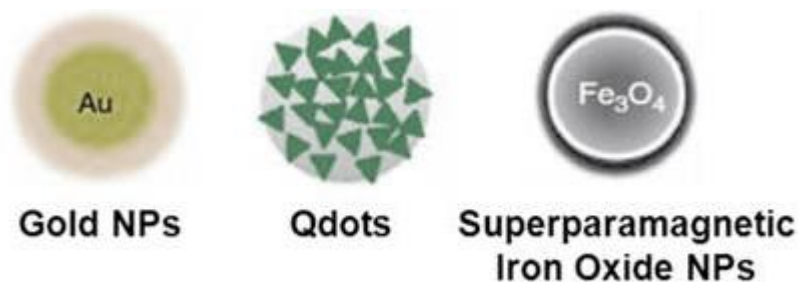


Figure 19. Les nanoparticules inorganiques (Base de données, Nanoshel)

Des matériaux inorganiques tels que l'or, le fer ou encore la silice ont été utilisés pour synthétiser des matériaux nanostructurés pour diverses applications de délivrance de médicaments et d'imagerie (Figure 19). Ces NP inorganiques peuvent être conçues pour avoir une grande variété de tailles, de structures et de géométries. Les NP d'or (AuNPs) sont utilisées sous diverses formes telles que les nanosphères, les nanobâtonnets, les nanoétoiles, les nanocoquilles et les nanocages (246). De plus, les NP inorganiques ont des propriétés physiques, électriques, magnétiques et optiques uniques, en raison des propriétés du matériau de base. Par exemple, les AuNPs possèdent à leur surface des électrons libres qui oscillent continuellement à une fréquence dépendant de leur taille et de leur forme, leur conférant des propriétés photothermiques (247). Les AuNPs sont également facilement

fonctionnalisés, ce qui leur confère des propriétés et des capacités de délivrance intéressante (246). L'oxyde de fer est un autre matériau couramment étudié et font partie de la majorité des nanoparticules inorganiques approuvés par la FDA (248). Les NP d'oxyde de fer magnétique sont composées de magnétite (Fe_3O_4) ou de magnésite (Fe_2O_3) et possèdent des propriétés superparamagnétiques à certaines tailles également et ont fait leurs preuves en tant qu'agents de contraste, vecteur de délivrance thérapeutiques thermosensible (249). D'autres NP inorganiques courantes tel que le phosphate de calcium et les NP de silice mésoporeuses, qui ont toutes deux été utilisées avec succès pour la délivrance de gènes et de médicaments (250, 251). Ils sont généralement constitués de matériaux semi-conducteurs tels que le silicium et sont principalement utilisés dans les applications d'imagerie in vitro, mais ils offrent des possibilités prometteuses pour les domaines de diagnostic in vivo (252, 253). En raison de leurs propriétés magnétiques, radioactives ou plasmoniques, les NP inorganiques sont particulièrement utilisés pour des applications telles que le diagnostic, l'imagerie et les thérapies photothermiques. La plupart ont une bonne biocompatibilité et stabilité, et sont parfaitement adaptés aux applications de niche qui nécessitent des propriétés inexistantes dans les matériaux organiques. Cependant, leur application clinique est limitée par des problèmes de faible solubilité et de toxicité, en particulier dans les formulations utilisant des métaux lourds (254).

9.2 Les nanoparticules organiques

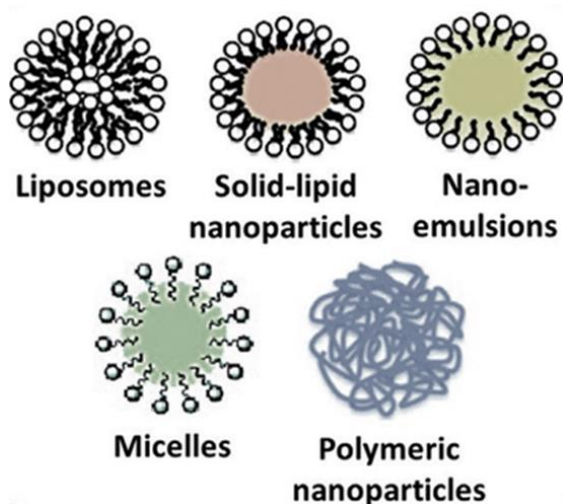


Figure 20. Les nanoparticules inorganiques (Islam A.K et al. *Current and Future Aspects of Nanomedicine, Book, 2020*)

Les nanoparticules organiques (NP) sont issues de molécules organiques naturelles ou synthétiques. La nature fournit un large éventail d'exemples de NP organiques telles que des agrégats de protéines, des corps lipidiques, des émulsions de lait ou des structures organisées plus au moins complexes telles que des virus (Figure 20). De nombreux produits alimentaires tels que les crèmes, le chocolat et les gâteaux présentent des nano émulsions dans leur formulation et c'est également le cas dans l'industrie cosmétique. Les NP organiques sont également utilisées dans les formulations pharmaceutiques en tant que vecteurs. On retrouve d'une part les nanoparticules lipidiques avec **les liposomes**, les émulsions Puis d'autre part les nanoparticules polymériques avec **les PLGA,...** L'une des caractéristiques les plus importantes des NP organiques est qu'elles offrent des voies relativement simples pour l'encapsulation de substances. Ceci, combiné au fait que les molécules utilisées pour la fabrication des NP organiques peuvent être biodégradables, rend les NP organiques plus attrayantes pour l'administration de médicaments et les applications biomédicales.

9.2.1 Les nanoparticules lipidiques

- **Les liposomes**



Figure 21. Les Liposomes (Base de données, Shutterstock)

Les liposomes sont des NP lipidiques qui comptent le plus grand nombre de nanoparticules, ils sont composé de phospholipides, formant des structures vésiculaires (Figure 21). L'un des avantages les plus importants des liposomes est leur capacité à fusionner avec la membrane cellulaire et à libérer leur contenu dans le cytoplasme, ce qui en fait des systèmes de transport appropriés pour une administration ciblée (255, 256). Le liposome le plus simple est composé d'au moins une bicouche lipidique entourant un noyau creux aqueux d'un diamètre de 50 à 1000 nm. Les molécules

thérapeutiques peuvent être chargées dans ce noyau ou piégées dans la/les bicouches lipidiques pour être délivrées (257-259). Selon le nombre de bicouches, ils sont classés en trois types de base : multilamellaires, petites unilamellaires et grandes unilamellaires. Les vésicules multilamellaires sont constituées de plusieurs bicouches lipidiques séparées les unes des autres par des espaces aqueux. En revanche, les vésicules unilamellaires consistent en une seule bicouche entourant un espace aqueux. Ces propriétés structurales leur permettent de porter à la fois des molécules hydrophobes et hydrophiles. Les molécules hydrophiles peuvent être transportées à l'intérieur aqueux du liposome, tandis que les molécules hydrophobes peuvent être capturées dans la membrane lipidique (260). Par ailleurs, plus d'un type de médicament peut être chargé soit dans deux compartiments (lipidique et aqueux) soit dans plusieurs couches aqueuses de liposomes multilamellaires. Cela permet également à différentes molécules de médicament d'être libérées séquentiellement avec la dissociation des couches allant de l'enveloppe externe vers le cœur interne (261). Les petits liposomes neutres ou chargés positivement ont un temps de circulation plus élevé que les grands liposomes non modifiés (256). De plus, des modifications de surface peuvent être obtenues soit en recouvrant d'un polymère fonctionnalisé ou de chaînes PEG qui améliorent la délivrance et augmentent leur temps de circulation dans les systèmes biologiques (262). Les liposomes sont étudiés pour une grande variété d'applications thérapeutiques, telles que le diagnostic et la thérapie du cancer, les vaccins et l'administration de médicaments ciblés dans différentes pathologies y compris les MICI (259). Pour ces raisons, les NP à base de lipides constituent la classe la plus courante de nanomédicaments approuvés par la FDA (263). En revanche leur stabilité *in vitro* et *in vivo* s'avère être altéré, notamment via des modifications de la taille des NP, de la charge de surface, de la composition lipidique, du nombre de lamelles et des modifications de surface (en présence ou non de ligands), qui peuvent être altérées lors de la synthèse (256, 263).

L'encapsulation de la curcumine dans des liposomes peut améliorer son absorption, ainsi que sa biodisponibilité. Takahashi et ses collaborateurs ont synthétisé des liposomes chargés de curcumine préparés à partir de lécithine de soja commerciale (SLP-PC70) en utilisant la méthode de micro fluidique. Les liposomes étaient composés de petites vésicules unilamellaires d'un diamètre d'environ 263 nm et d'une efficacité d'encapsulation de 68 %. La biodisponibilité de la curcumine après administration orale de 100 mg/kg de liposomes chargés de curcumine à des rats était significativement plus élevée que celle de la curcumine libre (264).

- **Liposomes Like**

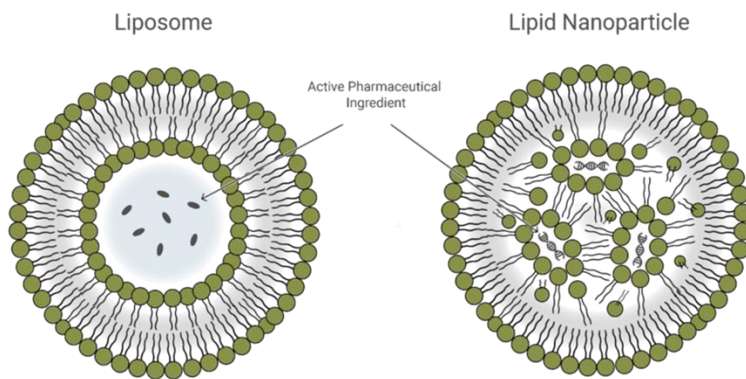


Figure 22. Les Liposomes Like (LNP) (Exelead, Merck® LNP)

Un autre sous-ensemble notable de NP lipidiques appelé LNP pour « liposome-like » nanoparticule, ce sont des structures de type liposome utilisées pour la délivrance d'acides nucléiques. Ils diffèrent des liposomes traditionnels principalement parce qu'ils forment des structures micellaires au sein du noyau des particules, une morphologie qui peut être modifiée en fonction des paramètres de formulation et de synthèse (265). Les LNP sont généralement composés de quatre composants principaux : des lipides cationiques ou ionisables qui se complexent avec du matériel génétique chargé négativement et facilitent la fuite endosomale, des phospholipides pour la structure des particules, du cholestérol pour la stabilité et la fusion membranaire, et des lipides pégylés pour améliorer la stabilité et la circulation (266, 267). L'efficacité de leur délivrance d'acide nucléique ainsi que leur synthèse simple, leur petite taille et leur stabilité sérique ont rendu les LNP particulièrement importants dans les applications de thérapie génique personnalisée (268). Les LNP ionisables sont une plate-forme idéale pour l'administration de ces thérapies à base d'acides nucléiques car ils ont une charge presque neutre à pH physiologique mais se chargent dans les compartiments endosomaux acides, favorisant l'échappement endosomal pour l'administration intracellulaire (269, 270). Cependant, malgré ces avantages, les systèmes LNP peuvent encore être limités par une faible charge de médicament et une biodistribution qui entraînent une absorption élevée dans le foie et la rate (263).

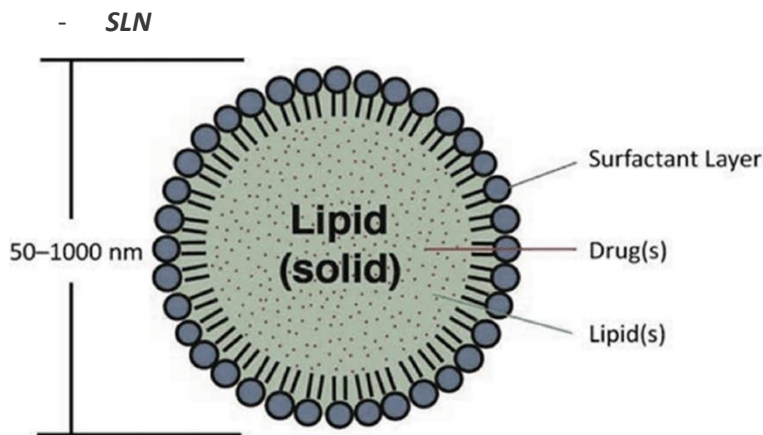


Figure 23. Les nanoparticules lipidiques solides (SLN) (Khalid Khalisanni et al. Bioengineered, 2020)

Les nanoparticules lipidiques solides (SLN) sont des dispersions colloïdales aqueuses constituées d'une matrice lipidique solide à température ambiante. Les tensioactifs améliorent leur stabilité, tandis que le choix du lipide affecte les propriétés de délivrance. La taille des SLN varie de 10 à 1000 nm selon la méthode de synthèse (271) (Figure 23). Les SLN peuvent encapsuler de très grandes quantités de médicaments lipophiles ainsi que de médicaments hydrophiles et d'acides nucléiques, ce qui en fait des vecteurs d'administration de médicaments polyvalents (272, 273). Les SLN peuvent recouvert ou chargés de divers éléments, y compris des anticorps, des nanoparticules magnétiques, des lipides/polymères sensibles au pH pour moduler leur délivrance et la libération de médicaments (274, 275). Ils se sont révélés être des vecteurs efficaces pour l'administration de médicaments anticancéreux, pulmonaires et oraux (276, 277).

Les SLN préparés à partir d'acide stéarique, de tristéarate de glycéryle et de trioctanoate de glycéryle sont des vecteurs d'eluxadoline (ELX) et pourraient atténuer considérablement la colite après la libération réussie du médicament *in vivo*. L'analyse du score histologique, des dommages macroscopiques et microscopiques et de l'activité antioxydante a révélé que les SLN chargés d'ELX étaient très efficaces dans le traitement de la colite induite par l'acide acétique chez le rat (278). Dans une autre étude, un SLN différent a été utilisé comme vecteur de dexaméthasone et de butyrate. Lorsqu'ils ont été administrés à des souris présentant une colite induite par le DSS, ces SLN ont diminués considérablement les principales cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β et le TNF α (279).

9.2.2 Les nanoparticules polymériques

9.2.2.1 Les nanoparticules polymériques - Naturelles

Les polymères naturels ont longtemps été utilisés comme vecteurs de médicaments pour le traitement des MICI en raison de leur biocompatibilité, biodégradabilité et abondance dans la nature (280). Ces matériaux naturels présentent souvent une interaction unique avec des molécules spécifiques et permettent une modification facile, leur conférant une grande polyvalence dans la délivrance de médicaments (281). En plus de ces caractéristiques, les polymères naturels peuvent également offrir une solution beaucoup plus sûre et plus économique à la toxicité et à l'immunogénicité observées dans certains biomatériaux synthétiques utilisés auparavant (282).

- Chitosan

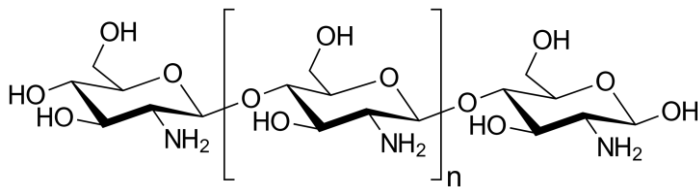


Figure 24. Le chitosan (base de données, Chemical and Products Database)

Le chitosan est un biopolymère cationique naturel composé d'unités N-acétyl-D-glucosamine et D-glucosamine reliées par une liaison β -1,4-glycosidique (283) (Figure 24). Le chitosan, polysaccharide naturel chargé positivement, est produit par désacétylation chimique (en milieu alcalin) ou enzymatique de la chitine. On le retrouve dans la composition de l'exosquelette des crustacés (arthropodes) ou de l'endosquelette des calmars (céphalopodes) et même dans la paroi de certains champignons, c'est donc une ressource abondante, bon marché et renouvelable aux propriétés de biocompatibilité et anti-inflammatoire, qui a été approuvée par la Food and Drug Administration dans le domaine des probiotiques (284). De plus, les interactions électrostatiques entre les composants chargés négativement du mucus et le chitosan chargé positivement qui sont dues à ses propriétés mucoadhésives permettent d'améliorer et prolonger le temps de résidence des polyphénols près des entérocytes augmentant ainsi leur absorption dans la région mucoale de l'intestin (285).

En raison de ces propriétés, les nanoparticules de chitosan peuvent maintenir une libération prolongée et augmenter l'interaction avec la surface muqueuse chargée négativement du côlon (286). Il a été rapporté que la combinaison de chitosan avec des polyphénols produit un effet probiotique synergique dans les maladies inflammatoires, inhibant la dégradation des polyphénols et améliorant leur biodisponibilité dans le tractus gastro-intestinal. Par exemple, He et al. (287) ont rapporté que des nanoparticules chargées d'anthocyanes recouvertes de carboxyméthylchitosane chargé négativement et de chlorhydrate de chitosan chargé positivement pourraient ralentir la dégradation des anthocyanes et améliorer leur biodisponibilité (287). D'autres recherches ont mis en évidence, la possibilité de cibler le côlon en recouvrant des nanoparticules de chitosan chargées de curcumine avec de l'Eudragit® FS 30D (un polymère sensible au pH), ce qui a présenté une excellente rétention et une libération prolongée de la curcumine près du côlon (288). Dans une étude similaire, des NP de chitosan ont été recouverte avec de l'Eudragit® S100 (ES100), et de l'acide hyaluronique (HA) pour former des délivrer du Tacrolimus® (FK506, un immunosuppresseur utilisé principalement en transplantation d'organes) et de l'hydroxypropyl- β -cyclodextrine (HP- β -CD). L'agent ES100 a permis aux particules de chitosan chargés de cibler spécifiquement le site de l'inflammation intestinale, de plus le HA a fourni aux NP de chitosan une plus grande affinité pour les récepteurs CD44. L'ensemble de ces modifications uniques ont amélioré l'efficacité thérapeutique globale des NP de chitosan (289).

- **Pectine**

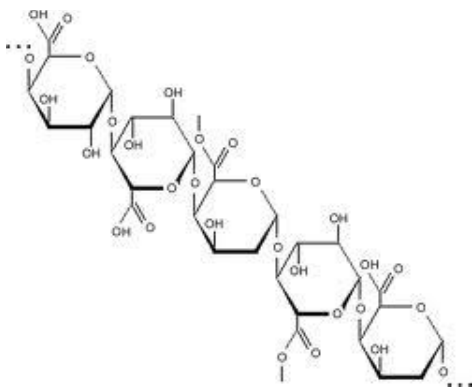


Figure 25. La Pectine (base de données, Chemical and Products Database)

La pectine est un polysaccharide essentiellement linéaire. La pectine est constituée principalement d'unités d'acide D-galacturonique (GalA) (290), liées au moyen d'une liaison glycosidique α -(1-4) (Figure 25). Ces acides uroniques ont des groupes carboxyle, dont certains se présentent naturellement sous forme d'esters méthyliques et d'autres qui sont traités avec de l'ammoniac pour produire des groupes carboxamide. La pectine contient de quelques centaines à environ 1000 unités de saccharide dans une configuration de chaîne, cela correspond à des poids moléculaires moyens d'environ 50 000 à 150 000 daltons. De grandes différences peuvent exister entre les échantillons et entre les molécules d'un échantillon et les estimations peuvent différer entre les méthodes de mesure.

Les pectines sont solubles dans l'eau pure. Les sels de cations monovalents de pectine et d'acides pectiques sont généralement solubles dans l'eau, par contre les sels de cations di- et trivalents sont peu solubles voire insolubles. Les solutions diluées de pectine sont newtoniennes mais à une concentration modérée, elles présentent des caractéristiques de comportement pseudoplastiques non newtoniennes. La viscosité, la solubilité et la gélification sont généralement liées. Par exemple, les facteurs qui augmentent la résistance du gel augmenteront la tendance à la gélification, diminueront la solubilité et augmenteront la viscosité, et vice versa. Ces propriétés des pectines sont fonction de leur structure, qui est celle d'un polyanion linéaire. Ainsi, les sels de cations monovalents des pectines sont fortement ionisés en solution, et la répartition des charges ioniques le long de la molécule tend à la maintenir sous une forme étendue par répulsion coulombique (291).

La pectine est un polymère naturel qui sensible à la fois à la dégradation microbienne et au pH (292, 293). Cette caractéristique unique permet aux biomatériaux dérivés de la pectine d'être largement étudiés en tant que vecteurs pour l'administration de médicaments spécifiques au côlon (294).

- *Les nanoparticules de maltodextrine – NPL*

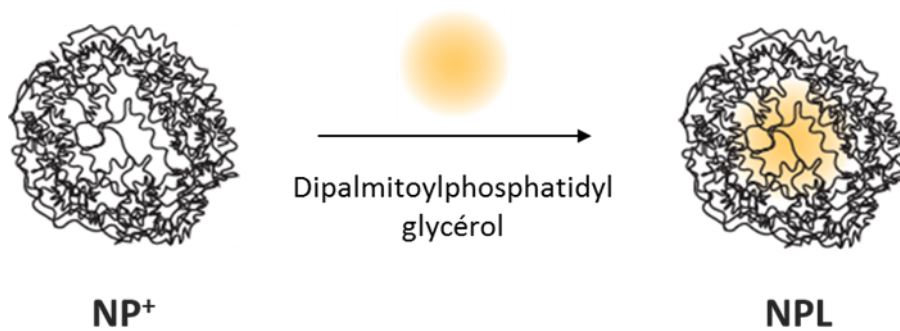


Figure 26. Représentation schématique des nanoparticules de maltodextrine lipidées (NPL)

L'hydrolyse partielle de l'amidon permet de générer de la maltodextrine, un polymère naturel de glucose présentant des liaisons α -1,4. Même si la maltodextrine peut former des microparticules dans l'eau naturellement pour pouvoir l'utiliser comme nanovecteur il faut passer par des étapes de synthèses comme la nanoprécipitation, l'hydrolyse enzymatique ou chimique, l'émulsification ou via des traitements physiques tels que la sonication ou l'homogénéisation à haute pression (295). Utilisés pour délivrer des protéines et des petites molécules (296, 297), mais également présente dans l'industrie alimentaire (sucre etc.) (Figure 26).

Le Pr. Betbeder a mis en avant les avantages et limites liée à l'utilisation des NPL. La maltodextrine a été solubilisée dans l'eau, réticulée à l'aide d'épichlorhydrine et cationisée pour former un gel dense et cationique, qui a été broyé à haute pression, et ultrafiltré (ultrafiltration tangentielle) pour éliminer les plus petits fragments, sels et résidus de synthèse, à la fin on obtient des nanoparticules NP⁺ de 60 nm, sphériques, poreuses et cationiques (298). Plusieurs études ont démontrés que leurs caractéristiques permettent à ces NP⁺ d'être endocytosées par les cellules épithéliales respiratoires en atteignant un maxima de NP endocytosées dès 1 heure d'incubation (299).

Un cœur composé de phospholipides anioniques (DPPG ou dipalmitoyl-phosphatidylglycérol a été ajouté aux NP⁺ (post loading) formant ainsi les NPL, ceci dans le but d'optimiser leur association à des molécules hydrophobes. Cet ajout de 70% de DPPG ne modifie ni la taille, ni la charge de surface ni la stabilité des nanoparticules (300), au contraire grâce à la porosité de NP⁺, les lipides présents au cœur

de la NPL sont accessibles et ajoutent de nouvelles caractéristiques à ces NP notamment une furtivité vis-à-vis du système du complément (300).

Les travaux de Dombu C et al. ont montré que les NPL étaient endocytosées principalement par la voie des clathrines, mais qu'en plus elles subissent une exocytose via la voie impliquant le cholestérol (299). Des analyses de cytotoxicité et de génotoxicité ont prouvé qu'elles ne sont pas toxiques aux doses utilisées pour délivrer des substances actives dans les cellules (301), et que pour les deux formes de ces NP, NP⁺ ou NPL, on observe des profils d'endocytose similaire (302). Par ailleurs une étude sur la biodistribution des NPL administré par voie nasale a été réalisée par Bernocchi B et al. A permis de mettre en lumière la capacité des NPL à augmenter le temps de résidence des substances associées au niveau des muqueuses nasale chez la souris, ceci durant 6h. Après quoi les NPL avaient été avalées puis éliminées dans les fèces. De plus cette étude n'a révélé aucune présence des NPL dans le cerveau ou les vaisseaux sanguins, suggérant que les NPL n'avaient pas traversé les épithéliums sains environnant (303). L'efficacité de délivrance de la NPL peut être expliquée par l'échappement endosomal important dont elle fait preuve et qui a été révélé par FRET ((Fluorescence Resonance Energy Transfert) par microscopie confocale (304). En comparaison avec les NP les plus répandue dans le domaine de la délivrance de médicament, tel que les PLGA anioniques ou cationique et des liposomes anioniques ou cationique, Lê Minh Quan et al. A montré que les NPL pouvaient associer une plus grande quantité d'antigène tout en autant plus rapidement endocytosé par les cellules épithéliales respiratoires, cellules dendritiques et macrophage que les autres nanoparticules(298). Et enfin Il a également été prouvé qu'ils peuvent s'associer pour délivrer des médicaments hydrophobes comme par exemple l'antiparasitaire diminazène, le protégeant de l'oxydation (305) et améliorant ces effets. Malgré que Les NPL aient une charge de surface global cationique, elles se comportent comme des NP zwitterioniques, certainement grâce à leur noyau lipidique anionique, ce qui les rend capables de pénétrer et de diffuser à travers le mucus (306, 307).

9.2.2.2 Les nanoparticules polymériques – Synthétiques

Bien que tous les polymères synthétiques ne soient pas appropriés pour des applications thérapeutiques, divers biomatériaux synthétiques ont réussi à améliorer de manière significative la délivrance de médicaments ou molécules anti-inflammatoire dans le cas des MICI. L'obstacle majeur qui limite généralement l'efficacité des systèmes conventionnels d'administration de médicaments

contre les MICI est l'environnement inflammatoire, qui modifie fortement les caractéristiques physiologiques impliqués dans l'absorption et la régulation de la réponse inflammatoire. C'est pourquoi la variabilité des polymères synthétiques s'avère être un avantage pour le traitement des MICI (308). En particulier, les propriétés physicochimiques de certains polymères synthétiques qui peuvent présenter des propriétés anti-inflammatoires naturelles ou être facilement adaptées de sorte à ce que les polymères puissent résister et répondre aux besoins spécifiques des traitements IBD.

Les polymères synthétiques peuvent être facilement modulés en termes de proportions de monomères, de poids moléculaires et de liaisons chimiques, et se caractérisent donc par leur diversité. Par exemple, le PLGA, l'acide lactique et le poly (glycolide) (PGA) peuvent être progressivement dégradés en acide lactique et en acide glycolique dans le corps, et la poly(ϵ -caprolactone) (PCL) peut être dégradée par la lipase (309). De plus, les polymères synthétiques sont généralement plus purs et plus homogènes que les polymères naturels, et ces propriétés sont bénéfiques pour une meilleure reproductivité (310). C'est pourquoi, les polymères synthétiques ont connu une croissance exponentielle dans le domaine biomédical ces dernières années.

- **Les PLGA**

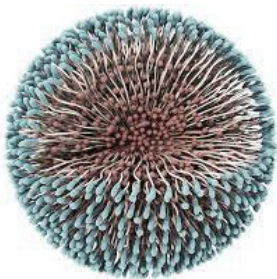


Figure 27. Représentation schématique des nanoparticules de PLGA (base de données, Precision-Nanosystems)

Le poly (acide lactique-co-glycolique) (PLGA) est un copolymère de poly (acide lactique) (PLA) et de poly (acide glycolique) (PGA) qui a été largement utilisé comme vecteur d'administration de médicaments dans de nombreux produits à libération contrôlée en raison de leur bonne biocompatibilité dans les environnements physiologiques (Figure 27). Ces copolymères de PLGA sont

associés à des médicaments ou autres substances à toutes les échelles, que l'on peut retrouver dans les implants, les revêtements de dispositifs médicaux, les microparticules et nanoparticules (311-314).

Les nanoparticules de PLGA peuvent être synthétisées chimiquement à l'aide de monomères d'acide lactique et glycolide par des techniques dite de « bottom-up » (ascendante) telles que la polymérisation par précipitation, la polymérisation en émulsion, mais également via d'autres technique nommé « top down » (descendantes) telles que l'évaporation de solvant d'émulsion (émulsions mono ou multiphases), la nanoprécipitation (315, 316).

Par rapport aux polymères naturels, les propriétés et les fonctions des polymères synthétiques biodégradables sont plus prévisibles (317). Le PLGA, en tant que polymère synthétique, est l'un des vecteurs d'administration de médicaments les plus largement utilisés (318, 319), qui peut transporter des protéines (320), peptides (321, 322), ADN bactérien ou viral (323) (324) et divers médicaments anticancéreux (325, 326). Le PLGA est hydrolysé en acide lactique et en acide glycolique *in vivo*, puis métabolisé en eau et en dioxyde de carbone par le cycle de l'acide tricarboxylique, et finalement excrété dans les poumons. La sécurité du PLGA a été reconnue par la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis et l'Agence européenne des médicaments, et a maintenant été officiellement incluse par la FDA en tant qu'excipient pharmaceutique (327-329).

L'avantage des polymères synthétiques biodégradables réside dans le fait qu'ils permettent d'ajuster : le rapport entre les monomères d'acide lactique et glycolique, le poids moléculaire (MW), la concentration et le groupe terminal, ce qui affectera l'efficacité d'encapsulation (EE%) et la cinétique de libération des médicaments (330). Le polymère PLGA conserve certaines propriétés des deux monomères, telles que la rigidité, l'hydrophobicité, la dégradation lente de l'acide lactique et une dégradation plus rapide de l'acide glycolique (331). D'une manière générale, l'augmentation de la teneur en monomère glycolique dans le polymère PLGA peut améliorer l'hydrophilie du polymère (323, 331, 332). Cependant, il existe des cas particuliers. Des études ont montré que lorsque le rapport des deux monomères est de 50:50, le polymère se dégrade à la vitesse la plus rapide. En effet, le PLGA 50:50 a la cristallinité la plus faible et une hydrophilie élevée, il est donc utile que l'eau pénètre dans la matrice du polymère (333). Les polymères PLGA à haut poids moléculaire ont un taux de dégradation plus rapide en raison de leur meilleure intégrité structurelle (334, 335). De plus, l'augmentation de la concentration de PLGA augmentera la taille des NP (327). De manière générale, les polymères

contenant des groupes -COOH libres sont plus hydrophiles, et les PLGA à terminaison ester ont une meilleure résistance à l'hydrolyse que le PLGA à terminaison acide, car le cycle de dégradation devient plus long (332, 335).

Dans le cas de la vectorisation de la curcumine, ce sont les NP de PLGA qui sont les plus utilisées pour délivrer de la curcumine, en raison de sa biocompatibilité et de sa biodégradabilité, mais surtout parce que de nombreuses études démontrent leur efficacité sur des modèles *in vitro* et *in vivo*. Par exemple une étude a montré que les nanoparticules de PLGA chargées de curcumine synthétisées par la méthode d'émulsion-diffusion-évaporation présentant une efficacité d'encapsulation de 76,9 % et une capacité d'encapsulation de 15 %, la biodisponibilité orale des nanoparticules de PLGA chargées de curcumine était jusqu'à neuf fois supérieure à celle de la curcumine avec la pipérine (336). Dans cette étude, la libération de médicament *in vitro* a montré un profil de libération biphasique avec une libération initiale de 24 % à 24 heures et une libération atteignant les 43 % après 20 jours (336).

- **Autres polymères synthétiques**

Eudragit est composé de copolymères de méthacrylate de méthyle (MMA) et d'acrylate d'éthyle (EA) avec de l'acide méthacrylique (MA) et sont utilisés pour les enrobages médicaments ou substances destinées à une délivrance entériques (337). Leur effet entérique est attribué à la présence de groupes carboxyliques qui sont convertis en carboxylate à un pH allant de 5 à 7 par formation de sel avec des alkalis ou des amines. Ils forment un film insoluble dans l'eau qui résiste au suc gastrique. Le pH de dissolution du copolymère dépend principalement de la teneur en groupements carboxyliques ; poly (MA-MMA) 1: 1 (Eudragit L) se dissout à > pH 6, poly (MA-MMA) 1: 2 (Eudragit S) se dissout au-dessus de pH 7.

Eudragit L100 et Eudragit S100, qui peuvent se dissoudre à pH 6 et 7, respectivement, sont les plus couramment utilisés en combinaison, à divers rapports pondéraux pour optimiser la libération de médicament au pH désiré (338). Eudragit S100 est un polymère biocompatible pour l'administration de médicaments spécifiques au côlon, qui a été utilisé dans des formulations à l'échelle nanométrique pour permettre la libération de médicaments lorsqu'il atteint la lumière du côlon légèrement acide (339). Zhou et al. ont développé une formulation associant l'Eudragit S100- sensible au pH enrobé

sur des NP de PLGA chargé de budésonide (corticostéroïde), cette étude a démontré que le budésonide était stable, et a été libéré au pH colique avec un effet anti-inflammatoire dans le modèle TNBS de colite expérimentale (340).

Alors que la plupart des études utilisent ce matériau synthétique comme agent d'enrobage ou additifs pour aider la fonction d'autres formulations, certaines études ont également rapporté le potentiel thérapeutique de formulations directement préparés à partir de polymères Eudragit. Dans une étude, L'Eudragit L100 a été utilisé pour préparer des microparticules (MP) contenant de la prednisolone. Les MP Eudragit ont été synthétisées par électro pulvérisation simple et coaxiale, et leur taille et leur morphologie ont été facilement contrôlées en modifiant les paramètres d'électro pulvérisation. Fait intéressant, les MP ont adopté une forme de beignet au lieu d'une forme sphérique conventionnelle, peut-être en raison de la mobilité limitée de la solution de polymère pendant l'électro pulvérisation et l'évaporation. Malgré la forme toroïdale, les MP d'Eudragit L100 étaient très sensibles aux changements de pH et ont démontré des profils de libération spécifiques à l'environnement colique utiles dans les applications *in vivo* et cliniques (341). De plus, les nanocapsules préparées à partir d'ES100 étaient également des vecteurs de budésonide intéressants, car ils amélioraient la pathologie des MICI sur les modèles murins. Par rapport à l'administration de budésonide libre, l'administration de nanocapsules ES100 avaient amélioré significativement la glycémie et les signes histologiques d'inflammation colique (342).

9.3 Caractéristiques des nanoparticules

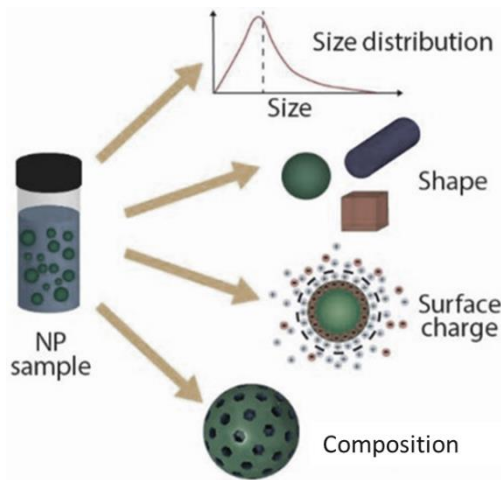


Figure 28. Les caractéristiques des nanoparticules (Modena, M. et al. *Advanced Materials*, 2019)

Un nanomètre (nm) correspond à un milliardième, ou 10^{-9} , de mètre (245). Pour avoir une idée de l'échelle dans lesquels doivent s'opérer ces interactions, le diamètre d'une double hélice d'ADN est d'environ 2 nm, le plus petit atome, l'hydrogène, a un diamètre d'environ 0,25 nm et la distance entre deux atomes de carbone liés dans une molécule est d'environ 0,1 nm. Autres exemples les plus petites bactéries, celles du genre *Mycoplasma*, mesurent environ 200 nm. La taille dépend fortement du procédé utilisé pour leur synthèse. Ils peuvent être obtenus par assemblage « bottom up » d'atomes par voie chimique ou, au contraire, par fragmentation « top down » d'un matériau en plus petit fragments. Les propriétés des NP sont régies par quatre caractéristiques principales : la taille, la forme, la composition et la charge de surface (245, 343, 344) (Figure 28).

9.3.1 Taille

Les NP par convention ont une taille qui varie entre 1 et 100 nm (245). La limite inférieure est fixée par la taille des atomes puisque la nanotechnologie doit construire ses particules à partir d'atomes et de molécules. La limite supérieure est plus arbitraire mais elle est établie en fonction des barrières que doivent franchir les NP, tel que le passage à travers le mucus ou encore l'internalisation par des cellules (343, 344). La taille limite supérieure pour des applications biomédicale peut être considérée comme 1000 nm (1 micromètre - μm), car cette taille permet l'internalisation des NP par les cellules eucaryotes non phagocytaires (345), même si les cellules phagocytaires telles que les cellules dendritiques et les

macrophages peuvent internaliser des particules plus importante allant jusqu'à 4 μm (346). Les particules supérieures à 1000 nm sont quant à elles appelées microparticules. Les NP ont des propriétés physicochimiques uniques qui sont distinctes que l'on retrouve plus pour un même matériau à une échelle plus grande, macroscopiques ou microscopiques. La propriété la plus intrigante est leur capacité à échapper aux forces des lois du mouvement de Newton, étant régies par les lois de la mécanique quantique (245). Lorsque l'on observe leur comportement en suspension dans une solution, les mouvements des NP sont très dynamiques, et ils se déplacent rapidement et sont entraînés au hasard par le mouvement brownien (347). Leur rapport surface/masse très élevé revêt une importance particulière dans les applications de délivrance de médicament, une propriété qui augmente progressivement avec la diminution de la taille. Cette grande surface fonctionnelle est capable de lier, d'absorber et de transporter de nombreux composés tels que des sondes, des protéines et des médicaments (245, 343, 344).

La taille nanométrique est la propriété cardinale de l'interaction avec les systèmes biologiques, elle détermine la capacité des NP à passer à travers les barrières biologiques, mais régie également leur interaction avec le système immunitaire, l'absorption, la distribution dans le métabolisme (344, 348). En fonction de la taille des NP administré par voie orale, leur adressage (c.-à-d. cellule épithéliale ou phagocytaire) ou le niveau de profondeur dans la muqueuse intestinale qu'elles vont atteindre est déjà prédéterminé par cette caractéristique (345, 346, 348, 349).

9.3.2 Composition

Pour rappel la composition des NP peut être d'origine biologique ou chimique. Les matériaux biologiques comprennent les lipides, l'acide lactique, les polysaccharides (dextran, le chitosan) et les protéines (albumine). Les matériaux chimiques comprennent les polymères, le carbone, la silice et les métaux. Les polymères, à leur tour, peuvent avoir des compositions chimiques différentes. La chimie est d'une importance cruciale pour assurer l'innocuité des NP car certains constituants nanométriques peuvent s'avérer toxiques (344). La composition chimique présente à la surface détermine la première interaction des NP avec les tissus et les cellules, la charge de surface étant l'un des aspects majeurs avec leurs caractéristiques d'hydrophobicité/hydrophilie (350). La charge à de nombreuses propriétés telles que celle de stabiliser la dispersion des particules en solution, d'empêcher leur agrégation et de donner de la stabilité à la suspension de NP (351). Dans les applications médicales, la charge de surface

peut être utilisée pour augmenter la proximité des NP avec l'épithélium, augmenter son absorption et déterminer différentes interactions avec l'épithélium intestinal. Par exemple, les NP chargées positivement ont une forte affinité pour l'épithélium sain, tandis que les particules chargées négativement adhèrent préférentiellement à la muqueuse enflammée (352, 353). L'hydrophilie, à son tour, peut contribuer à l'absorption tissulaire améliorant la pénétration des NP dans la couche de mucus intestinal (343). La porosité, qui est une mesure des espaces vides dans un matériau. Les matériaux poreux possèdent de grandes quantités de « nanopores » qui permettent l'inclusion et la rétention de molécules, permettant d'obtenir une modulation contrôlée (354). D'autres propriétés de surface peuvent être conférées aux NP en les enrobant de divers polymères neutres comme par exemple, le polyéthylène glycol (PEG). Le PEG permet aux NP d'éviter la reconnaissance immunitaire suite à une administration intraveineuse ou de résister à la dégradation enzymatique suite à une administration orale pour obtenir une administration ciblée (355).

9.3.3 Forme

La capacité d'une NP à être internalisée à travers une surface biologique dépend également de la surface de contact et de la courbure de la particule au point de contact. Ainsi, la forme géométrique représente une caractéristique importante pour la performance des NP. Les NP en forme de disque ou de bâtonnet ont la plus grande probabilité d'adhésion, principalement en raison de leur grande surface disponible pour le contact et les interactions multivalentes (356), donnant lieu à un flux d'échanges de substances plus important par unité de volume (357). Cependant, de nos jours, les études expérimentales ont principalement été menées avec des NP sphériques (liposomes, émulsions, capsules, sphères) ou tubulaires (nanotubes), en partie en raison des limitations de la technologie de fabrication dans le contrôle de leur forme. Les principes de minimisation d'énergie impliqués dans les techniques de production ascendantes "bottom up" pour les structures stables déterminent la forme sphérique, car les sphères ont le moins de surface par unité de volume et, par conséquent, minimisent les énergies interfaciales. L'avancement des techniques impliquées dans la nanofabrication a permis le développement et la production de diverses NP non sphériques. Néanmoins il faut savoir qu'il a été supposé que les particules nanocristallines par elles-mêmes peuvent avoir un effet biologique sur les cellules. Par exemple, alors que la forme α -quartz de la silice est pro-inflammatoire en raison de la rupture lysosomale induite après leur internalisation cellulaire, les particules de silice amorphe n'induisent quant à elles aucune rupture lysosomale (358). Pour résumer, la taille, la chimie de surface

et la forme confèrent aux NP la capacité d'entrer cellules, pour transporter des composés et peuvent influencer les fonctions cellulaires et les agents qu'elles transportent.

9.3.4 Charge de surface

L'internalisation des NP dépend bien de la charge de surface du nanomatériau. À l'heure actuelle, la majorité des rapports suggèrent que les nanomatériaux chargés positivement s'internalisent principalement par les voies médiées par les clathrines avec une certaine fraction utilisant la macropinocytose. Les exemples incluent des nanoparticules cationiques d'origine très différente - PEG-co-PLA recouvert de stéarylamine, PLGA modifié par un groupe amino, chitosan, etc. (359, 360). Cependant, il existe quelques exceptions, notamment les polyplexes à base de PEI, qui sont fortement cationiques et peuvent pourtant utiliser plusieurs voies, y compris l'endocytose médiée par les cavéoles (361). Il convient de noter, cependant, que de tels complexes sont généralement formulés avec un excès de polycation et dans un environnement cellulaire ils peuvent, en outre se lier aux protéines sériques, ce qui peut affecter considérablement leur charge et modifier leur trafic intracellulaire. Une autre exception concerne les particules PRINT chargées positivement qui peuvent utiliser plusieurs voies d'endocytoses (362). En revanche, les nanoparticules chargées négativement, telles que celle qu'on retrouve dans la formulation du DOXIL[®], les micelles et les QD, sont plus susceptibles d'utiliser l'endocytose médiée par les cavéoles (363, 364). Les exceptions incluent certaines nanoparticules de PLGA chargées négativement, qui peuvent pénétrer dans les cellules par des voies indépendantes des cavéoles (365, 366). Étant donné que les membranes cellulaires sont généralement chargées négativement, il est largement admis que les nanomatériaux chargés négativement devraient s'internaliser plus lentement que leurs homologues chargés positivement. Pourtant, une exception frappante est le QD chargé négativement, dont il a été démontré qu'il s'internalise beaucoup plus rapidement que le QD neutre ou chargé positivement (364). Il n'est pas clair d'après la littérature si les nanomatériaux neutres montrent une préférence pour des voies d'entrée cellulaires spécifiques. Dans le cas des micelles Pluronic[®] neutres, la voie CME semble être la principale voie d'entrée. Cependant, cela peut être dû à la capacité de ce copolymère à blocs à inhiber l'endocytose médiée par les cavéoles à des concentrations micellaires (367).

9.4 Endocytoses des NP

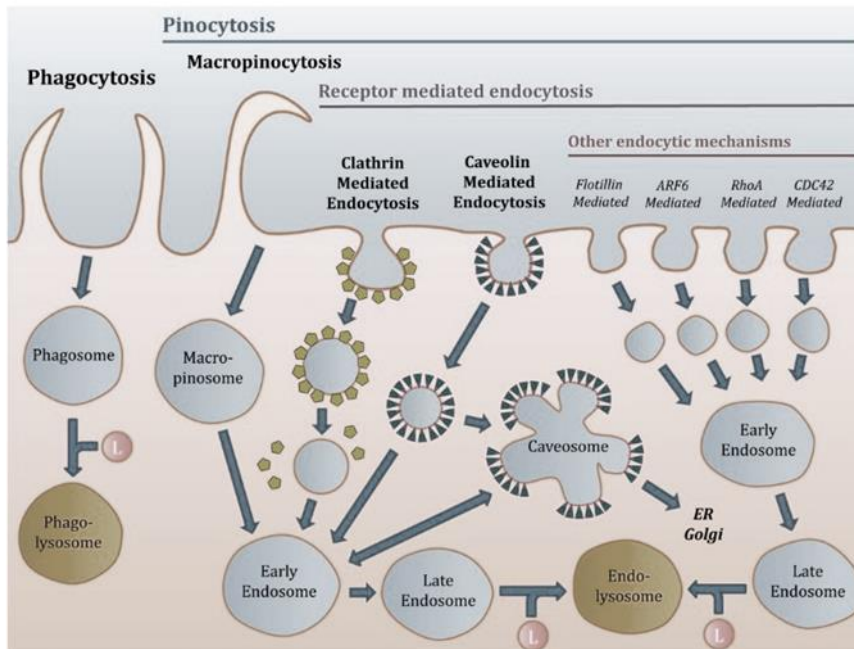


Figure 29. Les différentes voies d'endocytose (Manzanares D et al. *Pharmaceutics*, 2020)

La plupart des méthodes actuelles pour étudier le trafic intracellulaire de nanomatériaux impliquent soit la colocalisation des nanomatériaux avec des marqueurs et des structures spécifiques d'endocytose, soit l'exclusion de mécanismes d'endocytose spécifiques par des inhibiteurs d'endocytose ou des mutants cellulaires. En cas d'études de colocalisation, différents marqueurs peuvent être utilisés. Par exemple, dans la conception dite "pulse-chase", des protéines des voies de trafic connues, telles que la transferrine ou la toxine cholérique B (CTB) sont marquées et exposées aux cellules simultanément ou avant l'ajout du nanomatériau également marqué cette étape est nommée "pulse", ensuite on détecte leur présence dans les vésicules intra cellulaires à différents moments et cette étape est nommée «chase». La méthode actuelle de détection la plus répandue consiste à attacher différentes sondes fluorescentes à une protéine et au nanomatériau qui permettent d'analyser la distribution du transfert d'énergie de résonance de couleur ou de fluorescence (FRET) dans les compartiments cellulaires. L'avantage d'une telle approche est qu'elle permet d'utiliser l'imagerie des cellules vivantes par microscopie confocale, ce qui provoque sans doute moins d'artefacts. L'inconvénient est que ces marqueurs d'endocytose sont rarement sélectifs par rapport à des voies de trafic spécifiques et peuvent utiliser différents mécanismes d'endocytose

dans différents types cellulaires. L'exclusion de certaines voies d'endocytose spécifiques est une technique distincte pour élucider l'endocytose. Ceci peut être réalisé, par exemple, en utilisant divers inhibiteurs pharmacologiques de l'endocytose qui incluent des agents chimiques ou biologiques (368, 369). Parmi les exemples d'inhibiteurs chimiques on peut retrouver ceux qui vont induire l'appauvrissement en K^+ pour la voie CME, la méthyl-bêta-cyclodextrine (M β CD) et d'autres composés interagissant avec le cholestérol pour la voie des cavéoles, ainsi que d'autres composés décrits dans l'article n°1 présenté dans la partie résultat. Le problème avec les inhibiteurs chimiques est qu'ils sont rarement sélectifs et perturbent souvent plusieurs voies d'endocytose (369). Par conséquent, il est essentiel d'utiliser de tels inhibiteurs en combinaison avec des marqueurs d'endocytose comme témoins positifs et/ou d'autres méthodes pour valider le mécanisme d'inhibition et la concentration efficace d'inhibiteur en fonction du type de cellules utilisés. La microscopie confocale peut être réalisée après exposition des cellules à des inhibiteurs chimiques et biologiques et comparée à celle des cellules non traitées (370). On peut aussi coupler la microscopie confocale standard à des analyses d'imagerie 3D Z-stack pour obtenir la localisation exacte des NP étudiés. L'absorption des NP peut également être quantifiée par cytométrie, microscopie à fluorescence ou simple prélèvement de radioactivité (371). Cependant, une analyse approfondie et concluante doit inclure plusieurs approches pour disséquer sans ambiguïté les mécanismes de trafic intracellulaire.

9.4.1 Voies des clathrines

La CME est la « voie classique » d'internalisation, qui est présente et intrinsèquement active dans toutes les cellules de mammifères (Figure 29). Elle est responsable de l'absorption de nutriments essentiels comme le cholestérol transporté dans les cellules par les lipoprotéines de basse densité (LDL) via le récepteur LDL, ou le fer transporté par la transferrine (Tf) via le récepteur Tf. Ces protéines sont maintenant couramment utilisées comme marqueurs de CME. D'autres fonctions de la CME permettent de réduire l'expression des récepteurs de signalisation cellulaire par leur internalisation et dégradation. La CME joue un rôle dans le maintien de l'homéostasie cellulaire, par exemple, par la régulation des pompes ioniques (35, 372) qui module la dynamique d'absorption. Mécaniquement, la CME implique l'invagination des récepteurs associés à leurs ligands dans une vésicule. La vésicule se forme en raison de la polymérisation d'une protéine cytosolique appelée clathrine-1, qui nécessite également des protéines d'assemblage comme AP180 et AP-2. La vésicule assemblée est d'environ 120 nm, puis elle est dissociée de la membrane plasmique par une petite GTPase, la dynamine (373). Il a

été démontré que diverses protéines accessoires telles que l'amphiphysine, Eps15 et l'intersectine agissent comme des échafaudages qui relient la machinerie endocytaire au cytosquelette d'actine (374, 375). L'actine définit la régulation spatiale et le mouvement de la vésicule endocytosée vers l'intérieur des cellules. Dans les cellules, la couche de clathrines est éliminée et les vésicules fusionnent avec les endosomes précoces où elles sont triées en endosomes/lysosomes tardifs, en réseau trans-Golgi ou en endosomes de recyclage pour être transportées vers la membrane plasmique (376). Bien qu'il existe de nombreux rapports et parfois contradictoires sur les voies de trafic des nanomatériaux.

9.4.2 Voies des cavéoles

Les cavéoles sont abondantes dans les muscles, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les adipocytes et absentes dans les neurones et les leucocytes (372) (Figure 29). Ils sont un sous-ensemble de radeaux lipidiques, des régions riches en cholestérol de la membrane plasmique qui permettent l'endocytose et la fonctionnalité des récepteurs de transduction du signal (377). La caractéristique définitive des cavéoles est la présence de la protéine membranaire en épingle à cheveux, la cavéoline-1, qui est nécessaire à la biogenèse des cavéoles. En raison de cette protéine, les cavéoles prennent leur structure caractéristique en forme de flacon d'une taille de 60 à 80 nm et peuvent intérioriser des molécules qui se lient à la surface des cavéoles. En plus de la cavéoline-1, présente dans la plupart des cellules, il existe d'autres isoformes comme la cavéoline-2 ou la cavéoline-3 (spécifique du muscle) (372). D'autres composants de la machinerie endocytaire des cavéoles comprennent des protéines comme la cavine, qui induit la courbure de la membrane, la dynamine, qui permet la division des vésicules, ainsi que la protéine membranaire associée aux vésicules (VAMP2) et la protéine associée aux vésicules des vésicules synaptosomes (SNAP), qui assurent la fusion de vésicules (378, 379). Après bourgeonnement à partir de la membrane plasmique, les vésicules des cavéoles transportent et fusionnent avec les cavéosomes ou le MVB à pH neutre (380). Cette voie semble être plus lente que la CME *in vitro* mais, surtout, au moins dans certains cas, elle peut contourner les lysosomes. Par conséquent, plusieurs agents pathogènes, dont des virus et des bactéries, exploitent cette voie pour échapper à la dégradation dans les vésicules lysosomales (381). Pour la même raison, cette voie est considérée comme bénéfique pour la délivrance cellulaire de protéines et d'ADN (382). Certaines molécules comme CTB et la toxine Shiga auront une forte affinité pour la voie médiée par les cavéoles, elles interagissent avec les glycosphingolipides (GSL) résidant dans la cavéole, comme GM-1 (CTB) et Gb3 (toxine Shiga) (372). Le BTC et la toxine Shiga sont parfois utilisés comme marqueurs des cavéoles.

Cependant, il convient de noter qu'ils ne se limitent pas aux cavéoles et peuvent également pénétrer par des voies indépendantes de la clathrine et des cavéoles décrites ci-dessous. A savoir, la cavéoline-1 est une protéine, qui lie et favorise l'internalisation de plusieurs molécules, dont les lipides (cholestérol), les acides gras et les protéines membranaires (381).

Ainsi, les cavéoles séquestrent plusieurs ligands responsables de la signalisation cellulaire et leurs composants de signalisation en aval à proximité immédiate pour une activation et une transduction efficaces du signal. Certains exemples incluent les protéines G hétérotrimériques, les tyrosines kinases non réceptrices, le récepteur de l'insuline, le récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes et la nitricoxyde synthase endothéliale (eNOS) (380). Beaucoup de ces molécules semblent interagir directement avec la cavéoline. Par exemple, eNOS se lie au domaine "scaffold" de la cavéoline-1 et reste inactif lorsqu'il est lié. Les ligands, qui perturbent cette interaction, permettent l'activation d'eNOS, ce qui conduit à la production d'oxyde nitrique (NO) et augmente la perméabilité vasculaire (383). Plusieurs nanomatériaux pénètrent dans les cellules via les cavéoles. Cette voie a fortement été étudiée en nanomédecine, de par sa capacité de contourner les lysosomes. De plus, l'endocytose médiée par les cavéoles est la voie trans endothéliale la plus importante et cette voie peut donc être utilisée pour la délivrance trans vasculaire de nanomatériaux (384).

9.4.3 Macropinocytose

La macropinocytose est un cas particulier d'endocytose indépendante de la clathrine, des cavéoles et de la dynamine, qui est initiée par l'activation transitoire des récepteurs tyrosine kinases par des facteurs de croissance (368) (Figure 29). L'activation du récepteur induit une cascade de signalisation qui conduit à des changements dans le cytosquelette d'actine et déclenche la formation de vésicules membranaires. Ces vésicules membranaires vont saillir pour englober le liquide et les nutriments environnants dans le milieu extracellulaire (368, 385, 386). Ils peuvent simplement fusionner avec la membrane cellulaire ou former une vacuole intracellulaire, également appelée macropinosome (387). Les macropinosomes sont plus grands de l'ordre de 0,5 à 10 μm et distincts des autres vésicules formées lors de la pinocytose. De nombreuses particules telles que les bactéries, les corps apoptotiques, les cellules nécrotiques et les virus peuvent induire ce mécanisme indépendamment des facteurs de croissance et s'internaliser dans les macropinosomes (368). On a supposé que certains NP utilisaient cette voie en raison de leur dépendance à l'entrée des inhibiteurs de la formation d'actine, tels que la cytochalasine D (367). Cette voie est possible pour pratiquement toutes les cellules à quelques exceptions près, telles que les macrophages et les cellules endothéliales des micro vaisseaux

cérébraux. En principe, les cellules peuvent internaliser de grosses particules de taille submicronique dans des cellules dépourvues de phagocytose. Dans la plupart des cas, cette voie peut servir de point d'entrée non spécifique et elle est encore étudiée en pour les NP qui peuvent utiliser plusieurs mécanismes d'entrée cellulaire.

9.4.4 Phagocytose

La phagocytose se produit principalement dans les cellules phagocytaires, comme les macrophages, les monocytes, les neutrophiles et les cellules dendritiques (Figure 29). Il existe des suggestions selon lesquelles certains autres types de cellules, appelés phagocytes non spécifiques, tels que les fibroblastes, les cellules épithéliales et endothéliales, peuvent également présenter une certaine activité phagocytaire, mais dans une mesure beaucoup plus faible (388). Au total, la voie phagocytaire d'internalisation cellulaire se décompose en trois étapes distinctes, premièrement : reconnaissance des particules par opsonisation dans la circulation sanguine, deuxièmement : adhésion des particules opsonisées sur la membrane cellulaire, troisièmement : ingestion de la particule par les cellules. L'opsonisation des nanoparticules se produit par adsorption de protéines, telles que les immunoglobulines IgG et IgM, les composants du complément (C3, C4, C5), les protéines du sérum sanguin dont la laminine, la fibronectine. La particule opsonisée se fixe alors à la surface du macrophage par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques. Par exemple, le récepteur Fc (FcR) ou les récepteurs du complément (CR) peuvent se lier respectivement au fragment constant des immunoglobulines ou aux molécules du complément adsorbées au niveau de la particule [32]. D'autres récepteurs peuvent jouer un rôle dans la phagocytose des nanoparticules comprennent les récepteurs du mannose/fructose (389, 390). L'interaction récepteur-ligand conduit à des cascades de signaux, qui entraînent un réarrangement de l'actine et la formation d'un phagosome. Le phagosome peut avoir différentes tailles en fonction de la taille des particules, qui peut aller de quelques centaines de nanomètres à des dizaines de microns (388). Des exemples ont été décrits avec des macrophages dérivés de moelle osseuse murine de près de 14 μm ingérant des billes de latex opsonisées IgG de plus de 20 μm de diamètre (391). Le phagosome et son contenu subissent une maturation à travers une série d'événements de fusion et de fission, qui conduisent au transfert des particules captées vers les endosomes tardifs et finalement les lysosomes pour former un phagolysosome, afin de dégrader les particules captées.

PARTIE 2.

RESULTATS

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

PARTIE 2.

RESULTATS

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

1. Résultat préliminaire.

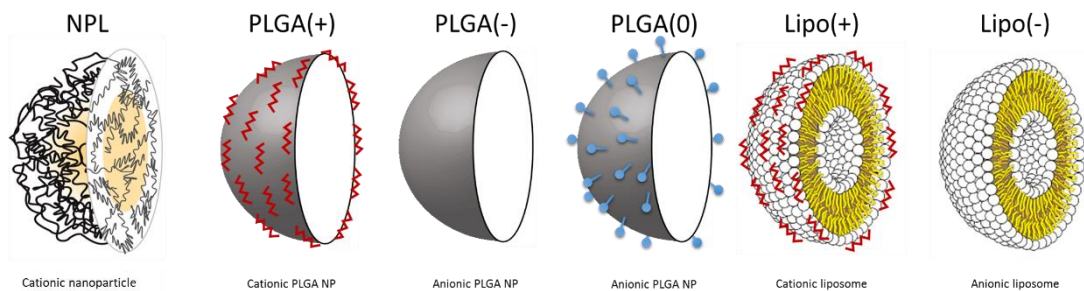


Figure 30 : Représentation des différentes nanoparticules synthétisées

Des résultats préliminaires nous ont permis de sélectionner le nanovecteur optimal pour la délivrance de curcumine, comme on peut le voir dans la figure 30, nous avons étudié 3 types de nanoparticules avec des charges de surfaces différentes. Ces différentes nanoparticules ont été associées à la curcumine, les formulations ont été caractérisées. Ensuite nous avons évalué comparé la capacité d'encapsulation de ces différentes formulations et enfin nous avons vérifié si la propriété antioxydante de la curcumine était préservé dans les formulations en délivrant ces formulations dans les cellules épithéliales intestinales Caco-2.

1.1. Synthèse et caractérisation des particules

<i>formulation</i>	<i>Hydrodynamic diameter (nm)</i>	<i>Zeta-potentiel (mV)</i>
<i>NPL (Cur)</i>	<i>65 / (69)</i>	<i>+37 / (+35)</i>
<i>PLGA+ (Cur)</i>	<i>100 / (109)</i>	<i>+35 / (+34)</i>
<i>PLGA- (Cur)</i>	<i>98 / (108)</i>	<i>-28 / (-25)</i>
<i>PEG PLGA (Cur)</i>	<i>112 / (110)</i>	<i>+2 / (+5)</i>
<i>Liposome+ (Cur)</i>	<i>56 / (60)</i>	<i>+29 / (+30)</i>
<i>Liposome- (Cur)</i>	<i>61 / (66)</i>	<i>-21 / (-28)</i>

Table 1 : Caractérisations des nanoparticules avant et après association à la curcumine

Les NPL ont été obtenues à partir de maltodextrine réticulée auxquelles on ajoute un cœur de phospholipides (DPPG), les NP obtenues ont un diamètre hydrodynamique moyen de 65 nm et une charge de surface de +37mV.

Les NPs de PLGA négatives (PLGA-) ont été synthétisées par nanoprécipitation et sans détergeant, et leur surface a été modifiée par ajout de chitosan (10%) pour produire des NPs de PLGA positives (PLGA+). Les diamètres moyens obtenus des PLGA- et des PLGA+ étaient de 98nm et 100nm respectivement. Le potentiel zêta était négatif pour les PLGA- (-28mV) et positif pour les PLGA+ (+35mV), confirmant l'association du chitosan à la surface de la particule. Les particules neutres ont été synthétisées à partir d'un copolymère de PLGA pegylé. Leur taille était similaire à celle des PLGA- et PLGA+ (112nm) et leur charge de surface était neutre (+2 mV) indiquant un recouvrement du PEG autour de la particule.

Les liposomes ont été synthétisés par injection éthanolique. Les liposomes anioniques (liposome-) étaient composés d'un mélange de DPPC et DPPG, et avaient un diamètre moyen de 61nm et un potentiel zêta de -21mV. Les liposomes cationiques (Liposome+) étaient composés de DPPC et de chitosan, et avaient un diamètre moyen de 56nm avec une charge de surface de +29mV, confirmant la présence du chitosan à la surface de la particule.

Ces NPs ont ensuite été associées à la curcumine. On observe sur la Table 1, que l'association à la curcumine n'a modifié ni la taille ni la charge électrique de surface des nanoparticules.

Nos formulations répondent à nos critères et sont valide pour la poursuite des expérimentations.

1.2. Efficacité d'encapsulation de la curcumine

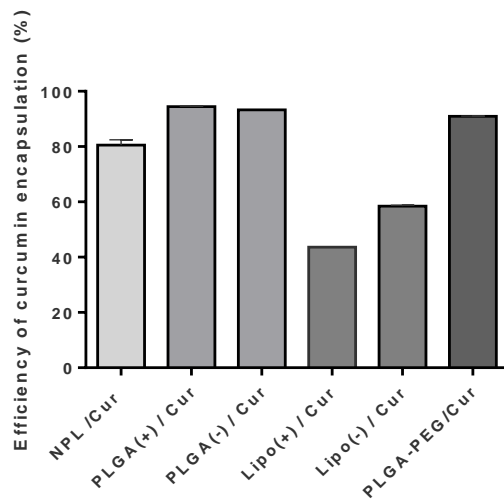


Figure 31 : Évaluation du taux d'encapsulation de la curcumine. La curcumine libre, non associée aux NPs, a été séparée par filtration. La quantité de curcumine dans le filtrat a été quantifiée par fluorimétrie (485/538 nm) en utilisant en parallèle une courbe standard de curcumine allant de 0,1 mg à 1 mg. Dans chaque nanoparticule, le pourcentage d'efficacité d'encapsulation (%EE) de curcumine a été calculé (n=3).

A la suite de la caractérisation, nous avons évalué le taux d'encapsulation de la curcumine pour chaque nanoparticule. Figure 31, les nanoparticules de PLGA présentent des taux dépassant les 90%, suivie des NPL à 80% puis des liposomes avec une efficacité d'association allant de 40% à 60%.

Après ce résultat nous avons décidé d'exclure les liposomes de nos expérimentations car ce sont les nanoparticules qui associent le plus faible taux de curcumine. Nous avons également exclus les PLGA car des données sur la délivrance de la curcumine ont démontré que pour un taux d'association sensiblement proche des NPL, les nanoparticules de PLGA sont très faiblement endocytosées par les cellules notamment les cellules épithéliales intestinales, ces données s'appuie sur des publications de notre laboratoire qui démontre qu'il existe une différence dans la vitesse d'endocytose entre ces deux nanoparticules. De plus nous n'avions pas observé la conservation des propriétés anti inflammatoire de la curcumine avec ces nanovecteurs.

Pour la suite de nos expérimentations nous avons concentrés nos recherches sur la délivrance de la curcumine associée à la nanoparticule poreuse de maltodextrine NPL.

1.3. Analyse de l'effet antioxydant de la curcumine

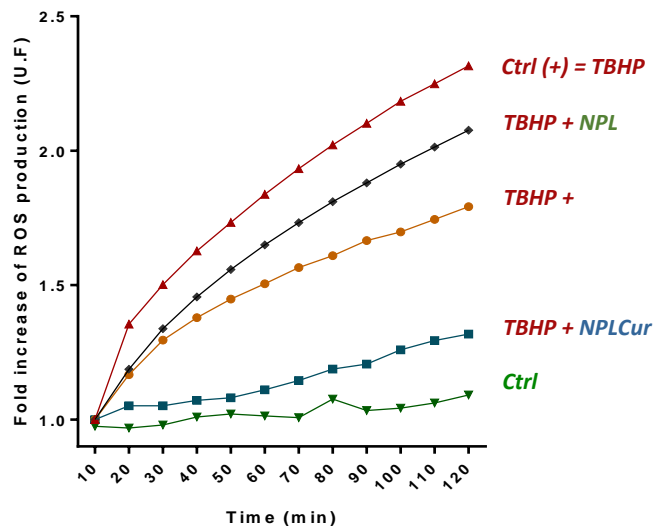


Figure 32 : Évaluation de l'effet antioxydant de la curcumine associée à la NPL. Les cellules Caco-2 ont été incubées avec du H2DCF-DA puis traitées avec du TBHP et de la curcumine libre ou associée au NPL à une concentration finale de 8 µg / ml. La fluorescence de la sonde H2DCF-DA a été mesurée pour quantifier l'induction des ROS. Le contrôle positif (+) correspond aux cellules traitées avec 100 µM de TBHP pour induire la valeur de production maximale de ROS et le contrôle négatif (-) étaient les cellules non traitées.

Après caractérisation et vérification du taux d'encapsulation, nous avons évalué si la curcumine associée à la NPL était fonctionnelle ou non, pour cela nous avons analysé le pouvoir antioxydant de la curcumine associée à la NPL en comparaison à la curcumine seule sur la lignée épithéliale intestinale Caco-2. Les cellules ont été incubées avec du TBHP qui induit la production de ROS et ceci en présence ou non de nos formulations : Curcumine seule ou des NPLCur à (8 µg / mL), durant 3 heures. Sur la figure 32, La formulation contenant des nanoparticules seules diminuent légèrement l'efficacité de l'induction des ROS par le TBHP, ceci peut s'expliquer par le fait que les nanoparticules peuvent encapsuler du TBHP et donc réduire sa toxicité. Le pouvoir antioxydant de la curcumine vectorisée est supérieur à celui de la curcumine seule, car on observe un effet dès les 20 premières minutes lorsque la curcumine est associée au NPL. Ces résultats démontrent que la curcumine délivrée dans les cellules était

toujours fonctionnelle. La vectorisation permet une meilleure délivrance ce qui impact directement l'activité antioxydante de la curcumine.

2. Article 1.

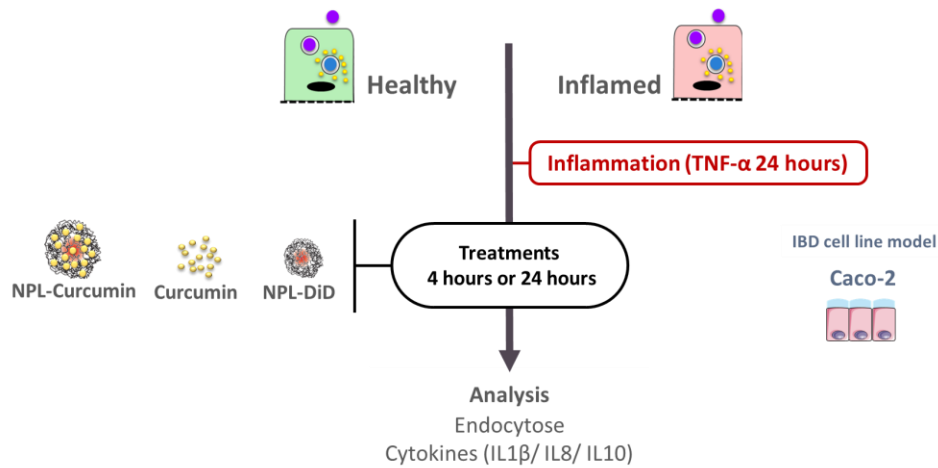


Figure 33 : Illustration générale des expérimentations

Dans cette première étude publiée dans le journal *International Journal of Pharmaceutics : X* nous avons pu mettre en évidence la capacité des NPL à délivrer de la curcumine dans les Caco-2 soumis à deux conditions saine ou inflammatoire. Nous avons ensuite comparé deux méthodes de résolution de cette inflammation, soit un modèle dit « early treatment » avec un traitement court de 4h, ou un modèle dit « late treatment » avec un traitement plus long de 24h en présence de l'agent inflammatoire comme indiqué sur la figure 33.

Les résultats font état d'une diminution des cytokines inflammatoire grâce à la formulation NPLCur, nous avons pu obtenir des effets comparables à ceux induit par le corticoïde de classe IV qu'est la dexaméthasone. De plus nous avons observé une stimulation de l'expression de la cytokine anti-inflammatoire IL10.

Nous avons ainsi démontré l'efficacité des NPL quant à leur rôle de vecteur.



Starch nanoparticles improve curcumin-induced production of anti-inflammatory cytokines in intestinal epithelial cells

Norhane Salah^a, Laurent Dubuquoy^a, Rodolphe Carpentier^{a,*}, Didier Betbeder^{a,b}

^a Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U1286 - INFINITE - Institute for Translational Research in Inflammation, F-59000 Lille, France

^b Vaxiano, 59000 Lille, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Nanoparticles
Delivery system
Curcumin
Bowel disease
Inflammation
Mucosal delivery

ABSTRACT

Inflammatory bowel disease (IBD), encompassing Crohn's disease and ulcerative colitis, is a long-term condition resulting from self-sustained intestinal inflammation. Curcumin (Cur), a powerful, naturally occurring antioxidant and anti-inflammatory polyphenol, has been investigated as a therapeutic for IBD, but its poor stability and low bioavailability limits its efficacy. We investigated the use of crosslinked starch nanocarrier (NPL) on the intracellular delivery and the anti-inflammatory efficiency of curcumin. Caco-2 epithelial cells were stimulated with TNF α for 24 h and the anti-inflammatory effects of NPL/Cur formulations were evaluated at the early stages of inflammation (4 h) or later, when fully established (24 h). NPL allowed the intracellular delivery of curcumin, which was enhanced in inflammatory cells, due to a modification of the endocytosis pathways. NPL/Cur decreased the secretion of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and IL-8 while increasing the anti-inflammatory cytokine IL-10. Finally, the inflammation-related opening of the tight junctions better allowed NPL/Cur to cross the epithelium by paracellular transport. This was confirmed by *ex vivo* analysis where NPL/Cur, administered to colonic explants from chemically-induced acute colitis mouse model, delivered curcumin deeper in the epithelium. To conclude, NPL/Cur formulation emphasizes the anti-inflammatory effects of curcumin and could constitute a therapeutic alternative in the management of IBD.

1. Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD) is a term commonly used to refer to Crohn's disease and ulcerative colitis, both characterized by a self-perpetuating inflammation of the intestinal epithelium. The incidence and prevalence of IBD are increasing (Hou et al., 2013), and the disease usually develops in patients between 25 and 30 years old (Siegel et al., 2017), with diagnosis according to precise clinical, endoscopic, radiologic and histological criteria.

Since the etiology of IBD remains unknown, these pathologies are generally experienced as chronic conditions, and medication has focused on resolving the inflammation state. During flare-ups, the first-line medical treatments target inflammation using non-steroidal anti-inflammatory drugs such as mesalazine (5-aminosalicylated acid - 5-ASA). Specifically, 5-ASA decreases inflammation by blocking cyclooxygenase (COX) activity and by inhibiting the production of the major pro-inflammatory mediators (IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF α) (Na and Moon, 2019). Other conventional treatments involve the use of immunosuppressant and biological agents (e.g. anti-TNF-monoclonal antibodies)

such as infliximab or adalimumab, which block inflammation mediators/promoters involved in the disease (Na and Moon, 2019).

However, despite a large therapeutic library, medication generally remains insufficient to completely cure the inflammation. Moreover, these drugs are expensive and exhibit severe side effects such as anemia, depression and insomnia, but also opportunistic bacterial infections, solid tumors and lymphomas (Shu et al., 2019).

To limit the side effects of current therapeutics and improve the compliance of patients, new therapeutic strategies need to be developed, including the use of natural products with anti-inflammatory properties (Bribi et al., 2016; Davatgaran-Taghypour et al., 2017; Mozaffari et al., 2014). Numerous studies have highlighted the natural anti-inflammatory and antioxidant activities of phytochemicals such as phenolic compounds and flavonoids. They have been shown *in vitro* to modulate the production of inflammatory mediators such as TNF α , IL-1 β , IL-10, IL-6, inducible nitric oxide (NO) synthase (iNOS), prostaglandinE2 (PGE-2) and cyclooxygenase 2 (COX2) (Aggarwal et al., 2013).

Curcumin (Cur; 1, 7-bis (4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1, 6-

* Corresponding author.

E-mail address: rodolphe.carpentier@univ-lille.fr (R. Carpentier).

<https://doi.org/10.1016/j.ijpx.2022.100114>

Received 8 December 2021; Received in revised form 21 February 2022; Accepted 5 March 2022

Available online 8 March 2022

2590-1567/© 2022 The Author(s).

Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

heptadiene-3, 5-Dione) is a hydrophobic polyphenol, the principal curcuminoid of turmeric, traditionally used as a Indian spice in south Asian cooking, and is known to have numerous biological functions (antioxidant, anti-microbial, anti-parasitic, anti-cancer and anti-inflammatory effects) (Kunnumakkara et al., 2017). These are mainly explained by the ability of curcumin to modulate NF- κ B, AP-1, c-Jun, Jak-STAT pathways (Aggarwal et al., 2003; Anand et al., 2008). Curcumin has been widely studied as a treatment for IBD and other diseases: clinical trials in humans demonstrated the safety and tolerability of curcumin (Epstein et al., 2010) and its efficacy as a chemo-protective agent (Shehzad et al., 2010) and an effective anti-inflammatory drug against ulcerative colitis (Hanai et al., 2006). However, several limitations were also observed in its clinical use after oral administration, mainly a low solubility in biological fluids resulting in a poor bioavailability, and a rapid metabolism resulting in limited plasma levels, much below its required therapeutic concentration (Pan et al., 1999; Sasaki et al., 2011).

An effective approach to treat IBD is the specific targeting of inflamed areas, in order to reduce systemic side effects and improve therapeutic efficacy, as local drug delivery results in higher drug concentrations in affected tissues, reduces histological degrees of inflammation, and enables better control of the disease (Grimpen and Pavli, 2010; Strojny et al., 2016).

In this regard, significant research has been conducted on new delivery systems that better target the gut and improve the protection of anti-inflammatory drugs against the digestive environment. The use of carriers provides many advantages, in particular to overcome the various biological barriers that limit access of the drug to the targets, and to improve the oral bioavailability of hydrophobic molecules such as curcumin (Grimpen and Pavli, 2010; Strojny et al., 2016). Moreover, the usefulness of curcumin associated with nanoparticles (NPs) has been reported in some pathologies such as skin disorders, cancer or wound healing (Kane et al., 2021; Vollono et al., 2019; Zhou et al., 2021).

Finally, NPs, depending on their composition, surface charge and physico-chemical properties, can passively accumulate at the sites of inflammation, taking advantage of the increased intestinal permeability (Tolstanova et al., 2012), which could enhance NPs uptake by infiltrating cells, and minimize systemic side effects (Lamprecht, 2010; Torchilin, 2014). In addition, due to their size, NPs can also penetrate deeply into the target tissue, which could be beneficial in particular for treatment of Crohn's disease.

In this sense, liposomal formulations, polymeric micelles or polymeric NPs are the most used vectors (Karthikeyan et al., 2021). Recently, liposomal formulations composed of lecithin and cholesterol were associated to Curcumin (5% drug loading and 90% encapsulation efficiency) to treat lung carcinoma. The formulations inhibited nuclear factor-kappaB (NF- κ B) pathway and downregulated relevant inflammatory factors as transforming growth factor- β (TGF- β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-8 (IL-8) (Shi et al., 2012). In another study, Xie X et al. produced biodegradable Curcumin-loaded PLGA (poly[lactic-co-glycolic acid]) NPs (5.75% drug loading and 91.96% encapsulation efficiency). The results indicated that PLGA NPs improved the oral bioavailability of Curcumin at 5.6-fold and had a longer half-life compared to free Curcumin. The authors thought that the improved oral bioavailability was associated with increased water solubility, higher release rate, inhibition of P-glycoprotein-mediated efflux (Betbeder et al., 2015) and increased residence time in the intestinal cavity (Xie et al., 2011). Noteworthy, these examples highlighted moderate drug loading which did not exceed 20% (Chen et al., 2020).

In this study, we attempted to develop a new nanoparticulated formulation that could efficiently help curcumin increasing its solubility and anti-inflammatory properties, as an alternative to current symptomatic treatments in IBD. We previously developed starch nanoparticles (hereafter called NPL) able to deliver proteins and biomolecules within airway epithelial cells (Dombu and Betbeder, 2013). They are composed of crosslinked and positively-charged

maltodextrin (α 1-4 D-Glucose polymer) with an inner core of anionic phospholipid (dipalmitoyl phosphatidylglycerol). NPL actively enter cells by endocytosis (Dombu et al., 2012), and due to their porous structure and lipophilic core, they are capable to be loaded with and to deliver hydrophobic molecules (Kroubi et al., 2010). Based on these findings, we hypothesized that NPL could deliver curcumin inside the epithelial cells in order to limit intestinal inflammation.

Here, in the context of IBD, we developed a formulation composed of NPL loaded with curcumin (NPL/Cur) to evaluate whether the anti-inflammatory activity of the curcumin is improved thanks to a better cellular delivery by NPL. We set up complementary models of "early" (4 h) and "late" (24 h) treatments of intestinal inflammation, to evaluate NPL/Cur anti-inflammatory properties against both a starting and an established inflammation. We first examined the ability of the NPL/Cur to deliver curcumin in the cells, for both models. The production of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, IL-8 and the anti-inflammatory cytokine IL-10 were analyzed in cells treated by NPL/Cur by enzyme linked immune sorbent assay (ELISA) tests. The transepithelial passage of NPL and curcumin were determined using transepithelial electrical resistance (TEER) and Lucifer Yellow (LY) assay. Finally, delivery of curcumin was performed *ex vivo* on murine colonic samples from healthy versus chemically-induced colitis.

2. Materials and methods

2.1. NPL synthesis, labeling and curcumin association

2.1.1. Synthesis of NPL

The porous and cationic starch nanoparticles NPL were synthesized according to the previously described methods (Paillard et al., 2010). The maltodextrin (Roquette, France) was dissolved in a 2 N sodium hydroxide solution with magnetic stirring at room temperature, then epichlorohydrin and glycidyl trimethyl ammonium chloride (Sigma-Aldrich, France) were added, leading to the formation of a cationic hydrogel. The gel was then neutralized with acetic acid and crushed by a high-pressure homogenizer (LM20-30 microfluidizer, Microfluidics, France). The nanoparticles obtained (NP⁺) were purified from oligosaccharides, low-molecular weight reagents and salts, by tangential flow ultra-filtration (Akta Flux6, GE Healthcare, France) using a 300 kDa cut-off hollow fiber. Finally, 70% (w:w) of dipalmitoyl-phosphatidylglycerol (DPPG, Lipoid, Germany) was incorporated into NP⁺ at 80 °C for 2 h and filtered through 0.2 μ m filter to obtain NPL nanoparticles.

2.1.2. Characterization of NPL and NPL/Cur formulations

The hydrodynamic diameter (Z-average) and the polydispersity index (PDI) of the nanoparticles and formulations was measured by dynamic light scattering (DLS, Zetasizer nanoZS, Malvern UK) at 25 °C, using 1 mg/mL NPL in an aqueous solution of 23 mM NaCl.

The zeta potential of the nanoparticles and formulations was measured by electrophoretic light scattering (ELS) at 25 °C, using NPL at 1 mg/mL in ultrapure water.

2.1.3. NPL labeling

Labeling the lipid part of NPL was performed by mixing NPL with a 1 mg/mL ethanolic solution of 1, 1'-dioctadecyl-3, 3', 3''-tetramethylindodicarbocyanine, 4-chlorobenzenesulfonatesalt (DiI, 1 mg/mL) at 0.7% w/w overnight at room temperature. The resulting NPL-DiI was purified by exclusion chromatography (PD-10 column Sephadex™ G-25, Sigma-Aldrich, France).

2.2. Formulation of Curcumin with NPL (NPL/Cur)

A 1 mg/mL curcumin (purity: 97%, lot n° KXGOG, Tokyo Chemical Industry, UK, Ltd. ®) solution in ethanol was mixed with NPL in a mass ratio of 1:1 under stirring during 2 h at room temperature. The resulting NPL/Cur were filtered through a 0.2 μ m filter and characterized as

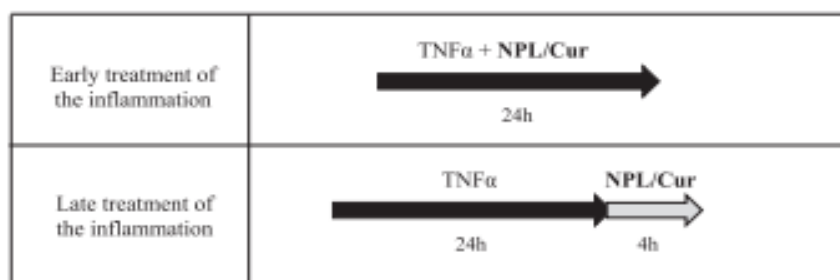


Fig. 1. Protocols developed as models for early and late treatments of the starting and established TNF α -induced inflammation.

Table 1

Characterization and encapsulation efficiency of free (NPL) and curcumin loaded (NPL/Cur) nanoparticles. The hydrodynamic diameter (Z-average, nm) and the polydispersity index (PDI) of nanoparticles were measured by dynamic light scattering while the zeta potential (mV) was measured by electrophoretic mobility. The encapsulation efficiency (EE) of curcumin into NPL was determined by separative filtration and expressed as a percentage of association over free curcumin. Analyses were measured in triplicate, and values represent the mean \pm SD.

	Hydrodynamic diameter (nm)	PDI	Zeta-potential (mV)	EE (%)
NPL	65 \pm 11	0.219	+37 \pm 8	–
NPL/Cur	69 \pm 14	0.204	+35 \pm 6	80

described in Section 2.1.2.

The free curcumin was separated by filtration using a 30 kDa membrane (NanoSep, Pall, France) at 10,000 g for 5 min at room temperature. The amount of curcumin in the filtrate was quantified by fluorimetry using the ex: 485 nm/em: 538 nm wavelengths, over a curcumin standard curve ranging from 0.1 mg to 1 mg. The encapsulation efficiency (EE) of Cur in NPL was calculated as follows:

$$(m_{\text{cur total}} - m_{\text{cur filtrate}} / m_{\text{cur total}}) \times 100 = \%EE \text{ of Cur loaded in NPL}$$

2.3. Cell culture and treatments

The human intestinal epithelial cell line Caco-2 (ATCC #HTB-37) was maintained in DMEM supplemented with 20% heat-inactivated fetal calf serum, 100 U/mL Penicillin, 100 mg/mL streptomycin and 1% L-glutamine at 37 °C in a humidified, 5% CO₂ atmosphere. Cells were seeded at a density of 1.0 \times 10⁵ cells per well or 5.0 \times 10⁴ for, respectively, 6-well plates (9.5 cm²) and 12-well plates (3.5 cm²) until confluence.

To study the treatment of the starting inflammation (early treatment), cells were treated with 10 ng/mL TNF α for 24 h, along with 8 μ g/mL NPL/Cur, to limit the progression of the inflammation.

To study the treatment of the established inflammation (late treatment), cells were treated with 10 ng/mL TNF α for 24 h to induce inflammation. Then the medium was renewed, and 8 μ g/mL NPL/Cur was added for 4 h.

The procedure is summarized on Fig. 1.

2.4. Characterization of NPL/Cur uptake by intestinal epithelial cells

The uptake of NPL and curcumin were evaluated using flow cytometry as previously described (Le et al., 2018).

Cells were washed twice with PBS and treated with 8 μ g/mL of NPL_{DID}, Cur or NPL_{DID}/Cur either for 4 h or for 24 h, in both early and late treatment conditions following the Fig. 1. Cells were then washed again with PBS, harvested using trypsin and suspended in PBS for flow

cytometry analysis.

To determine the uptake pathway of NPL/Cur, the cells were pre-incubated for 15 min at 37 °C with different endocytosis inhibitors: nystatin (20 μ g/mL), filipin (10 μ g/mL), chlorpromazine (CPZ, 10 μ g/mL), phenylarsine oxide (PAO, 1 μ g/mL), amiloride (23 μ g/mL). Then 8 μ g/mL NPL_{DID}/Cur were added for 30 min before collecting the cells using trypsin and measuring nanoparticle endocytosis by flow cytometry (CYAN ADP Analyzer, Beckman Coulter). In this way, triplicate analyses were performed on 5000 cells.

2.5. Influence of NPL/Cur on cytokine secretion

Cells were incubated for 4 h or for 24 h with 8 μ g/mL of NPL, Cur or NPL/Cur following the early and late treatment protocols in Fig. 1. The secretion of IL-1 β , IL-6, IL-8 and IL-10 were measured by ELISA in each supernatant. Dexamethasone (Dex) was used at 0.1 mM as an anti-inflammatory positive control. The detection ranges of the ELISA kits (Invitrogen, France) were between 2 and 300 pg/mL.

2.6. Transcytosis of NPL/Cur on Caco-2 cells

Transcytosis of NPL/Cur was evaluated as previously described (Bernocchi et al., 2016). Caco-2 cells were seeded on Transwell® filters (3 μ m porosity Transwell® filters, BD Bioscience, France) at a density of 1 \times 10⁵ cells/Transwell® (0.9 cm²), in order to reproduce an intestinal epithelial barrier. Medium was changed every other day until confluence, which was checked by TEER measurement with an epithelial Volt/ Ω meter (EVOM2, World Precision Instrument, USA, equipped with an STX2 electrode). The cells were pre-incubated with Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Life Technologies, France) during 30 min at 37 °C before measuring the permeability. As a positive control for the tight junction (TJ) opening, 50 μ g/mL of a low molecular weight chitosan (CS; Sigma-Aldrich, France, 5 mg/mL at pH 6.5) was used, and a 50 μ g/mL solution of lucifer yellow (Sigma-Aldrich, France) was added as control for paracellular and transcellular transports.

Cell monolayers were treated with 8 μ g/mL of NPL_{DID}, NPL/Cur, or Cur. The TEER was checked after 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h and 24 h. The samples from the apical side and basolateral side were collected separately and the fluorescence was measured with a Fluoroskan Ascent™ Microplate Fluorometer (Thermo Scientific, France) using the following filters: NPL_{DID} λ_{ex} :633 nm/ λ_{em} :670 nm; Cur λ_{ex} :485 nm/ λ_{em} :538 nm.

2.7. Ex vivo uptake of NPL/Cur by colonic cells from Balb/c mice

Colonic segments of 1 cm from Balb/c mice, aged between 6 and 8 weeks, were collected. Tissues came from unused organs from animal experiments performed in accordance with the guidelines for animal experimentation (EU Directive 2010/63/EU), with a protocol approved by the local ethics review board (Nord-Pas-de-Calais CEEA N°75, Lille, France). Healthy mice were compared with mice suffering from Dextran Sulfate Sodium (DSS)-induced colitis. The inflammation of the colon was assessed by morphological observations (colon retraction and bowel

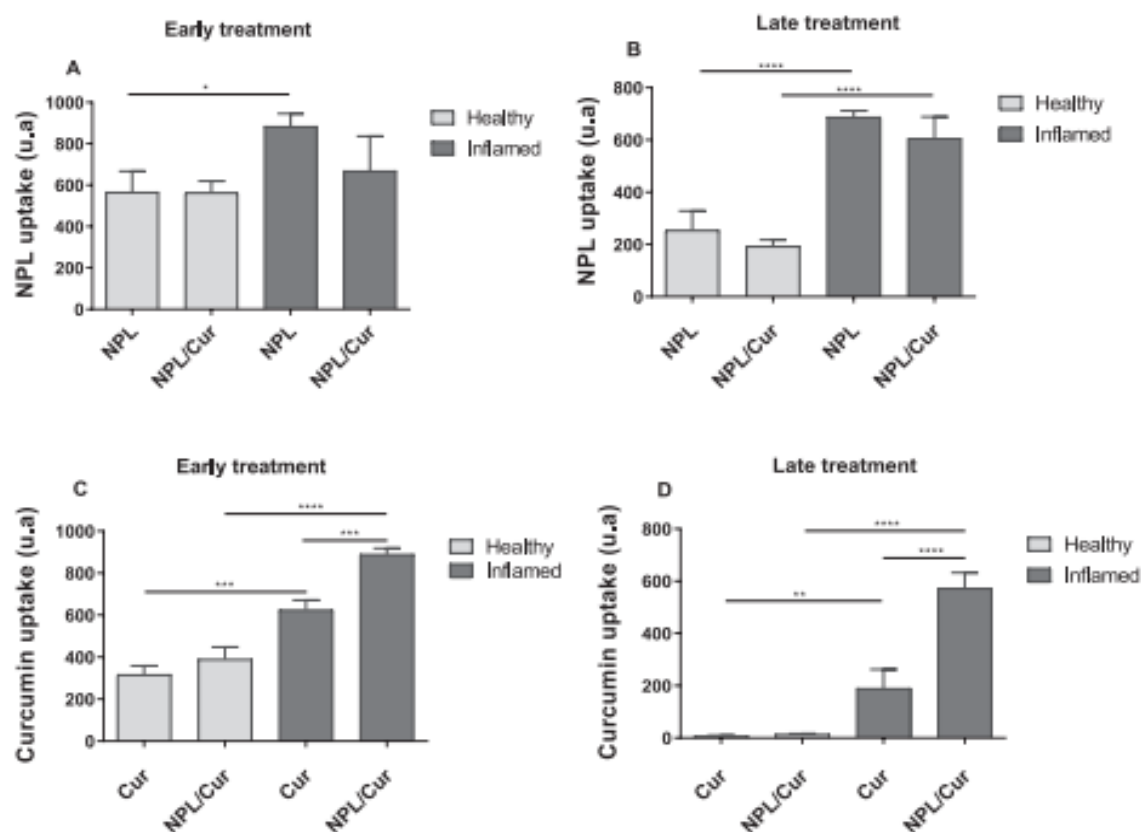


Fig. 2. Endocytosis of NPL and curcumin. The intracellular amount of NPL in non-inflamed (“healthy”, light gray) or inflamed (dark gray) cells was analyzed by flow cytometry in the early 4 h (A) versus late 24 h (B) treatment conditions, using 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NPL or NPL/Cur. In a similar manner, the intracellular amount of curcumin, free- or NPL-associated, in the early (C) versus late (D) treatment conditions was measured. The analyses were performed in triplicate and values represent the mean \pm SD of the mean fluorescence intensities based on a minimum of 5000 gated events. The significance of the statistical test is indicated as follow: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Table 2

Endocytosis inhibitors used in this study. The final concentration and the targeted endocytosis pathways are indicated.

Inhibitors Final	Concentration	Endocytosis pathway
Nystatin	20 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Caveolae
Filipin	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Caveolae
Chlorpromazine (CPZ)	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Clathrin
Phenylarsine oxide (PAO)	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Clathrin
Amiloride	23 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Macropinocytosis

wall thickening) and clinical signs (loss weight, bloody stools, and diarrhea).

Segments were incubated for 4 h at 37 °C in HBSS buffer, and intraluminal instillations of Cur or NPL/Cur (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were performed with a 32G needle. Tissues were then twice washed with PBS, fixed for 30 min with 4% paraformaldehyde at 4 °C, and frozen in Optimal cutting temperature (OCT) matrix (Sakura® Finetek, USA), after which 15 μm slices were obtained using a cryostat (Leica® CM3050 S). Nuclei were stained with Hoechst 33342 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and mounted with Fluoroshield™ (Merck Millipore, France), allowing visualization on a Zeiss LSM710 confocal microscope (Zeiss, France).

2.8. Statistical analysis

The results are represented as the mean \pm standard deviation of at least 3 independent experiments and the analysis of variance was done

using suitable ANOVA tests for each experiment.

3. Results

3.1. Characterization of the curcumin-nanoparticle formulation (NPL/Cur)

NPL are composed of a crosslinked maltodextrin shell with a core of phospholipids (DPPG). The NPL had an average hydrodynamic diameter of 65 nm and their PDI was 0.219. Moreover, they had a surface charge of +37 mV, which is important for their cell uptake and colloidal stability. The NPL/Cur formulation was made by adding equal amount of Curcumin (1 mg/mL) to NPL (1 mg/mL) leading to a 1:1 mass ratio formulation. The incorporation of curcumin by the NPL did not alter their size. The unaltered zeta potential of the NPL/Cur relative to NPL confirmed that the curcumin was associated with the lipid core of NPL, and not merely bound to their surface.

The efficiency of the curcumin encapsulation by the NPL, quantified by fluorimetry, was 80% (Table 1), and no curcumin release was measured in solution for at least 2 weeks of storage time. We thereby demonstrated that the curcumin was correctly associated with the lipid core of the NPL.

3.2. NPL/Cur uptake by caco-2 cells

To reproduce inflammatory conditions *in vitro*, cells were stimulated with 10 ng/mL of TNF α for 24 h at 37 °C.

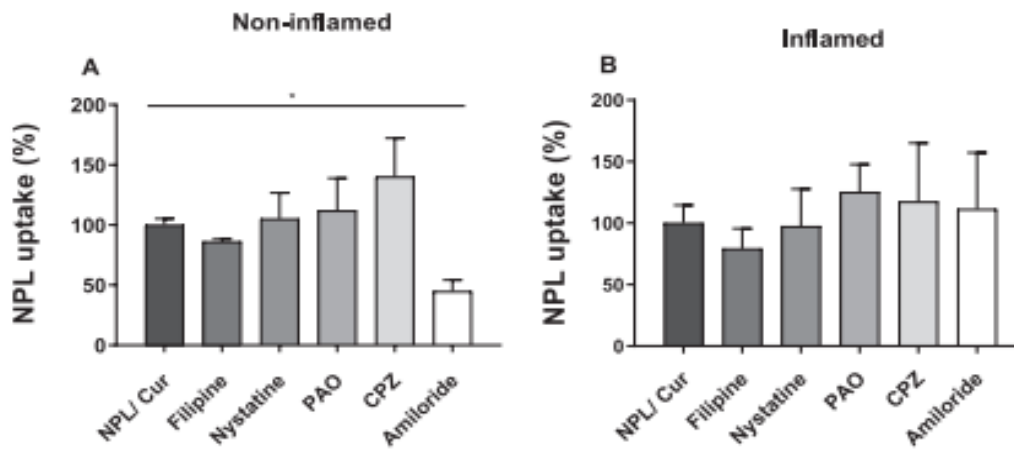


Fig. 3. Mechanisms of endocytosis of NPL/Cur in Caco-2 cells. Untreated, non-inflamed (A), or 24 h TNF α -induced inflamed (B) cells were treated with endocytosis pathway inhibitors for 15 min then 8 μ g/mL NPL_{DOD}/Cur were added to cells for 30 min at 37 $^{\circ}$ C. Cells were then washed and immediately analyzed by flow cytometry. Data represent the mean fluorescence intensity \pm SD ($n = 3$) and cells not treated with inhibitors were set to 100% uptake. The significance of the statistical test is indicated as follow: * $p < 0.05$.

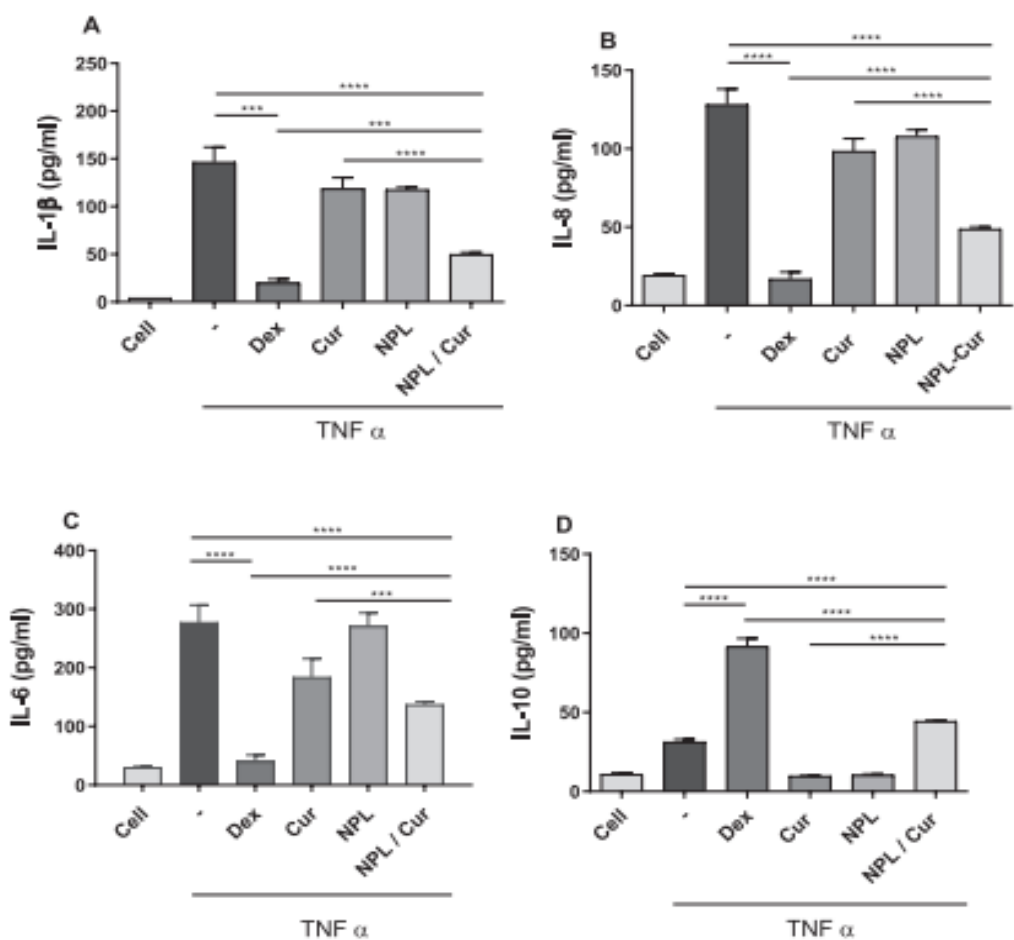


Fig. 4. Cytokine production in early treatment of inflamed Caco-2 cells. Cells were concomitantly stimulated with 10 ng/mL of TNF α and treated with either 8 μ g/mL of NPL, Curcumin (Cur) or NPL/Cur during 24 h. The concentration of IL-1 β (A), IL-8 (B), IL-6 (C) and IL-10 (D) cytokines in the supernatant was measured by ELISA. Values are expressed in pg/mL and represent the mean \pm SD of triplicate analyses. The significance of the ANOVA statistical test is indicated as follow: *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Treatments with NPL, Cur or NPL/Cur were performed following two schemes: either during the presence of TNF α , to limit the progression of the inflammatory state (early treatment), or for 4 h after the TNF α -induced inflammation, to resolve an established inflammation (late treatment).

We first examined the influence of the inflammatory state on the endocytosis of NPL alone. In cells with an early treatment, a 1.56-fold

increase of NPL uptake was observed compared to the healthy conditions (Fig. 2A). There was nevertheless an observable difference in cells with a late treatment, with a 2.7-fold increase of NPL uptake between healthy and inflamed conditions (Fig. 2B). The association of curcumin into NPL did not change this increase (x3.1).

Thereafter, the efficiency of curcumin delivery was examined. In the early treatment conditions, a significant increase of the NPL/Cur

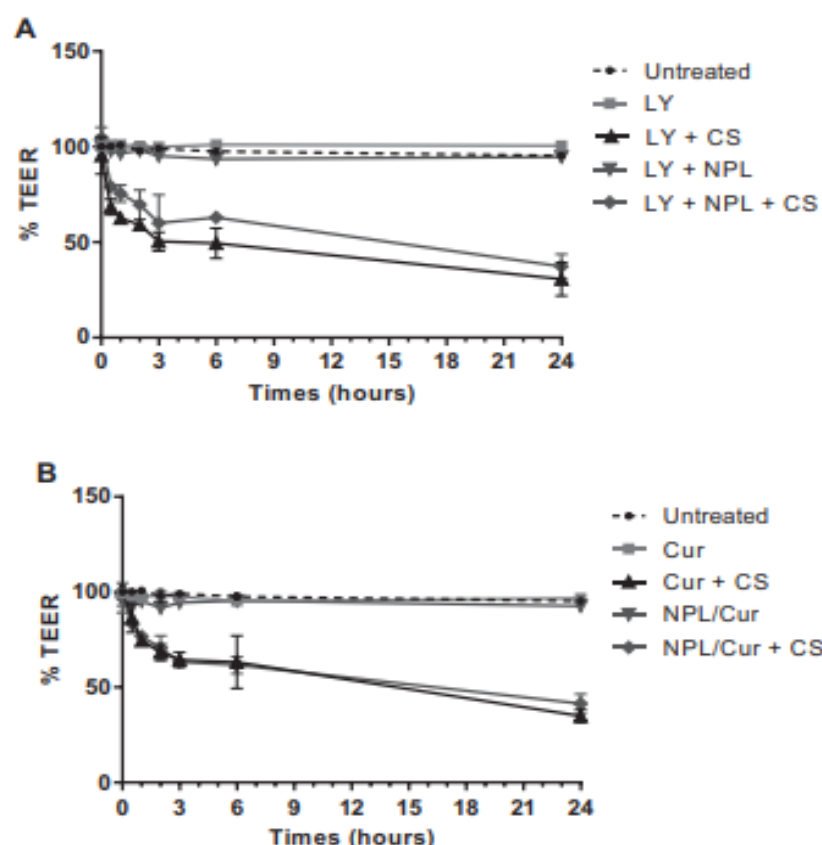


Fig. 6. Evaluation of tight junction opening in caco-2 cells at confluence. Cells were treated or not with chitosan (CS) (0.05% w/v) to loosen the epithelial junctions, and the influence of 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of NPL (A), curcumin or NPL/Cur (B) on the trans-epithelial electrical resistance (TEER) was evaluated. T0 is set to 100% and values represent the mean \pm SD of triplicate analyses expressed as a percentage of the initial TEER value. Lucifer Yellow (LY) was used as a passive tracker of the transepithelial passage. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

NPL/Cur significantly increased its production (Fig. 5D).

3.5. Transcytosis and paracellular passage of NPL/Cur across Caco-2 epithelial barrier

Inflammation is a multicellular process involving epithelial, sub-epithelial, endothelial and circulating cells. To determine whether the NPL/Cur can cross an intestinal epithelium and resolve sub-epithelial inflammation, a Caco-2 model of epithelial barrier was established and the ability of NPL to deliver curcumin across the epithelial barrier was evaluated.

The Caco-2 cells were cultured on Transwell® filters until the cells reached confluence with a TEER value in the range of 350–450 $\Omega\cdot\text{cm}^{-2}$. CS was used as positive control for the opening of the tight junctions (TJ), a mechanism mediated by integrin relaxation (Hsu et al., 2012; Hsu et al., 2013). Lucifer Yellow (LY) was used as a tracker of the transcytosis and paracellular passage. Treatment with CS exhibited a TEER reduction of 60% confirming tight junction opening. The LY and NPL had no effect on the TEER value, on either untreated or chitosan-treated epithelial barrier (Fig. 6A), neither did free curcumin or NPL-associated curcumin (Fig. 6B). This confirmed that this model was suitable for studying the trans-epithelial passage of curcumin.

To analyze the permeability of the epithelial barrier, the transport of LY across the intestinal epithelial barrier was assessed in parallel to the TEER measurements (Fig. 7). Without CS, the transcytosis of LY increased for 24 h (x2.68 between 0.5 h and 24 h), and as expected, a higher permeation was observed when the tight junctions were opened (x3.96 between 0.5 h and 24 h). The NPL did not modify the permeation of LY in presence or in absence of CS (Fig. 7A) which was consistent with TEER data (Fig. 6A).

We then examined the permeation of NPL across the epithelial barrier. Without CS, the transcytosis of NPL increased for 24 h (x3.58 between 0.5 h and 24 h), as depicted by the progressive increase of NPL amount in the basal compartment. CS increased this permeation (x7.61 between 0.5 h and 24 h). After 24 h, CS allowed a significant higher dose of NPL to cross the barrier, by a ratio of x2.9 (Fig. 7B). We noticed that the Curcumin did not alter the behavior of the NPL after 24 h of CS treatment (x2.6).

Finally, we analyzed if the permeation of curcumin was modified when associated to the NPL. Without CS, no difference of curcumin transcytosis was observed whether free or associated to NPL. However, CS increased both curcumin and NPL/Cur permeations after 1 h, with a higher and faster permeation of NPL-associated Cur than the free molecule. This was particularly obvious after 4 h and 6 h where a 2-fold and a 1.3-fold increase were respectively observed between these conditions (Fig. 7C). This indicated that the NPL/Cur increased curcumin delivery across a loosened epithelial barrier.

3.6. Ex vivo study of NPL/Cur uptake by colonic cells of Balb/c mice

Since NPL were shown to effectively deliver Cur across an epithelial barrier with loosened tight junctions (Fig. 7), we examined the capacity of NPL/Cur to be taken up by colonic cells in DSS-induced colitis mice. Colonic explants were treated with free curcumin or NPL/Cur, and the presence of curcumin was analyzed by confocal microscopy (Fig. 8). DSS induced severe inflammation of the colon, confirmed by a thickened wall gut, a shorter colon, and weight loss (data not shown). Free curcumin slightly diffused across healthy epithelium but its association with the nanocarrier in the NPL/Cur allowed a deeper delivery. Moreover, NPL delivered Cur even better in DSS-damaged epithelium,

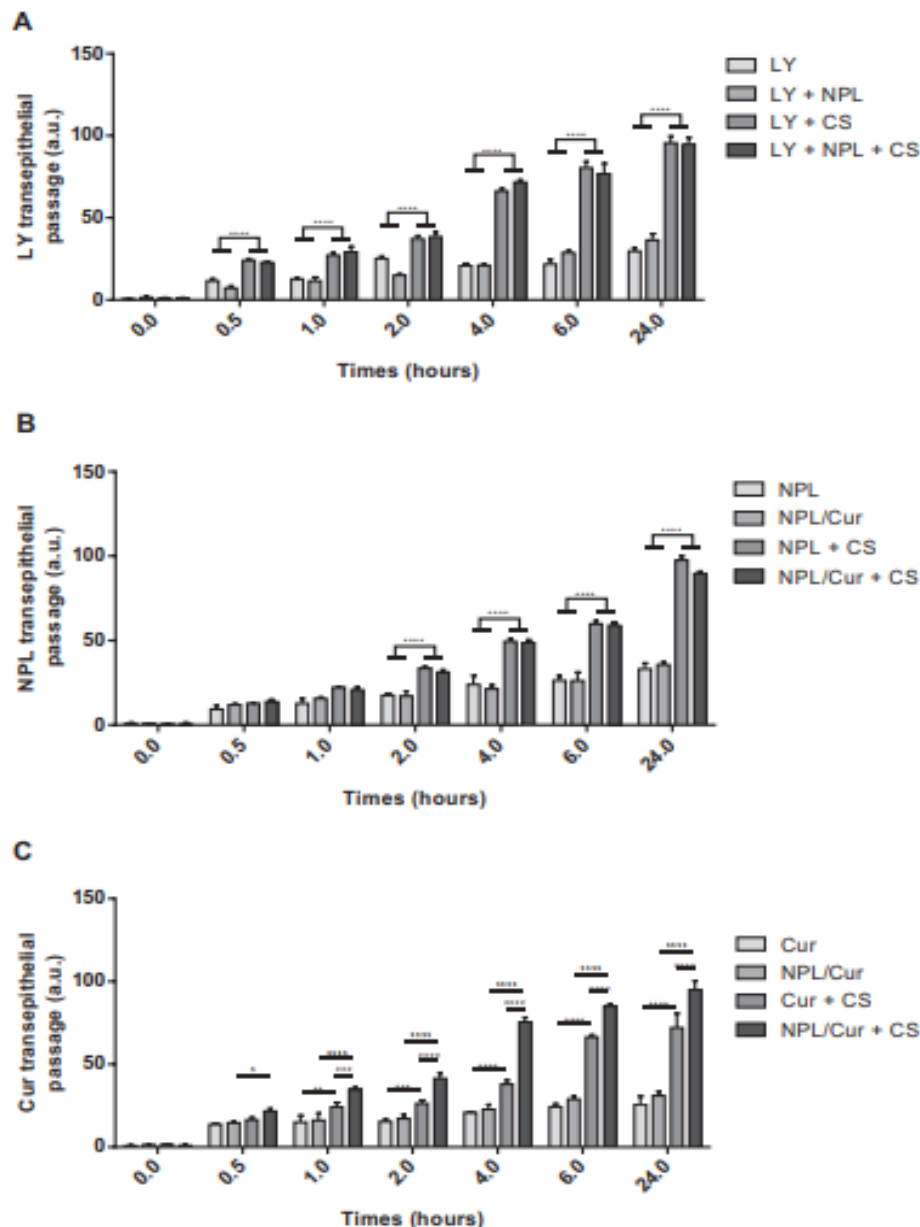


Fig. 7. Evaluation of the trans-epithelial passage of NPL/Cur in Caco-2 at confluence. **A)** Passage of the tracker Lucifer Yellow (LY): cells were treated with LY and influence of NPL in presence or absence of chitosan (CS) was shown. **B)** Passage of the NPL labelled with DiD: cells were treated with 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of NPL_{DiD} or NPL_{DiD}/Cur in presence or not of CS. **C)** Passage of free or NPL-associated curcumin: cells were treated with 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of curcumin or NPL/Cur, in the presence or not of CS. Results are expressed as the means \pm SD of triplicate measurements. Different symbols are used for clarity of the statistical ANOVA significance in C. The number of *, # or \$ symbols represent the *p* value: * *p* < 0.05, ** *p* < 0.01, ****p* < 0.001, *****p* < 0.0001. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

consistent with the *in vitro* permeation results (Fig. 7). NPL increased the curcumin bioavailability in the gut wall and thus could be considered as a good nanocarrier candidate to deliver curcumin to epithelial cells of an inflammatory gut.

4. Discussion

Curcumin exerts pleiotropic activities such as antioxidant, anti-carcinogenic and anti-infectious effects, all based upon the regulation of a large number of cellular signaling pathways (Calabrese et al., 2008). However, its poor solubility in biological fluid and its high rate of metabolism limit its potential clinical use. Nanomedicine as drug carrier and delivery system could overcome these limitations (Kumar et al., 2012). In the context of IBD promising results were already obtained with 5-ASA, corticosteroids, immunosuppressants or siRNA

loaded in various NPs (Nunes et al., 2019; Taghipour et al., 2018). However, the clinical use of this strategy is still under evaluation.

In this study, we investigated the ability of the NPL nanocarrier, a crosslinked maltodextrin shell with a phospholipid core (Dombu et al., 2012), to deliver curcumin directly into inflamed intestinal epithelial cells and the anti-inflammatory effects of the NPL/Cur formulations.

In an inflammatory context, the electrical charge of the intestinal epithelial surface is perturbed, and the overall charge at the cells' surface becomes mainly cationic (Zhang et al., 2015). From this starting point, much research has focused on the use of anionic or neutral nanoparticles, aiming to increase their adhesion and epithelial residence time. Thus, it is important to state that, while the surface charge of the NPL is cationic, they behave as unique nanocarriers thanks to their anionic lipid core. Moreover, mucus production is increased in IBD, requiring nanoparticles that can penetrate and diffuse through the

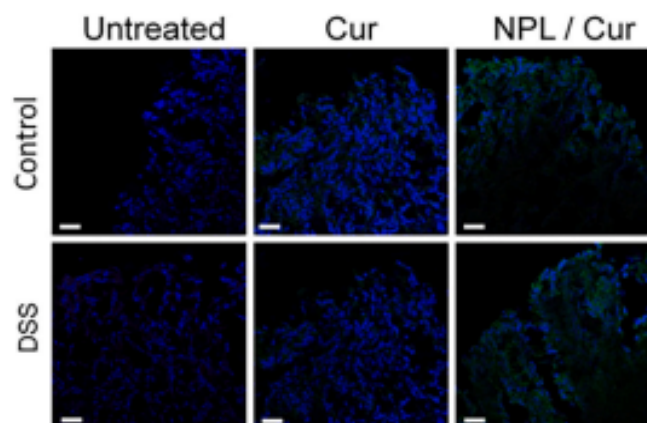


Fig. 8. Uptake of NPL/Cur into colonic explant in untreated versus DSS-induced colitis mice. Curcumin or NPL/Cur (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were incubated for 4 h in the lumen of colonic explants and curcumin was visualized by confocal microscopy. Nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue) while intrinsic curcumin fluorescence is shown in green. Scale bar = 50 μm . (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

mucus, which is the case for NPL (Murgia et al., 2018). Hence, the NPL combine three potential advantages for drug delivery in the context of IBD: (i) NPL are muco-penetrating nanocarriers, thanks to their size below 100 nm (here 65 nm, Table 1) and their phospholipid core (Fasquelle et al., 2020); (ii) they quickly interact and penetrate cells, due to their highly cationic surface charge (here +35 mV) (Le et al., 2018); (iii) they were proved to associate and deliver hydrophobic drugs (Kroubi et al., 2010). They can also protect a drug from oxidation, as shown for the anti-parasitic diminazene (Kroubi et al., 2010), which is a particular advantage when using curcumin (Betbeder et al., 2015). Thus, NPL are good candidates for curcumin cell delivery compared to other systems that only focus on increasing the drugs residence time in the epithelium's surface (Kumar et al., 2012).

The association of curcumin in NPL did not modify either the size or the zeta potential of the nanocarrier (Table 1), indicating an association between the curcumin and the phospholipids in the NPL core, as already described for diminazene and proteins (Bernocchi et al., 2016; Kroubi et al., 2010). Moreover, as a highly lipophilic molecule, hydrophobic interactions associated curcumin to the lipid core of the NPL; this latter being stably incorporated to the shell as previously demonstrated (Paillard et al., 2010), and explaining that no curcumin release is observed.

In the case of IBD, the inflammation state appears progressively, is continuous and self-sustaining (Luther and Dave, 2020). Rapid and efficient drug delivery would therefore be of interest to break this vicious circle. However, mimicking IBD *in vitro* is not possible and only specific features of inflammation can be reproduced. Here, we stimulated Caco-2 cells with TNF α to induce an inflammatory state, validated by measuring the secretion of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and IL-8 (Figs. 4 and 5). Treatments with anti-inflammatory compounds can either counteract or resolve the inflammation. In this regard, two protocols were examined, using NPL/Cur either in the early (during the TNF α -induced inflammation), or in the late (after the TNF α stimulation) steps of inflammation. In inflamed cells, we observed an increase of the NPL endocytosis leading to a better delivery of curcumin, compared with non-inflamed cells (Fig. 2). Under non-inflamed conditions macropinocytosis was the preferred endocytosis pathway for NPL (Fig. 3), while it was clathrin-, caveolae- and macropinocytosis-independent in inflamed conditions (Fig. 3), indicating a modification of the endocytosis mechanisms. We could hypothesize that nanoparticles use the flotillin pathway as an alternative, since its expression

is abundant in inflamed enterocytes (Gauss et al., 2013).

Inflammatory cytokines and COX-2 are essential mediators of inflammation, and are known to be upregulated in IBD (Aggarwal et al., 2013; Singer et al., 1998). For instance, the excessive generation of IL-1 β increases intestinal permeability, promoting activation of dendritic cells and macrophages (Al-Sadi and Ma, 2007; Al-Sadi et al., 2012; Coccia et al., 2012) and leading to acute and chronic inflammation (Halle et al., 2008; Larsen et al., 2009). Phytochemicals with anti-inflammatory and antioxidant activities have thus been studied in the management of IBD, as they can modulate various inflammatory mediators such as IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF α , PGE-2, iNOS, and COX-2 (Davatgaran-Taghipour et al., 2017; Zhang et al., 2016). We thus focused our study of the anti-inflammatory effects of curcumin, either free or delivered by the NPL, on the secretion of IL-1 β , IL-6, IL-8 and IL-10 (Aggarwal et al., 2003). While neither curcumin alone nor NPL/Cur could reduce the secretion of the pro-inflammatory cytokines, NPL/Cur efficiently inhibited their expression (Figs. 4 and 5). On the contrary, IL-10 secretion was solely upregulated by NPL/Cur, despite the TNF α -induced inflammation. This proved that the NPL nanocarrier plays a key role in boosting the anti-inflammatory effects of curcumin. The mechanisms probably rely on the curcumin encapsulation which increases its solubility in biological fluids (Jurenka, 2009), and on the delivery of curcumin in cells (Le et al., 2019), (Fig. 2).

During a flare up of IBD inflammation, the epithelial barrier is damaged which induces disruption, or even the rupture, of the TJ. Here, we used chitosan, a cationic polysaccharide, to open the TJ (Chen et al., 2011). The initial aperture of epithelial TJ is thinner than 1 nm whereas chitosan can enlarge it to 150 nm, sufficient to allow the passage nanoparticles ≤ 50 nm across a Caco-2 cell monolayer (Lin et al., 2007). Here, the TJ opening allowed the passage of curcumin, NPL and NPL/Cur, (Figs. 6 and 7). However, this effect might be cell-type dependent as shown previously in airway epithelial cells (Bernocchi et al., 2016).

To better assess the NPL/Cur delivery in an inflamed intestine, an *ex vivo* murine colonic explant from a DSS-induced inflammation model was used. After 4 h of treatment, Cur was detected within the intestinal wall, not merely in the superficial layers of epithelial cells (Fig. 8). This supported the previous observation that NPL can cross a loosened intestinal epithelium (Fig. 7). This suggests that in IBD, NPL/Cur could also reach the subepithelial tissue and deliver curcumin to epithelial-associated immune cells, themselves implicated in the duration of the inflammation (eg. macrophages or dendritic cells).

5. Conclusion

Despite promising experimental evidence, clinical trials involving curcumin have failed to generate convincing results. Indeed, its therapeutic use could be either as a dietary supplement or a preventive treatment, or in association with other treatments (Iqbal et al., 2018). Owing to its low bioavailability and chemical instability when taken in free form, curcumin is an ideal candidate when loaded in delivery systems such as nanoparticles (Betbeder et al., 2015). Our results describe an easily scalable NPL/Cur nanoparticulated formulation. By encapsulating curcumin, NPL increased the intracellular drug delivery. This led to a boosted anti-inflammatory effect, evidenced by the downregulation of pro-inflammatory cytokines and the up-regulation of anti-inflammatory IL-10. This suggests that an adequate nanoparticulated formulation can actually help curcumin to be used as an efficient anti-inflammatory drug. NPL/Cur formulation described here needs to be further investigated to elucidate the exact mechanisms of the NPL-dependent, anti-inflammatory effects of curcumin, and to establish its efficiency *in vivo* on IBD induced animal models.

CRediT authorship contribution statement

Norhane Salah: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Laurent**

Dubuquoy: Funding acquisition, Writing – original draft. **Rodolphe Carpentier:** Conceptualization, Methodology, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Didier Betbeder:** Conceptualization, Funding acquisition, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Declaration of Competing Interest

D.B. is C.E.O and C.S.O of Vaxinano SAS.

Acknowledgment

The authors would like to thank Meryem Tardivel, Antonino Bon-giovanni and Nathalie Jouy from the Flow core and Imaging facilities of Plateformes Lilloises en Biologie et Santé (PLBS) - UMS 2014 - US 41 (Lille, France) for their technical assistance. We are also grateful to Dr. Mathilde Body-Malapel and Pr Guillaume Garçon (University of Lille, France) for their support in the *ex vivo* experiments. We are finally grateful to Dr. Mike Howsam for critical proofreading. This work was performed with the support of the University of Lille, INSERM, the CHU Lille, and Vaxinano.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijphx.2022.100114>.

References

Aggarwal, B.B., Kumar, A., Bharti, A.C., 2003. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 23 (1A), 363–398.

Aggarwal, B.B., Gupta, S.C., Sung, B., 2013. Curcumin: an orally bioavailable blocker of TNF and other pro-inflammatory biomarkers. *Br. J. Pharmacol.* 169 (8), 1672–1692.

Al-Sadi, R.M., Ma, T.Y., 2007. IL-1beta causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J. Immunol.* 178 (7), 4641–4649.

Al-Sadi, R., Guo, S., Dokladny, K., Smith, M.A., Ye, D., Kaza, A., et al., 2012. Mechanism of interleukin-1beta induced-increase in mouse intestinal permeability *in vivo*. *J. Interferon Cytokine Res.* 32 (10), 474–484.

Anand, P., Thomas, S.G., Kunnusankaran, A.B., Sunderam, C., Hanikumar, K.B., Sung, B., et al., 2008. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. *Biochem. Pharmacol.* 76 (11), 1590–1611.

Bernocchi, B., Carpentier, R., Lantier, I., Ducourneau, C., Dimier-Poisson, I., Betbeder, D., 2016. Mechanisms allowing protein delivery in nasal mucosa using NPL nanoparticles. *J. Control. Release.* 232, 42–50.

Betbeder, D., Lipka, E., Howsam, M., Carpentier, R., 2015. Evolution of availability of curcumin inside poly-lactide-co-glycolic acid nanoparticles: impact on antioxidant and antiinflammatory properties. *Int. J. Nanomedicine* 10, 5355–5366.

Brihi, N., Algieri, F., Rodriguez-Nogales, A., Vezza, T., Garrido-Mesa, J., Utrilla, M.P., et al., 2016. Intestinal anti-inflammatory effects of total alkaloid extract from *Fumaria caperolata* in the DNBS model of mice colitis and intestinal epithelial CMT93 cells. *Phytother.* 23 (9), 901–913.

Calabrese, V., Bates, T.E., Mancuso, C., Cornelius, C., Vestrimiglia, B., Cambisa, M.T., et al., 2008. Curcumin and the cellular stress response in free radical-related diseases. *Mol. Nutr. Food Res.* 52 (9), 1062–1073.

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 (36), 9826–9838.

Chen, Y., Lu, Y., Liu, R.J., Xiang, G., 2020. Nano encapsulated curcumin: and its potential for biomedical applications. *Int. J. Nanomedicine* 15, 3099–3120.

Cocrea, M., Harrison, O.J., Schörling, C., Asquith, M.J., Becher, B., Powrie, F., et al., 2012. IL-1beta mediates chronic intestinal inflammation by promoting the accumulation of IL-17A-secreting innate lymphoid cells and CD4(+) Th17 cells. *J. Exp. Med.* 209 (9), 1595–1609.

Davutyan-Yaghiipour, Y., Masoomzadeh, S., Farzati, M.H., Bahrami-Soltani, R., Karimi-Souresh, Z., Rahimi, R., et al., 2017. Polyphenol nanoformulations for cancer therapy: experimental evidence and clinical perspective. *Int. J. Nanomedicine* 12, 2689–2702.

Dumba, C.V., Betbeder, D., 2013. Airway delivery of peptides and proteins using nanoparticles. *Biomaterials* 34 (2), 516–525.

Dumba, C., Carpentier, R., Betbeder, D., 2012. Influence of surface charge and inner composition of nanoparticles on intracellular delivery of proteins in airway epithelial cells. *Biomaterials* 33 (35), 9117–9126.

Epstein, J., Sanderson, I.R., Macdonald, T.T., 2010. Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from *in vitro*, animal and human studies. *Br. J. Nutr.* 103 (11), 1545–1557.

Fauquelle, F., Carpentier, R., Demoussaux, B., Desseyn, J.-L., Betbeder, D., 2020. Importance of the phospholipid core for mucin hydrogel penetration and mucosal cell uptake of maltodextrin nanoparticles. *ACS Appl. Bio. Mater.* 3 (9), 5741–5749.

Gauss, A., Buchholz, I., Zahr, A., Schmitz, G., Stremmel, W., Fuellekrug, J., et al., 2013. Flotillin-2 expression in the human gut: from a cell model to human tissue in health and inflammatory bowel diseases. *Int. J. Med. Sci.* 10 (10), 1259–1270.

Grimpén, F., Pavli, P., 2010. Advances in the management of inflammatory bowel disease. *Intern. Med. J.* 40 (4), 258–264.

Halle, A., Hornung, V., Petraldi, G.C., Stewart, C.R., Moos, B.G., Reinheckel, T., et al., 2008. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat. Immunol.* 9 (8), 857–865.

Hansi, H., Iida, T., Takeuchi, K., Watanabe, F., Maruyama, Y., Andoh, A., et al., 2006. Curcumin maintenance therapy for ulcerative colitis: randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 4 (12), 1502–1506.

Hou, J.K., Kramer, J.R., Richardson, P., Mei, M., El-Serag, H.B., 2013. The incidence and prevalence of inflammatory bowel disease among U.S. veterans: a national cohort study. *Inflamm. Bowel Dis.* 19 (5), 1059–1064.

Hsu, L.W., Lee, P.L., Chen, C.T., Mi, F.L., Juang, J.H., Hwang, S.M., et al., 2012. Elucidating the signaling mechanism of an epithelial tight-junction opening induced by chitosan. *Biomaterials* 33 (26), 6254–6263.

Hsu, L.W., Ho, Y.C., Chuang, E.Y., Chen, C.T., Juang, J.H., Su, F.Y., et al., 2013. Effects of pH on molecular mechanisms of chitosan-integrin interactions and resulting tight-junction disruptions. *Biomaterials* 34 (3), 784–793.

Iqbal, U., Anwar, H., Quadri, A.A., 2018. Use of curcumin in achieving clinical and endoscopic remission in ulcerative colitis: a systematic review and meta-analysis. *Am J Med Sci* 356 (4), 350–356.

Jurenska, J.S., 2009. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. *Alt. Med. Rev.* 14 (2), 141–153.

Kane, A.M., Liu, C., Akhter, D.T., McKeone, D.M., Bell, C.A., Thurecht, K.J., et al., 2021. Curcumin chemoprevention reduces the incidence of brf mutant colorectal cancer in a preclinical study. *Dig. Dis. Sci.* 66 (12), 4326–4332.

Karthikeyan, A., Young, K.N., Moniruzzaman, M., Beyene, A.M., Do, K., Kalaitseti, S., et al., 2021. Curcumin and its Modified Formulations on Inflammatory Bowel Disease (IBD): the Story so Far and Future Outlook. *Pharmaceutics* 13 (4).

Kroubi, M., Daoukade, S., Karembe, H., Jallouf, Y., Howsam, M., Mossalayi, D., et al., 2010. Development of a nanoparticulate formulation of diminazene to treat African trypanosomiasis. *Nanotechnology* 21 (50), 505102.

Kumar, S., Dilbaghi, N., Saharan, R., Bhanjana, G., 2012. Nanotechnology as emerging tool for enhancing solubility of poorly water-soluble drugs. *BioNanoScience* 2 (4), 227–251.

Kunnumakkara, A.B., Bordoloi, D., Padmanabhi, G., Monisha, J., Roy, N.K., Prasad, S., et al., 2017. Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases. *Br. J. Pharmacol.* 174 (11), 1325–1348.

Lamprecht, A., 2010. IBD: selective nanoparticle adhesion can enhance colitis therapy. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 7 (6), 311–312.

Larsen, C.M., Faulenbach, M., Vaag, A., Ehses, J.A., Donath, M.Y., Mandrup-Poulsen, T., 2009. Sustained effects of interleukin-1 receptor antagonist treatment in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 32 (9), 1663–1668.

Le, M.Q., Carpentier, R., Lantier, I., Ducourneau, C., Dimier-Poisson, I., Betbeder, D., 2018. Residence time and uptake of porous and cationic maltodextrin-based nanoparticles in the nasal mucosa: Comparison with anionic and cationic nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 550 (1–2), 316–324.

Le, M.Q., Carpentier, R., Lantier, I., Ducourneau, C., Fouquille, F., Dimier-Poisson, I., et al., 2019. Protein delivery by porous cationic maltodextrin-based nanoparticles into nasal mucosal cells: Comparison with cationic or anionic nanoparticles. *Int. J. Pharm.* X 1, 100001.

Lin, Y.-H., Chen, C.-T., Liang, H.-F., Kulkarni, A.R., Lee, P.-W., Chen, C.-H., et al., 2007. Novel nanoparticles for oral insulin delivery via the paracellular pathway. *Nanotechnology* 18 (10), 105102.

Luther, J., Dove, M., 2020. Rising inflammatory bowel disease prevalence highlights the need for effective, Cost-Effective Therapies. *Inflamm. Bowel Dis.* 26 (4), 626–627.

Mouaffief, S., Nikfar, S., Abdolghaffar, A.H., Abdollahi, M., 2014. New biologic therapeutics for ulcerative colitis and Crohn's disease. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 14 (5), 583–600.

Murgia, X., Loreti, B., Hartwig, O., Hittinger, M., Lehr, C.M., 2018. The role of mucus on drug transport and its potential to affect therapeutic outcomes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 124, 82–97.

Nu, S.Y., Moon, W., 2019. Perspectives on current and novel treatments for inflammatory bowel disease. *Gut Liver* 13 (6), 604–616.

Nunes, R., Neves, J.D., Sarmiento, B., 2019. Nanoparticles for the regulation of intestinal inflammation: opportunities and challenges. *Nanomedicine* 14 (19), 2631–2644.

Paillet, A., Passirani, C., Sautier, P., Kroubi, M., Gaerion, E., Bernit, J.P., et al., 2010. Positively-charged, porous, polysaccharide nanoparticles loaded with anionic molecules behave as 'stealth' cationic nanocarriers. *Pharm. Res.* 27 (1), 126–133.

Pan, M.H., Huang, T.M., Lin, J.K., 1999. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug Metab. Dispos.* 27 (4), 486–494.

Sasaki, H., Sunagawa, Y., Takahashi, K., Imaizumi, A., Fukuda, H., Hashimoto, Y., et al., 2011. Innovative preparation of curcumin for improved oral bioavailability. *Biol. Pharm. Bull.* 34 (5), 660–665.

Shehadi, A., Wahid, F., Lee, Y.S., 2010. Curcumin in cancer chemoprevention: molecular targets, pharmacokinetics, bioavailability, and clinical trials. *Arch. Pharm.* 343 (9), 489–499.

Shi, H.S., Guo, X., Li, D., Zhang, Q.W., Wang, Y.S., Zheng, Y., et al., 2012. A systemic administration of liposomal curcumin inhibits radiation pneumonitis and sensitizes lung carcinoma to radiation. *Int. J. Nanomedicine* 7, 2601–2611.

- Shu, W., Pang, Z., Xu, C., Lin, J., Li, G., Wu, W., et al., 2019. Anti-TNF- α monoclonal antibody therapy improves anemia through downregulating hepatocyte hepcidin expression in inflammatory bowel disease. *Mediat. Inflamm.* 2019, 4038619.
- Singh, R.L., Fedewa, S.A., Anderson, W.F., Miller, K.D., Ma, J., Rosenberg, P.S., et al., 2017. Colorectal cancer incidence patterns in the United States, 1974–2013. *J. Natl. Cancer Inst.* 109 (8).
- Singer, I.I., Kowka, D.W., Schloemann, S., Tessner, T., Riehl, T., Stenson, W.F., 1998. Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 115 (2), 297–306.
- Strojny, B., Grodzik, M., Sawosz, E., Winnicka, A., Kuramowicz, N., Jaworski, S., et al., 2016. Diamond Nanoparticles Modify Curcumin activity: In Vitro Studies on Cancer and Normal Cells and in Ovo Studies on Chicken embryo Model. *PLoS One* 11 (10), e0164637.
- Taghipour, Y.D., Bahramzoltani, B., Marques, A.M., Nasiri, R., Rahimi, B., Haratiipour, P., et al., 2018. Correction to: a systematic review of nano formulation of natural products for the treatment of inflammatory bowel disease: drug delivery and pharmacological targets. *Daru: J. Faculty Pharm. Tehran Univ. Med. Sci.* 26 (2), 241–242.
- Tolstanova, G., Deng, X., French, S.W., Linggi, W., Pananovic, B., Khomenko, T., et al., 2012. Early endothelial damage and increased colonic vascular permeability in the development of experimental ulcerative colitis in rats and mice. *Laboratory investigation. J. Tech. Methods Pathol.* 92 (1), 9–21.
- Torchilin, V.P., 2014. Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 13 (11), 813–827.
- Vallone, L., Falconi, M., Gaziano, R., Iacovelli, F., DiRi, E., Terracciano, C., et al., 2019. Potential of curcumin in skin disorders. *Nutrients*. 11 (9).
- Xie, X., Tao, Q., Zou, Y., Zhang, F., Guo, M., Wang, Y., et al., 2011. PLGA nanoparticles improve the oral bioavailability of curcumin in rats: characterizations and mechanisms. *J. Agric. Food Chem.* 59 (17), 9280–9289.
- Zhang, S., Ermann, J., Sacri, M.D., Zhou, A., Hamilton, M.J., Cao, B., et al., 2015. An inflammation-targeting hydrogel for local drug delivery in inflammatory bowel disease. *Sci. Transl. Med.* 7 (300), 300ea128.
- Zhang, M., Viermois, E., Prasad, M., Zhang, Y., Wang, L., Zhang, Z., et al., 2016. Edible ginger-derived nanoparticles: a novel therapeutic approach for the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and colitis-associated cancer. *Biomaterials*. 101, 321–340.
- Zhou, F., Zhou, H., Shu, J., Fu, S., Yang, Z., 2021. Skin wound healing promoted by novel curcumin-loaded micelle hydrogel. *Ann. Trans. Med.* 9 (14), 1152.

3. Article 2.

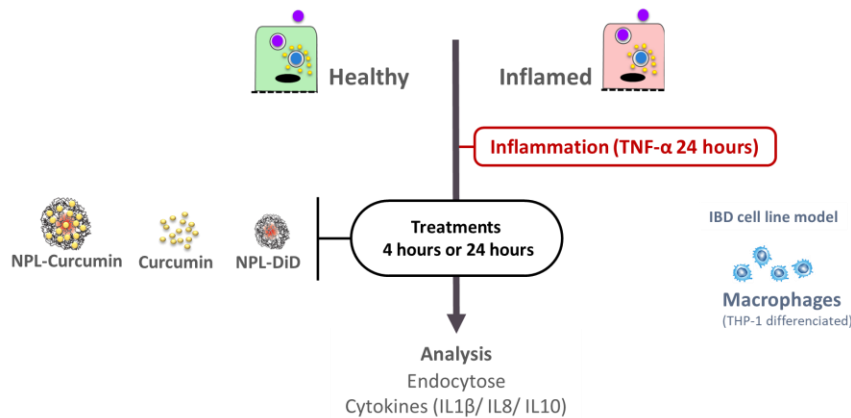


Figure 34 : Illustration générale des expérimentations

Dans cette seconde étude notre objectif était de vérifier si dans un contexte inflammatoire tel que les MICI, la formulation NPLCur qui pourrait être en contact avec les cellules immunitaires sous adjacentes de l'épithélium inflammée et endommagé, pouvait ou non participer à la résolution de cet état inflammatoire. Nous avons reproduit les modèles sain et inflammée publier précédemment et appliqué les traitements court ou long au modèle THP-1, comme indiqué dans la figure 34.

Et d'après nos résultats la réponse est oui, nous démontrant que cette formulation peut pénétrer dans les macrophages et induire une diminution des cytokines pro-inflammatoire, tout en stimulant une cytokine clé anti inflammatoire qu'est l'IL-10.

Curcumin associated to starch nanoparticles improve anti-inflammatory cytokines production in macrophages

*Norhane Salah¹, Laurent Dubuquoy¹, Rodolphe Carpentier*¹, Didier Betbeder^{1,2}*

1. Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U1286 - INFINITE - Institute for Translational Research in Inflammation, F-59000 Lille, France

2. Vaxinano, 59000 Lille, France

* *Corresponding author, email: rodolphe.carpentier@univ-lille.fr*

Inflammatory bowel disease (IBD), include Crohn's disease and ulcerative colitis, is a chronic disease resulting from self-sustained intestinal inflammation. Curcumin (Cur), a polyphenols with naturally antioxidant and anti-inflammatory properties, has been investigated as a therapeutic for IBD, but its poor stability and low bioavailability limits its efficacy. We investigated the use of crosslinked-starch nanocarrier (NPL) on the intracellular delivery and the anti-inflammatory efficiency of curcumin. Based on previous study that demonstrate the ability of NPL/Cur to reduce inflammatory mediators in epithelial cells. We try to evaluate the efficiency of the formulation on an immune cell line, macrophages. As macrophages are primary antigen-presenting cells that secreted a large number of cytokines (TNF- α) to regulate the migration and activation of other immune cells or non-immune cells. Studies demonstrated their involvement in the inflammatory response of intestinal mucosa and above all the sustaining of this inflammatory state. Macrophages cells were stimulate with TNF α for 24h and the anti-inflammatory effects of NPL/Cur formulation were assessed at the early stages of inflammation or later, when established. NPL allowed the intracellular delivery of curcumin, which was even more increased in inflammatory cells, without inducing cytotoxic effects on macrophages. As it has been highlight on epithelial cells, NPL/Cur decreased the secretion of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and IL-8 while increasing the anti-inflammatory cytokine IL-10. Finally NPL/Cur formulation seem to emphasize the anti-inflammatory effects of curcumin on different cells types and could constitute a therapeutic alternative in the management of IBD.

Keywords: Nanoparticles, Curcumin, IBD, Inflammation

1. Introduction

IBD is composed of two chronic disorders, Ulcerative colitis and Crohn's disease, (392) within the gastrointestinal tract. Although the exact etiology of IBD is still unclear but it is well known that they are multifactorial interactions between genetic susceptibility, host immune responses and environmental factors (393). An imbalance of the gut immune response trigger a strong immune response characterized by an uncontrolled inflammation that stay sustained represents how IBD diseases may starts. The mucus layer and intestinal epithelium provide a crucial interface between luminal bacteria, pathogens, food antigens, and the mucosal immune system (394, 395). The homeostasis maintained in tissue is due to a correlation between intestinal barrier function and macrophage (M ϕ) function. Intestinal macrophages release cytokines and other soluble factors, such as PGE₂, that preserve the intestinal homeostasis (396).

Macrophages are mononuclear phagocytes that play important roles in innate and adaptive immune responses (397). They express surface receptors that can bind to pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and damage-associated molecular patterns (DAMPs) (398, 399) that give them the ability to detect pathogens and tissue destruction in order to adapt the immune response. Macrophages can coordinate innate and adaptive immune responses, when it recognize pathogens, macrophages release chemokines and cytokines to attract and activate other immune cells to the site of infection leading to the amplification of inflammatory responses, or the activation of antigen-specific adaptive immune responses against the pathogens (400). M ϕ use different receptors to interact with epithelial cells or immune cells, Toll-like receptors (TLRs), NOD-like receptors (NLRs), mannose receptors, fibronectin receptors, complement receptors and even Fc-gamma receptors are just a few examples of them (401).

The process of elimination of pathogens or phagocytosis is directly link to these receptors (402, 403).

Maintaining tolerance to the commensal microbiota and antigens while maintaining effectiveness to potential pathogens infections is the crucial function of M ϕ in the intestine (404). If this balance is broken infections or inflammation can take over intestinal homeostasis. Inflammatory bowel disease (IBD) is an example of the lack of balance in the gut, leading to exacerbated inflammatory response (405, 406).

Intestinal M ϕ are the first leukocyte line of defense against pathogens (407), but they can also produce tumor necrosis factor (TNF), a pro-inflammatory cytokine that change the structure and role of tight junctions inducing the disruption of the intestinal barrier function (405). Microorganisms can pass through the intestinal barrier from the lumen to the tissues when occurs an alteration of intestinal epithelial barrier integrity because there are increase of the intestinal permeability (408-410).

Numerous anti-inflammatory drugs have been developed to reduce or control chronic inflammation of IBD, corticosteroids, anti-TNF α . But they may have side effects with a controversial benefit effect in long term remission (411). Therefore, there is an interesting alternative plant based treatments (412).The diet of IBD patients reveal how important the impact of food had on inflammation manage (413). The therapeutic effect of food is linked to the presence of naturally compounds present in fruit vegetable and some spice that exhibit anti-inflammatory effects, these compounds are for most of them polyphenols (414, 415).

Polyphenols like curcumin (Cur) can suppress inflammation and reduce oxidative stress in cells, either by modulation of the signaling pathways involved, direct scavenging of oxidants or

induction of antioxidant enzymes, thus helping avert chronic inflammation-related diseases (416, 417). Curcumin is extracted from the rhizome of the turmeric plant, it has been studied for its anti-oxidant effects first but demonstrated other health benefits on inflammation, cancer.

Cur is a bioactive compound reported to affect multiple inflammation associated biomarkers, including transcription factors, enzymes, pro-inflammatory cytokines and chemokines, and free radicals (415, 418, 419). In vitro and in vivo studies have highlight curcumin downregulation of TNF- α , IL-6, IL-1 β , nitric oxide (NO), prostaglandin E2 (PGE2), inhibitor of κ B subunit (I κ B) and I κ B kinase (IKK) via suppressing the NF- κ B signaling pathway (420-423).

Anti-inflammatory effects of curcumin has been shown to mediate the regulation of M2 polarization (424). Studies demonstrated that curcumin plays a key role in M2 polarization (425), by inhibition of DNA methyltransferase3b (DNMT3b) that overexpression relate to increased M1 polarization, on the other hand it increased phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat 6) a transcription factor activated by IL-4 and IL-10 (425). However, curcumin low solubility in biological fluids and poor bioavailability state of its limitations for a clinical use. Therefore its rapid metabolization do not empower a sufficient and efficient levels that can induce a therapeutic anti-inflammatory effects (213, 426).

In this issue, relevant research has been performed on delivery systems that improve the oral bioavailability of curcumin while preserving its properties for a better addressing in IBD manage. That's why nanoparticles (NPs) can be useful to furnish a better target to gut inflammation. Nanoparticles provides advantages that has been demonstrate to overcome

several biological barriers, limiting access of the drug to the targets (427, 428). Curcumin associated with nanoparticles has been reported to improve the efficiency of its multifactorial properties on different pathologies (429, 430). Design of NPs depend on four major domain: their composition, size, surface charge and physico-chemical properties. In IBD they can amass at inflammatory sites using to advantage the permeability alteration (431) to reach infiltrating cells (432).

We previously demonstrated that starch nanoparticles (hereafter called NPL) were able to actively enter cells by endocytosis (302), and thanks to their porous structure and lipophilic core, they were capable to be loaded with and to deliver hydrophobic molecules (305). We demonstrate that Cur-NPL enhances anti-inflammatory properties of curcumin compared to free curcumin and dexamethasone corticosteroid (433). In addition, due to their size, NPL may penetrate into the target tissue in inflammatory state, which could be beneficial in particular for treatment of Crohn's disease (433). Based on these findings, we hypothesized that NPL could deliver curcumin inside macrophages cells in order to reduce intestinal inflammation.

Here, in the context of IBD, used the models of "early" and "late" treatments to evaluate the NPL/Cur anti-inflammatory properties against both a starting and an established inflammation on macrophages. We assessed the formulation composed of NPL loaded with curcumin (NPL/Cur) on the ability of NPL/Cur to deliver curcumin in the cells, for both. The production of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, IL-8 and the anti-inflammatory cytokine IL-10.

2. Materials and methods

2.1. NPL synthesis, labeling and curcumin association

2.1.1 *Synthesis of NPL*

According to the previously described method (300), porous and cationic starch nanoparticles (NPL) were synthesized. At room temperature maltodextrin (Roquette, France) was dissolved in 2 N sodium hydroxide with magnetic stirring then epichlorohydrin (4.72 mL) and glycidyl trimethyl ammonium chloride (GTMA, 31.08 g) were added, leading to a cationic polysaccharide hydrogel formation. Acetic acid was used to neutralize the gel and crushed by high pressure homogenizer (LM20-30 microfluidizer, Microfluidics, France). NPs obtained were purified from oligosaccharides, low-molecular weight reagents and salts, by tangential flow ultra-filtration (Akta Flux6, GE Healthcare, France) using a 300 kDa cut off hollow fiber. At last 70% (w:w) of DPPG (dipalmitoyl-phosphatidylglycerol, Lipoid, Germany) was incorporated into NP⁺ at 80°C for 2h, and filtered through 0.2 µm filter to obtain NPL nanoparticles.

2.1.2 *Dynamic Light Scattering (DLS)*

The hydrodynamic diameter (Z-average) of the nanoparticles was measured by dynamic light scattering (Zetasizer nanoZS, Malvern UK) at 25°C, using 1 mg/ml NPL in an aqueous solution of 23 mM NaCl.

2.1.3 Zeta Potential

The zeta potential of the nanoparticles was measured by electrophoretic light scattering (Zetasizer nanoZS, Malvern UK) at 25°C, using NPL at 1 mg/ml in ultrapure water.

2.1.4 NPL labeling

DiD (1, 1''-dioctadecyl-3, 3, 3'', 3''-tetramethylindodicarbocyanine, 4-chlorobenzenesulfonatesalt, 1mg/mL) was mixed to NPL with a 1 mg/ml ethanolic solution at 0.7% w/w overnight at room temperature. NPL_{DiD} was purified by exclusion chromatography (PD-10 column Sephadex™ G- 25, Sigma-Aldrich, France).

2.2. Synthesis of NPL/Cur

In a mass ratio of 1:1 a curcumin solution in ethanol at 1 mg/ml (Tokyo Chemical Industry UK, Ltd®) was mixed with NPL under stirring during 2 hours at room temperature. The resulting NPL/Cur were filtered through a 0.2 µm filter and characterized as described in previous study (433). A 30kDa membrane (NanoSep, Pall, France) at 10,000 g for 5 minutes at room temperature for separating free curcumin. The filtrate contained curcumin that was quantified by fluorimetry using the ex: 485 nm/em: 538 nm wavelengths, over a curcumin standard curve ranging from 0.1 mg to 1 mg. The encapsulation efficiency (EE) of Cur in NPL was calculated as follows:

$$(m_{\text{cur total}} - m_{\text{cur filtrate}} / m_{\text{cur total}}) \times 100 = \% \text{ EE of Cur loaded into NPL}$$

2.3. Cells culture and inflammatory conditions

THP-1 (ATCC #TIB-202) is a monocyte isolated from peripheral blood from an acute monocytic leukemia patient. Cells were incubated with 40ng/ml of Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma-Aldrich[®], Merck) to trigger the differentiation of the monocytes cells into macrophages. Cells were maintained in RPMI-1640 supplemented with 10% heat inactivated, 100 U/mL Penicillin, 100 mg/mL streptomycin and 1% L-glutamine at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. Cells were seeded 3 days before the experiment at a density of 1.0×10^5 cells per well or 5.0×10^4 for respectively, 6-well plates (9.5 cm²), and 12-well plates (3.5 cm²), until confluence. Cells was undergo to two conditions, described previously (433) of a starting inflammation state named early treatment and an established inflammation state named late treatment. Cells were respectively treated with 10 ng/mL TNF- α for 24 h, along with NPL/Cur, to limit the progression of the inflammation, or with 10 ng/mL TNF- α for 24 h to induce inflammation, then the media was renewed, and NPL/Cur was added for 4 h. The procedure is summarized on figure 1.

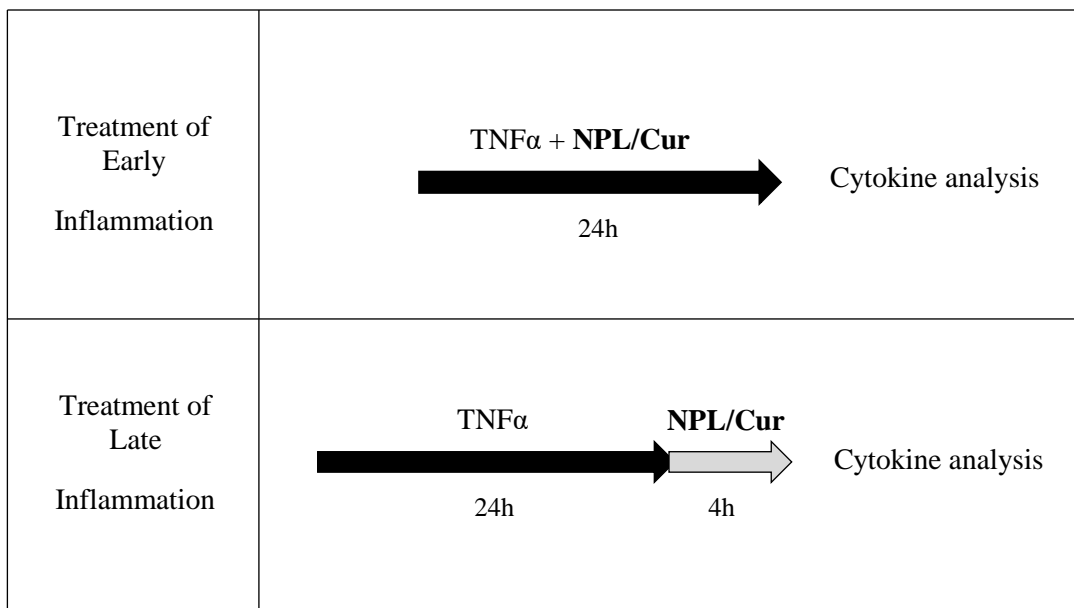


Figure 1. Inflamed (TNF α -induced) protocols developed as models for early and late inflammation.

2.3.1 Analysis of mitochondrial toxicity

Macrophages were seeded at a density of 3×10^4 cells in a 96-well plate for 72 h. Then treated for 4 h and 24 h with 8 $\mu\text{g/ml}$ of NPL_{DiD}, NPL/Cur or Free Cur, in both early and late inflamed conditions following the Figure 1. The mitochondrial activity was assessed by the MTT method using the CellTiter 96 non-radioactive cell proliferation assay kit (Promega, France), an MTT-induced tetrazolium-to-formazan conversion, according to the manufacturer's instructions. After treatment, cells were washed with PBS and 15% (v/v) of the dye solution was added for 3 hours at 37° C, then stopped. After 1 hour, absorbance was read at 590 nm on a Multiskan GO spectrophotometer (Thermo Scientific, France). The negative control was untreated cells, while 4% (v/v) paraformaldehyde (20 min at 37° C) was used as a positive control.

2.3.2 Study of cellular toxicity

To measure the influence of NPs on cell viability, cells were seeded in 24-well plates at a density of 5×10^4 cells per well until confluence. They were then treated for 4 h and 24 h with 8 $\mu\text{g/ml}$ of NPL_{DiD}, NPL/Cur and Free Cur, in both conditions following the Figure 1. Cells were harvested with trypsin, collected by centrifugation and diluted in PBS without calcium and magnesium. The DNA-intercalating dye, propidium iodide was used to discern cells with damaged membranes at 1 mg/ml, (Invitrogen™, ThermoFischer Scientific, France). Cells were analyzed by flow cytometry on a Cyan ADP Analyzer (Beckman Coulter).

2.4 Characterization of NPL-Cur uptake by macrophages

The uptake of nanoparticles was performed by flow cytometry, in order to determine the influence of nanoparticles on curcumin endocytosis. Cells were washed twice with PBS and treated with 8 $\mu\text{g/ml}$ of NPLDiD, Cur or NPLDiD/Cur either for 4h or for 24h, in both early and late inflamed conditions following the Figure 1. Cells were then washed with PBS, harvested using trypsin and suspended in PBS. Flow cytometry analysis were performed on 5 000 cells, in triplicate on a Cyan ADP Analyzer (Beckman Coulter).

2.4.1 Effects of endocytosis inhibitors on NPL/Cur pathway

The analysis of uptake pathway of NPL/Cur on macrophages was assessed with a pre-incubation of cells for 15 min at 37 °C with different endocytosis inhibitors: nystatin (20 µg/ml), filipin (10 µg/ml), chlorpromazine (CPZ 10 µg/ml), phenylarsine oxide (PAO 1 µg/ml), and amiloride (0.023 mg/ml), cytochalasine D (0.020 mg/ml). Afterwards NPL_{DiD}/Cur (8µg/ml) were added for 30 min then cells were collected by trypsin and fluorescence of nanoparticles was measured by flow cytometry (CYAN ADP Analyzer, Beckman Coulter), in triplicate on 5 000 cells.

2.4.2 Influence of NPL/Cur on cytokine excretion

Cells were incubated with 8 µg/ml of NPL, Cur or NPL/Cur, for 4h and 24h at 37 °C for the both healthy and inflamed conditions follow protocols in Figure 1. IL-1, IL-8 and IL-10 secretions were measured by ELISA in each supernatant after 4h or 24h of treatments. The anti-inflammatory dexamethasone was used at 0.1 mM as a positive control. The detection ranges of the ELISA kits (Invitrogen[®], France) were between 2 and 300 pg/ml.

2.5 Statistical Analysis

The results are represented as the mean ± standard deviation of at least 3 independent experiments and the analysis of variance was done using suitable ANOVA tests for each experiment.

3. Results

3.1 Characterisation of curcumin associated to nanoparticle (NPL/Cur)

NPL were made from crosslinked maltodextrin structure with a core of phospholipids (DPPG). NPL had an average hydrodynamic diameter of 62 nm and their poly-dispersity index was up to 0.221, while their surface charge was +38 mV. The addition of curcumin to a final concentration of 8 μ g/mL as describe in previous study (433) do not significantly modified either the size meaning that the nanoparticles did not aggregated, nor that the curcumin accumulate on the surface of these nanoparticles. The PDI values demonstrated that after association the formulation kept a homogeneous size and remained monodisperse. The non-modification of the surface charge confirmed that the curcumin was associated to the lipid core of NPL. The efficiency of the curcumin encapsulation in the NPL that was quantified by a fluorimeter at 485/538 nm, and was up to 80% (Table 1). Therefore, we showed that the curcumin was correctly associated to NPL and NPL/Cur was useable for delivery studies.

	Hydrodynamic diameter (nm)	PDI	Zeta-potential (mV)	EE (%)
NPL	62 \pm 10	0.221	+38 \pm 3	-
NPLCur	65 \pm 13	0.200	+36 \pm 7	80

Table 1. Characterization and encapsulation efficiency of NPL and curcumin loaded into NPL.

The hydrodynamic diameter (Z-average size, nm) and the polydispersity index (PDI) of nanoparticles were determined by dynamic light scattering while the zeta potential (mV) was by electrophoretic mobility. The encapsulation efficiency (EE) of curcumin into NPL was determined by separative filtration and expressed as a percentage of association over free curcumin. Analyses were measured in triplicate, and values represent the mean \pm SD.

3.2 Influence of NPL/Cur on mitochondrial activity

In order to analyse if NPL and NPL/Cur formulation were safe and acceptable for the following delivery studies of curcumin, we assessed at 4h and 24h and in both conditions early and late inflammation treatments, if there are any modification of mitochondrial activity, since mitochondrial activity was related to cell viability. We show in figure 1 that NPL did not affect the metabolic activity in a time dependent manner when they were added during 4, and 24 hours. The viability of cells treated with the free cationic NPL or curcumin associated to NPL did not decrease at 4h or 24h for the early treatments but it is slightly decrease at 24 hours for the late treatments in macrophages. As the increase of the cytotoxicity was not significantly related to the carrier. These results demonstrate the harmlessness of these nanoparticles on macrophages

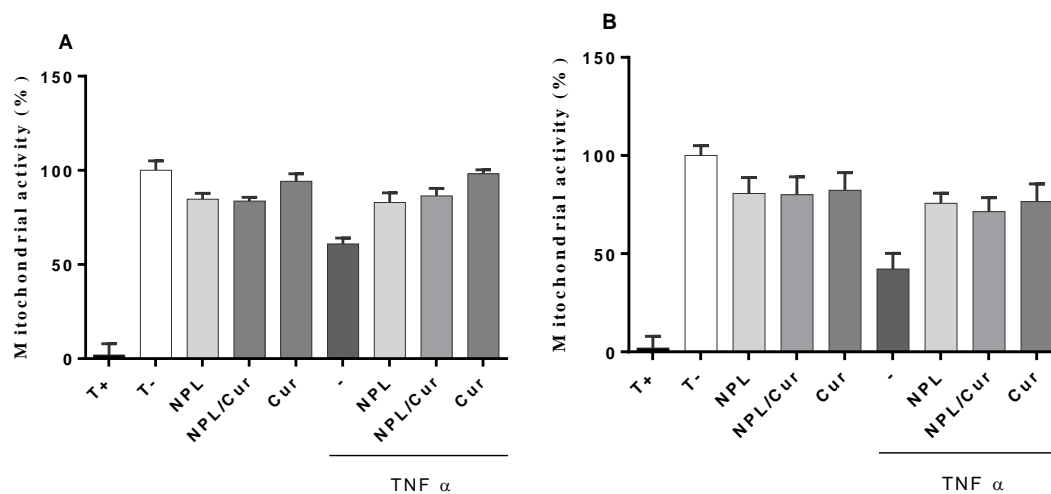


Figure 1. Evaluation of the mitochondrial activity. Cells were treated with NPL, NPLDiD/Cur and Cur, (8 μ g/ml) under two conditions: untreated, non-inflamed or TNF α -induced inflamed for 4 hours (A), or 24-hour (B). Then washed and immediately analyzed by cytometry. The mitochondrial activity referred to viability of cells and was determined by the MTT assays. Positive controls correspond to cells treated with 4% (v/v) paraformaldehyde to induce the

minimal MTT value and 100% was set over the negative control. Data represent the mean \pm SD (n = 3) of the percentage of viability.

3.3 Study of cytotoxicity effects of NPL / Cur on macrophages

To ensure that the effect of our formulations is not due to compromised membrane integrity. Propidium iodide, a probe, fluoresces when interacting with DNA, but can only access DNA if the cell membrane and nuclear membrane are compromised, as it does not penetrate intact membranes. Regardless the two physiological conditions, at 4h (Figure 2A) we did not observe any cytotoxicity, except for the treatment with TNF α . However, after 24 h of incubation, cells achieved 50% membrane disruption (Figure 2B), but this was not significantly different from untreated cells. These results suggest that at our concentration, NPL or NPL/Cur does not induce any specific cytotoxicity even after 24 hours of exposure.

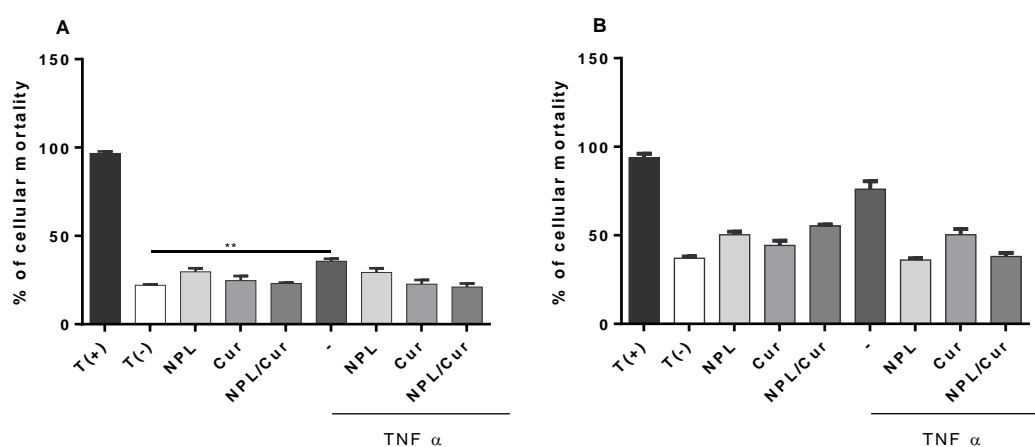


Figure 2. Effect of NPL, NPL/Cur treatments on the membrane integrity of macrophages cells to propidium iodide exposure. Each formulation was used at (8 μ g/ml) for 4h (A) or 24 hours (B), under two conditions: untreated, non-inflamed or TNF α -induced inflamed. Positive controls correspond to cells treated with 1mg/ml (v/v) DMSO to induce the maximal cytotoxicity. Untreated cells was set up as negative controls. Data was evaluated by flow

cytometry and represent the mean \pm SD (n = 3) and the significance of the statistical test is indicated as ** p<0.01

3.4 NPL/Cur uptake by macrophages

We reproduce inflammatory conditions in vitro previously described (433), cells were stimulated with 10 ng/ml of TNF α for 24h at 37°C, then NPL, Cur or NPL/Cur were added following Figure 1: either in presence of TNF α , to reduce the progression of the inflammatory state early treatment, or for 4h after the TNF α -induced inflammation, to repress an established inflammation late treatment.

In cells with an early treatment, a 1.6-fold increase of NPL uptake was observed compared to the healthy conditions (Figure 3A). There was an observable difference yet in cells with a late treatment, with a 1.14-fold increase of NPL uptake between healthy and inflamed conditions (Figure 3B). The association of curcumin into NPL change its uptake, the only increase observable was in early inflammation in healthy condition with a 1.02 fold of NPL/Cur compared to NPL. We notice a decrease of NPL when it's associated to Cur, by 1.0 fold for inflamed condition in early inflammation, and a 2.1 fold decreased for both condition in early inflammation.

Afterwards, the efficiency of curcumin delivery was examined. In the early treatment, a significant increase of the NPL/Cur compared to Cur delivery was observable between healthy and inflamed conditions (x6 Figure 3C). However in late-treated cells, a decreased of NPL/Cur compared to cur by respectively 1.5 fold and 1.9 was observed between inflamed and healthy condition (Figure 3D). Moreover, the free curcumin seems to increase in late inflammation delivery by 3.0 compared to early inflammation (Figure 3C). Unlike previous results there we

do not observed an uptake time depend. We notice that contrary to epithelial cells, macrophages have a higher rate uptake in a short time laps, meaning that longer the incubation time, the lower the delivery become. These results suggest that in an inflammatory context such as IBD, NPL was able to deliver a highly amount of curcumin into macrophages cells underneath 4 hours and delivery still sustains even after 24hours, in a constant manner in both condition healthy and inflamed (Figure3D).

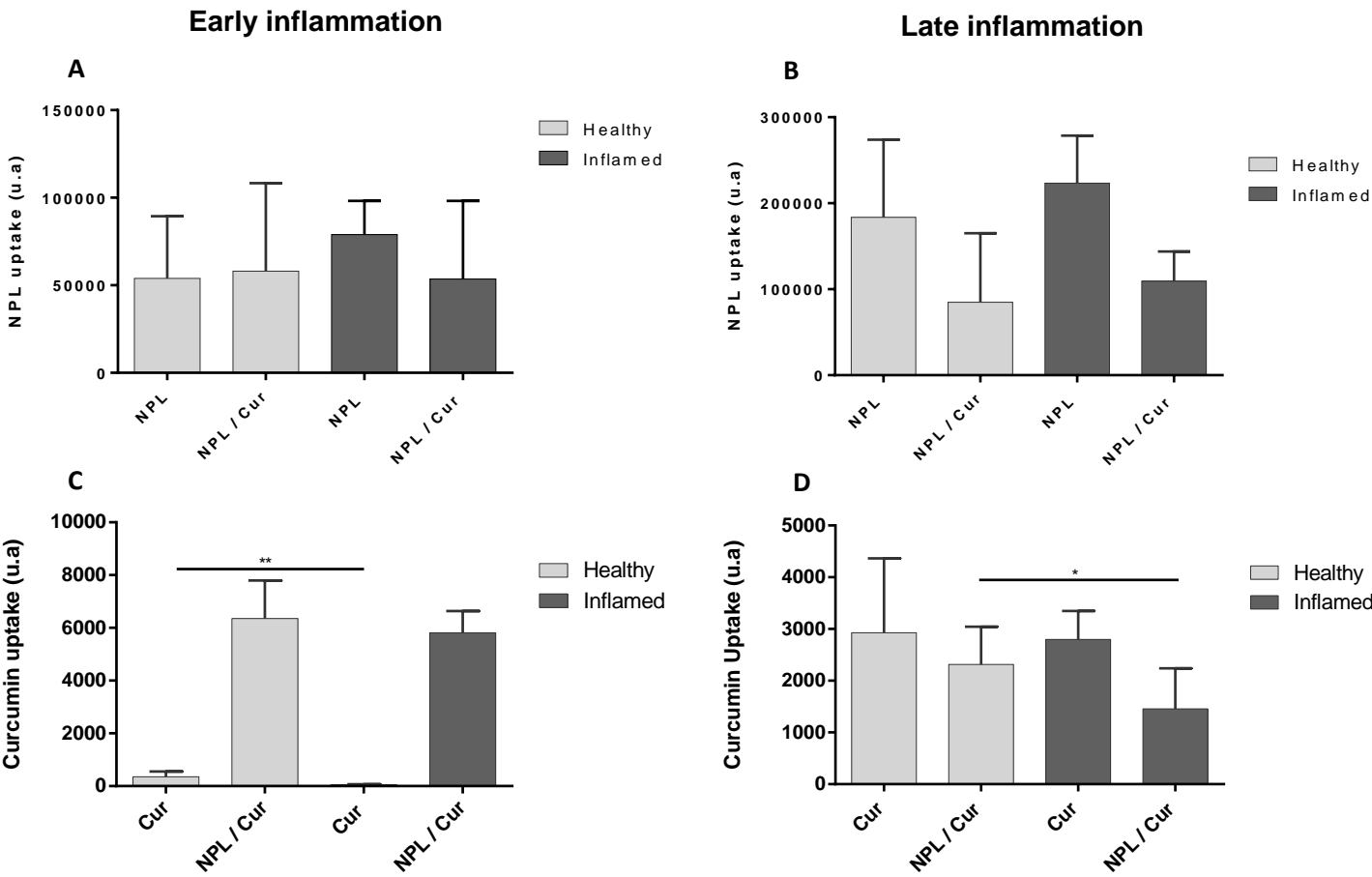


Figure 3. Endocytosis of NPL and curcumin. The intracellular amount of NPL in non-inflamed (“healthy”, light grey) or inflamed (dark grey) cells was analyzed by flow cytometry in the early (A) versus late (B) treatment conditions, using NPL or NPL/Cur. In a similar manner, the intracellular amount of curcumin, free- or NPL-associated, in the early (C) versus late (D)

treatment conditions was measured. The analyses were performed in triplicate and values represent the mean \pm SD of the mean fluorescence intensities based on a minimum of 5,000 gated events. The significance of the statistical test is indicated as follow: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

3.5 Endocytosis mechanism of NPL/Cur

Inhibitors Final	Concentration	Endocytosis pathway
Nystatin	20 $\mu\text{g/mL}$	Caveolae
Filipin	10 $\mu\text{g/mL}$	Caveolae
Chlorpromazine (CPZ)	10 $\mu\text{g/mL}$	Clathrin
Phenylarsine oxide (PAO)	1 $\mu\text{g/mL}$	Clathrin
Amiloride	23 $\mu\text{g/mL}$	Macropinocytosis
Cytochalasine D	10 $\mu\text{g/mL}$	Phagocytosis

Table.2 Endocytosis Inhibitors. The final concentration and the endocytosis pathways inhibited.

Despite the inflammatory condition did not modify uptake of NPL/Cur (Figure 3), the incubation time had in opposite to conditions, affected the uptake. Macrophages endocytosis mechanisms involved may manage specific time depending pathways for processing NPL/Cur. Macrophages were exposed to inhibitors of specific endocytosis pathways (Table 2), then NPL/Cur uptake was analyzed. The use of Nystatin in non-inflamed condition on cells induce a significant inhibition of NPL/Cur, but chlorpromazine and cytochalasine D affected in a stronger manner the inhibition of NPL/Cur. Assuming that the two main pathways was clathrin-mediated endocytosis and phagocytosis pathways (Figure 4A), even if we can observe that there are an implication of the caveolae and lipid raft internalizations. In spite of that, NPL/Cur uptake was not affected by any of these inhibitors when inflammatory state occurs (Figure 4B).

Suggesting, that NPL/Cur uptake followed independent pathways of the clathrin/caveola and phagocytosis, under TNF α -induced inflammation.

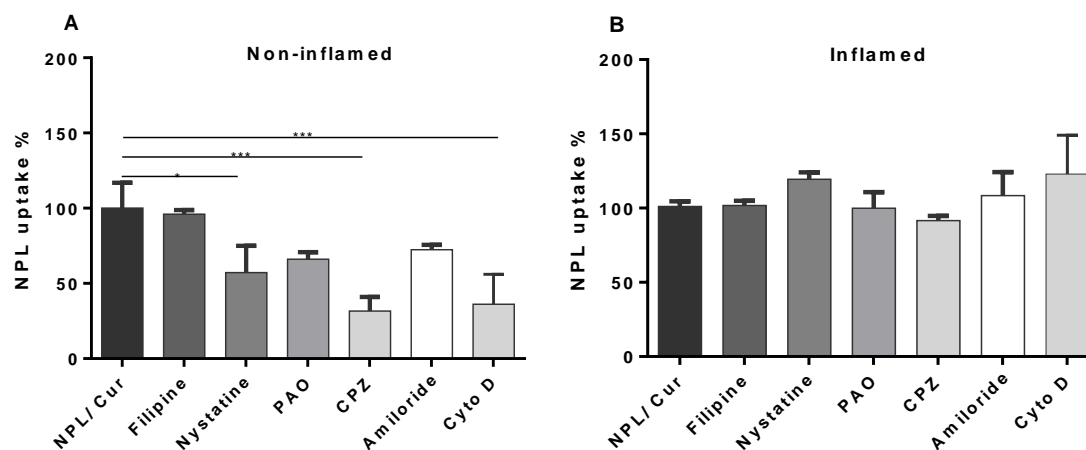


Figure 4. Mechanisms of endocytosis of NPL/Cur in macrophages cells. Untreated, non-inflamed (A), or 24-hour TNF α -induced inflamed (B) cells were treated with endocytosis pathway inhibitors for 15 min then NPLDiD/Cur were added to cells for 30 min at 37 °C. Cells were then washed and immediately analyzed by flow cytometry. Data represent the mean fluorescence intensity +/- SD (n = 3) and cells not treated with inhibitors were set to 100% uptake. The significance of the statistical test is indicated as follow: * p<0.05, *** p <0.001.

3.6 Anti-inflammatory effect of NPL/Cur

NPL/Cur efficiency was evaluated on inflammatory state by the quantification of pro-inflammatory (IL-1 β , IL-8 and IL-6) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines secretions. According to the Figure 1, macrophages cells were stimulated with TNF α . As a repressor of inflammatory state a glucocorticoid was used, dexamethasone (Dex) and as expected it reduce completely the secretion of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 IL-8, in early and late treatments. In healthy, non-inflamed cells none of these formulations cause the secretion of inhibition of pro-inflammatory (IL-1 β , IL-8 and IL-6) and anti-inflammatory (IL-10) for both time incubation tested 4 hours and 24 hours (Supporting Figure S1 / S2). The secretion of IL-1 β (Figure 5A), IL-8 (Figure 5B) and IL-6 (Figure 5C) significantly decreased with NPL/Cur

while free curcumin or NPL did not induce a significant decrease of pro inflammatory cytokines, in early treatment. In addition anti-inflammatory cytokine IL-10 (Figure 5D) was only induce by NPL/Cur formulation.

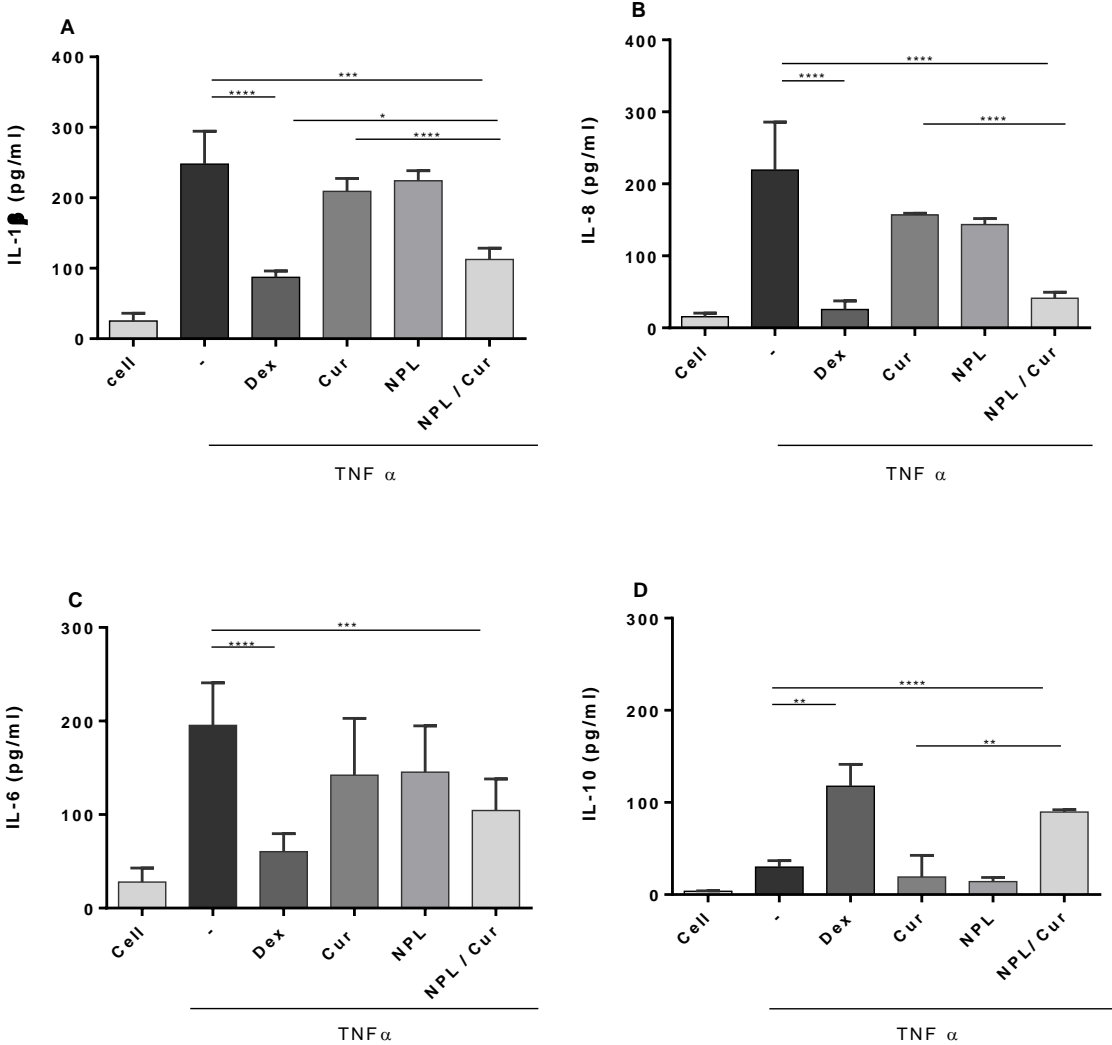


Figure 5. Cytokine production in early treatment of inflamed in macrophages cells. Cells were concomitantly stimulated with 10 ng/mL of TNF α and treated with either NPL, Curcumin (Cur) or NPL/Cur during 24h. The concentration of IL-1 β (A), IL-8 (B), IL-6 (C) and IL-10 (D) cytokines in the supernatant was measured by ELISA. Values are expressed in pg/ml and represent the mean \pm SD of triplicate analyses. The significance of the ANOVA statistical test is indicated as follow: *** p < 0.001; **** p < 0.0001.

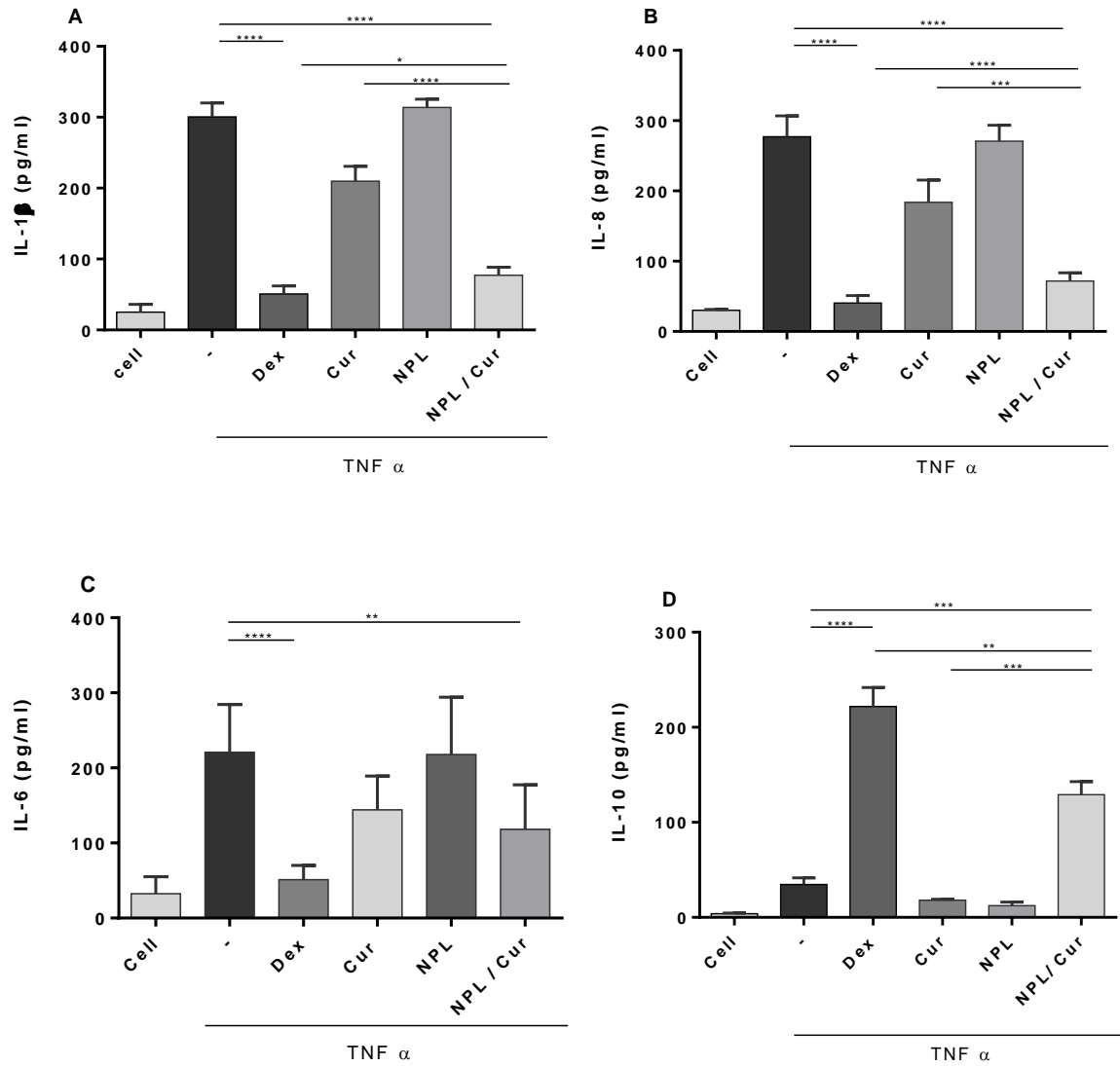


Figure 6. Cytokine production in a late treatment condition in macrophages cells. Cells were pre-treated with 10 ng/mL of TNF α during 24h to induce the production of inflammatory cytokines, then cells were treated for 4h with either NPL, Curcumin (Cur) or NPL/Cur. The concentration of IL-1 β (A), IL-8 (B), IL-6 (C) and IL-10 (D) cytokines in the supernatant was measured by ELISA. Values are expressed in pg/ml and represent the mean \pm SD of triplicate analyses. The significance of the ANOVA statistical test is indicated as follow: ** p < 0.01; *** p < 0.001; **** p < 0.0001.

After 24h of TNF α stimulation, late treatment was established, then cells were exposed to NPL, curcumin or NPL/Cur for 4h. As mentioned earlier IL-1 β (Figure 6A), IL-8 (Figure 6B) and IL-6 (Figure 6C) secretions only decreased when it's exposed to NPL/Cur. The anti-inflammatory IL-10, was also induced by only NPL/Cur. We notice that NPL/Cur was as efficient as the Dex control in inhibiting the secretion of pro-inflammatory cytokines while inducing the secretion of anti-inflammatory cytokine IL-10 (Figure 6D).

4. Discussion

Curcumin has been shown to exhibit strong therapeutic potential relating to its anti-inflammatory (434-437), antioxidant (438-440), immunomodulatory (441-443), anti-cancer (444-448), activities. Curcumin has a long history of use as a traditional treatment for inflammatory diseases in certain countries (449) and its efficacy on animal models of inflammation has been investigated and demonstrated (450, 451). However, even if it's a multifactorial molecule, curcumin's poor solubility, bioavailability and its high rate of metabolism limit its use to a dietary supplement. Nanoparticles as a delivery system could overcome these limitations (452). In the context of IBD, promising results were already obtained with corticosteroids, immunosuppressants or piperine loaded in various NPs (339, 453). In this study, we investigated the ability of the NPL nanocarrier (302), to deliver curcumin directly into macrophage cells as we demonstrated previously that NPL/Cur could deliver curcumin into epithelial cells undergoing an inflammatory state with a strong and efficient anti-inflammatory effect.

However, little is known about the effect of curcumin on the production of macrophage-derived cytokines which play an important role in the production and the development of inflammation (454-457).

Studies have shown evidence that curcumin may affect macrophage activity and induce an M2 phenotype polarization. Curcumin has displayed strong inhibitory activity against inflammation in which macrophages play a major role (458, 459). Another study showed that curcumin inhibited the production of IL-8, MIP-1a, MCP-1, IL-1b and TNF- α by PMA- or LPS-stimulated peripheral blood monocytes and alveolar macrophages (460).

Until last decades macrophages polarization was essentially restricted to the classical dichotomy classification (461) with M1 polarized macrophages that express large quantities of pro inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6) and promote immune responses by up-regulation of MHC-II, in conjunction with costimulatory molecules, and M2 polarized macrophages, in contrast, there for support inflammation resolution thanks to a gene expression switch toward anti-inflammatory cytokines (TGF- β , IL-10) and the induction of endocytic receptors, including scavenger and C-type lectin receptors. However, researches show that the performance of macrophages under certain special conditions is not representative, the cell surface markers may be contradictory, and their phenotype may change over time during the disease. Notwithstanding in literature many different populations are described, but three of them are more characterized (55). First, macrophages that described as Classically Activated Macrophages (CAM ϕ s) that are associated with host defense, high microbicide activity and pro-inflammatory cytokine production (462), they can be activated *in vitro* through two signals, interferon- γ (IFN- γ) and lipopolysaccharide (LPS) or other TLR ligand. Then, the Regulatory Macrophages (RM ϕ), can be activated in response to two signals, either by a stimulation via TLR ligands like LPS, or by a high-density immune complexes, adenosine, and prostaglandin (463). Finally the Alternatively Activated Macrophages (AA-M ϕ) promoting debris scavenging, tissue repair and wound healing, besides promoting fibrosis (464, 465). Their activation result from an exposure to the Th2 cytokines such as: (IL-4 or IL-13).

Several IBD patients are still unresponsive to the current therapeutic (466), creating a pending need for alternative treatments options, as studies support by evidence the pro resolving phenotype in macrophages, it might be a other therapeutic approach to control intestinal inflammation and improve the restoring tissue function. Studies corroborated in IBD therapies

mesalazine or infliximab (467, 468) effect on macrophage functions, by inhibiting inflammatory signaling pathways and/or inducing polarization of alternatively activated macrophages. Oriented differentiation of immature inflammatory macrophages towards a mature homeostatic macrophage phenotype might be an efficient approach to restore a gut homeostasis balance.

In an inflammatory context of IBD inflammation, the epithelial barrier is damaged which induces disruption, or even the rupture, of the tight junctions (TJ), If the damage that occurs can disrupt the membrane permeability to allow the passage nanoparticles across the epithelial barrier, as we previously demonstrated with the use of chitosan (433, 469). Suggesting that NPL/Cur could also reach the sub epithelial tissue and deliver curcumin to epithelial- associated immune cells, like macrophages. Based on our finding we aimed to evaluate if curcumin associated to cationic nanoparticles that behave as zwitterionic nanocarriers (306) could induce a reduction of inflammatory state of macrophages cells. Hence, previously data published exhibit that NPL can also protect a hydrophobic drug from oxidation, as we have already shown for the anti-parasitic diminazene (305, 470).

As expected and already described for curcumin, diminazene and proteins (303, 305, 433), curcumin incorporation into NPL lipid core did not modify the size or the surface charge of NPL (Table 1), suggesting that these association led the curcumin into the core of the NPs.

To ensure a homeostasis balance restoration, we need to provide a strong drug delivery with a high efficiency effect on the inflammation state that noteworthy, in IBD start progressively but remain self-sustained (471). Here, we stimulated macrophages cells with TNF α to induce an

inflammatory state, validated by measuring the secretion of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and IL-8 (Figures 5 and 6). Treatments with anti-inflammatory compounds can either counteract or resolve the inflammation. In this regard, two protocols were examined, using NPL/Cur either in the early (during the TNF α -induced inflammation), or in the late (after the TNF α stimulation) steps of inflammation. In inflamed cells, we observed an increase of the NPL endocytosis leading to a better delivery of curcumin, compared with non-inflamed cells (Figure 4). Under non-inflamed conditions clathrin, caveolae and phagocytosis pathways was involved for NPL (Figure 4), while it was clathrin-, caveolae- and micropinocytosis-independent in inflamed conditions (Figure 4), indicating a modification of the endocytosis mechanisms.

Chronic inflammation is sustained in IBD when uncontrolled pro inflammatory cytokine like IL-1 β secretion occurs (472, 473). Leading to an increase of intestinal permeability, promoting activation of dendritic cells and macrophages (474, 475) then creating an imbalance between immune responses Th1/Th2.

Several studies reported that curcumin increases the mRNA expression and secretion of IL-4 and IL-13, which are classical and powerful M2 inducing cytokines (55, 464, 476, 477). In addition, a study highlight that IL-4 and/or IL-13 neutralizing antibodies almost completely abolished M2 polarization of Raw264.7, which indicates that curcumin induces M2 polarization mainly by production IL-4 and/or IL-13 (425). Another study reported that curcumin is a potential inhibitor of DNA methyltransferase (DNMT) (478, 479), knowing that DNA methyltransferase3b (DNMT3b) regulates macrophage polarization. Knockdown of DNMT3b promoted macrophage polarization to M2 phenotype, whereas overexpressing DNMT3b

promoted an increase in M1 macrophages (480). These results indicate that inhibition of DNA methylation is a possible way by which curcumin induces M2 polarization of macrophages.

Based on our previous published data on NPL/Cur anti-inflammatory effect, and the ability of NPL/Cur to reach a sub epithelial mucosa. We evaluated these effects on an anti-inflammatory *in vitro* model, reproducing an IBD micro environment is not possible, we based our model by mimicking only specific features of inflammation that can be reproduced. NPL/Cur demonstrated an efficient inhibition of the pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8) while improving the secretion of anti-inflammatory cytokine (IL-10) (Figure 5 and 6), in opposite to free curcumin effect. Even if the TNF α -induced inflammation failed on increase IL-10 secretion. Curcumin association to NPL proved these NPs are harmless, safe and do not induce any cytotoxicity, and in mean time can increase its solubility in biological fluids (481), and on the delivery of curcumin in cells (298, 433), (Figure 3), these improvements lead to rising up of the anti-inflammatory effects of curcumin.

5. Conclusion

In the present study, a bio-sourced nanoparticle synthesized was successfully conjugated to curcumin with a desirable size and an expected surface charge, providing a harmless and nontoxic nanocarrier for drug delivery into macrophage cells. Importantly, these NPLs were efficiently taken up by macrophages, as they enhanced a strong amount of curcumin uptake in short incubation time. In addition, NPL/Cur decreased pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8), while increasing the anti-inflammatory cytokine IL-10 *in vitro*. The generated

NPL/Cur had demonstrated a sufficient effects on inflammatory state as efficiently dexamethasone (glucocorticoid). NPL/Cur combination could be an interesting alternative of IBD therapy manage.

Acknowledgment

The authors would like to thank Nathalie Jouy from the Flow core and Imaging facilities of Plateformes Lilloises en Biologie et Santé (PLBS) - UMS 2014 - US 41 (Lille, France) for their technical assistance. This work was performed with the support of the University of Lille, INSERM, the CHU Lille, and Vaxinano who provided the nanoparticles and some financial support.

Conflict of Interest

D.B. is C.E.O and C.S.O of Vaxinano SAS.

Supporting figures.

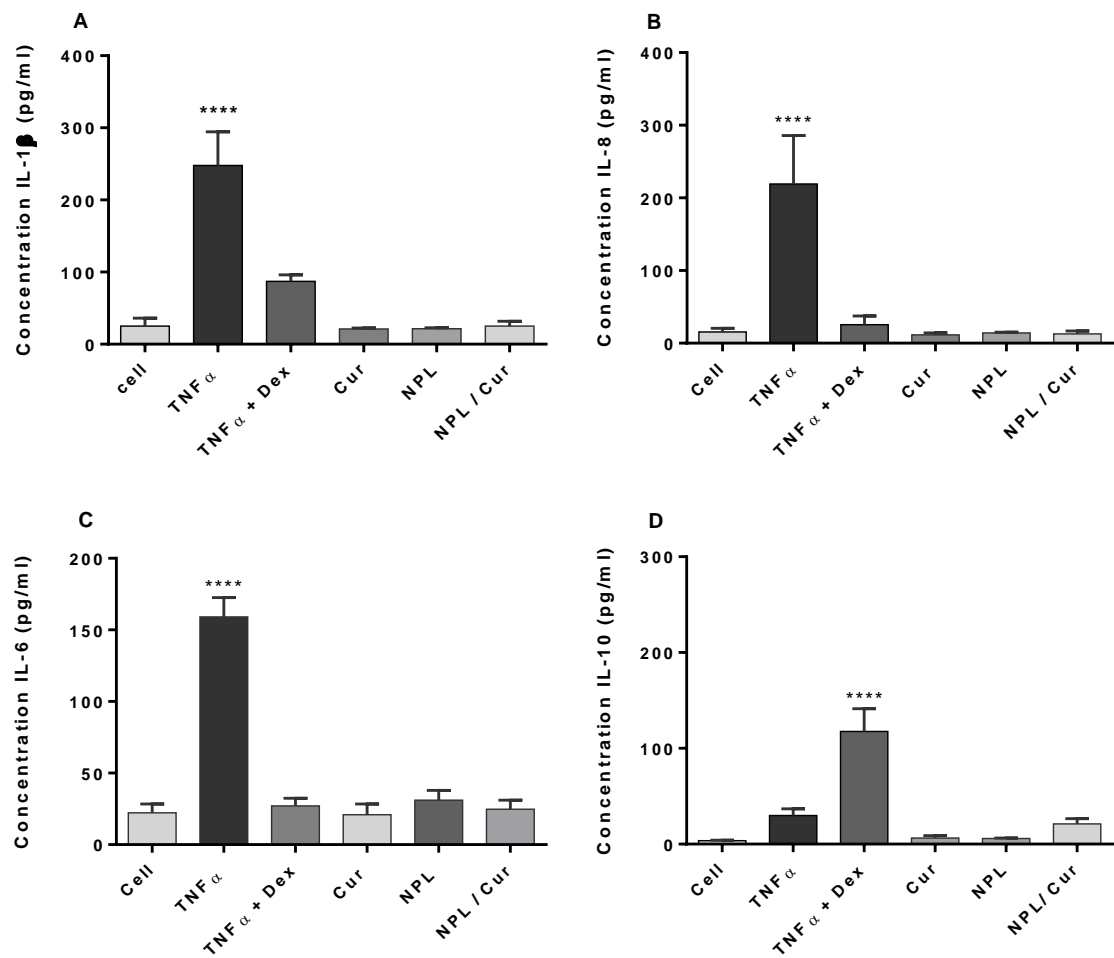


Figure S1. Cytokine productions under non-inflamed condition on macrophages. Cells were treated for 4h with either NPL, Curcumin (Cur) or NPL/Cur. The concentration of IL-1 β (A), IL-8 (B), IL-6 (C) and IL-10 (D) cytokines in the supernatant was measured by ELISA. Values are expressed in pg/ml and represent the mean \pm SD of triplicates. The significance of the ANOVA statistical test is indicated as follow: **** p < 0.0001 over all other conditions.

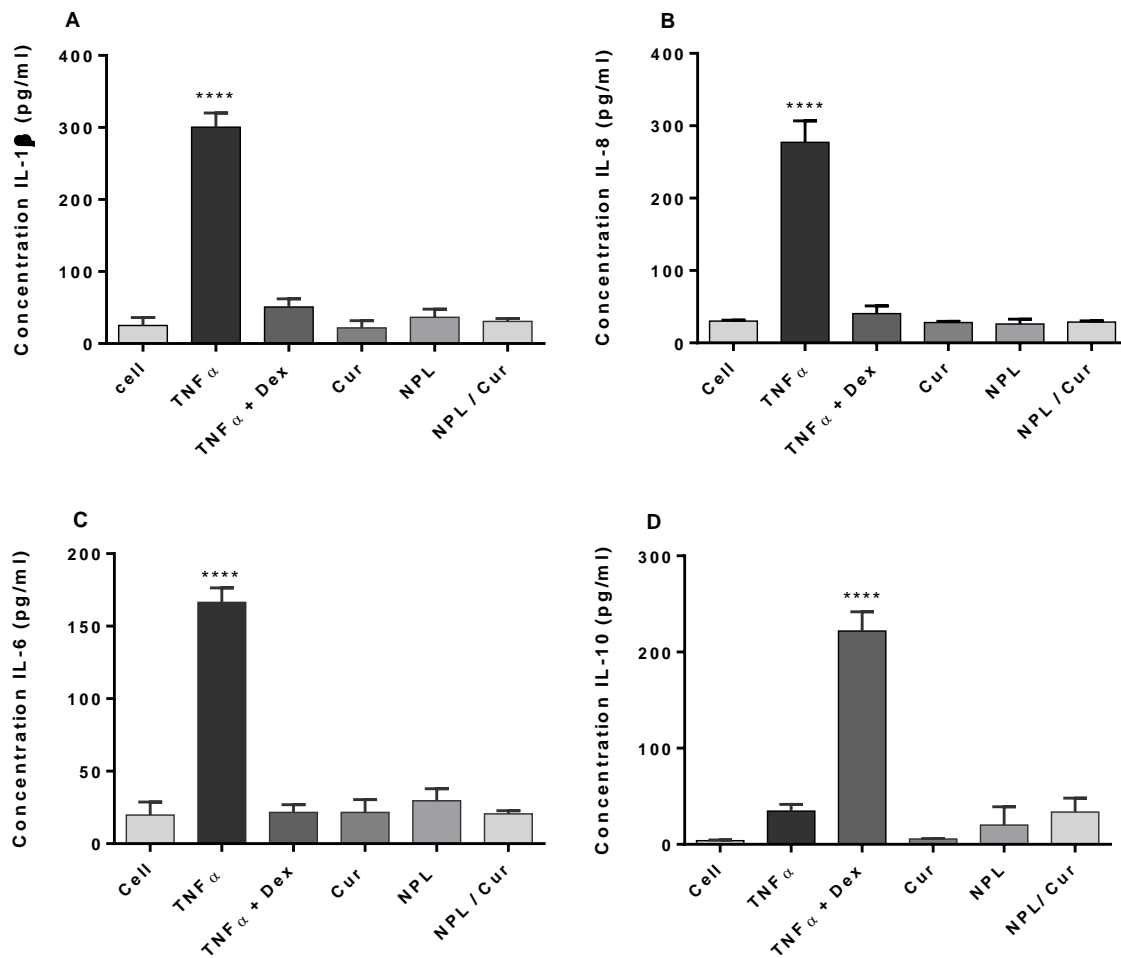


Figure S2. Cytokine productions under non-inflamed condition on macrophages. Cells were treated during 24h with either NPL, Curcumin (Cur) or NPL/Cur. The concentration of IL-1 β (A), IL-8 (B), IL-6 (C) and IL-10 (D) cytokines in the supernatant was measured by ELISA. Values are expressed in pg/ml and represent the mean \pm SD of triplicates. The significance of the ANOVA statistical test is indicated as follow: **** p < 0.0001 over all other conditions.

PARTIE 3.

Discussion générale

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Les nanoparticules et la curcumine seuls ou combinés ?

1. L'importance de l'amélioration des traitements contre les MICI

Au cours des dernières décennies, l'épidémiologie des MICI a considérablement changé. Le début du XXI^e siècle a été témoin d'une augmentation rapide de l'incidence dans les pays nouvellement industrialisés (482). Bien que la mortalité se stabilise dans les pays occidentaux, le fardeau reste élevé puisque la prévalence et l'incidence de ces pathologies continuent d'augmenter (482).

Historiquement, les traitements standards pour les MICI ont été les aminosalicylates, avec des cures courtes de stéroïdes pour les poussées sévères, et si la rémission n'était pas maintenue le choix thérapeutique s'orientait vers les immunomodulateurs et des inhibiteurs du facteur de nécrose tumorale alpha (anti-TNF α). Dans le cas de la maladie de Crohn par exemple, des études ont démontré une efficacité supérieure du budésonide chez les patients atteints d'une maladie iléale distale, iléocæcale ou du côlon droit, ou encore le choix de la prednisolone chez les patients atteints d'une maladie plus grave ou étendue comparé aux aminosalicylates. Ces dernières années, on a pu voir une expansion des options thérapeutiques pour les MICI. Malgré les progrès dans ce domaine, environ 30 % des patients sont principalement insensibles aux anti-TNF α et même parmi les répondeurs, jusqu'à 10 % perdront leur réponse au médicament chaque année (483). Les MICI entraîne fréquemment des lésions segmentaires progressives du tractus gastro-intestinal (484), et des études ont démontré que ces lésions intestinales structurelles et fonctionnelles forment un processus dynamique, avec seulement 10 % des patients qui présentent une rémission prolongée (485-487). A savoir que même les patients asymptomatiques présentent souvent des signes d'inflammation active à l'endoscopie, et

des lésions intestinales structurelles (sténoses et/ou fistules) identifiées par imagerie ont été observées chez plus de 50 % des patients, 10 ans après leur diagnostic (487).

Traditionnellement, les effets thérapeutiques sont principalement évalués par un score qui tient compte uniquement des symptômes cliniques. De nos jours, l'activité de la maladie peut également être évaluée par des indicateurs plus objectifs tels que les résultats des biomarqueurs (488). Les objectifs ne sont plus seulement d'induire et de maintenir la rémission des symptômes, de prévenir et de traiter les complications, mais également d'obtenir une cicatrisation mucoale. La cicatrisation de la muqueuse fait référence à l'élimination de l'inflammation mucoale locale et à la restauration de la structure de la muqueuse intestinale (489). Plusieurs études montrent que la cicatrisation mucoale peut être associée à des taux réduits de récurrence clinique, d'hospitalisation, de chirurgie et d'invalidité, et à un bon pronostic à long terme (175, 490, 491).

Par conséquent, il faut retenir que même à l'ère moderne du traitement, la majorité des patients subissent toujours une intervention chirurgicale en raison d'un contrôle inadéquat de l'inflammation. La prise en charge traditionnelle des MICI, qui comprennent une intensification progressive des traitements étape par étape avec des réévaluations de réponses basées uniquement sur les symptômes cliniques, exposent donc les patients à d'importants effets secondaires infectieux et néoplasiques. Bien que complexe, deux problèmes ont été identifiés dans cette approche. Le premier est le retard à l'initiation d'un traitement hautement efficace chez les patients présentant un haut risque de progression de la maladie, et le second est le manque de corrélation entre les symptômes et l'activité réelle de la maladie définie par la variation des marqueurs biologiques des muqueuses.

Il est clair que le besoin de développer et mettre en œuvre des médicaments ou des associations de médicaments hautement efficaces avec des profils d'effets secondaires plus favorables que les traitements actuels, est un besoin important et non satisfait pour les MICI. De plus le concept de « rémission profonde » s'est imposé dans la littérature comme la cible thérapeutique optimale pour améliorer la qualité de vie et prévenir la progression de la maladie. Ce concept réunit la rémission clinique, la rémission biochimique et la guérison des muqueuses et pose les bases à partir desquelles nous devons évaluer les futures thérapies.

2. Présenter l'intérêt d'utiliser des molécules naturelles non toxiques pour traiter l'inflammation et préciser l'importance du ciblage de ces principes actifs pour avoir accès aux cellules enflammées

Il existe un besoin clinique d'identifier de nouveaux composés sûrs pour prévenir ou traiter les MICI (492), ce besoin est renforcé par le fait qu'environ un tiers des patients atteints de MICI doivent subir une intervention chirurgicale après une utilisation à long terme des traitements traditionnels (493). La phytothérapie, y compris les produits naturels tels que la baicaléine, la berbérine, l'indigo naturalis, l'andrographolide, la curcumine et la bromélaïne, présentent une efficacité dans le traitement des MICI, et attirent de plus en plus de patients vers cette alternative thérapeutique naturelle (498).

García-Lafuente et al. (494) suggèrent que les composés phénoliques, en tant que traitement naturel alternatif, offrent un grand espoir pour l'amélioration des symptômes des MICI, mais la plupart des études sur les effets anti-inflammatoires des composés phénoliques se sont concentrées sur les cellules immunitaires et non intestinales (495). Les données présentes dans la littérature s'accordent sur le fait que ces composés naturels ont une activité anti inflammatoire, via la modulation des niveaux d'expression de diverses cytokines, notamment l'IL-1, l'IL-6, l'IL-10, l'amplificateur de la chaîne légère du facteur nucléaire κ des cellules B activées (NF- κ B), le TNF- α , l'oxyde nitrique inductible (NO) synthase (iNOS) et la cyclooxygénase (COX)-2 (496).

Les plantes médicinales sont populaires en raison de leur innocuité perçue (c.-à-d. l'absence d'effets secondaires) et de leur efficacité (497).

Les polyphénols, l'un des composés antioxydants les plus courants dans les fruits et légumes, ont démontré des effets bénéfiques dans la prise en charge des MICI. L'épigallocatechine gallate dans le thé, la curcumine dans le curcuma, la naringénine des agrumes, l'acide ellagique, le resvératrol et les dérivés de la quercétine sont des composés polyphénoliques abondants dans l'alimentation humaine (498). Parmi les plantes médicinales on retrouve également les plantes suivantes : *Plantago ovata*, *Andrographis paniculata*, *Aloe vera*, *Artemisia absinthium*, *Boswellia serrata*, *Cannabis sativa* et *Tripterygium wilfordii*. Ces plantes ont démontré leur efficacité et leur potentiel a été rapporté dans une revue de Triantafyllidi et ses collègues en 2015 sur les thérapies à base de

plantes pour le traitement des MICI. Elle a rapporté que sur 11 thérapies à base de plantes impliquant 1874 patients atteints de MICI, 7 d'entre elles ont eu des effets bénéfiques, tandis que 4 ont entraîné une rémission clinique (497). 9 patients sur 30 atteints de RCH active ont présenté une rémission clinique 4 semaines après la prise orale de gel d'*A.Vera*, contre un patient sur 14 dans le groupe placebo (499). Les graines de *P.Ovata*, comparées à la mésalazine, ont montré un effet équivalent sur le maintien de la rémission dans la RCH après 12 mois (500).

Dans un autre essai, il a été démontré que des patients ayant reçu un traitement avec 2 g/jour de curcumine en plus de la sulfasalazine ou de la mésalazine pour le traitement des MICI, présentent au cours des six mois de traitement un taux de rechute significativement inférieur à celui du groupe placebo (501, 502). Enfin, une méta-analyse réalisée par Rahimi et al. sur 7 essais cliniques contrôlés (vs placebo) avec un total de 474 patients, suggère que les remèdes à base de plantes peuvent avoir des effets bénéfiques sur l'induction de la rémission chez les patients souffrant de MICI (503). Avec toutes ces données mettant en avant les effets naturelles et anti-inflammatoires de toutes ces plantes, que manque-t-il pour en faire un vrai médicament à la disposition de tout patient ?

Et bien malgré une liste non exhaustive de tous les effets bénéfiques des plantes, le problème réside dans leur métabolisation. Ces molécules actives, sont photosensibles, sensibles au pH, instables et peu solubles voire insolubles, même avec des quantités d'extrait brut élevée, ces molécules seules ne peuvent pas induire une réduction suffisante de l'état inflammatoire du patient. Pour améliorer l'activité de ces principes actifs, il faut améliorer leur délivrance. Pour cela nous devons cibler les tissus enflammés, les cellules enflammées, et surtout les bons compartiments cellulaires, car le devenir intracellulaire de ces molécules anti-inflammatoires est déterminant pour préserver leurs propriétés anti inflammatoires.

A partir de là, les systèmes de délivrance des médicaments se sont diversifiés et adaptés aux cibles des principes actifs. En général, les modes d'administration dans le traitement des MICI sont les voies parentérale, perorale et rectale.

L'importance des systèmes d'administration et du ciblage des médicaments

La première barrière à franchir est celle de l'estomac. Pour éviter la dégradation enzymatique des médicaments imposée par l'environnement acide de l'estomac, il existe un moyen simple et peu coûteux de modifier les caractéristiques d'administration de médicaments, comme des formes posologiques enrobant des capsules et des comprimés avec des polymères biocompatibles. L'enrobage entérique préserve les agents actifs incorporés contre l'environnement intestinal, comme le suc gastrique, les acides biliaires ainsi que la dégradation microbienne, créant un profil de libération prolongée et retardée du médicament dans les zones intestinales souhaitées et améliore ainsi l'efficacité thérapeutique. Les polymères les plus courants pour l'enrobage des comprimés et des gélules sont les dérivés des acides acryliques et les copolymères du méthacrylate de méthyle (Eudragit®) ainsi que les dérivés de la cellulose avec des valeurs seuil de pH comprises entre 4,5 et 7,0 (504). En général, les formes posologiques à noyau solide, telles que les comprimés, les pastilles, les granulés, les nanoparticules et les microparticules conviennent à un enrobage à texture uniforme (monocouche) ou à texture stratifiée (multicouche). Ces formes posologiques enrobées peuvent être remplies dans des capsules ou compressées sous forme de comprimés, qui peuvent en outre être enrobés avec le même polymère ou d'autres polymères sensibles au pH. Ces formes posologiques multiparticulaires ont une efficacité accrue pour une libération de médicament spécifique dans les zones intestinales enflammées. La littérature a également décrit la capacité des nanoparticules à pénétrer les tissus pour atteindre les cellules, en ayant parfois un ciblage permettant de renforcer la délivrance des nanoparticules et donc des molécules qui lui sont associées. Les nanoparticules se classent en 4 générations, le classement se base sur leurs caractéristiques physico-chimiques (forme, charge, taille ect.) Figure 35.

- **Première génération**

La première génération de nanoparticules est une génération créée dans le but d'encapsuler des agents actifs et d'améliorer leur biodisponibilité, cependant sans modification en leur surface, ces nanoparticules peuvent être très vite éliminées par l'organisme. Les protéines présentes dans le sang s'agrègent autour de ces nanoparticules, formant des coronas suffisamment importants pour être rapidement pris en charge par les macrophages et éliminés

1^{ère} génération :

NPs conventionnelles

4^{ème} génération :

NPs multifonctionnelles

2^{ème} génération :

NPs furtives

3^{ème} génération :

NPs ciblées

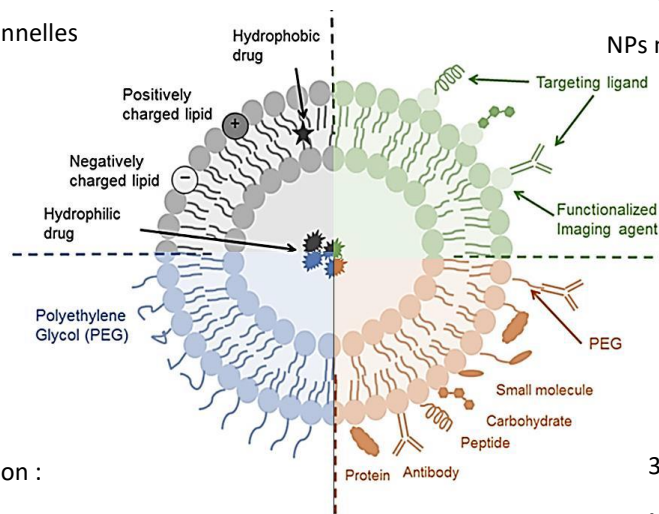


Figure 35 : Représentation schématique des générations de nanoparticules appliquées aux liposomes.

- **Seconde génération**

Afin d'échapper à l'élimination par les macrophages et autre système de reconnaissance de pathogènes, de nouvelles formes de nanoparticules ont été pensées, les nanoparticules furtives. Pour cela, des polymères neutres ou hydrophiles ont été ajoutés en surface des nanoparticules. Grâce à ce masque le contact entre les nanoparticules et les éléments présents dans le corps (opsonines, anticorps, protéines du complément) sera plus difficile (505). En mettant en difficulté le système de clairance, la demi-vie des nanoparticules a été augmentée. Parmi les polymères les plus utilisés pour cela, on retrouve le PEG (poly éthylène glycol) greffé en surface des nanoparticules, il octroie une certaine furtivité, rendant possible l'accès des nanoparticules aux

tissus ciblés (506, 507). Dans le cas des médicaments anticancéreux, on peut citer le Doxil®. Ce médicament met à profit cette furtivité en plus de cibler de manière passive les tissus cancéreux, en profitant de la perméabilité plus importante des endothéliums vasculaires néoformés (enhanced permeability and retention ou effet EPR). Cependant, malgré cette avancée, cette génération de nanoparticules atteint ses limites face à l'hétérogénéité due au cancer, c'est pourquoi de nombreuses barrières restent à franchir afin de rendre possible l'emploi des nanoparticules en tant que vecteur d'anticancéreux.

- **Troisième génération**

La troisième génération de nanoparticules qui émerge a permis de passer à de la délivrance ciblée active et contrôlée, en greffant à la surface des nanoparticules un élément spécifique du tissu ciblé et des récepteurs membranaires avec notamment des molécules, peptides, anticorps, fragments FC ayant des affinités pour certains types de récepteurs (transferrine, EGF) (508) ou certains types cellulaires (509).

Autrement dit, cette génération de nano vecteur peut allier furtivité et spécificité de ciblage pour rendre la délivrance de nano médicaments encore plus performante.

- **Quatrième génération**

La quatrième génération regroupe les nanoparticules créées afin de cibler non plus un tissu ou un type cellulaire mais un compartiment intracellulaire, cytoplasme mitochondrie, noyau etc. Pour ce faire, on utilise les multiples choix qu'offre le design de nanoparticules. A savoir que sans greffage particulier les nanomédicaments vont pénétrer les cellules non spécialisées par endocytose, et cela présente un risque pour le médicament et les nanoparticules qui peuvent être dégradés par l'acidité contenu dans

Les compartiments endo lysosomale (510). C'est le concept d'échappement à ces voies de dégradation qui caractérise les nanoparticules de quatrième génération. A partir de là, des systèmes utilisant des polymères sensibles au pH de ces compartiments ou l'emploi de peptides de pénétration cellulaire (CPP) vont permettent soit la rupture de l'organelle et libérer les nanomédicaments dans le cytoplasme, soit la formation de micelle membranaire grâce aux liaisons entre ces peptides et des phospholipides membranaires (510). L'ajout de ligand spécifique aux nanoparticules va induire une interaction précise permettant le ciblage d'organite. C'est

notamment le cas lors de l'ajout de la guanidinium cyclique, le triphenylphosphonium ou l'octa arginine qui permettent de cibler la mitochondrie, tant dis que l'ajout de peptide NLS ou du peptide KKKRKV des virus SV40 permettent de cibler le noyau (508, 511). Ainsi, en faisant varier les ligands greffés on peut orienter la délivrance de notre nanomédicaments. En revanche, on sait aussi de par la littérature et le peu de nanomédicaments sur le marché clinique, que plus la conception d'un vecteur contient d'étapes complexes plus il sera difficile de maîtriser sa stabilité et ses propriétés lors de sa production industrielle.

Le contexte inflammatoire des MICI, rend la conception de nanovecteurs d'autant plus complexe puisque c'est une pathologie multifactorielle. En effet, l'expression des ligands et ou des récepteurs en lien avec l'état inflammatoire, varie d'un patient à l'autre. Il faut donc accorder une importance supplémentaire aux choix des caractéristiques que l'on souhaite attribuer au design de la nanoparticule.

La curcumine associée à la NPL

La curcumine exerce des activités pléiotropes comme des effets antioxydants, anti-tumoraux et anti- infectieux, tous basés sur la régulation de voies de signalisation cellulaire (512). Cependant, sa faible solubilité dans les fluides biologiques et son taux élevé de métabolisation limitent son utilisation clinique potentielle. La nanomédecine permet le transport ciblé de médicaments et pourrait permettre de surmonter ces limitations (513). Dans le cadre des MICI, des résultats prometteurs ont déjà été obtenus avec du 5-ASA, des corticoïdes, des immunosuppresseurs ou des siRNA encapsulées dans différentes NPs. L'utilisation clinique de cette stratégie est encore en cours d'évaluation (453, 514).

Nous avons étudié la capacité de la NPL, composée de maltodextrine réticulée avec un noyau phospholipidique (302), à délivrer la curcumine directement dans les cellules épithéliales intestinales enflammées, ainsi que les effets anti-inflammatoires des formulations NPL/Cur.

Dans un contexte inflammatoire, la charge électrique de surface des cellules épithéliales intestinales est perturbée, avec une charge globale devenant majoritairement cationique (515). A partir de ce point de départ, de nombreuses recherches se sont focalisées sur l'utilisation de nanoparticules anioniques ou neutres, visant à augmenter leur adhésion et leur temps de contact épithélial. Ainsi, il est important de préciser que, bien que la charge de surface des NPL soit cationique, leur noyau lipidique anionique leur confère un comportement plus vaste. De plus, la production de mucus est augmentée dans les MICI, nécessitant des nanoparticules capables de pénétrer et de diffuser à travers le mucus, ce qui est le cas des NPL (306). Ainsi, les NPL étudiées ici combinent trois avantages potentiels pour la délivrance de médicaments dans le cadre des MICI : (i) les NPL sont des vecteurs muco-pénétrants, grâce à leur taille inférieure à 100 nm et leur noyau phospholipidique (516) ; (ii) ils interagissent rapidement et pénètrent dans les cellules, en raison de leur charge de surface hautement cationique (516) ; (iii) il a été prouvé qu'ils associaient et délivraient des médicaments hydrophobes (305). Ils peuvent également protéger les substances actives de l'oxydation, comme déjà montré pour le diminazène (305), ce qui est un avantage particulier lors de l'utilisation de la curcumine (470). Ainsi, les NPL sont de bons candidats pour l'administration de curcumine, par rapport à d'autres systèmes qui se concentrent uniquement sur l'augmentation du temps de contact des médicaments à la surface de l'épithélium (303).

L'association de la curcumine dans la NPL n'a modifié ni la taille ni le potentiel zêta du nanoporteur, indiquant une association entre la curcumine et les phospholipides dans le noyau de la NPL, comme déjà décrit pour le diminazène ou les protéines (303, 305). En effet, la curcumine étant une molécule hautement lipophile, elle peut être facilement associée au noyau lipidique de la NPL via des interactions hydrophobes. Ce noyau lipidique est incorporé de manière stable dans le noyau NPL comme l'ont démontré des études antérieures; ceci explique pourquoi aucune libération de curcumine n'est observée au cours du temps.

Dans le cas des MICI, l'état inflammatoire qui apparaît progressivement, est continu et auto-entretenu (471). Une délivrance rapide et efficace du médicament serait donc intéressante pour briser ce cercle vicieux. Cependant, modéliser la physiopathologie complète des MICI in vitro est inenvisageable ; seules les caractéristiques spécifiques de l'inflammation peuvent être reproduites. Ici, nous avons stimulé les cellules Caco-2 avec du TNF α pour induire un état inflammatoire, validé en mesurant la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6 et IL-

8. Les traitements avec des composés anti- inflammatoires peuvent contrecarrer ou résoudre l'inflammation. À cet égard, deux protocoles ont été examinés, utilisant NPL/Cur soit au début (pendant l'inflammation induite par le TNF α), soit à la fin

(Après la stimulation par le TNF α) des étapes d'induction de l'inflammation. Dans les cellules enflammées, nous avons observé une augmentation de l'endocytose de la NPL conduisant à une meilleure délivrance de la curcumine, par rapport aux cellules non enflammées. Dans des conditions non inflammatoires, la macropinocytose était la voie d'endocytose préférentielle des NPL, alors qu'elle était indépendante de la clathrine, des cavéoles et de la micropinocytose dans des conditions inflammatoires, indiquant une modification des mécanismes d'endocytose. Des études complémentaires seraient nécessaires pour bien comprendre ce phénomène. En revanche, sachant que la curcumine ne pouvant agir que si elle est délivrée dans les cellules sans être dégradée, il fallait déterminer si lorsqu'elle est associée à la NPL, la curcumine échapperait au système endolysosomal et persisterait donc dans le cytoplasme. Les résultats que nous avons obtenu sur la délivrance de NPL/Cur, nous ont permis de confirmer qu'elle échappait à ce système tout en renforçant sa biodisponibilité intracellulaire.

Les cytokines inflammatoires et la COX-2 sont des médiateurs essentiels de l'inflammation et sont connues pour être régulées à la hausse dans les MICI (412). Par exemple, la génération excessive d'IL- 1 β augmente la perméabilité intestinale, favorisant l'activation des cellules dendritiques et des macrophages (39) et entraînant une inflammation aiguë et chronique (472). Des composés phytochimiques aux activités anti-inflammatoires et antioxydantes ont ainsi été étudiés dans la prise en charge des MICI, en effet ils peuvent moduler divers médiateurs inflammatoires tels que l'IL-1 β , IL-6, IL-10, le TNF α , la PGE-2, l'iNOS et la COX- 2 (517). Nous avons donc focalisé notre étude sur les effets anti-inflammatoires de la curcumine, libre ou délivrée par les NPL, sur la sécrétion d'IL-1 β , IL-6, IL-8 et IL-10. Alors que, ni la curcumine seule, ni le NPL ne pouvaient réduire la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires, la formulation NPL/Cur inhibait efficacement leur expression. Au contraire, la sécrétion d'IL-10 était uniquement régulée à la hausse par NPL/Cur, malgré l'inflammation induite par le TNF α . Cela a prouvé que la NPL joue un rôle clé dans le renforcement des effets anti- inflammatoires de la curcumine. Les mécanismes impliqués sont dus à l'encapsulation de la curcumine qui augmente sa solubilité dans les fluides biologiques (481), et sur la délivrance plus importante de la curcumine dans les cellules (298).

Lors d'une poussée inflammatoire de MICI, la barrière épithéliale est endommagée ce qui induit une rupture des JS. Ici, nous avons utilisé du chitosan, un polysaccharide cationique, pour ouvrir les JS (50). L'ouverture initiale des JS de l'épithélium est < 1 nm alors que le chitosan peut l'agrandir à 150 nm, suffisant pour permettre le passage des nanoparticules ≤ 50 nm à travers une monocouche de cellules Caco-2 (469). Ici, l'ouverture JS a permis le passage de la curcumine, des NPL et des NPL/Cur.

Cependant, cet effet pourrait dépendre du type cellulaire, comme observé précédemment dans les cellules épithéliales des voies respiratoires (303).

Pour mieux évaluer la délivrance de NPL/Cur dans un intestin enflammé, un explant colique murin ex vivo d'un modèle d'inflammation induite par le DSS a été utilisé. Après 4h de traitement, la curcumine a été détectée dans la paroi intestinale, notamment dans les couches profondes de l'épithélium. Cela suggère que dans les MICI, la Cur pourrait également atteindre le tissu sous-épithélial.

3. Perspectives

La formulation NPL/Cur a démontré sa capacité à réduire l'inflammation sur un modèle cellulaire in vitro épithélial et immunitaire. Pour confirmer ces résultats, il faudra reproduire ces expériences sur des modèles murins, en imitant des conditions inflammatoires, avec l'emploi de détergent provoquant une inflammation (TNBS, DSS). Mais également étudier plus en profondeur la localisation intracellulaire des NPL/Cur, dans les différents types cellulaires qui peuvent l'internaliser (épithélial, immunitaire, paneth). L'optimisation du ciblage pourra être envisagée par l'ajout d'un ligand plus spécifique comme le mannose pour cibler les macrophages ou un motif CPP pour les cellules épithéliales intestinales.

Il faudra également évaluer de manière plus globalement l'inflammation sur les modèles murins avec des scores histologiques d'infiltration de cellule inflammatoire, ou macroscopique en observant l'état du colon, sa taille, etc. Analyser les fèces des animaux, pour étudier l'impact de notre formulation sur le microbiote sera également envisagée. Pour résumer, nous devons confirmer ces résultats, les reproduire sur des modèles plus complexes, et évaluer si les NPL peuvent améliorer la délivrance d'autres molécules anti inflammatoires (tel que la quercétine, le resvératrol, le Kaempférol).

L'étape ultime de ce travail sera donc d'effectuer d'autres études et analyses pour définir s'il est possible de translater cette formulation vers un système de nanomédicaments standardisé, établissant ainsi sa faisabilité à l'échelle industrielle répondant ainsi aux besoins des patients atteints de MICI.

PARTIE 4.

Conclusion générale

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Au-delà de l'arsenal thérapeutique mis à disposition des praticiens, les MICI restent des pathologies complexes à traiter, et pour cause la difficulté de guérison est associée à celle de contrôler et réduire l'inflammation, puis celle de maintenir une rémission. Le développement de système de délivrance bien que prometteur n'a pas fait émerger de traitement universel ou de traitement permettant une amélioration radicale de l'état des personnes affectées. Les nanoparticules offrent toutefois un autre axe de recherche, qui permet de cibler plus en profondeur les acteurs de cet état inflammatoire. Cependant, les recherches actuelles se concentrent sur les cellules immunitaires, même si les nanoparticules peuvent également atteindre les autres cellules du système digestif (cellules épithéliales, endothéliales). L'utilisation d'un nanovecteur, ou plusieurs, associés à des molécules anti-inflammatoires, vont permettre de renforcer les effets anti-inflammatoires, tout en diminuant la dose administrée de médicament et donc diminuer les effets secondaires. Cependant, passer d'une production limitée à des modèles *in vitro* ou *in vivo* à une production à grande échelle industrielle soumet la conception de ces nanoparticules à de nouvelles exigences. La stabilité, les quantités, la qualité, la pureté et le coût sont des critères qui vont exclure de nombreuses nanoparticules. Sans oublier qu'en fonction du modèle expérimental, l'efficacité de certaines formulations n'est pas la même. La différence entre les espèces et la complexité physiologique humaine vont également rendre la conception de nanomédicaments plus difficile. C'est la raison pour laquelle nous observons peu de médicaments à base de nanoparticules comparé aux publications sur les nanoparticules qui augmentent d'année en année. Malgré certaines limites, les nanotechnologies offrent un grand choix en termes de matériaux et de techniques de fabrication. La nanomédecine va, quant à elle, progressivement, évaluer et établir les formulations qui permettront d'améliorer les propriétés anti-inflammatoires tout en s'affranchissant des limites évoquées.

Bibliographie

1. Krejs GJ. Physiological role of somatostatin in the digestive tract: gastric acid secretion, intestinal absorption, and motility. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1986;119:47-53.
2. Kiela PR, Ghishan FK. Physiology of Intestinal Absorption and Secretion. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2016;30(2):145-59.
3. Sarker SA, Gyr K. Non-immunological defence mechanisms of the gut. *Gut.* 1992;33(7):987-93.
4. Qin X, Caputo FJ, Xu DZ, Deitch EA. Hydrophobicity of mucosal surface and its relationship to gut barrier function. *Shock.* 2008;29(3):372-6.
5. Brandtzaeg P. Molecular and cellular aspects of the secretory immunoglobulin system. *APMIS.* 1995;103(1):1-19.
6. Elphick DA, Mahida YR. Paneth cells: their role in innate immunity and inflammatory disease. *Gut.* 2005;54(12):1802-9.
7. Lencer WI, Cheung G, Strohmeier GR, Currie MG, Ouellette AJ, Selsted ME, et al. Induction of epithelial chloride secretion by channel-forming cryptdins 2 and 3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(16):8585-9.
8. Salzman NH, Hung K, Haribhai D, Chu H, Karlsson-Sjoberg J, Amir E, et al. Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat Immunol.* 2010;11(1):76-83.
9. Deplancke B, Gaskins HR. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am J Clin Nutr.* 2001;73(6):1131S-41S.
10. Ermund A, Schutte A, Johansson ME, Gustafsson JK, Hansson GC. Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. I. Gastrointestinal mucus layers have different properties depending on location as well as over the Peyer's patches. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2013;305(5):G341-7.
11. Birchenough GM, Johansson ME, Gustafsson JK, Bergstrom JH, Hansson GC. New developments in goblet cell mucus secretion and function. *Mucosal immunology.* 2015;8(4):712-9.
12. Johansson ME, Sjoval H, Hansson GC. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013;10(6):352-61.
13. Johansson ME, Larsson JM, Hansson GC. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108 Suppl 1:4659-65.
14. Johansson ME, Ambort D, Pelaseyed T, Schutte A, Gustafsson JK, Ermund A, et al. Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(22):3635-41.
15. Carrascosa C, Raheem D, Ramos F, Saraiva A, Raposo A. Microbial Biofilms in the Food Industry- A Comprehensive Review. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18(4).
16. Smith MW. Expression of digestive and absorptive function in differentiating enterocytes. *Annu Rev Physiol.* 1985;47:247-60.
17. Snoeck V, Goddeeris B, Cox E. The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. *Microbes Infect.* 2005;7(7-8):997-1004.
18. Henderson P, van Limbergen JE, Schwarze J, Wilson DC. Function of the intestinal epithelium and its dysregulation in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases.* 2011;17(1):382-95.
19. Specian RD, Oliver MG. Functional biology of intestinal goblet cells. *Am J Physiol.* 1991;260(2 Pt 1):C183-93.
20. Kim YS, Ho SB. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep.* 2010;12(5):319-30.

21. Knoop KA, Newberry RD. Goblet cells: multifaceted players in immunity at mucosal surfaces. *Mucosal immunology*. 2018;11(6):1551-7.
22. Gassler N. Paneth cells in intestinal physiology and pathophysiology. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2017;8(4):150-60.
23. Balda MS, Matter K. Tight junctions at a glance. *J Cell Sci*. 2008;121(Pt 22):3677-82.
24. Schulzke JD, Fromm M. Tight junctions: molecular structure meets function. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1165:1-6.
25. Bauer H, Stelzhammer W, Fuchs R, Weiger TM, Danninger C, Probst G, et al. Astrocytes and neurons express the tight junction-specific protein occludin in vitro. *Exp Cell Res*. 1999;250(2):434-8.
26. Blank F, Wehrli M, Lehmann A, Baum O, Gehr P, von Garnier C, et al. Macrophages and dendritic cells express tight junction proteins and exchange particles in an in vitro model of the human airway wall. *Immunobiology*. 2011;216(1-2):86-95.
27. Hartsock A, Nelson WJ. Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1778(3):660-9.
28. Escaffit F, Boudreau F, Beaulieu JF. Differential expression of claudin-2 along the human intestine: Implication of GATA-4 in the maintenance of claudin-2 in differentiating cells. *J Cell Physiol*. 2005;203(1):15-26.
29. Liu Y, Nusrat A, Schnell FJ, Reaves TA, Walsh S, Pochet M, et al. Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J Cell Sci*. 2000;113 (Pt 13):2363-74.
30. Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S, Tsukita S. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol*. 2005;171(6):939-45.
31. Mariano C, Sasaki H, Brites D, Brito MA. A look at tricellulin and its role in tight junction formation and maintenance. *Eur J Cell Biol*. 2011;90(10):787-96.
32. Kojima T, Murata M, Go M, Spray DC, Sawada N. Connexins induce and maintain tight junctions in epithelial cells. *J Membr Biol*. 2007;217(1-3):13-9.
33. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature reviews Immunology*. 2009;9(11):799-809.
34. Keita AV, Soderholm JD. The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors. *Neurogastroenterol Motil*. 2010;22(7):718-33.
35. Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature*. 2003;422(6927):37-44.
36. Utech M, Mennigen R, Bruewer M. Endocytosis and recycling of tight junction proteins in inflammation. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:484987.
37. Prasad S, Mingrino R, Kaukinen K, Hayes KL, Powell RM, MacDonald TT, et al. Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. *Lab Invest*. 2005;85(9):1139-62.
38. Wang F, Graham WV, Wang Y, Witkowski ED, Schwarz BT, Turner JR. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression. *Am J Pathol*. 2005;166(2):409-19.
39. Al-Sadi R, Ye D, Dokladny K, Ma TY. Mechanism of IL-1beta-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J Immunol*. 2008;180(8):5653-61.
40. Al-Sadi R, Boivin M, Ma T. Mechanism of cytokine modulation of epithelial tight junction barrier. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009;14(7):2765-78.
41. Abreu MT. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(2):131-44.
42. Asquith MJ, Boulard O, Powrie F, Maloy KJ. Pathogenic and protective roles of MyD88 in leukocytes and epithelial cells in mouse models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2010;139(2):519-29, 29 e1-2.

43. Cario E. Toll-like receptors in inflammatory bowel diseases: a decade later. *Inflammatory bowel diseases*. 2010;16(9):1583-97.
44. Vaishnava S, Behrendt CL, Ismail AS, Eckmann L, Hooper LV. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(52):20858-63.
45. Dupaul-Chicoine J, Yeretssian G, Doiron K, Bergstrom KS, McIntire CR, LeBlanc PM, et al. Control of intestinal homeostasis, colitis, and colitis-associated colorectal cancer by the inflammatory caspases. *Immunity*. 2010;32(3):367-78.
46. Allen IC, TeKippe EM, Woodford RM, Uronis JM, Holl EK, Rogers AB, et al. The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer. *J Exp Med*. 2010;207(5):1045-56.
47. Xu W, He B, Chiu A, Chadburn A, Shan M, Buldys M, et al. Epithelial cells trigger frontline immunoglobulin class switching through a pathway regulated by the inhibitor SLPI. *Nat Immunol*. 2007;8(3):294-303.
48. Cerutti A, Rescigno M. The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity*. 2008;28(6):740-50.
49. Corr SC, Gahan CC, Hill C. M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008;52(1):2-12.
50. Miller H, Zhang J, Kuolee R, Patel GB, Chen W. Intestinal M cells: the fallible sentinels? *World journal of gastroenterology*. 2007;13(10):1477-86.
51. Smith PD, Ochsenbauer-Jambor C, Smythies LE. Intestinal macrophages: unique effector cells of the innate immune system. *Immunol Rev*. 2005;206:149-59.
52. Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, McCartney-Francis N, Wahl LM, Roberts AB, et al. Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(16):5788-92.
53. Bamias G, Corridoni D, Pizarro TT, Cominelli F. New insights into the dichotomous role of innate cytokines in gut homeostasis and inflammation. *Cytokine*. 2012;59(3):451-9.
54. Steinbach EC, Plevy SE. The role of macrophages and dendritic cells in the initiation of inflammation in IBD. *Inflammatory bowel diseases*. 2014;20(1):166-75.
55. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews Immunology*. 2008;8(12):958-69.
56. Lelouard H, Fallet M, de Bovis B, Meresse S, Gorvel JP. Peyer's patch dendritic cells sample antigens by extending dendrites through M cell-specific transcellular pores. *Gastroenterology*. 2012;142(3):592-601 e3.
57. Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ, Bell SJ, Emmanuel AV, Knight SC, et al. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2005;129(1):50-65.
58. Mora JR, Bono MR, Manjunath N, Weninger W, Cavanagh LL, Roseblatt M, et al. Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature*. 2003;424(6944):88-93.
59. Menning A, Lodenkemper C, Westendorf AM, Szilagyi B, Buer J, Siewert C, et al. Retinoic acid-induced gut tropism improves the protective capacity of Treg in acute but not in chronic gut inflammation. *Eur J Immunol*. 2010;40(9):2539-48.
60. Gunn MD, Tangemann K, Tam C, Cyster JG, Rosen SD, Williams LT. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(1):258-63.
61. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*. 2006;24(6):677-88.

62. Iwakura Y, Ishigame H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(5):1218-22.
63. Conley ME, Delacroix DL. Intravascular and mucosal immunoglobulin A: two separate but related systems of immune defense? *Ann Intern Med*. 1987;106(6):892-9.
64. Brandtzaeg P, Prydz H. Direct evidence for an integrated function of J chain and secretory component in epithelial transport of immunoglobulins. *Nature*. 1984;311(5981):71-3.
65. Macpherson AJ, Uhr T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science*. 2004;303(5664):1662-5.
66. Soderholm JD, Olaison G, Peterson KH, Franzen LE, Lindmark T, Wiren M, et al. Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease. *Gut*. 2002;50(3):307-13.
67. Irvine EJ, Marshall JK. Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk. *Gastroenterology*. 2000;119(6):1740-4.
68. Sun Y, Fihn BM, Sjoval H, Jodal M. Enteric neurones modulate the colonic permeability response to luminal bile acids in rat colon in vivo. *Gut*. 2004;53(3):362-7.
69. Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, et al. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology*. 2005;129(2):550-64.
70. Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun*. 2000;68(12):7010-7.
71. Akhtar M, Watson JL, Nazli A, McKay DM. Bacterial DNA evokes epithelial IL-8 production by a MAPK-dependent, NF-kappaB-independent pathway. *FASEB J*. 2003;17(10):1319-21.
72. Rhee SH, Im E, Riegler M, Kokkotou E, O'Brien M, Pothoulakis C. Pathophysiological role of Toll-like receptor 5 engagement by bacterial flagellin in colonic inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(38):13610-5.
73. Rosenstiel P, Fantini M, Brautigam K, Kuhbacher T, Waetzig GH, Seegert D, et al. TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*. 2003;124(4):1001-9.
74. Berrebi D, Maudinas R, Hugot JP, Chamaillard M, Chareyre F, De Lagausie P, et al. Card15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon. *Gut*. 2003;52(6):840-6.
75. Franchimont D, Vermeire S, El Housni H, Pierik M, Van Steen K, Gustot T, et al. Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut*. 2004;53(7):987-92.
76. Malmstrom V, Shipton D, Singh B, Al-Shamkhani A, Puklavec MJ, Barclay AN, et al. CD134L expression on dendritic cells in the mesenteric lymph nodes drives colitis in T cell-restored SCID mice. *J Immunol*. 2001;166(11):6972-81.
77. Krajina T, Leithauser F, Moller P, Trobonjaca Z, Reimann J. Colonic lamina propria dendritic cells in mice with CD4+ T cell-induced colitis. *Eur J Immunol*. 2003;33(4):1073-83.
78. Ashcroft AJ, Cruickshank SM, Croucher PI, Perry MJ, Rollinson S, Lippitt JM, et al. Colonic dendritic cells, intestinal inflammation, and T cell-mediated bone destruction are modulated by recombinant osteoprotegerin. *Immunity*. 2003;19(6):849-61.
79. Baumgart DC, Metzke D, Schmitz J, Scheffold A, Sturm A, Wiedenmann B, et al. Patients with active inflammatory bowel disease lack immature peripheral blood plasmacytoid and myeloid dendritic cells. *Gut*. 2005;54(2):228-36.
80. Steinman RM, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(1):351-8.

81. Papadakis KA, Zhu D, Prehn JL, Landers C, Avanesyan A, Lafkas G, et al. Dominant role for TL1A/DR3 pathway in IL-12 plus IL-18-induced IFN-gamma production by peripheral blood and mucosal CCR9+ T lymphocytes. *J Immunol*. 2005;174(8):4985-90.
82. Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet*. 2007;369(9573):1641-57.
83. Cruickshank SM, McVay LD, Baumgart DC, Felsburg PJ, Carding SR. Colonic epithelial cell mediated suppression of CD4 T cell activation. *Gut*. 2004;53(5):678-84.
84. van de Wal Y, Corazza N, Allez M, Mayer LF, Iijima H, Ryan M, et al. Delineation of a CD1d-restricted antigen presentation pathway associated with human and mouse intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*. 2003;124(5):1420-31.
85. Nakazawa A, Dotan I, Brimnes J, Allez M, Shao L, Tsushima F, et al. The expression and function of costimulatory molecules B7H and B7-H1 on colonic epithelial cells. *Gastroenterology*. 2004;126(5):1347-57.
86. Ina K, Itoh J, Fukushima K, Kusugami K, Yamaguchi T, Kyokane K, et al. Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance. *J Immunol*. 1999;163(2):1081-90.
87. Van den Brande JM, Braat H, van den Brink GR, Versteeg HH, Bauer CA, Hoedemaeker I, et al. Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2003;124(7):1774-85.
88. Martin B, Banz A, Bienvenu B, Cordier C, Dautigny N, Becourt C, et al. Suppression of CD4+ T lymphocyte effector functions by CD4+CD25+ cells in vivo. *J Immunol*. 2004;172(6):3391-8.
89. Neurath MF, Weigmann B, Finotto S, Glickman J, Nieuwenhuis E, Iijima H, et al. The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *J Exp Med*. 2002;195(9):1129-43.
90. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*. 2005;201(2):233-40.
91. Fuss IJ, Becker C, Yang Z, Groden C, Hornung RL, Heller F, et al. Both IL-12p70 and IL-23 are synthesized during active Crohn's disease and are down-regulated by treatment with anti-IL-12 p40 monoclonal antibody. *Inflammatory bowel diseases*. 2006;12(1):9-15.
92. Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S, et al. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *The Journal of clinical investigation*. 2004;113(10):1490-7.
93. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*. 2006;441(7090):231-4.
94. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 2006;24(2):179-89.
95. Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*. 2003;421(6921):384-8.
96. Neunlist M, Aubert P, Toquet C, Oreshkova T, Barouk J, Lehur PA, et al. Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. *Gut*. 2003;52(1):84-90.
97. Furlan R, Ardizzone S, Palazzolo L, Rimoldi A, Perego F, Barbic F, et al. Sympathetic overactivity in active ulcerative colitis: effects of clonidine. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006;290(1):R224-32.

98. Demaude J, Salvador-Cartier C, Fioramonti J, Ferrier L, Bueno L. Phenotypic changes in colonocytes following acute stress or activation of mast cells in mice: implications for delayed epithelial barrier dysfunction. *Gut*. 2006;55(5):655-61.
99. Gaya DR, Russell RK, Nimmo ER, Satsangi J. New genes in inflammatory bowel disease: lessons for complex diseases? *Lancet*. 2006;367(9518):1271-84.
100. Hampe J, Schreiber S, Shaw SH, Lau KF, Bridger S, Macpherson AJ, et al. A genomewide analysis provides evidence for novel linkages in inflammatory bowel disease in a large European cohort. *Am J Hum Genet*. 1999;64(3):808-16.
101. Lahjouji K, Mitchell GA, Qureshi IA. Carnitine transport by organic cation transporters and systemic carnitine deficiency. *Mol Genet Metab*. 2001;73(4):287-97.
102. Williams CN, Kocher K, Lander ES, Daly MJ, Rioux JD. Using a genome-wide scan and meta-analysis to identify a novel IBD locus and confirm previously identified IBD loci. *Inflammatory bowel diseases*. 2002;8(6):375-81.
103. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*. 2006;314(5804):1461-3.
104. Tamai I, Yabuuchi H, Nezu J, Sai Y, Oku A, Shimane M, et al. Cloning and characterization of a novel human pH-dependent organic cation transporter, OCTN1. *FEBS Lett*. 1997;419(1):107-11.
105. Cummings JR, Jewell DP. Clinical implications of inflammatory bowel disease genetics on phenotype. *Inflammatory bowel diseases*. 2005;11(1):56-61.
106. Russell RK, Satsangi J. IBD: a family affair. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2004;18(3):525-39.
107. Satsangi J, Grootsholten C, Holt H, Jewell DP. Clinical patterns of familial inflammatory bowel disease. *Gut*. 1996;38(5):738-41.
108. Loftus EV, Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*. 2004;126(6):1504-17.
109. Zheng JJ, Zhu XS, Huangfu Z, Gao ZX, Guo ZR, Wang Z. Crohn's disease in mainland China: a systematic analysis of 50 years of research. *Chin J Dig Dis*. 2005;6(4):175-81.
110. Moum B, Aadland E, Ekbohm A, Vatn MH. Seasonal variations in the onset of ulcerative colitis. *Gut*. 1996;38(3):376-8.
111. Sonnenberg A, Jacobsen SJ, Wasserman IH. Periodicity of hospital admissions for inflammatory bowel disease. *The American journal of gastroenterology*. 1994;89(6):847-51.
112. Soncini M, Triossi O, Leo P, Magni G, Giglio LA, Mosca PG, et al. Seasonal patterns of hospital treatment for inflammatory bowel disease in Italy. *Digestion*. 2006;73(1):1-8.
113. Lewis JD, Aberra FN, Lichtenstein GR, Bilker WB, Brensinger C, Strom BL. Seasonal variation in flares of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2004;126(3):665-73.
114. Kurata JH, Kantor-Fish S, Frankl H, Godby P, Vadheim CM. Crohn's disease among ethnic groups in a large health maintenance organization. *Gastroenterology*. 1992;102(6):1940-8.
115. Nguyen GC, Torres EA, Regueiro M, Bromfield G, Bitton A, Stempak J, et al. Inflammatory bowel disease characteristics among African Americans, Hispanics, and non-Hispanic Whites: characterization of a large North American cohort. *The American journal of gastroenterology*. 2006;101(5):1012-23.
116. Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Landmark article Oct 15, 1932. Regional ileitis. A pathological and clinical entity. By Burril B. Crohn, Leon Ginzburg, and Gordon D. Oppenheimer. *JAMA*. 1984;251(1):73-9.
117. Svartz N. Salazopyrin, a new sulfanilamide preparation. A. Therapeutic Results in Rheumatic Polyarthrits. B. Therapeutic Results in Ulcerative Colitis. C. Toxic Manifestations in Treatment with Sulfanilamide Preparations. *Acta Medica Scandinavica*. 2009;110:577-98.

118. Caprilli R, Cesarini M, Angelucci E, Frieri G. The long journey of salicylates in ulcerative colitis: The past and the future. *J Crohns Colitis*. 2009;3(3):149-56.
119. Rousseaux C, Lefebvre B, Dubuquoy L, Lefebvre P, Romano O, Auwerx J, et al. Intestinal antiinflammatory effect of 5-aminosalicylic acid is dependent on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J Exp Med*. 2005;201(8):1205-15.
120. Harris SG, Phipps RP. The nuclear receptor PPAR gamma is expressed by mouse T lymphocytes and PPAR gamma agonists induce apoptosis. *Eur J Immunol*. 2001;31(4):1098-105.
121. Almawi WY, Melemedjian OK. Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. *J Leukoc Biol*. 2002;71(1):9-15.
122. Stahn C, Lowenberg M, Hommes DW, Buttgerit F. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. *Mol Cell Endocrinol*. 2007;275(1-2):71-8.
123. Reily MM, Pantoja C, Hu X, Chinenov Y, Rogatsky I. The GRIP1:IRF3 interaction as a target for glucocorticoid receptor-mediated immunosuppression. *EMBO J*. 2006;25(1):108-17.
124. Buttgerit F, Straub RH, Wehling M, Burmester GR. Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: an update on the mechanisms of action. *Arthritis Rheum*. 2004;50(11):3408-17.
125. Derijks LJ, Gilissen LP, Hooymans PM, Hommes DW. Review article: thiopurines in inflammatory bowel disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2006;24(5):715-29.
126. Pierik M, Rutgeerts P, Vlietinck R, Vermeire S. Pharmacogenetics in inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology*. 2006;12(23):3657-67.
127. Tiede I, Fritz G, Strand S, Poppe D, Dvorsky R, Strand D, et al. CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. *The Journal of clinical investigation*. 2003;111(8):1133-45.
128. Ben-Horin S, Goldstein I, Fudim E, Picard O, Yerushalmi Z, Barshack I, et al. Early preservation of effector functions followed by eventual T cell memory depletion: a model for the delayed onset of the effect of thiopurines. *Gut*. 2009;58(3):396-403.
129. Shuai K, Liu B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nature reviews Immunology*. 2003;3(11):900-11.
130. Sandborn WJ, Su C, Sands BE, D'Haens GR, Vermeire S, Schreiber S, et al. Tofacitinib as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. *N Engl J Med*. 2017;376(18):1723-36.
131. Charles-Schoeman C, Wicker P, Gonzalez-Gay MA, Boy M, Zuckerman A, Soma K, et al. Cardiovascular safety findings in patients with rheumatoid arthritis treated with tofacitinib, an oral Janus kinase inhibitor. *Semin Arthritis Rheum*. 2016;46(3):261-71.
132. Sandborn WJ, Ghosh S, Panes J, Vranic I, Wang W, Niezychowski W, et al. A phase 2 study of tofacitinib, an oral Janus kinase inhibitor, in patients with Crohn's disease. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2014;12(9):1485-93 e2.
133. Panes J, Sandborn WJ, Schreiber S, Sands BE, Vermeire S, D'Haens G, et al. Tofacitinib for induction and maintenance therapy of Crohn's disease: results of two phase IIb randomised placebo-controlled trials. *Gut*. 2017;66(6):1049-59.
134. Marafini I, Zorzi F, Codazza S, Pallone F, Monteleone G. TGF-Beta signaling manipulation as potential therapy for IBD. *Curr Drug Targets*. 2013;14(12):1400-4.
135. Boirivant M, Pallone F, Di Giacinto C, Fina D, Monteleone I, Marinaro M, et al. Inhibition of Smad7 with a specific antisense oligonucleotide facilitates TGF-beta1-mediated suppression of colitis. *Gastroenterology*. 2006;131(6):1786-98.

136. Monteleone G, Kumberova A, Croft NM, McKenzie C, Steer HW, MacDonald TT. Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. *The Journal of clinical investigation*. 2001;108(4):601-9.
137. Monteleone G, Neurath MF, Ardizzone S, Di Sabatino A, Fantini MC, Castiglione F, et al. Mongersen, an oral SMAD7 antisense oligonucleotide, and Crohn's disease. *N Engl J Med*. 2015;372(12):1104-13.
138. Sanchez T, Hla T. Structural and functional characteristics of S1P receptors. *J Cell Biochem*. 2004;92(5):913-22.
139. Danese S, Furfaro F, Vetrano S. Targeting S1P in Inflammatory Bowel Disease: New Avenues for Modulating Intestinal Leukocyte Migration. *Journal of Crohn's & colitis*. 2018;12(suppl_2):S678-S86.
140. Scott FL, Clemons B, Brooks J, Brahmachary E, Powell R, Dedman H, et al. Ozanimod (RPC1063) is a potent sphingosine-1-phosphate receptor-1 (S1P1) and receptor-5 (S1P5) agonist with autoimmune disease-modifying activity. *Br J Pharmacol*. 2016;173(11):1778-92.
141. Nielsen OH, Li Y, Johansson-Lindbom B, Coskun M. Sphingosine-1-Phosphate Signaling in Inflammatory Bowel Disease. *Trends Mol Med*. 2017;23(4):362-74.
142. Sandborn WJ, Feagan BG, Wolf DC, D'Haens G, Vermeire S, Hanauer SB, et al. Ozanimod Induction and Maintenance Treatment for Ulcerative Colitis. *N Engl J Med*. 2016;374(18):1754-62.
143. Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, et al. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med*. 2005;353(23):2462-76.
144. Reinisch W, Sandborn WJ, Hommes DW, D'Haens G, Hanauer S, Schreiber S, et al. Adalimumab for induction of clinical remission in moderately to severely active ulcerative colitis: results of a randomised controlled trial. *Gut*. 2011;60(6):780-7.
145. Sandborn WJ, van Assche G, Reinisch W, Colombel JF, D'Haens G, Wolf DC, et al. Adalimumab induces and maintains clinical remission in patients with moderate-to-severe ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2012;142(2):257-65 e1-3.
146. Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, Mayer L, Present DH, Braakman T, et al. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N Engl J Med*. 1997;337(15):1029-35.
147. Hanauer SB, Sandborn WJ, Rutgeerts P, Fedorak RN, Lukas M, MacIntosh D, et al. Human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody (adalimumab) in Crohn's disease: the CLASSIC-I trial. *Gastroenterology*. 2006;130(2):323-33; quiz 591.
148. Schreiber S, Khaliq-Kareemi M, Lawrance IC, Thomsen OO, Hanauer SB, McColm J, et al. Maintenance therapy with certolizumab pegol for Crohn's disease. *N Engl J Med*. 2007;357(3):239-50.
149. Sandborn WJ, Hanauer SB, Rutgeerts P, Fedorak RN, Lukas M, MacIntosh DG, et al. Adalimumab for maintenance treatment of Crohn's disease: results of the CLASSIC II trial. *Gut*. 2007;56(9):1232-9.
150. Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, et al. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet*. 2002;359(9317):1541-9.
151. Allez M, Karmiris K, Louis E, Van Assche G, Ben-Horin S, Klein A, et al. Report of the ECCO pathogenesis workshop on anti-TNF therapy failures in inflammatory bowel diseases: definitions, frequency and pharmacological aspects. *J Crohns Colitis*. 2010;4(4):355-66.
152. D'Haens GR, Panaccione R, Higgins PD, Vermeire S, Gassull M, Chowers Y, et al. The London Position Statement of the World Congress of Gastroenterology on Biological Therapy for IBD with the European Crohn's and Colitis Organization: when to start, when to stop, which drug to choose, and how to predict response? *The American journal of gastroenterology*. 2011;106(2):199-212; quiz 3.

153. Ben-Horin S, Chowers Y. Review article: loss of response to anti-TNF treatments in Crohn's disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2011;33(9):987-95.
154. Toruner M, Loftus EV, Jr., Harmsen WS, Zinsmeister AR, Orenstein R, Sandborn WJ, et al. Risk factors for opportunistic infections in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2008;134(4):929-36.
155. Andersen NN, Jess T. Risk of infections associated with biological treatment in inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(43):16014-9.
156. Siegel CA, Marden SM, Persing SM, Larson RJ, Sands BE. Risk of lymphoma associated with combination anti-tumor necrosis factor and immunomodulator therapy for the treatment of Crohn's disease: a meta-analysis. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2009;7(8):874-81.
157. Benson JM, Peritt D, Scallan BJ, Heavner GA, Shealy DJ, Giles-Komar JM, et al. Discovery and mechanism of ustekinumab: a human monoclonal antibody targeting interleukin-12 and interleukin-23 for treatment of immune-mediated disorders. *MAbs*. 2011;3(6):535-45.
158. Feagan BG, Sandborn WJ, Gasink C, Jacobstein D, Lang Y, Friedman JR, et al. Ustekinumab as Induction and Maintenance Therapy for Crohn's Disease. *N Engl J Med*. 2016;375(20):1946-60.
159. Hibi T, Imai Y, Murata Y, Matsushima N, Zheng R, Gasink C. Efficacy and safety of ustekinumab in Japanese patients with moderately to severely active Crohn's disease: a subpopulation analysis of phase 3 induction and maintenance studies. *Intest Res*. 2017;15(4):475-86.
160. Papp KA, Griffiths CE, Gordon K, Lebwohl M, Szapary PO, Wasfi Y, et al. Long-term safety of ustekinumab in patients with moderate-to-severe psoriasis: final results from 5 years of follow-up. *Br J Dermatol*. 2013;168(4):844-54.
161. Menter A, Papp KA, Gooderham M, Pariser DM, Augustin M, Kerdel FA, et al. Drug survival of biologic therapy in a large, disease-based registry of patients with psoriasis: results from the Psoriasis Longitudinal Assessment and Registry (PSOLAR). *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2016;30(7):1148-58.
162. Papp K, Gottlieb AB, Naldi L, Pariser D, Ho V, Goyal K, et al. Safety Surveillance for Ustekinumab and Other Psoriasis Treatments From the Psoriasis Longitudinal Assessment and Registry (PSOLAR). *J Drugs Dermatol*. 2015;14(7):706-14.
163. Rath T, Billmeier U, Ferrazzi F, Vieth M, Ekici A, Neurath MF, et al. Effects of Anti-Integrin Treatment With Vedolizumab on Immune Pathways and Cytokines in Inflammatory Bowel Diseases. *Front Immunol*. 2018;9:1700.
164. Schleier L, Wiendl M, Heidbreder K, Binder MT, Atreya R, Rath T, et al. Non-classical monocyte homing to the gut via alpha4beta7 integrin mediates macrophage-dependent intestinal wound healing. *Gut*. 2020;69(2):252-63.
165. Shim HH, Chan PW, Chuah SW, Schwender BJ, Kong SC, Ling KL. A review of vedolizumab and ustekinumab for the treatment of inflammatory bowel diseases. *JGH Open*. 2018;2(5):223-34.
166. Lobaton T, Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. Review article: anti-adhesion therapies for inflammatory bowel disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2014;39(6):579-94.
167. Vermeire S, Ghosh S, Panes J, Dahlerup JF, Luegering A, Sirotiakova J, et al. The mucosal addressin cell adhesion molecule antibody PF-00547,659 in ulcerative colitis: a randomised study. *Gut*. 2011;60(8):1068-75.
168. Vermeire S, Sandborn WJ, Danese S, Hebuterne X, Salzberg BA, Klopocka M, et al. Anti-MAdCAM antibody (PF-00547659) for ulcerative colitis (TURANDOT): a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2017;390(10090):135-44.
169. van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, de Vos WM, et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med*. 2013;368(5):407-15.

170. Surawicz CM, Brandt LJ, Binion DG, Ananthakrishnan AN, Curry SR, Gilligan PH, et al. Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infections. *The American journal of gastroenterology*. 2013;108(4):478-98; quiz 99.
171. Bennet JD, Brinkman M. Treatment of ulcerative colitis by implantation of normal colonic flora. *Lancet*. 1989;1(8630):164.
172. Paramsothy S, Paramsothy R, Rubin DT, Kamm MA, Kaakoush NO, Mitchell HM, et al. Faecal Microbiota Transplantation for Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Crohns Colitis*. 2017;11(10):1180-99.
173. Narula N, Kassam Z, Yuan Y, Colombel JF, Ponsioen C, Reinisch W, et al. Systematic Review and Meta-analysis: Fecal Microbiota Transplantation for Treatment of Active Ulcerative Colitis. *Inflammatory bowel diseases*. 2017;23(10):1702-9.
174. Na SY, Moon W. [Evolving Therapeutic Strategies in the Inflammatory Bowel Disease]. *Korean J Gastroenterol*. 2018;71(2):61-8.
175. Okamoto R, Watanabe M. Investigating cell therapy for inflammatory bowel disease. *Expert opinion on biological therapy*. 2016;16(8):1015-23.
176. Hawkey CJ, Allez M, Clark MM, Labopin M, Lindsay JO, Ricart E, et al. Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Refractory Crohn Disease: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2015;314(23):2524-34.
177. Colombel JF, Sandborn WJ, Reinisch W, Mantzaris GJ, Kornbluth A, Rachmilewitz D, et al. Infliximab, azathioprine, or combination therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med*. 2010;362(15):1383-95.
178. Panaccione R, Ghosh S, Middleton S, Marquez JR, Scott BB, Flint L, et al. Combination therapy with infliximab and azathioprine is superior to monotherapy with either agent in ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2014;146(2):392-400 e3.
179. Feagan BG, Rutgeerts P, Sands BE, Hanauer S, Colombel JF, Sandborn WJ, et al. Vedolizumab as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med*. 2013;369(8):699-710.
180. Sands BE, Kozarek R, Spainhour J, Barish CF, Becker S, Goldberg L, et al. Safety and tolerability of concurrent natalizumab treatment for patients with Crohn's disease not in remission while receiving infliximab. *Inflammatory bowel diseases*. 2007;13(1):2-11.
181. Hirten RP, Iacucci M, Shah S, Ghosh S, Colombel JF. Combining Biologics in Inflammatory Bowel Disease and Other Immune Mediated Inflammatory Disorders. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2018;16(9):1374-84.
182. Barbalho SM, Bosso H, Salzedas-Pescinini LM, de Alvares Goulart R. Green tea: A possibility in the therapeutic approach of inflammatory bowel diseases?: Green tea and inflammatory bowel diseases. *Complement Ther Med*. 2019;43:148-53.
183. Wang H, Xue Y, Zhang H, Huang Y, Yang G, Du M, et al. Dietary grape seed extract ameliorates symptoms of inflammatory bowel disease in IL10-deficient mice. *Mol Nutr Food Res*. 2013;57(12):2253-7.
184. Vezza T, Rodriguez-Nogales A, Algieri F, Utrilla MP, Rodriguez-Cabezas ME, Galvez J. Flavonoids in Inflammatory Bowel Disease: A Review. *Nutrients*. 2016;8(4):211.
185. Duenas M, Munoz-Gonzalez I, Cueva C, Jimenez-Giron A, Sanchez-Patan F, Santos-Buelga C, et al. A survey of modulation of gut microbiota by dietary polyphenols. *Biomed Res Int*. 2015;2015:850902.
186. Liu F, Li D, Wang X, Cui Y, Li X. Polyphenols intervention is an effective strategy to ameliorate inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Int J Food Sci Nutr*. 2021;72(1):14-25.

187. Moura FA, de Andrade KQ, Dos Santos JCF, Araujo ORP, Goulart MOF. Antioxidant therapy for treatment of inflammatory bowel disease: Does it work? *Redox Biol.* 2015;6:617-39.
188. Asakura H, Kitahora T. Chapter 23 - Antioxidants and Polyphenols in Inflammatory Bowel Disease: Ulcerative Colitis and Crohn Disease. In: Watson RR, Preedy VR, Zibadi S, editors. *Polyphenols: Prevention and Treatment of Human Disease (Second Edition)*: Academic Press; 2018. p. 279-92.
189. Ebrahimi A, Schluesener H. Natural polyphenols against neurodegenerative disorders: potentials and pitfalls. *Ageing Res Rev.* 2012;11(2):329-45.
190. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004;79(5):727-47.
191. Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouysegu L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2011;50(3):586-621.
192. Stuart JA, Robb EL. Health Effects of Resveratrol and Its Derivatives. In: Stuart JA, Robb EL, editors. *Bioactive Polyphenols from Wine Grapes*. New York, NY: Springer New York; 2013. p. 9-25.
193. Abdallah DM, Ismael NR. Resveratrol abrogates adhesion molecules and protects against TNBS-induced ulcerative colitis in rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2011;89(11):811-8.
194. Sanchez-Fidalgo S, Cardeno A, Villegas I, Talero E, de la Lastra CA. Dietary supplementation of resveratrol attenuates chronic colonic inflammation in mice. *Eur J Pharmacol.* 2010;633(1-3):78-84.
195. Davi G, Santilli F, Patrono C. Nutraceuticals in diabetes and metabolic syndrome. *Cardiovasc Ther.* 2010;28(4):216-26.
196. Lu MF, Xiao ZT, Zhang HY. Where do health benefits of flavonoids come from? Insights from flavonoid targets and their evolutionary history. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;434(4):701-4.
197. Romano B, Borrelli F, Fasolino I, Capasso R, Piscitelli F, Cascio M, et al. The cannabinoid TRPA1 agonist cannabichromene inhibits nitric oxide production in macrophages and ameliorates murine colitis. *Br J Pharmacol.* 2013;169(1):213-29.
198. Epstein J, Sanderson IR, Macdonald TT. Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies. *Br J Nutr.* 2010;103(11):1545-57.
199. Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H. Curcumin: the Indian solid gold. *Adv Exp Med Biol.* 2007;595:1-75.
200. Shiyou Li WY, Guangrui Deng, Peiyang Yang, Bharat Aggarwal. Chemical composition and product quality control of turmeric (*Curcuma longa* L.) *Pharmaceutical Crops.* 2011;2:28-54.
201. Perko T, Ravber M, Knez Ž, Škerget M. Isolation, characterization and formulation of curcuminoids and in vitro release study of the encapsulated particles. *The Journal of Supercritical Fluids.* 2015;103:48-54.
202. Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer.* 2005;41(13):1955-68.
203. Barzegar A. The role of electron-transfer and H-atom donation on the superb antioxidant activity and free radical reaction of curcumin. *Food Chem.* 2012;135(3):1369-76.
204. Ansari MJ, Ahmad S, Kohli K, Ali J, Khar RK. Stability-indicating HPTLC determination of curcumin in bulk drug and pharmaceutical formulations. *J Pharm Biomed Anal.* 2005;39(1-2):132-8.
205. Gupta SC, Kismali G, Aggarwal BB. Curcumin, a component of turmeric: from farm to pharmacy. *Biofactors.* 2013;39(1):2-13.
206. Gopi S, Jacob J, Varma K, Jude S, Amalraj A, Arundhathy CA, et al. Comparative Oral Absorption of Curcumin in a Natural Turmeric Matrix with Two Other Curcumin Formulations: An Open-label Parallel-arm Study. *Phytother Res.* 2017;31(12):1883-91.

207. Prasad S, Tyagi AK, Aggarwal BB. Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: the golden pigment from golden spice. *Cancer Res Treat*. 2014;46(1):2-18.
208. Priyadarsini KI. Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. 2009;10(2):81-95.
209. Jovanovic SV, Steenken S, Boone CW, Simic MG. H-Atom Transfer Is A Preferred Antioxidant Mechanism of Curcumin. *Journal of the American Chemical Society*. 1999;121(41):9677-81.
210. Galano A, Álvarez-Diduk R, Ramírez-Silva MT, Alarcón-Ángeles G, Rojas-Hernández A. Role of the reacting free radicals on the antioxidant mechanism of curcumin. *Chemical Physics*. 2009;363:13-23.
211. Payton F, Sandusky P, Alworth WL. NMR study of the solution structure of curcumin. *J Nat Prod*. 2007;70(2):143-6.
212. Kolev TM, Velcheva EA, Stamboliyska BA, Spitteller M. DFT and experimental studies of the structure and vibrational spectra of curcumin. *International Journal of Quantum Chemistry*. 2005;102(6):1069-79.
213. Pan MH, Huang TM, Lin JK. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug Metab Dispos*. 1999;27(4):486-94.
214. Ireson C, Orr S, Jones DJ, Verschoyle R, Lim CK, Luo JL, et al. Characterization of metabolites of the chemopreventive agent curcumin in human and rat hepatocytes and in the rat in vivo, and evaluation of their ability to inhibit phorbol ester-induced prostaglandin E2 production. *Cancer Res*. 2001;61(3):1058-64.
215. Ireson CR, Jones DJ, Orr S, Coughtrie MW, Boocock DJ, Williams ML, et al. Metabolism of the cancer chemopreventive agent curcumin in human and rat intestine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002;11(1):105-11.
216. Aggarwal BB, Deb L, Prasad S. Curcumin differs from tetrahydrocurcumin for molecular targets, signaling pathways and cellular responses. *Molecules*. 2014;20(1):185-205.
217. Panahi Y, Khalili N, Hosseini MS, Abbasinazari M, Sahebkar A. Lipid-modifying effects of adjunctive therapy with curcuminoids-piperine combination in patients with metabolic syndrome: results of a randomized controlled trial. *Complement Ther Med*. 2014;22(5):851-7.
218. Shoji M, Nakagawa K, Watanabe A, Tsuduki T, Yamada T, Kuwahara S, et al. Comparison of the effects of curcumin and curcumin glucuronide in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Food Chem*. 2014;151:126-32.
219. Ghoneim AI, Abdel-Naim AB, Khalifa AE, El-Denshary ES. Protective effects of curcumin against ischaemia/reperfusion insult in rat forebrain. *Pharmacol Res*. 2002;46(3):273-9.
220. Bishnoi M, Chopra K, Kulkarni SK. Protective effect of Curcumin, the active principle of turmeric (*Curcuma longa*) in haloperidol-induced orofacial dyskinesia and associated behavioural, biochemical and neurochemical changes in rat brain. *Pharmacol Biochem Behav*. 2008;88(4):511-22.
221. Gonzales AM, Orlando RA. Curcumin and resveratrol inhibit nuclear factor-kappaB-mediated cytokine expression in adipocytes. *Nutr Metab (Lond)*. 2008;5:17.
222. Soetikno V, Sari FR, Veeraveedu PT, Thandavarayan RA, Harima M, Sukumaran V, et al. Curcumin ameliorates macrophage infiltration by inhibiting NF-kappaB activation and proinflammatory cytokines in streptozotocin induced-diabetic nephropathy. *Nutr Metab (Lond)*. 2011;8(1):35.
223. Yang H, Du Z, Wang W, Song M, Sanidad K, Sukamtoh E, et al. Structure-Activity Relationship of Curcumin: Role of the Methoxy Group in Anti-inflammatory and Anticolitis Effects of Curcumin. *J Agric Food Chem*. 2017;65(22):4509-15.

224. Midura-Kiela MT, Radhakrishnan VM, Larmonier CB, Laubitz D, Ghishan FK, Kiela PR. Curcumin inhibits interferon-gamma signaling in colonic epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012;302(1):G85-96.
225. Atreya I, Atreya R, Neurath MF. NF-kappaB in inflammatory bowel disease. *J Intern Med*. 2008;263(6):591-6.
226. Zhao F, Gong Y, Hu Y, Lu M, Wang J, Dong J, et al. Curcumin and its major metabolites inhibit the inflammatory response induced by lipopolysaccharide: translocation of nuclear factor-kappaB as potential target. *Mol Med Rep*. 2015;11(4):3087-93.
227. Bhaumik S, Jyothi MD, Khar A. Differential modulation of nitric oxide production by curcumin in host macrophages and NK cells. *FEBS Lett*. 2000;483(1):78-82.
228. Li X, Liu X. Effect of curcumin on immune function of mice. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2005;25(2):137-40.
229. Menon VP, Sudheer AR. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Adv Exp Med Biol*. 2007;595:105-25.
230. Ukil A, Maity S, Karmakar S, Datta N, Vedasiromoni JR, Das PK. Curcumin, the major component of food flavour turmeric, reduces mucosal injury in trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis. *Br J Pharmacol*. 2003;139(2):209-18.
231. Yang KY, Lin LC, Tseng TY, Wang SC, Tsai TH. Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007;853(1-2):183-9.
232. Cheng AL, Hsu CH, Lin JK, Hsu MM, Ho YF, Shen TS, et al. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Res*. 2001;21(4B):2895-900.
233. Sharma RA, Euden SA, Platton SL, Cooke DN, Shafayat A, Hewitt HR, et al. Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance. *Clin Cancer Res*. 2004;10(20):6847-54.
234. Vareed SK, Kakarala M, Ruffin MT, Crowell JA, Normolle DP, Djuric Z, et al. Pharmacokinetics of curcumin conjugate metabolites in healthy human subjects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17(6):1411-7.
235. Khezri K, Saeedi M, Mohammadamini H, Zakaryaei AS. A comprehensive review of the therapeutic potential of curcumin nanoformulations. *Phytother Res*. 2021;35(10):5527-63.
236. Ipar VS, Dsouza A, Devarajan PV. Enhancing Curcumin Oral Bioavailability Through Nanoformulations. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2019;44(4):459-80.
237. Kou L, Bhutia YD, Yao Q, He Z, Sun J, Ganapathy V. Transporter-Guided Delivery of Nanoparticles to Improve Drug Permeation across Cellular Barriers and Drug Exposure to Selective Cell Types. *Front Pharmacol*. 2018;9:27.
238. Blanco E, Shen H, Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat Biotechnol*. 2015;33(9):941-51.
239. Mitragotri S, Lammers T, Bae YH, Schwendeman S, De Smedt S, Leroux JC, et al. Drug Delivery Research for the Future: Expanding the Nano Horizons and Beyond. *J Control Release*. 2017;246:183-4.
240. Wechsler ME, Ramirez JEV, Peppas NA. 110(th) Anniversary: Nanoparticle mediated drug delivery for the treatment of Alzheimer's disease: Crossing the blood-brain barrier. *Ind Eng Chem Res*. 2019;58(33):15079-87.
241. Hua S, de Matos MBC, Metselaar JM, Storm G. Current Trends and Challenges in the Clinical Translation of Nanoparticulate Nanomedicines: Pathways for Translational Development and Commercialization. *Front Pharmacol*. 2018;9:790.

242. Kulkarni SA, Feng S-S. Effects of Particle Size and Surface Modification on Cellular Uptake and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery. *Pharmaceutical Research*. 2013;30(10):2512-22.
243. Kobayashi KS, Chamillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nunez G, et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science*. 2005;307(5710):731-4.
244. Prasad PN. *Introduction to Nanomedicine and Nano-bioengineering*. John Wiley & Sons ed2012. 608 p.
245. Engineering TRSaTRAO. *Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties*. 2004.
246. Yang W, Liang H, Ma S, Wang D, Huang J. Gold nanoparticle based photothermal therapy: Development and application for effective cancer treatment. *Sustainable Materials and Technologies*. 2019;22:e00109.
247. Wang J, Potocny AM, Rosenthal J, Day ES. Gold Nanoshell-Linear Tetrapyrrole Conjugates for Near Infrared-Activated Dual Photodynamic and Photothermal Therapies. *ACS Omega*. 2020;5(1):926-40.
248. Bobo D, Robinson KJ, Islam J, Thurecht KJ, Corrie SR. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharm Res*. 2016;33(10):2373-87.
249. Arias LS, Pessan JP, Vieira APM, Lima TMT, Delbem ACB, Monteiro DR. Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications: A Perspective on Synthesis, Drugs, Antimicrobial Activity, and Toxicity. *Antibiotics (Basel)*. 2018;7(2).
250. Huang KW, Hsu FF, Qiu JT, Chern GJ, Lee YA, Chang CC, et al. Highly efficient and tumor-selective nanoparticles for dual-targeted immunogene therapy against cancer. *Sci Adv*. 2020;6(3):eaax5032.
251. Xu C, Nam J, Hong H, Xu Y, Moon JJ. Positron Emission Tomography-Guided Photodynamic Therapy with Biodegradable Mesoporous Silica Nanoparticles for Personalized Cancer Immunotherapy. *ACS Nano*. 2019;13(10):12148-61.
252. Wagner AM, Knipe JM, Orive G, Peppas NA. Quantum dots in biomedical applications. *Acta Biomater*. 2019;94:44-63.
253. Zhang Y, Meng S, Ding J, Peng Q, Yu Y. Transition metal-coordinated graphitic carbon nitride dots as a sensitive and facile fluorescent probe for beta-amyloid peptide detection. *Analyst*. 2019;144(2):504-11.
254. Manshian BB, Jimenez J, Himmelreich U, Soenen SJ. Personalized medicine and follow-up of therapeutic delivery through exploitation of quantum dot toxicity. *Biomaterials*. 2017;127:1-12.
255. Fonseca-Santos B, Gremiao MP, Chorilli M. Nanotechnology-based drug delivery systems for the treatment of Alzheimer's disease. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:4981-5003.
256. Sercombe L, Veerati T, Moheimani F, Wu SY, Sood AK, Hua S. Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. *Front Pharmacol*. 2015;6:286.
257. Leucuta SE. Nanotechnology for delivery of drugs and biomedical applications. *Curr Clin Pharmacol*. 2010;5(4):257-80.
258. Buse J, El-Aneed A. Properties, engineering and applications of lipid-based nanoparticle drug-delivery systems: current research and advances. *Nanomedicine (Lond)*. 2010;5(8):1237-60.
259. Daraee H, Etemadi A, Kouhi M, Alimirzalu S, Akbarzadeh A. Application of liposomes in medicine and drug delivery. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2016;44(1):381-91.
260. Oberholzer T, Luisi PL. The use of liposomes for constructing cell models. *J Biol Phys*. 2002;28(4):733-44.
261. Patil YP, Jadhav S. Novel methods for liposome preparation. *Chem Phys Lipids*. 2014;177:8-18.

262. Gabizon A, Catane R, Uziely B, Kaufman B, Safra T, Cohen R, et al. Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes. *Cancer Res.* 1994;54(4):987-92.
263. Fenton OS, Olafson KN, Pillai PS, Mitchell MJ, Langer R. Advances in Biomaterials for Drug Delivery. *Adv Mater.* 2018:e1705328.
264. Takahashi M, Uechi S, Takara K, Asikin Y, Wada K. Evaluation of an oral carrier system in rats: bioavailability and antioxidant properties of liposome-encapsulated curcumin. *J Agric Food Chem.* 2009;57(19):9141-6.
265. Leung AK, Tam YY, Chen S, Hafez IM, Cullis PR. Microfluidic Mixing: A General Method for Encapsulating Macromolecules in Lipid Nanoparticle Systems. *J Phys Chem B.* 2015;119(28):8698-706.
266. Cheng X, Lee RJ. The role of helper lipids in lipid nanoparticles (LNPs) designed for oligonucleotide delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;99(Pt A):129-37.
267. Kulkarni JA, Witzigmann D, Leung J, Tam YYC, Cullis PR. On the role of helper lipids in lipid nanoparticle formulations of siRNA. *Nanoscale.* 2019;11(45):21733-9.
268. Berraondo P, Martini PGV, Avila MA, Fontanellas A. Messenger RNA therapy for rare genetic metabolic diseases. *Gut.* 2019;68(7):1323-30.
269. Vhora I, Lalani R, Bhatt P, Patil S, Misra A. Lipid-nucleic acid nanoparticles of novel ionizable lipids for systemic BMP-9 gene delivery to bone-marrow mesenchymal stem cells for osteoinduction. *International journal of pharmaceutics.* 2019;563:324-36.
270. Patel S, Ryals RC, Weller KK, Pennesi ME, Sahay G. Lipid nanoparticles for delivery of messenger RNA to the back of the eye. *J Control Release.* 2019;303:91-100.
271. de Jesus MB, Zuhorn IS. Solid lipid nanoparticles as nucleic acid delivery system: properties and molecular mechanisms. *J Control Release.* 2015;201:1-13.
272. Doktorovova S, Souto EB, Silva AM. Nanotoxicology applied to solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers - a systematic review of in vitro data. *Eur J Pharm Biopharm.* 2014;87(1):1-18.
273. Ezzati Nazhad Dolatabadi J, Valizadeh H, Hamishehkar H. Solid Lipid Nanoparticles as Efficient Drug and Gene Delivery Systems: Recent Breakthroughs. *Adv Pharm Bull.* 2015;5(2):151-9.
274. Rostami E, Kashanian S, Azandaryani AH, Faramarzi H, Dolatabadi JE, Omidfar K. Drug targeting using solid lipid nanoparticles. *Chem Phys Lipids.* 2014;181:56-61.
275. Shen H, Shi S, Zhang Z, Gong T, Sun X. Coating Solid Lipid Nanoparticles with Hyaluronic Acid Enhances Antitumor Activity against Melanoma Stem-like Cells. *Theranostics.* 2015;5(7):755-71.
276. Weber S, Zimmer A, Pardeike J. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for pulmonary application: a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm.* 2014;86(1):7-22.
277. Luo Y, Teng Z, Li Y, Wang Q. Solid lipid nanoparticles for oral drug delivery: chitosan coating improves stability, controlled delivery, mucoadhesion and cellular uptake. *Carbohydr Polym.* 2015;122:221-9.
278. Anwer MK, Ahmed MM, Aldawsari MF, Alshahrani S, Fatima F, Ansari MN, et al. Eluxadolone Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Improved Colon Targeting in Rat Model of Ulcerative Colitis. *Pharmaceuticals (Basel).* 2020;13(9).
279. Dianza C, Foglietta F, Ferrara B, Rosa AC, Muntoni E, Gasco P, et al. Solid lipid nanoparticles delivering anti-inflammatory drugs to treat inflammatory bowel disease: Effects in an in vivo model. *World journal of gastroenterology.* 2017;23(23):4200-10.
280. Idrees H, Zaidi SZJ, Sabir A, Khan RU, Zhang X, Hassan SU. A Review of Biodegradable Natural Polymer-Based Nanoparticles for Drug Delivery Applications. *Nanomaterials (Basel).* 2020;10(10).

281. Tong X, Pan W, Su T, Zhang M, Dong W, Qi X. Recent advances in natural polymer-based drug delivery systems. *Reactive and Functional Polymers*. 2020;148:104501.
282. Yang C, Zhang M, Merlin D. Advances in Plant-derived Edible Nanoparticle-based lipid Nano-drug Delivery Systems as Therapeutic Nanomedicines. *J Mater Chem B*. 2018;6(9):1312-21.
283. Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *Int J Food Microbiol*. 2010;144(1):51-63.
284. Chiesa E, Greco A, Riva F, Tosca EM, Dorati R, Pisani S, et al. Staggered Herringbone Microfluid Device for the Manufacturing of Chitosan/TPP Nanoparticles: Systematic Optimization and Preliminary Biological Evaluation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(24).
285. M. Ways TM, Lau WM, Khutoryanskiy VV. Chitosan and Its Derivatives for Application in Mucoadhesive Drug Delivery Systems. *Polymers*. 2018;10(3).
286. He P, Davis SS, Illum L. In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *International journal of pharmaceutics*. 1998;166(1):75-88.
287. He B, Ge J, Yue P, Yue X, Fu R, Liang J, et al. Loading of anthocyanins on chitosan nanoparticles influences anthocyanin degradation in gastrointestinal fluids and stability in a beverage. *Food Chemistry*. 2017;221:1671-7.
288. Raj PM, Raj R, Kaul A, Mishra AK, Ram A. Biodistribution and targeting potential assessment of mucoadhesive chitosan nanoparticles designed for ulcerative colitis via scintigraphy. *RSC Advances*. 2018;8(37):20809-21.
289. Cai X, Wang X, He M, Wang Y, Lan M, Zhao Y, et al. Colon-targeted delivery of tacrolimus using pH-responsive polymeric nanoparticles for murine colitis therapy. *International journal of pharmaceutics*. 2021;606:120836.
290. Mukhiddinov ZK, Khalikov DK, Abdusamiev FT, Avloev CC. Isolation and structural characterization of a pectin homo and ramnogalacturonan. *Talanta*. 2000;53(1):171-6.
291. Paoletti S, Cesaro A, Delben F, Ciana A. Ionic Effects on the Conformation, Equilibrium, Properties, and Rheology of Pectate in Aqueous Solutions and Gels. *Chemistry and Function of Pectins*. ACS Symposium Series. 310: American Chemical Society; 1986. p. 73-87.
292. Macleod GS, Fell JT, Collett JH. Studies on the physical properties of mixed pectin/ethylcellulose films intended for colonic drug delivery. *International journal of pharmaceutics*. 1997;157(1):53-60.
293. Semd e R, Amighi K, Pierre D, Devleeschouwer MJ, Mo es AJ. Leaching of pectin from mixed pectin/insoluble polymer films intended for colonic drug delivery. *International journal of pharmaceutics*. 1998;174(1):233-41.
294. Muvva AC, Indhu Annie ; Ghatte, Vivek ; Lewis, Shaila Angela. Modified pectins for colon-specific drug delivery. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*. 2020;54:12-8.
295. Kim HY, Park SS, Lim ST. Preparation, characterization and utilization of starch nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2015;126:607-20.
296. Chronakis IS. On the molecular characteristics, compositional properties, and structural-functional mechanisms of maltodextrins: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1998;38(7):599-637.
297. Wang H, Feng T, Zhuang H, Xu Z, Ye R, Sun M. A Review on Patents of Starch Nanoparticles: Preparation, Applications, and Development. *Recent Pat Food Nutr Agric*. 2018;9(1):23-30.
298. Le MQ, Carpentier R, Lantier I, Ducournau C, Fasquelle F, Dimier-Poisson I, et al. Protein delivery by porous cationic maltodextrin-based nanoparticles into nasal mucosal cells: Comparison with cationic or anionic nanoparticles. *Int J Pharm X*. 2019;1:100001.
299. Dombu CY, Kroubi M, Zibouche R, Matran R, Betbeder D. Characterization of endocytosis and exocytosis of cationic nanoparticles in airway epithelium cells. *Nanotechnology*. 2010;21(35):355102.

300. Paillard A, Passirani C, Saulnier P, Kroubi M, Garcion E, Benoit JP, et al. Positively-charged, porous, polysaccharide nanoparticles loaded with anionic molecules behave as 'stealth' cationic nanocarriers. *Pharm Res.* 2010;27(1):126-33.
301. Merhi M, Dombu CY, Briant A, Chang J, Platel A, Le Curieux F, et al. Study of serum interaction with a cationic nanoparticle: Implications for in vitro endocytosis, cytotoxicity and genotoxicity. *International journal of pharmaceutics.* 2012;423(1):37-44.
302. Dombu C, Carpentier R, Betbeder D. Influence of surface charge and inner composition of nanoparticles on intracellular delivery of proteins in airway epithelial cells. *Biomaterials.* 2012;33(35):9117-26.
303. Bernocchi B, Carpentier R, Lantier I, Ducournau C, Dimier-Poisson I, Betbeder D. Mechanisms allowing protein delivery in nasal mucosa using NPL nanoparticles. *J Control Release.* 2016;232:42-50.
304. Kim CG, Kye YC, Yun CH. The Role of Nanovaccine in Cross-Presentation of Antigen-Presenting Cells for the Activation of CD8(+) T Cell Responses. *Pharmaceutics.* 2019;11(11).
305. Kroubi M, Daulouede S, Karembe H, Jallouli Y, Howsam M, Mossalayi D, et al. Development of a nanoparticulate formulation of diminazene to treat African trypanosomiasis. *Nanotechnology.* 2010;21(50):505102.
306. Murgia X, Loretz B, Hartwig O, Hittinger M, Lehr CM. The role of mucus on drug transport and its potential to affect therapeutic outcomes. *Adv Drug Deliv Rev.* 2018;124:82-97.
307. Fasquelle F, Carpentier R, Demouveau B, Desseyn J-L, Betbeder D. Importance of the Phospholipid Core for Mucin Hydrogel Penetration and Mucosal Cell Uptake of Maltodextrin Nanoparticles. *ACS Applied Bio Materials.* 2020;3(9):5741-9.
308. Sohail M, Mudassir, Minhas MU, Khan S, Hussain Z, de Matas M, et al. Natural and synthetic polymer-based smart biomaterials for management of ulcerative colitis: a review of recent developments and future prospects. *Drug Deliv Transl Res.* 2019;9(2):595-614.
309. Tian H, Tang Z, Zhuang X, Chen X, Jing X. Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. *Progress in Polymer Science.* 2012;37(2):237-80.
310. Lai P, Daear W, Lobenberg R, Prenner EJ. Overview of the preparation of organic polymeric nanoparticles for drug delivery based on gelatine, chitosan, poly(d,l-lactide-co-glycolic acid) and polyalkylcyanoacrylate. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2014;118:154-63.
311. Alonso-Sande M, des Rieux A, Fievez V, Sarmiento B, Delgado A, Evora C, et al. Development of PLGA-mannosamine nanoparticles as oral protein carriers. *Biomacromolecules.* 2013;14(11):4046-52.
312. Fredenberg S, Wahlgren M, Reslow M, Axelsson A. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems--a review. *International journal of pharmaceutics.* 2011;415(1-2):34-52.
313. Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel).* 2011;3(3):1377-97.
314. Siepmann J, Elkharraz K, Siepmann F, Klose D. How autocatalysis accelerates drug release from PLGA-based microparticles: a quantitative treatment. *Biomacromolecules.* 2005;6(4):2312-9.
315. Astete CE, Sabliov CM. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2006;17(3):247-89.
316. Merkel TJ, Herlihy KP, Nunes J, Orgel RM, Rolland JP, DeSimone JM. Scalable, shape-specific, top-down fabrication methods for the synthesis of engineered colloidal particles. *Langmuir.* 2010;26(16):13086-96.
317. Panchal SS, Vasava DV. Biodegradable Polymeric Materials: Synthetic Approach. *ACS Omega.* 2020;5(9):4370-9.

318. Cheng CY, Pho QH, Wu XY, Chin TY, Chen CM, Fang PH, et al. PLGA Microspheres Loaded with beta-Cyclodextrin Complexes of Epigallocatechin-3-Gallate for the Anti-Inflammatory Properties in Activated Microglial Cells. *Polymers (Basel)*. 2018;10(5).
319. Shi NQ, Zhou J, Walker J, Li L, Hong JKY, Olsen KF, et al. Microencapsulation of luteinizing hormone-releasing hormone agonist in poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres by spray-drying. *J Control Release*. 2020;321:756-72.
320. Zhai J, Wang YE, Zhou X, Ma Y, Guan S. Long-term sustained release Poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres of asenapine maleate with improved bioavailability for chronic neuropsychiatric diseases. *Drug Deliv*. 2020;27(1):1283-91.
321. Zhang C, Yang L, Wan F, Bera H, Cun D, Rantanen J, et al. Quality by design thinking in the development of long-acting injectable PLGA/PLA-based microspheres for peptide and protein drug delivery. *International journal of pharmaceutics*. 2020;585:119441.
322. Jin L, Pan Y, Pham AC, Boyd BJ, Norton RS, Nicolazzo JA. Prolonged Plasma Exposure of the Kv1.3-Inhibitory Peptide HsTX1[R14A] by Subcutaneous Administration of a Poly(Lactic-co-Glycolic Acid) (PLGA) Microsphere Formulation. *J Pharm Sci*. 2021;110(3):1182-8.
323. Koerner J, Horvath D, Groettrup M. Harnessing Dendritic Cells for Poly (D,L-lactide-co-glycolide) Microspheres (PLGA MS)-Mediated Anti-tumor Therapy. *Front Immunol*. 2019;10:707.
324. Lu Y, Wu F, Duan W, Mu X, Fang S, Lu N, et al. Engineering a "PEG-g-PEI/DNA nanoparticle-in-PLGA microsphere" hybrid controlled release system to enhance immunogenicity of DNA vaccine. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2020;106:110294.
325. Lee SY, Choi JW, Lee JY, Kim DD, Kim HC, Cho HJ. Hyaluronic acid/doxorubicin nanoassembly-releasing microspheres for the transarterial chemoembolization of a liver tumor. *Drug Deliv*. 2018;25(1):1472-83.
326. Shakeri S, Ashrafizadeh M, Zarrabi A, Roghanian R, Afshar EG, Pardakhty A, et al. Multifunctional Polymeric Nanoplatforams for Brain Diseases Diagnosis, Therapy and Theranostics. *Biomedicines*. 2020;8(1).
327. Han FY, Thurecht KJ, Whittaker AK, Smith MT. Bioerodable PLGA-Based Microparticles for Producing Sustained-Release Drug Formulations and Strategies for Improving Drug Loading. *Front Pharmacol*. 2016;7:185.
328. Ruman U, Fakurazi S, Masarudin MJ, Hussein MZ. Nanocarrier-Based Therapeutics and Theranostics Drug Delivery Systems for Next Generation of Liver Cancer Nanodrug Modalities. *Int J Nanomedicine*. 2020;15:1437-56.
329. Stefani RM, Lee AJ, Tan AR, Halder SS, Hu Y, Guo XE, et al. Sustained low-dose dexamethasone delivery via a PLGA microsphere-embedded agarose implant for enhanced osteochondral repair. *Acta Biomater*. 2020;102:326-40.
330. Li X, Wei Y, Wen K, Han Q, Ogino K, Ma G. Novel insights on the encapsulation mechanism of PLGA terminal groups on ropivacaine. *Eur J Pharm Biopharm*. 2021;160:143-51.
331. Essa D, Kondiah PPD, Choonara YE, Pillay V. The Design of Poly(lactide-co-glycolide) Nanocarriers for Medical Applications. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8:48.
332. Kim HU, Roh YH, Shim MS, Bong KW. Microfluidic fabrication of fatty alcohol-based microparticles for NIR light-triggered drug release. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2019;80:778-83.
333. Hsu M-Y, Feng C-H, Liu Y-W, Liu S-J. An Orthogonal Model to Study the Effect of Electrospraying Parameters on the Morphology of poly (d,l)-lactide-co-glycolide (PLGA) Particles. *Applied Sciences*. 2019;9(6).
334. Wan F, Yang M. Design of PLGA-based depot delivery systems for biopharmaceuticals prepared by spray drying. *International journal of pharmaceutics*. 2016;498(1-2):82-95.

335. Wang J, Helder L, Shao J, Jansen JA, Yang M, Yang F. Encapsulation and release of doxycycline from electrospray-generated PLGA microspheres: Effect of polymer end groups. *International journal of pharmaceutics*. 2019;564:1-9.
336. Shaikh J, Ankola DD, Beniwal V, Singh D, Kumar MN. Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer. *Eur J Pharm Sci*. 2009;37(3-4):223-30.
337. Thakral S, Thakral NK, Majumdar DK. Eudragit: a technology evaluation. *Expert Opin Drug Deliv*. 2013;10(1):131-49.
338. Liu L, Yao W, Rao Y, Lu X, Gao J. pH-Responsive carriers for oral drug delivery: challenges and opportunities of current platforms. *Drug Deliv*. 2017;24(1):569-81.
339. Taghipour YD, Bahramsoltani R, Marques AM, Naseri R, Rahimi R, Haratipour P, et al. Correction to: A systematic review of nano formulation of natural products for the treatment of inflammatory bowel disease: drug delivery and pharmacological targets. *Daru*. 2018;26(2):241-2.
340. Zhou H, Qian H. Preparation and characterization of pH-sensitive nanoparticles of budesonide for the treatment of ulcerative colitis. *Drug Des Devel Ther*. 2018;12:2601-9.
341. Shams T, Illangakoon UE, Parhizkar M, Harker AH, Edirisinghe S, Orlu M, et al. Electrospayed microparticles for intestinal delivery of prednisolone. *J R Soc Interface*. 2018;15(145).
342. Qelliny MR, Aly UF, Elgarhy OH, Khaled KA. Budesonide-Loaded Eudragit S 100 Nanocapsules for the Treatment of Acetic Acid-Induced Colitis in Animal Model. *AAPS PharmSciTech*. 2019;20(6):237.
343. Laroui H, Wilson DS, Dalmasso G, Salaita K, Murthy N, Sitaraman SV, et al. Nanomedicine in GI. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011;300(3):G371-83.
344. De Jong WH, Borm PJ. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int J Nanomedicine*. 2008;3(2):133-49.
345. Lacoueille F, Garcion E, Benoit JP, Lamprecht A. Lipid nanocapsules for intracellular drug delivery of anticancer drugs. *J Nanosci Nanotechnol*. 2007;7(12):4612-7.
346. Tabata Y, Inoue Y, Ikada Y. Size effect on systemic and mucosal immune responses induced by oral administration of biodegradable microspheres. *Vaccine*. 1996;14(17-18):1677-85.
347. Tamura A, Ozawa K, Ohya T, Tsuyama N, Eyring EM, Masujima T. Nanokinetics of drug molecule transport into a single cell. *Nanomedicine (Lond)*. 2006;1(3):345-50.
348. Powell JJ, Faria N, Thomas-McKay E, Pele LC. Origin and fate of dietary nanoparticles and microparticles in the gastrointestinal tract. *J Autoimmun*. 2010;34(3):J226-33.
349. Schmidt C, Lautenschlaeger C, Collnot EM, Schumann M, Bojarski C, Schulzke JD, et al. Nano- and microscaled particles for drug targeting to inflamed intestinal mucosa: a first in vivo study in human patients. *J Control Release*. 2013;165(2):139-45.
350. Jung T, Kamm W, Breitenbach A, Kaiserling E, Xiao JX, Kissel T. Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake? *Eur J Pharm Biopharm*. 2000;50(1):147-60.
351. Laroui H, Dalmasso G, Nguyen HT, Yan Y, Sitaraman SV, Merlin D. Drug-loaded nanoparticles targeted to the colon with polysaccharide hydrogel reduce colitis in a mouse model. *Gastroenterology*. 2010;138(3):843-53 e1-2.
352. Jubeh TT, Barenholz Y, Rubinstein A. Differential adhesion of normal and inflamed rat colonic mucosa by charged liposomes. *Pharm Res*. 2004;21(3):447-53.
353. Jani P, Halbert GW, Langridge J, Florence AT. The uptake and translocation of latex nanospheres and microspheres after oral administration to rats. *J Pharm Pharmacol*. 1989;41(12):809-12.
354. Sant S, Nadeau V, Hildgen P. Effect of porosity on the release kinetics of propafenone-loaded PEG-g-PLA nanoparticles. *J Control Release*. 2005;107(2):203-14.

355. Yun Y, Cho YW, Park K. Nanoparticles for oral delivery: targeted nanoparticles with peptidic ligands for oral protein delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(6):822-32.
356. Yang K, Ma YQ. Computer simulation of the translocation of nanoparticles with different shapes across a lipid bilayer. *Nat Nanotechnol.* 2010;5(8):579-83.
357. Liu Y, Tan J, Thomas A, Ou-Yang D, Muzykantov VR. The shape of things to come: importance of design in nanotechnology for drug delivery. *Ther Deliv.* 2012;3(2):181-94.
358. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol.* 2008;9(8):847-56.
359. Harush-Frenkel O, Rozentur E, Benita S, Altschuler Y. Surface charge of nanoparticles determines their endocytic and transcytotic pathway in polarized MDCK cells. *Biomacromolecules.* 2008;9(2):435-43.
360. Harush-Frenkel O, Debotton N, Benita S, Altschuler Y. Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;353(1):26-32.
361. Rejman J, Bragonzi A, Conese M. Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes. *Mol Ther.* 2005;12(3):468-74.
362. Gratton SE, Ropp PA, Pohlhaus PD, Luft JC, Madden VJ, Napier ME, et al. The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(33):11613-8.
363. Sahay G, Kim JO, Kabanov AV, Bronich TK. The exploitation of differential endocytic pathways in normal and tumor cells in the selective targeting of nanoparticulate chemotherapeutic agents. *Biomaterials.* 2010;31(5):923-33.
364. Zhang LW, Monteiro-Riviere NA. Mechanisms of quantum dot nanoparticle cellular uptake. *Toxicol Sci.* 2009;110(1):138-55.
365. Panyam J, Labhasetwar V. Dynamics of endocytosis and exocytosis of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles in vascular smooth muscle cells. *Pharm Res.* 2003;20(2):212-20.
366. Qaddoumi MG, Ueda H, Yang J, Davda J, Labhasetwar V, Lee VH. The characteristics and mechanisms of uptake of PLGA nanoparticles in rabbit conjunctival epithelial cell layers. *Pharm Res.* 2004;21(4):641-8.
367. Sahay G, Batrakova EV, Kabanov AV. Different internalization pathways of polymeric micelles and unimers and their effects on vesicular transport. *Bioconjug Chem.* 2008;19(10):2023-9.
368. Mercer J, Schelhaas M, Helenius A. Virus entry by endocytosis. *Annu Rev Biochem.* 2010;79:803-33.
369. Ivanov AI. Pharmacological inhibition of endocytic pathways: is it specific enough to be useful? *Methods Mol Biol.* 2008;440:15-33.
370. Sahay G, Gautam V, Luxenhofer R, Kabanov AV. The utilization of pathogen-like cellular trafficking by single chain block copolymer. *Biomaterials.* 2010;31(7):1757-64.
371. Gumbleton M, Stephens DJ. Coming out of the dark: the evolving role of fluorescence imaging in drug delivery research. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57(1):5-15.
372. Doherty GJ, McMahon HT. Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem.* 2009;78:857-902.
373. Pucadyil TJ, Schmid SL. Conserved functions of membrane active GTPases in coated vesicle formation. *Science.* 2009;325(5945):1217-20.
374. Slepnev VI, De Camilli P. Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *Nat Rev Neurosci.* 2000;1(3):161-72.
375. Ford MG, Mills IG, Peter BJ, Vallis Y, Praefcke GJ, Evans PR, et al. Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature.* 2002;419(6905):361-6.
376. Rappoport JZ. Focusing on clathrin-mediated endocytosis. *Biochem J.* 2008;412(3):415-23.
377. Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000;1(1):31-9.

378. Nabi IR. Cavin fever: regulating caveolae. *Nat Cell Biol.* 2009;11(7):789-91.
379. Schnitzer JE, Liu J, Oh P. Endothelial caveolae have the molecular transport machinery for vesicle budding, docking, and fusion including VAMP, NSF, SNAP, annexins, and GTPases. *J Biol Chem.* 1995;270(24):14399-404.
380. Parton RG, Simons K. The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(3):185-94.
381. Carver LA, Schnitzer JE. Caveolae: mining little caves for new cancer targets. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(8):571-81.
382. Rejman J, Conese M, Hoekstra D. Gene transfer by means of lipo- and polyplexes: role of clathrin and caveolae-mediated endocytosis. *J Liposome Res.* 2006;16(3):237-47.
383. Garcia-Cardena G, Oh P, Liu J, Schnitzer JE, Sessa WC. Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(13):6448-53.
384. Oh P, Borgstrom P, Witkiewicz H, Li Y, Borgstrom BJ, Chrastina A, et al. Live dynamic imaging of caveolae pumping targeted antibody rapidly and specifically across endothelium in the lung. *Nat Biotechnol.* 2007;25(3):327-37.
385. Kerr MC, Teasdale RD. Defining macropinocytosis. *Traffic.* 2009;10(4):364-71.
386. Jones AT. Macropinocytosis: searching for an endocytic identity and role in the uptake of cell penetrating peptides. *J Cell Mol Med.* 2007;11(4):670-84.
387. Swanson JA. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(8):639-49.
388. Hillaireau H, Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(17):2873-96.
389. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:593-623.
390. Rabinovitch M. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol.* 1995;5(3):85-7.
391. Cannon GJ, Swanson JA. The macrophage capacity for phagocytosis. *J Cell Sci.* 1992;101 (Pt 4):907-13.
392. Podolsky DK. The current future understanding of inflammatory bowel disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2002;16(6):933-43.
393. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature.* 2007;448(7152):427-34.
394. Jung HC, Eckmann L, Yang SK, Panja A, Fierer J, Morzycka-Wroblewska E, et al. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *The Journal of clinical investigation.* 1995;95(1):55-65.
395. Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature reviews Immunology.* 2014;14(3):141-53.
396. Pull SL, Doherty JM, Mills JC, Gordon JI, Stappenbeck TS. Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(1):99-104.
397. Gordon S, Crocker PR, Morris L, Lee SH, Perry VH, Hume DA. Localization and function of tissue macrophages. *Ciba Found Symp.* 1986;118:54-67.
398. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:991-1045.
399. Janeway CA, Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1989;54 Pt 1:1-13.

400. Zhang X, Mosser DM. Macrophage activation by endogenous danger signals. *J Pathol.* 2008;214(2):161-78.
401. Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science.* 1996;272(5258):50-3.
402. Silverstein SC. Phagocytosis of microbes: insights and prospects. *Trends Cell Biol.* 1995;5(3):141-2.
403. Allen LA, Aderem A. Mechanisms of phagocytosis. *Curr Opin Immunol.* 1996;8(1):36-40.
404. Platt AM, Mowat AM. Mucosal macrophages and the regulation of immune responses in the intestine. *Immunol Lett.* 2008;119(1-2):22-31.
405. Lissner D, Schumann M, Batra A, Kredel LI, Kuhl AA, Erben U, et al. Monocyte and M1 Macrophage-induced Barrier Defect Contributes to Chronic Intestinal Inflammation in IBD. *Inflammatory bowel diseases.* 2015;21(6):1297-305.
406. Grainger JR, Konkel JE, Zangerle-Murray T, Shaw TN. Macrophages in gastrointestinal homeostasis and inflammation. *Pflugers Arch.* 2017;469(3-4):527-39.
407. Belkaid Y, Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell.* 2014;157(1):121-41.
408. Nagashima R, Maeda K, Imai Y, Takahashi T. Lamina propria macrophages in the human gastrointestinal mucosa: their distribution, immunohistological phenotype, and function. *J Histochem Cytochem.* 1996;44(7):721-31.
409. Nikolaus S, Bauditz J, Gionchetti P, Witt C, Lochs H, Schreiber S. Increased secretion of pro-inflammatory cytokines by circulating polymorphonuclear neutrophils and regulation by interleukin 10 during intestinal inflammation. *Gut.* 1998;42(4):470-6.
410. Powell N, Walker AW, Stolarczyk E, Canavan JB, Gokmen MR, Marks E, et al. The transcription factor T-bet regulates intestinal inflammation mediated by interleukin-7 receptor+ innate lymphoid cells. *Immunity.* 2012;37(4):674-84.
411. Davatgaran-Taghipour Y, Masoomzadeh S, Farzaei MH, Bahramsoltani R, Karimi-Soureh Z, Rahimi R, et al. Polyphenol nanoformulations for cancer therapy: experimental evidence and clinical perspective. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:2689-702.
412. Aggarwal BB, Gupta SC, Sung B. Curcumin: an orally bioavailable blocker of TNF and other pro-inflammatory biomarkers. *Br J Pharmacol.* 2013;169(8):1672-92.
413. Kunnumakkara AB, Bordoloi D, Padmavathi G, Monisha J, Roy NK, Prasad S, et al. Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases. *Br J Pharmacol.* 2017;174(11):1325-48.
414. Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 2003;23(1A):363-98.
415. Anand P, Thomas SG, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Sung B, et al. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. *Biochemical pharmacology.* 2008;76(11):1590-611.
416. Calixto JB, Campos MM, Otuki MF, Santos AR. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med.* 2004;70(2):93-103.
417. Lee MT, Lin WC, Yu B, Lee TT. Antioxidant capacity of phytochemicals and their potential effects on oxidative status in animals - A review. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2017;30(3):299-308.
418. Lozada-Garcia MC, Enriquez RG, Ramirez-Apan TO, Nieto-Camacho A, Palacios-Espinosa JF, Custodio-Galvan Z, et al. Synthesis of Curcuminoids and Evaluation of Their Cytotoxic and Antioxidant Properties. *Molecules.* 2017;22(4).

419. Noorafshan A, Ashkani-Esfahani S. A review of therapeutic effects of curcumin. *Curr Pharm Des.* 2013;19(11):2032-46.
420. Aggarwal S, Ichikawa H, Takada Y, Sandur SK, Shishodia S, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates expression of cell proliferation and antiapoptotic and metastatic gene products through suppression of I κ B α kinase and Akt activation. *Mol Pharmacol.* 2006;69(1):195-206.
421. Jin CY, Lee JD, Park C, Choi YH, Kim GY. Curcumin attenuates the release of pro-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. *Acta Pharmacol Sin.* 2007;28(10):1645-51.
422. Chen D, Nie M, Fan MW, Bian Z. Anti-inflammatory activity of curcumin in macrophages stimulated by lipopolysaccharides from *Porphyromonas gingivalis*. *Pharmacology.* 2008;82(4):264-9.
423. Murakami Y, Ishii H, Takada N, Tanaka S, Machino M, Ito S, et al. Comparative anti-inflammatory activities of curcumin and tetrahydrocurcumin based on the phenolic O-H bond dissociation enthalpy, ionization potential and quantum chemical descriptor. *Anticancer Res.* 2008;28(2A):699-707.
424. Karuppagounder V, Arumugam S, Thandavarayan RA, Sreedhar R, Giridharan VV, Afrin R, et al. Curcumin alleviates renal dysfunction and suppresses inflammation by shifting from M1 to M2 macrophage polarization in daunorubicin induced nephrotoxicity in rats. *Cytokine.* 2016;84:1-9.
425. Gao S, Zhou J, Liu N, Wang L, Gao Q, Wu Y, et al. Curcumin induces M2 macrophage polarization by secretion IL-4 and/or IL-13. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;85:131-9.
426. Sasaki H, Sunagawa Y, Takahashi K, Imaizumi A, Fukuda H, Hashimoto T, et al. Innovative preparation of curcumin for improved oral bioavailability. *Biol Pharm Bull.* 2011;34(5):660-5.
427. Grimpen F, Pavli P. Advances in the management of inflammatory bowel disease. *Intern Med J.* 2010;40(4):258-64.
428. Strojny B, Grodzik M, Sawosz E, Winnicka A, Kurantowicz N, Jaworski S, et al. Diamond Nanoparticles Modify Curcumin Activity: In Vitro Studies on Cancer and Normal Cells and In Ovo Studies on Chicken Embryo Model. *PLoS One.* 2016;11(10):e0164637.
429. Zhou P, Zhou H, Shu J, Fu S, Yang Z. Skin wound healing promoted by novel curcumin-loaded micelle hydrogel. *Ann Transl Med.* 2021;9(14):1152.
430. Vollono L, Falconi M, Gaziano R, Iacovelli F, Dika E, Terracciano C, et al. Potential of Curcumin in Skin Disorders. *Nutrients.* 2019;11(9).
431. Tolstanova G, Deng X, French SW, Lungo W, Paunovic B, Khomenko T, et al. Early endothelial damage and increased colonic vascular permeability in the development of experimental ulcerative colitis in rats and mice. *Lab Invest.* 2012;92(1):9-21.
432. Lamprecht A. IBD: selective nanoparticle adhesion can enhance colitis therapy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010;7(6):311-2.
433. Salah N, Dubuquoy L, Carpentier R, Betbeder D. Starch nanoparticles improve curcumin-induced production of anti-inflammatory cytokines in intestinal epithelial cells. *Int J Pharm X.* 2022;4:100114.
434. Panahi Y, Sahebkar A, Parvin S, Saadat A. A randomized controlled trial on the anti-inflammatory effects of curcumin in patients with chronic sulphur mustard-induced cutaneous complications. *Ann Clin Biochem.* 2012;49(Pt 6):580-8.
435. Panahi Y, Hosseini MS, Khalili N, Naimi E, Simental-Mendia LE, Majeed M, et al. Effects of curcumin on serum cytokine concentrations in subjects with metabolic syndrome: A post-hoc analysis of a randomized controlled trial. *Biomed Pharmacother.* 2016;82:578-82.
436. Panahi Y, Hosseini MS, Khalili N, Naimi E, Majeed M, Sahebkar A. Antioxidant and anti-inflammatory effects of curcuminoid-piperine combination in subjects with metabolic syndrome: A randomized controlled trial and an updated meta-analysis. *Clin Nutr.* 2015;34(6):1101-8.

437. Sahebkar A. Are curcuminoids effective C-reactive protein-lowering agents in clinical practice? Evidence from a meta-analysis. *Phytother Res.* 2014;28(5):633-42.
438. Panahi Y, Sahebkar A, Amiri M, Davoudi SM, Beiraghdar F, Hoseininejad SL, et al. Improvement of sulphur mustard-induced chronic pruritus, quality of life and antioxidant status by curcumin: results of a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Br J Nutr.* 2012;108(7):1272-9.
439. Panahi Y, Khalili N, Sahebi E, Namazi S, Karimian MS, Majeed M, et al. Antioxidant effects of curcuminoids in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized controlled trial. *Inflammopharmacology.* 2017;25(1):25-31.
440. Sahebkar A, Mohammadi A, Atabati A, Rahiman S, Tavallaie S, Iranshahi M, et al. Curcuminoids modulate pro-oxidant-antioxidant balance but not the immune response to heat shock protein 27 and oxidized LDL in obese individuals. *Phytother Res.* 2013;27(12):1883-8.
441. Abdollahi E, Johnston TP, Ghaneifar Z, Vahedi P, Goleij P, Azhdari S, et al. Immunomodulatory Therapeutic Effects of Curcumin on M1 / M2 Macrophage polarization in Inflammatory Diseases. *Curr Mol Pharmacol.* 2022.
442. Panahi Y, Hosseini MS, Khalili N, Naimi E, Soflaei SS, Majeed M, et al. Effects of supplementation with curcumin on serum adipokine concentrations: A randomized controlled trial. *Nutrition.* 2016;32(10):1116-22.
443. Ganjali S, Sahebkar A, Mahdipour E, Jamialahmadi K, Torabi S, Akhlaghi S, et al. Investigation of the effects of curcumin on serum cytokines in obese individuals: a randomized controlled trial. *ScientificWorldJournal.* 2014;2014:898361.
444. Teymouri M, Pirro M, Johnston TP, Sahebkar A. Curcumin as a multifaceted compound against human papilloma virus infection and cervical cancers: A review of chemistry, cellular, molecular, and preclinical features. *Biofactors.* 2017;43(3):331-46.
445. Momtazi AA, Sahebkar A. Difluorinated Curcumin: A Promising Curcumin Analogue with Improved Anti-Tumor Activity and Pharmacokinetic Profile. *Curr Pharm Des.* 2016;22(28):4386-97.
446. Mirzaei H, Naseri G, Rezaee R, Mohammadi M, Banikazemi Z, Mirzaei HR, et al. Curcumin: A new candidate for melanoma therapy? *Int J Cancer.* 2016;139(8):1683-95.
447. Ramezani M, Hatamipour M, Sahebkar A. Promising anti-tumor properties of bisdemethoxycurcumin: A naturally occurring curcumin analogue. *J Cell Physiol.* 2018;233(2):880-7.
448. Momtazi AA, Shahabipour F, Khatibi S, Johnston TP, Pirro M, Sahebkar A. Curcumin as a MicroRNA Regulator in Cancer: A Review. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2016;171:1-38.
449. Ammon HP, Wahl MA. Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Med.* 1991;57(1):1-7.
450. Shishodia S. Molecular mechanisms of curcumin action: gene expression. *Biofactors.* 2013;39(1):37-55.
451. Gupta SC, Patchva S, Koh W, Aggarwal BB. Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2012;39(3):283-99.
452. Kumar S, Dilbaghi N, Saharan R, Bhanjana G. Nanotechnology as Emerging Tool for Enhancing Solubility of Poorly Water-Soluble Drugs. *BioNanoScience.* 2012;2(4):227-50.
453. Nunes R, Neves JD, Sarmiento B. Nanoparticles for the regulation of intestinal inflammation: opportunities and challenges. *Nanomedicine (Lond).* 2019;14(19):2631-44.
454. Du Y, Rong L, Cong Y, Shen L, Zhang N, Wang B. Macrophage polarization: an effective approach to targeted therapy of inflammatory bowel disease. *Expert Opin Ther Targets.* 2021;25(3):191-209.
455. Nathan CF. Secretory products of macrophages. *The Journal of clinical investigation.* 1987;79(2):319-26.
456. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv Immunol.* 1994;55:97-179.

457. Na YR, Stakenborg M, Seok SH, Matteoli G. Macrophages in intestinal inflammation and resolution: a potential therapeutic target in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019;16(9):531-43.
458. Jagetia GC, Aggarwal BB. "Spicing up" of the immune system by curcumin. *J Clin Immunol.* 2007;27(1):19-35.
459. Amano C, Minematsu H, Fujita K, Iwashita S, Adachi M, Igarashi K, et al. Nanoparticles Containing Curcumin Useful for Suppressing Macrophages In Vivo in Mice. *PLoS One.* 2015;10(9):e0137207.
460. Abe Y, Hashimoto S, Horie T. Curcumin inhibition of inflammatory cytokine production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *Pharmacol Res.* 1999;39(1):41-7.
461. Zhou D, Huang C, Lin Z, Zhan S, Kong L, Fang C, et al. Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways. *Cell Signal.* 2014;26(2):192-7.
462. Murray HW, Spitalny GL, Nathan CF. Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo by interferon-gamma. *J Immunol.* 1985;134(3):1619-22.
463. Sutterwala FS, Noel GJ, Salgame P, Mosser DM. Reversal of proinflammatory responses by ligating the macrophage Fcγ receptor type I. *J Exp Med.* 1998;188(1):217-22.
464. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity.* 2010;32(5):593-604.
465. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med.* 1992;176(1):287-92.
466. Papamichael K, Gils A, Rutgeerts P, Levesque BG, Vermeire S, Sandborn WJ, et al. Role for therapeutic drug monitoring during induction therapy with TNF antagonists in IBD: evolution in the definition and management of primary nonresponse. *Inflammatory bowel diseases.* 2015;21(1):182-97.
467. Vos AC, Wildenberg ME, Arijs I, Duijvestein M, Verhaar AP, de Hertogh G, et al. Regulatory macrophages induced by infliximab are involved in healing in vivo and in vitro. *Inflammatory bowel diseases.* 2012;18(3):401-8.
468. Bantel H, Berg C, Vieth M, Stolte M, Kruis W, Schulze-Osthoff K. Mesalazine inhibits activation of transcription factor NF-κB in inflamed mucosa of patients with ulcerative colitis. *The American journal of gastroenterology.* 2000;95(12):3452-7.
469. Lin Y-H, Chen C-T, Liang H-F, Kulkarni AR, Lee P-W, Chen C-H, et al. Novel nanoparticles for oral insulin delivery via the paracellular pathway. *Nanotechnology.* 2007;18(10):105102.
470. Betbeder D, Lipka E, Howsam M, Carpentier R. Evolution of availability of curcumin inside poly-lactic-co-glycolic acid nanoparticles: impact on antioxidant and antinitrosant properties. *Int J Nanomedicine.* 2015;10:5355-66.
471. Luther J, Dave M. Rising Inflammatory Bowel Disease Prevalence Highlights the Need for Effective, Cost-Effective Therapies. *Inflammatory bowel diseases.* 2020;26(4):626-7.
472. Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Ehses JA, Donath MY, Mandrup-Poulsen T. Sustained effects of interleukin-1 receptor antagonist treatment in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2009;32(9):1663-8.
473. Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol.* 2008;9(8):857-65.
474. Al-Sadi R, Guo S, Dokladny K, Smith MA, Ye D, Kaza A, et al. Mechanism of interleukin-1β induced-increase in mouse intestinal permeability in vivo. *J Interferon Cytokine Res.* 2012;32(10):474-84.

475. Coccia M, Harrison OJ, Schiering C, Asquith MJ, Becher B, Powrie F, et al. IL-1beta mediates chronic intestinal inflammation by promoting the accumulation of IL-17A secreting innate lymphoid cells and CD4(+) Th17 cells. *J Exp Med*. 2012;209(9):1595-609.
476. Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol*. 2005;175(1):342-9.
477. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(3):787-95.
478. Teiten MH, Dicato M, Diederich M. Curcumin as a regulator of epigenetic events. *Mol Nutr Food Res*. 2013;57(9):1619-29.
479. Shu L, Khor TO, Lee JH, Boyanapalli SS, Huang Y, Wu TY, et al. Epigenetic CpG demethylation of the promoter and reactivation of the expression of Neurog1 by curcumin in prostate LNCaP cells. *AAPS J*. 2011;13(4):606-14.
480. Yang X, Wang X, Liu D, Yu L, Xue B, Shi H. Epigenetic regulation of macrophage polarization by DNA methyltransferase 3b. *Mol Endocrinol*. 2014;28(4):565-74.
481. Jurenka JS. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. *Altern Med Rev*. 2009;14(2):141-53.
482. Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet*. 2017;390(10114):2769-78.
483. Ben-Horin S, Kopylov U, Chowers Y. Optimizing anti-TNF treatments in inflammatory bowel disease. *Autoimmunity reviews*. 2014;13(1):24-30.
484. Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *The Lancet*. 2012;380(9853):1590-605.
485. Gollop JH, Phillips SF, Melton LJ, Zinsmeister AR. Epidemiologic aspects of Crohn's disease: a population based study in Olmsted County, Minnesota, 1943-1982. *Gut*. 1988;29(1):49.
486. Peyrin-Biroulet L, Loftus EV, Jr., Colombel J-F, Sandborn WJ. The Natural History of Adult Crohn's Disease in Population-Based Cohorts. *Official journal of the American College of Gastroenterology | ACG*. 2010;105(2).
487. Solberg IC, Vatn MH, Høie O, Stray N, Sauar J, Jahnsen J, et al. Clinical Course in Crohn's Disease: Results of a Norwegian Population-Based Ten-Year Follow-Up Study. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2007;5(12):1430-8.
488. Nakase H, Hirano T, Wagatsuma K, Ichimiya T, Yamakawa T, Yokoyama Y, et al. Artificial intelligence-assisted endoscopy changes the definition of mucosal healing in ulcerative colitis. *Digestive endoscopy : official journal of the Japan Gastroenterological Endoscopy Society*. 2021;33(6):903-11.
489. Neurath MF. New targets for mucosal healing and therapy in inflammatory bowel diseases. *Mucosal immunology*. 2014;7(1):6-19.
490. Schnitzler F, Fidder H, Ferrante M, Noman M, Arijs I, Van Assche G, et al. Mucosal healing predicts long-term outcome of maintenance therapy with infliximab in Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2009;15(9):1295-301.
491. Huang S, Li L, Ben-Horin S, Mao R, Lin S, Qiu Y, et al. Mucosal Healing Is Associated With the Reduced Disabling Disease in Crohn's Disease. *Clinical and translational gastroenterology*. 2019;10(3):e00015.
492. Sergeant T, Piront N, Meurice J, Toussaint O, Schneider YJ. Anti-inflammatory effects of dietary phenolic compounds in an in vitro model of inflamed human intestinal epithelium. *Chemico-biological interactions*. 2010;188(3):659-67.

493. Chan HC, Ng SC. Emerging biologics in inflammatory bowel disease. *Journal of gastroenterology*. 2017;52(2):141-50.
494. Garcia-Lafuente A, Guillaumon E, Villares A, Rostagno MA, Martinez JA. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2009;58(9):537-52.
495. Rahman I, Biswas SK, Kirkham PA. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochemical pharmacology*. 2006;72(11):1439-52.
496. Koretz RL, Rotblatt M. Complementary and alternative medicine in gastroenterology: the good, the bad, and the ugly. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2004;2(11):957-67.
497. Triantafyllidi A, Xanthos T, Papalois A, Triantafyllidis JK. Herbal and plant therapy in patients with inflammatory bowel disease. *Annals of gastroenterology*. 2015;28(2):210-20.
498. Farzaei MH, Rahimi R, Abdollahi M. The role of dietary polyphenols in the management of inflammatory bowel disease. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2015;16(3):196-210.
499. Langmead L, Feakins RM, Goldthorpe S, Holt H, Tsironi E, De Silva A, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of oral aloe vera gel for active ulcerative colitis. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2004;19(7):739-47.
500. Fernandez-Banares F, Hinojosa J, Sanchez-Lombrana JL, Navarro E, Martinez-Salmeron JF, Garcia-Puges A, et al. Randomized clinical trial of *Plantago ovata* seeds (dietary fiber) as compared with mesalamine in maintaining remission in ulcerative colitis. Spanish Group for the Study of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis (GETECCU). *The American journal of gastroenterology*. 1999;94(2):427-33.
501. Vecchi Brumatti L, Marcuzzi A, Tricarico PM, Zanin V, Girardelli M, Bianco AM. Curcumin and inflammatory bowel disease: potential and limits of innovative treatments. *Molecules*. 2014;19(12):21127-53.
502. Hanai H, Iida T, Takeuchi K, Watanabe F, Maruyama Y, Andoh A, et al. Curcumin maintenance therapy for ulcerative colitis: randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2006;4(12):1502-6.
503. Rahimi R, Nikfar S, Abdollahi M. Induction of clinical response and remission of inflammatory bowel disease by use of herbal medicines: a meta-analysis. *World journal of gastroenterology*. 2013;19(34):5738-49.
504. Loftus EV. Management of extraintestinal manifestations and other complications of inflammatory bowel disease. *Current Gastroenterology Reports*. 2004;6(6):506-13.
505. Rutgeerts P, Van Assche G, Vermeire S. Review article: infliximab therapy for inflammatory bowel disease – seven years on. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2006;23(4):451-63.
506. Papadakis KA, Shaye OA, Vasilias EA, Ippoliti A, Dubinsky MC, Loane J, et al. Safety and Efficacy of Adalimumab (D2E7) in Crohn's Disease Patients with an Attenuated Response to Infliximab. *Official journal of the American College of Gastroenterology | ACG*. 2005;100(1).
507. Klotz U, Schwab M. Topical delivery of therapeutic agents in the treatment of inflammatory bowel disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005;57(2):267-79.
508. Gionchetti P, D'Arienzo A, Rizzello F, Manguso F, Maieron R, Lecis PE, et al. Topical Treatment of Distal Active Ulcerative Colitis With Beclomethasone Dipropionate or Mesalamine: A Single-blind Randomized Controlled Trial. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2005;39(4).
509. Mowat C, Cole A, Windsor A, Ahmad T, Arnott I, Driscoll R, et al. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut*. 2011;60(5):571-607.

510. Cohen RD, Woseth DM, Thisted RA, Hanauer SB. A meta-analysis and overview of the literature on treatment options for left-sided ulcerative colitis and ulcerative proctitis. *The American journal of gastroenterology*. 2000;95(5):1263-76.
511. Wen H, Park K. Oral controlled release formulation design and drug delivery: theory to practice: John Wiley & Sons; 2011.
512. Faber SM, Korelitz BI. Experience with Eudragit-S-coated mesalamine (Asacol) in inflammatory bowel disease. An open study. *Journal of clinical gastroenterology*. 1993;17(3):213-8.
513. Wong JM, Wei SC. Efficacy of Pentasa tablets for the treatment of inflammatory bowel disease. *J Formos Med Assoc*. 2003;102(9):613-9.
514. Feagan BG, MacDonald JK. Oral 5-aminosalicylic acid for maintenance of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2012(10).
515. Zhang S, Ermann J, Succi MD, Zhou A, Hamilton MJ, Cao B, et al. An inflammation-targeting hydrogel for local drug delivery in inflammatory bowel disease. *Science translational medicine*. 2015;7(300):300ra128.
516. Le MQ, Carpentier R, Lantier I, Ducournau C, Dimier-Poisson I, Betbeder D. Residence time and uptake of porous and cationic maltodextrin-based nanoparticles in the nasal mucosa: Comparison with anionic and cationic nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*. 2018;550(1-2):316-24.
517. Zhang M, Viennois E, Prasad M, Zhang Y, Wang L, Zhang Z, et al. Edible ginger-derived nanoparticles: A novel therapeutic approach for the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and colitis-associated cancer. *Biomaterials*. 2016;101:321-40.