

Année universitaire 2011-2012

THÈSE  
pour le  
**DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**  
par  
**Hélène MALHAIRE**  
**Née le 22 Février 1988 à Montmorency (95)**

-----  
**soutenue publiquement le 30 Novembre 2012**  
-----

**Mise au point de microparticules bioadhésives à  
libération modifiée en vue d'un ciblage intestinal**

JURY :

Président : Mme Marie-Claire VENIER-JULIENNE  
Directeur : Mlle Caroline CHEMIN  
Co-directeur : Mr Frédéric LAGARCE



### ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

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

Signature :

Cet engagement de non plagiat doit être inséré en première page de tous les rapports, dossiers, mémoires.

## Liste des enseignants

### Année Universitaire 2011-2012

#### **PROFESSEURS**

BENOIT Jean-Pierre  
BOUET Gilles  
BOURY Franck  
CALENDÀ Alphonse  
CHALEIL Denis  
DUVAL Olivier  
FOUSSARD Françoise  
JARDEL Alain  
MAHAZA Chetaou  
MARCHAIS Véronique  
MAURAS Geneviève  
MAURAS Yves  
PASSIRANI Catherine  
RICHOMME Pascal  
ROBERT Raymond  
SAULNIER Patrick  
SERAPHIN Denis  
VENIER Marie-Claire

#### *Disciplines*

Pharmacotechnie  
Chimie Physique Générale et Minérale  
Biophysique  
Biologie Moléculaire - Biotechnologie  
Pharmacie Clinique  
Chimie Thérapeutique  
Biochimie Générale et Clinique  
Physiologie  
Bactériologie - Virologie  
Bactériologie et Virologie  
Biologie Cellulaire  
Toxicologie  
Chimie générale – Chimie analytique  
Pharmacognosie  
Parasitologie et Mycologie médicale  
Biophysique pharmaceutique et biostatistiques  
Chimie Organique  
Pharmacotechnie

#### **MAITRES DE CONFERENCE**

ANNAIX Véronique  
BASTIAT Guillaume  
BAGLIN Isabelle  
BATAILLE Nelly  
BENOIT Jacqueline  
CLÈRE Nicolas  
CORVEZ Pol

#### *Disciplines*

Biochimie Générale et Clinique  
Biophysique pharmaceutique et biostatistiques  
Pharmaco - Chimie  
Biologie Cellulaire et Moléculaire  
Pharmacologie et Pharmacocinétique  
Pharmacologie  
Sémiologie



**MAITRES DE CONFERENCE**

	<i>Disciplines</i>
DERBRE Séverine	Pharmacognosie
DUBREUIL Véronique	Chimie Analytique
FAURE Sébastien	Pharmacologie Physiologie
FLEURY Maxime	Immunologie
GALLAND Françoise	Biophysique
GIRAUD Sandrine	Biologie moléculaire et cellulaire
GUILET David	Chimie Analytique
HELESBEUX Jean-Jacques	Chimie Organique
JOLIVET Jean-Paul	Biophysique
KHAN Mustayeen	Chimie Générale et Minérale
LAGARCE Frédéric	Pharmacotechnie-Biopharmacie
LANDREAU Anne	Botanique
LARCHER Gérald	Biochimie Générale et Clinique
LAVAULT Marie	Pharmacognosie
LE RAY Anne-Marie	Valorisation des substances naturelles
LICZNAR Patricia	Bactériologie - Virologie
MALLET Marie-Sabine	Chimie Analytique et Bromatologie
MAROT Agnès	Parasitologie et Mycologie médicale
MILTGEN-LANCELOT Caroline	Management et gestion des organisations de santé
NAIL BILLAUD Sandrine	Immunologie
OGER Jean-Michel	Chimie
PECH Brigitte	Pharmacotechnie
TRICAUD Anne	Biologie Cellulaire

**PRAG (Professeurs Agrégés)**

	<i>Disciplines</i>
HANOTTE Caroline	Économie – gestion
ROUX Martine	Espagnol

**PRCE (Professeurs certifiés affectés dans l'enseignement supérieur)**

	<i>Disciplines</i>
GENARD Nicole	Anglais
LECOMTE Stéphane	Anglais

# REMERCIEMENTS

**J'aimerais adresser mes plus sincères remerciements,**

A Madame le **Professeur Marie-Claire VENIER** et à Monsieur le **Docteur Frédéric LAGARCE** de me faire l'honneur d'être membres du jury.

A Mademoiselle **Caroline CHEMIN**, Directeur d'Etude, pour avoir dirigé mes travaux, pour sa disponibilité et ses conseils qui m'ont permis de mener à bien mon projet ainsi que pour sa présence dans ce jury.

Aux **Laboratoires SERVIER** pour m'avoir offert la possibilité de vivre cette expérience si enrichissante, et tout particulièrement à Monsieur **Patrick WÜTHRICH**, Directeur du Centre de Développement Pharmaceutique, Monsieur **Michel DELANDINES**, Directeur des Ressources Humaines, et Madame **Marie-Caroline DE LANGLAIS**, Conseillère en Ressources Humaines.

A Monsieur **Jean-Manuel PEAN**, Directeur du Département Galénique des Laboratoires Servier. Un grand merci pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et pour ses précieux conseils sur le choix de la thèse universitaire.

A Messieurs **Gérald PICHON**, **Jean-Marc DORLAND** et au département analytique pour le temps qu'ils m'ont accordé, leur patience, leurs conseils et pour tout le savoir-faire qu'ils m'ont enseigné, mais aussi pour leur bonne humeur et leur sympathie.

A Monsieur **Gilles BRIAULT**, pour avoir contribué à ma formation, pour sa présence magique qui résout tous les soucis que l'on peut rencontrer avec l'atomiseur et pour sa sympathie. Merci Gilles pour la bouteille qui me permettra de fêter cette fin de parcours. Je penserai fort à toi en la partageant !

A Monsieur **Patrick GENTY**, pour sa bonne humeur et le partage de son expérience, professionnelle mais pas seulement...

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

Sur un plan plus personnel, je tiens à remercier chaleureusement mes amis de promotion avec lesquels j'ai pu partager tant de choses durant ces cinq années à Angers. J'espère que cette ultime étape de notre formation ne signera pas la fin de notre complicité.

Un grand merci à Mademoiselle **Christine LAMY** pour son soutien et son aide. Tes éclairs de génie sont toujours aussi appréciables !

Enfin, je garde ma dernière pensée pour ma famille qui a su me supporter tout au long de ce chemin, dans les bons et les mauvais moments. Merci du fond du cœur et plein de bonheur pour mon frère et ma belle-sœur dans ce nouveau tournant de leur vie !

# **TABLES DES MATIERES**

# Table des matières

<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>13</b>
<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>17</b>
<b>I. PHYSIOLOGIE ET ANATOMIE DU TRACTUS GASTRO-INTESTINAL .....</b>	<b>18</b>
<b>II. BIOADHESION ET PARAMETRES INFLUENTS .....</b>	<b>22</b>
1. MECANISMES.....	22
2. PARAMETRES INFLUANT SUR LA BIOADHESION .....	23
2.1 <i>Environnement local</i> .....	23
2.2 <i>Formulation</i> .....	23
2.3 <i>Polymère</i> .....	24
<b>III. POLYMERES BIOADHESIFS .....</b>	<b>26</b>
1. POLYMERES BIOADHESIFS DE PREMIERE GENERATION.....	26
1.1 <i>Polymères anioniques</i> .....	26
1.2 <i>Polymères cationiques</i> .....	28
1.3 <i>Polymères non ioniques</i> .....	29
2. POLYMERES BIOADHESIFS DE SECONDE GENERATION .....	30
<b>IV. POLYMERES A LIBERATION MODIFIEE .....</b>	<b>33</b>
<b>V. CARACTERISATION DE LA BIOADHESION .....</b>	<b>34</b>
1. METHODES <i>IN VITRO</i> .....	35
1.1 <i>Techniques rhéologiques</i> .....	35
1.2 <i>Technique du sac retourné</i> .....	36
1.3 <i>Techniques spectroscopiques et microscopiques</i> .....	36
1.4 <i>Technique de la gouttière</i> .....	38
1.5 <i>Technique du cylindre tournant</i> .....	39
1.6 <i>Angle de contact</i> .....	40
1.7 <i>Force de détachement</i> .....	41
2. METHODES <i>IN VIVO</i> .....	41
<b>VI. SYNTHESE .....</b>	<b>42</b>
<b>PARTIE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>44</b>
<b>I. MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>45</b>
1. MATERIELS .....	45
1.1 <i>Principe actif</i> .....	45
1.2 <i>Polymères</i> .....	45
2. METHODES .....	46
2.1 <i>Préparation des formules</i> .....	46
2.1.1 Choix des solvants pour atomisation.....	46
2.1.2 Préparation des solutions à atomiser.....	47
2.1.2.1 <i>Solubilisation</i> .....	47
2.1.2.2 <i>Viscosité</i> .....	48
2.1.3 Atomisation.....	48
2.1.3.1 <i>Microparticules binaires</i> .....	48
2.1.3.2 <i>Microparticules ternaires, nues et de type cœur-couronne</i> .....	49
2.2 <i>Caractérisation des atomisats</i> .....	50
2.2.1 Teneur en principe actif.....	50
2.2.2 Microscopie Electronique à Balayage (MEB).....	52

# Table des matières

2.2.3 Diffractométrie de rayon X (DRX).....	53
2.2.4 Essai de dissolution.....	53
2.2.5 Texturométrie.....	55
2.2.6 Technique du sac retourné .....	57
2.2.7 Analyse thermogravimétrique (ATG).....	59
<b>II. RESULTATS .....</b>	<b>60</b>
1. MICROPARTICULES BINAIRES.....	60
1.1 <i>Préparation des formules</i> .....	60
1.1.1 Choix du solvant d'atomisation .....	60
1.1.2 Atomisation.....	61
1.2 <i>Imagerie par Microscopie Electronique à Balayage</i> .....	64
1.3 <i>Analyse par Diffraction de Rayons X</i> .....	68
1.4 <i>Cinétique de libération</i> .....	70
1.4.1 Stabilité du PA dans les conditions de l'essai.....	70
1.4.2 Profils de libération des formules.....	70
1.5 <i>Mucoadhésion par texturométrie</i> .....	74
2. MICROPARTICULES TERNAIRES, NUÉS ET DE TYPE CŒUR-COURONNE.....	85
2.1 <i>Préparation des formules</i> .....	85
2.2 <i>Imagerie par Microscopie Electronique à Balayage</i> .....	87
2.3 <i>Analyse par Diffractométrie de rayons X</i> .....	90
2.4 <i>Cinétique de libération</i> .....	90
2.5 <i>Mucoadhésion</i> .....	93
2.5.1 Texturométrie .....	93
2.5.2 Technique du sac retourné .....	95
2.6 <i>Analyse thermogravimétrique</i> .....	96
<b>III. DISCUSSION.....</b>	<b>100</b>
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>112</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>116</b>
<b>TABLES DES ILLUSTRATIONS .....</b>	<b>122</b>
<b>I. FIGURES.....</b>	<b>123</b>
<b>II. TABLEAUX .....</b>	<b>124</b>

# **LISTE DES ABREVIATIONS**

<b>A</b>	Alginate PG	Alginate de Propylène Glycol
<b>B</b>	BCS	Biopharmaceutical Classification System
<b>C</b>	CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
<b>D</b>	DCM	Dichlorométhane
	DP	Degré de Polymérisation
	DRX	Diffraction de Rayons X
<b>H</b>	HEC	Hydroxyéthylcellulose
	HPC	Hydroxypropylcellulose
	HPMC	Hydroxyméthylpropylcellulose
	HPMC AS	Hydroxyméthylpropylcellulose Accétate Succinate
	HPMC P	Hydroxyméthylpropylcellulose Phtalate
<b>L</b>	LP	Libération Prolongée
	LOD	Limit Of Detection
	LOQ	Limit Of Quantification
<b>M</b>	MEB	Microscopie Electronique à Balayage
<b>P</b>	PA	Principe Actif
	PBSG	Phosphate-Buffered Saline with Glucose
	PEG	Polyéthylène Glycol
	PVP	Polyvinylpyrrolidone
<b>Q</b>	qsp	Quantité suffisante pour
<b>R</b>	RMN	Résonnance Magnétique Nucléaire
	rpm	Rotation par minute
<b>T</b>	TGI	Tractus Gastro-Intestinal
	T <sub>in</sub>	Température d'entrée dans la chambre de séchage
	T <sub>out</sub>	Température de sortie de la chambre de séchage

# INTRODUCTION

Le ciblage intestinal est une stratégie envisagée par de nombreuses équipes scientifiques et pour diverses pathologies. Ceci peut en effet permettre d'améliorer la biodisponibilité d'une molécule en limitant une déperdition par dégradation, conséquence des processus de digestion, ou par élimination avec le bol alimentaire non absorbé. Cette vectorisation permet aussi d'optimiser le contact de la molécule avec la muqueuse intestinale et de potentialiser son absorption ainsi que son passage au niveau systémique. Dans d'autres situations, le ciblage peut être souhaité, sans augmentation de la fraction absorbée. Tel est le cas pour des pathologies comme le cancer colorectal, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ou les troubles digestifs localisés chez des personnes sensibles comme la femme enceinte (Mahadevan, 2007). Une libération ciblée de l'actif directement sur la muqueuse intestinale permet alors d'augmenter et de maintenir dans le temps une concentration locale efficace en principe actif (PA) au niveau du tissu malade, tout en évitant un passage dans le sang (Wehrlé, 2007). L'action pharmacologique est ainsi optimisée et les effets indésirables, réduits. L'observance du traitement est alors améliorée, tout comme l'efficacité thérapeutique.

Nombre de systèmes ont été mis en œuvre et testés en vue de vectoriser la libération d'un PA dans l'intestin (Pinto, 2010) :

- Des systèmes temps-dépendant : La libération est modifiée (décalée, retardée, prolongée...) et permet de cibler une région particulière du tractus gastro-intestinal (TDI) en fonction du temps de transit.
- Des systèmes pH-dépendant : Le système est sensible aux variations physiologiques du pH tout au long du TDI (pH stomacal acide et pH intestinal neutre à basique). Une gastro-résistance permettra d'éviter une dégradation prématuée au niveau de l'estomac et de protéger le PA jusqu'à sa libération dans l'intestin grêle ou le colon (Peppas et Kavimandan, 2006 ; Lin *et al.*, 2008 ; Makhlof *et al.*, 2009).

- Des systèmes pression-dépendant : La réabsorption de l'eau au niveau du colon, engendre une augmentation de la viscosité du bol alimentaire et de la pression sur le système thérapeutique, qui libère alors le PA spécifiquement dans le colon (Yang *et al.*, 2002).
- Des systèmes enzyme-dépendant : La dégradation du vecteur thérapeutique spécifiquement par l'activité enzymatique riche assurée par la flore commensale du colon permet de cibler cette région particulière du tube digestif (Shalaby *et al.*, 1992).
- Des systèmes bioadhésifs : Le système adhère à la muqueuse intestinale par différentes interactions, plus ou moins spécifiques, et permet d'optimiser le contact en termes de temps et de surface entre la forme pharmaceutique et le tissu-cible (Dodou *et al.*, 2005).
- Des systèmes activés par un stimulus externe : le dispositif Intelisite® est administré puis activé par un signal magnétique lorsqu'il arrive à proximité du tissu-cible (Clear *et al.*, 2001).

Les Laboratoires SERVIER ont souhaité s'intéresser au ciblage intestinal en vue d'assurer une libération localisée d'un PA, sans passage systémique. Une synergie de deux des stratégies précédemment évoquées est envisagée. Dans un premier temps, le système devra permettre une libération modifiée afin de protéger la molécule des conditions extrêmes de l'estomac. Dans un second temps, la formulation devra tapisser tout l'épithélium intestinal grâce aux mécanismes de bioadhésion. Enfin, afin de répondre parfaitement à la problématique, le passage systémique devra être limité.

Le présent rapport s'articulera donc en deux parties. Dans un premier temps, une revue bibliographique permettra de détailler les différentes caractéristiques anatomiques et physiologiques du TGI, pouvant impacter la formulation et les exigences requises pour une libération ciblée du PA. La bioadhésion, les mécanismes mis en jeu dans ce phénomène et les paramètres influents seront également développés. Les polymères

bioadhésifs ayant fait l'objet de publications seront répertoriés, tout comme divers tests, *in vivo* ou *in vitro*, permettant d'évaluer le pouvoir bioadhésif d'une formule. Enfin, des polymères non bioadhésifs, mais ciblant l'intestin selon d'autres principes concluront cette première partie. Dans un second temps, une partie expérimentale développera la mise au point, par atomisation, de microparticules binaires PA/polymère puis ternaire, nue ou, de manière théorique, de type cœur-couronne, et leur caractérisation. Cette seconde partie sera présentée de façon conventionnelle : les matériels et méthodes employés précèderont les résultats et leur discussion. Enfin, une conclusion générale, portant sur l'ensemble des travaux réalisés, et des perspectives permettront de clôturer le rapport.

**REVUE  
BIBLIOGRAPHIQUE**

## I. Physiologie et anatomie du tractus gastro-intestinal

Les facteurs physiologiques tels que le temps de transit, le pH environnemental, la surface d'échange, l'activité enzymatique et la microflore du colon influencent l'absorption et peuvent être utilisés pour contrôler la libération d'un PA. Ce sont donc autant de données à prendre en compte en formulation. D'un point de vue anatomique, le tractus gastro-intestinal ou TGI se compose de plusieurs parties, dont l'intestin grêle. Chacune de ces parties présente des propriétés particulières. Ainsi, la longueur, la composition enzymatique, le pH et la surface développée par la muqueuse intestinale varient tout au long de l'intestin grêle (Tableau 1, d'après Rouge *et al.*, 1996). L'intestin grêle mesure entre cinq et sept mètres et est constitué du duodénum, du jéjunum et de l'iléon, sa portion la plus distale. Cet organe présente des valvules connitives, des plis permanents orientés transversalement et débordant dans la lumière du tube intestinal. Leur fonction est d'augmenter la surface d'échange (environ trois fois) et de ralentir le transit. Sur ces plis se trouvent de nombreuses villosités augmentant huit fois la surface d'échange entre le milieu extérieur et l'organisme. Enfin, l'épithélium recouvrant ces villosités est constitué de cellules présentant environ 3000 villosités chacune, ce qui triple à nouveau la surface d'échange. La longueur remarquable de l'intestin grêle, combinée à l'architecture particulière de ce tissu, permet d'exposer une surface totale de quelques 200 m<sup>2</sup>, essentiellement localisée au niveau du jéjunum et de l'iléon faisant de ces deux parties les lieux majoritaires de l'absorption (Fawcett *et al.*, 2002).

Tableau 1 : Facteurs anatomiques et physiologiques, du tractus gastro-intestinal de l'homme, influençant l'absorption et le métabolisme d'un principe actif (adapté de Rouge *et al.*, 1996)

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

Le tissu intestinal se compose d'un épithélium sur lequel se trouvent des glandes et des cellules caliciformes productrices de mucus et d'un tissu conjonctif richement vascularisé, appelé chorion, chargé de nourrir l'épithélium. Le tout repose sur une base musculaire (Figure 1, Thibodeau et Patton, 2002). L'épaisseur relative de chaque tunique varie tout au long du TGI.

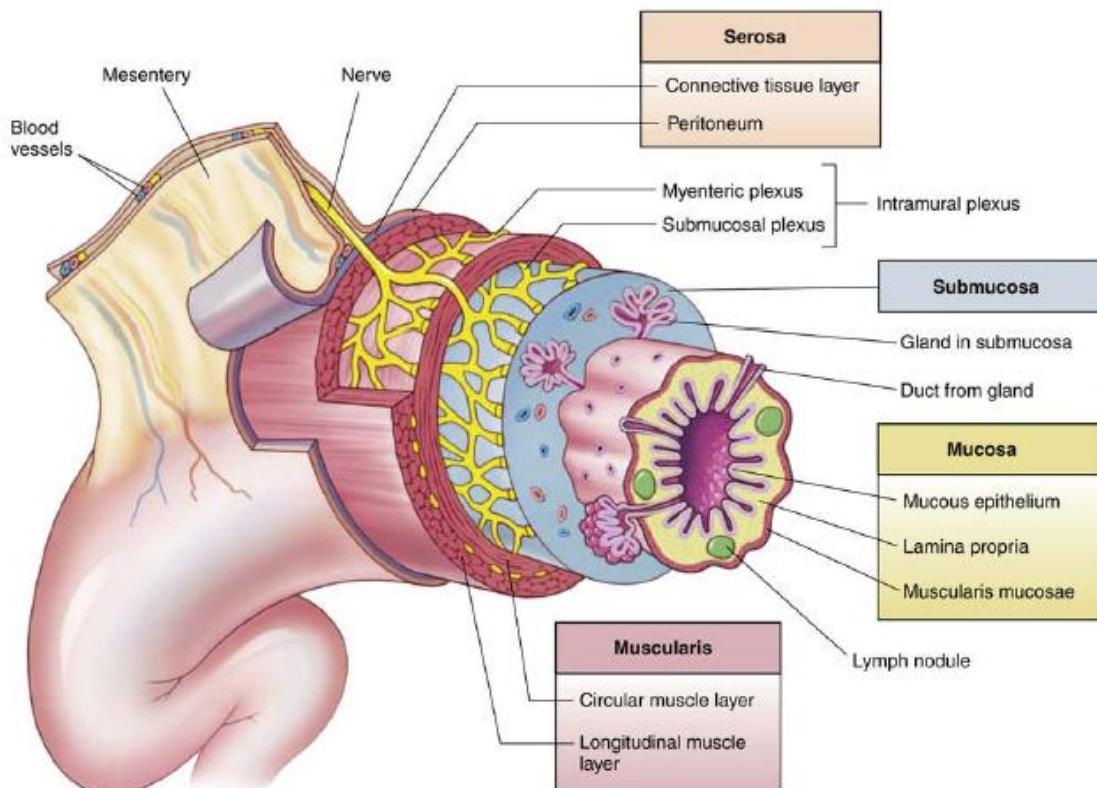


Figure 1 : Anatomie du tractus gastro-intestinal (Thibodeau et Patten, 2002)

Une couche de mucus recouvre l'épithélium intestinal. Son rôle est, entre autres, de protéger le tissu des éléments pathogènes et des processus de digestion. Il existe ainsi un gradient de pH sur toute l'épaisseur du mucus : les valeurs de pH varient entre un pH 1-2 dans la lumière du TGI, permettant l'accomplissement des processus de digestion, et des valeurs neutres, au contact des entérocytes, compatibles avec la viabilité des cellules. Le mucus apporte aussi un pouvoir lubrifiant afin de faire progresser le bol alimentaire dans le TGI, sans léser les tissus alentour (Ensign *et al.*, 2012).

Le mucus est composé majoritairement d'eau (95 %), de lipides et glycoprotéines (0,5 à 5 %), de sels minéraux (0,5 à 1 %) et de protéines libres (1 %). Cette composition varie en fonction du site de sécrétion, du rôle mécanique et des conditions physiologiques ou pathologiques (Rathbonne et Hadgraft, 1991). Parmi les glycoprotéines se trouvent les mucines. Elles sont constituées d'un corps polypeptidique (riche en sérine,

thréonine, alanine, glycine et proline) lié à des chaînes latérales oligosaccharidiques par des liens *o*-glycosidiques. Ces chaînons latéraux, souvent ramifiés, contiennent de 2 à 20 résidus de sucres, eux-mêmes parfois liés à des résidus de sulfate d'ester ou d'acide sialique. Aux pH supérieurs à 2,6, ces derniers sont ionisés, apportant une charge négative à la couche de mucus. Les molécules de mucines interagissent physiquement entre elles (enchevêtement des chaînes) et chimiquement (ponts disulfures, interactions électrostatiques et hydrophobes, liaisons hydrogène) pour conférer des propriétés viscoélastiques au mucus. Cette viscoélasticité peut être altérée par de nombreux facteurs tels que la proportion d'eau, la force ionique et le pH ou par des modifications biochimiques liées à certaines pathologies (Falson-Rieg *et al.*, 2004).

Afin de cibler l'épithélium intestinal, une formulation bioadhésive est envisagée. La bioadhésion consiste en l'adhésion de molécules sur une surface biologique. Dans le cas où cette surface est recouverte de mucus, comme c'est le cas au niveau de l'intestin, on parle de mucoadhésion (Woodley, 2001). Des stratégies similaires ont été préalablement investiguées par de nombreux auteurs dans le cadre d'un ciblage colonique. Dodou *et al.* s'y sont notamment intéressés pour améliorer l'exploration intestinale au cours du dépistage du cancer colorectal (Dodou *et al.*, 2005). D'autres scientifiques ont travaillé sur une thérapeutique permettant de traiter les maladies inflammatoires de l'intestin. McGirr et ses collaborateurs ont ainsi comparé la mucoadhésivité du Carbopol® 980 NF, un carbomère, et du polycarbophil, sur la muqueuse du colon, après vectorisation par un système Intelisite® (McGirr *et al.*, 2009). Cette approche est particulièrement séduisante puisqu'elle permet d'établir un contact étroit entre la formulation et le tissu afin d'améliorer l'absorption de la molécule active par les cellules-cibles. La mucoadhésion au niveau du TGI a ainsi été étudiée par de nombreux auteurs (Krauland *et al.*, 2004 ; Davis, 2005 ; Streubel *et al.*, 2006 ; Säkkinen *et al.*, 2006). Le péristaltisme, l'important turnover du mucus et le piégeage de la forme

pharmaceutique dans ce-dernier sont les principaux paramètres limitant le succès des formulations et auxquels il faudra remédier. Selon la littérature, les molécules ayant montré le plus grand intérêt en termes de mucoadhésion sont les polymères. C'est donc la mucoadhésion des polymères en particulier qui fera l'objet de la suite de cette revue bibliographique.

## II. Bioadhésion et paramètres influents

### 1. Mécanismes

Il existe plusieurs mécanismes conduisant à la mucoadhésion d'un polymère. Parmi eux, des processus relevant de la chimie tels que (i) la théorie électronique qui suppose que le polymère bioadhésif et le réseau de glycoprotéines possèdent des groupements chimiques électroniquement actifs et différents permettant un transfert d'électrons (Derjaguin *et al.*, 1977) et (ii) la théorie de l'adsorption qui met en jeu des liaisons chimiques secondaires de type Van der Waals et des liaisons hydrogène (Falson-Rieg *et al.*, 2004). D'autres processus s'appuient sur une interaction physique, comme (i) une mouillabilité efficace permettant un étalement satisfaisant et une surface recouverte importante, deux paramètres influents dans la bioadhésion et créant un contact étroit entre la formulation et le tissu biologique (Peppas et Buri, 1985) ou (ii) la diffusion/interpénétration qui est souvent considérée comme prépondérante. Lors de ce dernier processus, une partie de l'élément bioadhésif est capturée par les espaces libres présents dans le mucus ou tissu-cible, jusqu'à la création de liaisons adhésives semi-permanentes (Ponchel *et al.*, 1987). Le moteur de ce phénomène est la diffusion du polymère et des glycoprotéines du mucus, à l'interface, en fonction des gradients de concentration.

De nombreux paramètres inhérents à la formulation ou à la surface biologique et son environnement local peuvent influencer la qualité de la mucoadhésion. Il convient donc de s'y intéresser.

## 2. Paramètres influant sur la bioadhésion

### 2.1 Environnement local

L'environnement à proximité du tissu-cible impacte la mucoadhésion et ses mécanismes. Ces paramètres sont à prendre en considération bien qu'ils soient difficilement modulables. Ainsi, la température influence la viscosité du mucus, la vitesse de diffusion de la molécule et l'état du polymère. Le pH ou la présence d'ions dans les fluides biologiques engendrent, eux, une variation de la force ionique et de la pression osmotique (Falson-Rieg *et al.*, 2004). En outre, les ions monovalents tendraient à diminuer la bioadhésion, tandis que les ions divalents tendraient à l'augmenter (Lejoyeux *et al.*, 1989). Andrews et ses collaborateurs ont ajouté un paramètre supplémentaire qui est le turnover du mucus dans la région ciblée (Andrews *et al.*, 2009) : dans l'intestin, il est d'environ 200 minutes en moyenne (Yu *et al.*, 1996). Enfin, l'état physiopathologique du patient sera également à prendre en compte.

### 2.2 Formulation

D'autres paramètres liés à la formulation doivent être considérés, tels que la forme pharmaceutique ou les excipients intervenant dans la formule (Falson-Rieg *et al.*, 2004). Un système divisé présente l'avantage de pouvoir se disperser *in situ* pour couvrir une surface de contact plus importante. Par ailleurs, Romero et ses collaborateurs ont montré qu'un important diamètre moyen de pore des particules permettait d'accélérer le gonflement, ce qui est en faveur d'une bioadhésion plus précoce (Romero *et al.*, 1991). Selon Duchêne et Ponchel, un système divisé permet aussi d'éviter une irritation ou une ulcération localisée du tissu, phénomène qui

peut être observé avec une forme monolithique renfermant un PA irritant (Duchêne et Ponchel, 1997). Un complexe poly-électrolytique au sein des microparticules ou la formation d'un hydrogel dans l'intestin sont également envisageables (Lin *et al.*, 2005 ; Bigucci *et al.*, 2008 ; Bhattacharai *et al.*, 2010).

## 2.3 Polymère

Enfin, le polymère lui-même, par sa nature, module le phénomène de bioadhésion grâce à des phénomènes de cohésion, de gonflement ou de liaison mis en jeu avec le mucus (Figure 2, Bernkop-Schnürch et Steininger, 2000).

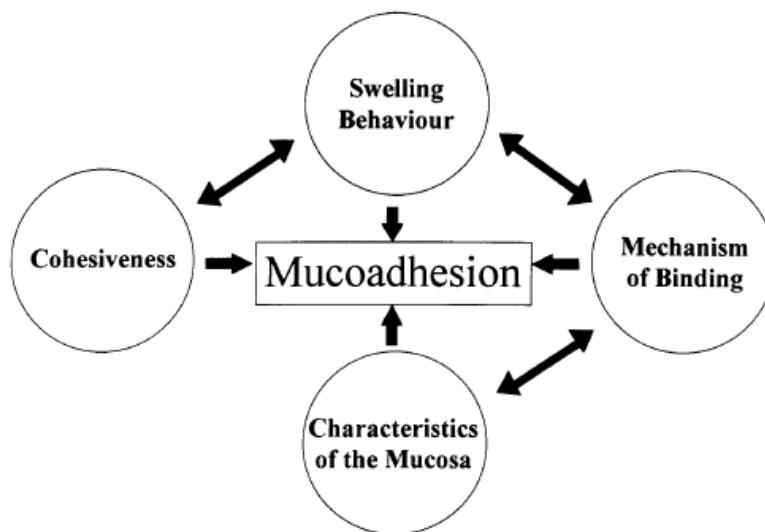


Figure 2 : Paramètres inhérents au polymère influençant la mucoadhésion (Bernkop-Schnürch et Steininger, 2000)

Premièrement, la structure chimique peut interférer dans le processus de bioadhésion. En effet, la charge et la densité de charge lui confèrent, outre un comportement pH-dépendant, une affinité pour le mucus. Les groupements hydrophiles sont également en faveur du processus. Sa masse moléculaire peut lui permettre de diffuser plus ou moins dans le mucus. Ceci sera d'autant plus facile si le polymère possède une structure voisine des molécules constituant le mucus, le rendant ainsi soluble dans ce fluide biologique. Ce dernier critère peut être évalué notamment grâce

au paramètre d'interaction de Flory  $\chi$  (Mikos et Peppas, 1988). Il permet de qualifier la solubilité d'un polymère dans un solvant, à une température donnée, selon la théorie de Flory-Huggins, décrivant l'interaction thermodynamique entre ces deux entités. Dans le cas présent, la valeur du  $\chi$  reflète l'interaction polymère-mucus (Falson-Rieg *et al.*, 2004). Deuxièmement, la structure physique et notamment le taux de réticulation ou le degré de polymérisation (DP) de la macromolécule peuvent aussi avoir une influence. Un DP supérieur à 200 permet d'observer un croisement des boucles et un comportement élastique. Le taux de réticulation et le DP contribuent à la flexibilité de la macromolécule, un critère essentiel pour permettre sa pénétration dans le réseau du mucus (Falson-Rieg *et al.*, 2004). Troisièmement, un taux d'hydratation assez important lui permet une mobilité des chaînes. Un nombre suffisant de sites « adhésifs », ou fonctionnels, libérés et exposés contribue à une interaction avec le mucus. Cependant, si le gonflement est excessif, les liaisons adhésives sont plus faibles du fait de l'éloignement des groupements fonctionnels. La vitesse d'hydratation importe elle aussi. Elle doit être suffisamment rapide (i.e. 80 % de la quantité d'eau totale captée pendant les 15 premières minutes) pour que la formulation établisse rapidement des liens avec le mucus et échappe au flux des fluides biologiques (Falson-Rieg *et al.*, 2004). Selon Andrews et ses collaborateurs, pour les formes semi-solides, il existe une concentration optimale au-delà de laquelle les chaînes de polymère sont en nombre suffisant, assurant ainsi une bonne interpénétration dans le mucus et une bioadhésion satisfaisante (Andrews *et al.*, 2009). En ce qui concerne les formes solides, un tel seuil n'existe pas et plus la concentration en polymère est importante, plus la force mucoadhésive est grande.

### III. Polymères bioadhésifs

Plusieurs familles de polymères ont d'ores et déjà montré de bonnes propriétés mucoadhésives. Ils peuvent être d'origine naturelle ou synthétique. Andrews et ses collaborateurs ont répertorié ces polymères en trois grandes catégories (Andrews *et al.*, 2009) : (i) les polymères qui, au contact de l'eau, développent des propriétés adhésives responsables de la bioadhésion ; (ii) les polymères qui adhèrent au tissu biologique grâce à des liaisons physiques (liaison électrostatique principalement mais aussi interaction hydrophobe ou liaison hydrogène) ; (iii) les polymères se liant à des sites spécifiques.

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

#### 1. Polymères bioadhésifs de première génération

Les polymères de première génération peuvent être subdivisés en trois groupes : les anioniques, les cationiques et les non ioniques (Grabovac *et al.*, 2005). Selon Ludwig, seuls les deux premiers groupes sont pertinents dans la bioadhésion (Ludwig, 2005).

##### 1.1 Polymères anioniques

Les polymères anioniques sont les plus employés, du fait de leur forte bioadhésion et de leur faible toxicité. Parmi ceux-ci, on trouve les dérivés de polyacrylate tels que les carbomères et le polycarbophil, les premiers polymères identifiés en termes de mucoadhésion (Ludwig, 2005). D'après les conclusions de Tamburic et Craig, suite à une étude par rhéologie et texturométrie, ce sont le haut poids moléculaire et le degré de réticulation important qui conditionnent la mucoadhésion (Tamburic et

Craig, 1997). Ch'ng et ses collaborateurs ont montré que les dérivés acryliques présentaient une adhésion maximale pour des valeurs de pH comprises entre 5 et 6. L'ionisation décuple alors leur capacité de gonflement en présence d'eau et permet l'ouverture des sites de liaisons ainsi qu'une meilleure accessibilité pour les chaînes de glycoprotéines du mucus. En revanche, ils ont constaté qu'à pH neutre, l'adhésion était minimale. D'autre part, lors de tests *in vivo*, ils ont observé un temps de transit plus allongé avec les polyacrylates, qu'avec les polyméthacrylates (Ch'ng *et al.*, 1985). L'équipe de Grabovac a étudié plusieurs types de polyacrylates et a conclu que le Carbopol® 980 NF possédait une adhésion supérieure au Carbopol® 974P NF, au polycarbophil et au Carbopol® 971P NF. D'autres scientifiques ont montré que, outre des propriétés mucoadhésives, les carbomères pouvaient permettre d'obtenir une cinétique de diffusion du PA de type Super Cas II (Llabot *et al.*, 2004). La vitesse de pénétration du solvant dans la matrice est alors contrôlée par la relaxation des chaînes de polymères, ce qui modifie la libération du PA. Wu et ses collaborateurs ont, quant à eux, réalisé des gélules enrobées d'HP55® (HPMC Phtalate), contenant des nanoparticules de PLGA et d'Eudragit® RS (Poly(methacrylate, ethylacrylate)), elles-mêmes renfermant de l'insuline. Ils ont vu, selon des méthodes *in vitro* et *in vivo*, que l'enrobage permettait de retarder la libération, du fait d'une insolubilité à pH acide et que les particules de PLGA et d'Eudragit® généraient une adhésion de la formule à la muqueuse intestinale (Wu *et al.*, 2012).

Les hydrates de carbone, tels que la gomme guar, la gomme gellane, la pectine, le dextran, l'amylose ou les alginates, peuvent aussi être employés. Leur métabolisation par l'activité enzymatique des bactéries anaérobiques de la flore du colon sont d'un grand attrait dans la conception d'une formulation ciblant cette région de l'intestin (Shukla et Tiwari, 2012). Cette stratégie est de plus en plus étudiée pour lutter contre des pathologies telles que le cancer colorectal, les amibiases et les

maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Cependant, l'inconvénient majeur des formulations constituées par ces macromolécules est l'impact du pH dans la lumière du TGI et du temps de résidence sur la libération de l'actif : la variabilité de ces paramètres d'un individu à l'autre et parfois même au sein d'un même individu peut modifier la cinétique de libération d'une administration à l'autre. Toutefois, ceci peut être contourné grâce à des modifications chimiques de la molécule. La réticulation est ainsi souvent utilisée afin de contrôler la libération (Shukla et Tiwari, 2012).

## 1.2 Polymères cationiques

Le chitosan est le polymère bioadhésif cationique le plus souvent étudié (Andrews *et al.*, 2009). Ce polysaccharide est obtenu par déacétylation de la chitine (Wang *et al.*, 2001). D'abord utilisé, entre autres, dans la cosmétique, l'agroalimentaire, le textile ou la papeterie, c'est maintenant l'industrie pharmaceutique qui s'y intéresse. Il montre des propriétés mucoadhésives intéressantes en établissant des liaisons ioniques entre ses groupements amines et des fonctions acide sialique ou acide sulfonique du mucus ainsi que des liaisons hydrogène (Asane *et al.*, 2011). D'autre part, la linéarité des chaînes lui confère une flexibilité permettant un enchevêtrement dans le mucus. En neutralisant certains sites anioniques des jonctions serrées, ce polysaccharide permet aussi la promotion de l'absorption d'un PA par la voie paracellulaire (Lehr *et al.*, 1992). Sa biocompatibilité, sa biodégradabilité et sa faible toxicité confirment le potentiel de cette macromolécule (Pillai *et al.*, 2009). Kockisch et son équipe ont comparé la bioadhésivité de microsphères polymères réalisées à partir de Carbopol®, de polycarbophil, de chitosan et de Gantrez® (Poly(méthyle vinyle éther/anhydride maléique), obtenues par émulsification et évaporation de solvant. Ils ont montré, *via* des tests dynamiques de mucoadhésion, que les particules de chitosan étaient particulièrement bien appropriées pour la cavité orale (Kockisch *et al.*, 2003). Huang et ses collaborateurs ont étudié des gélules de chitosan

enrobées d'HPMC Phtalate en vue de délivrer de la rebamipide au niveau du colon. L'HPMC Phtalate a permis de protéger la formule du milieu stomachal. Le chitosan a ensuite retardé la libération du principe actif jusqu'au niveau du colon, où les microorganismes et l'acidification du pH résultant de leur activité métabolique, ont dégradé le polymère (Huang *et al.*, 2008). L'équipe de Charoenthai s'est intéressée à ce polymère au vu de sa bioadhésivité prolongeant le temps de résidence de la formule dans l'intestin mais aussi compte tenu de sa capacité à promouvoir l'absorption. Le chitosan permet d'inhiber les enzymes protéolytiques et d'augmenter la perméabilité de la membrane biologique pour les peptides (Charoenthai *et al.*, 2007). Ils ont aussi montré que le grade de bas poids moléculaire engendrait, avec l'alginate de sodium, un complexe polyélectrolytique plus fort. Cependant, la molécule se comporte comme un polyélectrolyte cationique hydrosoluble à pH acide (Pillai *et al.*, 2009). Ceci est un inconvénient, lorsque l'intestin est ciblé, car la formulation se solubilise alors dans l'estomac. Toutefois, la molécule peut être chimiquement modifiée pour s'adapter aux fluctuations du pH jusqu'au tissu-cible (Sashiwa et Aiba, 2004). Säkkinen et son équipe ont cependant tempéré l'engouement pour cette macromolécule en montrant que les bonnes propriétés mucoadhésives, observées *in vitro*, ne correspondaient pas forcément à ce qui se passait *in vivo* (Säkkinen *et al.*, 2006). Ainsi, l'augmentation de la biodisponibilité du furosémide n'a pas été à la hauteur des espérances basées sur leur étude *in vitro*.

### 1.3 Polymères non ioniques

Grabovac et ses collaborateurs ont étudié 19 des polymères mucoadhésifs les plus publiés. Parmi ceux-ci, se trouvent l'hydroxypropyle cellulose ou HPC, l'hyrdoxyethyle cellulose ou HEC, la polyvinylepirrolidone ou PVP et le polyéthylène glycol ou PEG. Ceux-ci, à l'inverse des polymères anioniques ou cationiques, ne sont pas affectés par les électrolytes. A l'état non modifié et selon des tests réalisés avec un

cylindre rotatif, c'est l'HPC précipité qui a montré l'adhésion la plus importante ( $15,2 \pm 0,4$  h) (Grabovac *et al.*, 2005).

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

## 2. Polymères bioadhésifs de seconde génération

La seconde génération de polymères permet de pallier les difficultés à cibler la bioadhésion sur un site éloigné de la voie d'entrée. Dans la voie orale par exemple, le challenge est d'éviter une mucoadhésion trop précoce sur les muqueuses, en amont du site ciblé, et de permettre l'adhésion de la formule uniquement au niveau souhaité. Cette seconde génération s'appuie donc sur une reconnaissance spécifique entre un récepteur et son ligand (Falson-Rieg *et al.*, 2004). Par ailleurs, certains polymères « cytoadhésifs » contribuent à s'affranchir du turnover du mucus (Andrews *et al.*, 2009). Plusieurs stratégies de reconnaissance peuvent être mises en œuvre comme le montre le schéma de la Figure 3 (Ponchel et Irache, 1998).

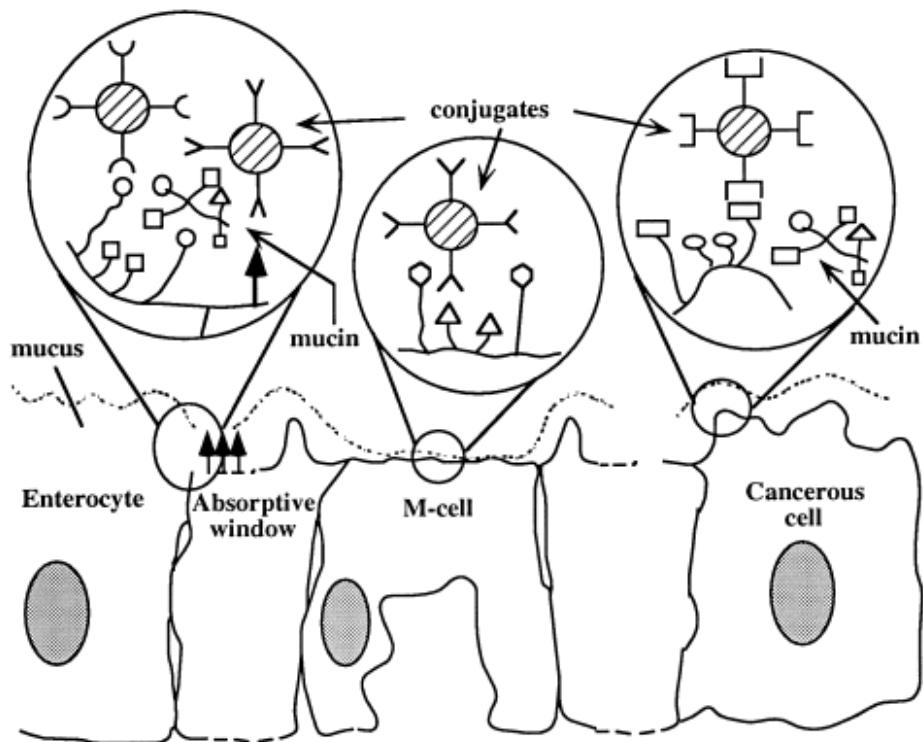


Figure 3 : Principales possibilités d'interaction de type ligand-récepteur. (1) Liaison du conjugué avec les glycoprotéines du mucus (cercles ouverts) ou des membranes cellulaires ou des glycolipides (flèche noire) ; (2) liaison avec un ligand spécifique de la surface de certaines cellules (ex : cellules M) ; (3) reconnaissance par les mucines sécrétées à des sites spécifiques (ex : cellules cancéreuses) (Ponchel et Irache, 1998)

Les lectines sont des protéines naturelles jouant un rôle dans les phénomènes de reconnaissance cellulaire. Ces molécules sont capables de se lier de façon réversible à des résidus d'hydrates de carbone présents sur une membrane cellulaire. Elles peuvent alors persister en surface ou être internalisées par endocytose (Woodley, 2000 ; Lehr, 2000). C'est notamment un des moyens employés par les bactéries pour infecter un organisme vivant. L'étape critique de ce phénomène est la traversée du mucus par la particule « cytoadhésive » jusqu'à la membrane cellulaire pour interagir avec celle-ci. Selon Wirth et ses collaborateurs, la dispersion, dans le mucus, d'une formulation contenant des lectines, pourrait permettre sa rétention, grâce à des liaisons réversibles. Le système pourrait ensuite être distribué jusqu'au niveau de la couche cellulaire où les lectines pourraient bioadhérer. Les particules piégées

dans le mucus constituerait alors un réservoir (Wirth *et al.*, 2002). Des microparticules de chitosan et d'alginate de calcium conjuguées à des agglutinines de germe de blé ont été chargées de 5-fluorouracil par Glavas Dodov et son équipe (Glavas Dodov *et al.*, 2009). Ils sont ainsi parvenus, par un procédé en une étape utilisant l'atomisation, à obtenir de nouvelles microparticules, composées d'un hydrogel, couplées à un ligand et permettant une vectorisation du PA jusqu'au site effectif pour le traitement, c'est-à-dire le colon. En revanche, la toxicité ou l'immunogénicité de nombreuses lectines ainsi que l'absence de données sur les effets que peuvent engendrer une administration répétée limitent encore leur utilisation (Andrews *et al.*, 2009). D'autres stratégies s'inspirent des mécanismes de colonisation bactérienne. Bernkop-Schnürch et son équipe ont ainsi proposé un réseau de polyacrylate lié de façon covalente à du K99-fimbriae, une protéine d'attachement d'origine bactérienne (Bernkop-Schnürch *et al.*, 1995). Enfin, les thiomères, des macromolécules thiolées, dérivent de polymères hydrophiles tels que les polyacrylates, le chitosan ou la gomme gellane déacétylée. Ils permettent la formation de liaisons disulfides avec des domaines glycoprotéiques riches en cystéine du mucus (Bernkop-Schnürch, 2005). Grabovac et son équipe, dans leurs travaux comparatifs précédemment cités, ont constaté que les polymères ainsi modifiés exhibaient une mucoadhésion supérieure à leurs homologues non modifiés. Le chitosan thiolé à pH 6,5 a présenté une mucoadhésion 10 fois supérieure sous forme lyophilisée et 20 fois supérieure sous forme précipitée, comparée au chitosan non modifié (Grabovac *et al.*, 2005). Malheureusement, cette nouvelle stratégie est encore peu ou pas commercialisée et les polymères doivent en général être synthétisés au laboratoire.

## IV. Polymères à libération modifiée

Le ciblage intestinal nécessite d'avoir une formulation à libération décalée et/ou prolongée. Les scientifiques s'intéressent à cette stratégie depuis longtemps. Les différents systèmes mis au point pour cibler chaque partie du TGI ont été répertoriés par Pinto. La prolongation ou la modification de la libération peuvent reposer sur la variation physiologique des propriétés intrinsèques du tractus. L'intestin grêle peut ainsi être atteint spécifiquement en prenant en compte les variations de pH, outre les phénomènes d'adhésion (Pinto, 2010). L'équipe de Carelli a ainsi développé un comprimé matriciel à base d'Eudragit® L100 ou S100 et de polyoxyde d'éthylène en vue de libérer de la prednisolone au niveau du jéjunum et de l'iléon (Carelli *et al.*, 2000). La gastro-résistance peut aussi contribuer à cibler l'intestin, dans sa partie proximale. Une équipe taïwanaise a employé l'Eudragit® L100-55 pour enrober des nanoparticules et conférer une gastro-résistance à la formulation (Nguyen *et al.*, 2011). D'autres ont fabriqué des nanoparticules de PLGA et d'Eudragit® RS, enrobées d'HP55®, un dérivé phtalate d'HPMC. La libération a pu ainsi être contrôlée selon deux principes : (1) l'HP55®, insoluble au pH acide de l'estomac a permis de retarder la seconde étape, soit (2) la bioadhésion de la formule grâce aux polymères bioadhésifs (Wu *et al.*, 2012). L'équipe de Pithavala a utilisé un nouveau système baptisé Intelisite® afin de délivrer de la ranitidine dans la partie distale de l'intestin grêle ou le colon. La libération est déclenchée grâce à un signal magnétique externe (Pithavala *et al.*, 1998). Le colon, quant à lui peut être atteint selon des principes reposant sur des modifications chimiques, une dégradation des polymères, la variation de pH, le temps ou l'adhésion, entre autres (Pinto, 2010). Les polysaccharides peuvent être utilisés comme agent d'enrobage (Yang *et al.*, 2002) ou sous forme matricielle. Ces macromolécules sont spécifiquement dégradées par la microflore du colon et permettent une libération spécifiquement au niveau du gros intestin. Cependant, certaines, parmi lesquelles l'inuline,

l’amylose, la gomme guar ou les pectines, doivent être chimiquement modifiées ou couplées à des polymères plus hydrophobes afin de renforcer leur hydrophobicité et limiter une libération prématuée du PA par simple solubilisation (Vandamme *et al.*, 2002).

Mortazavi et Smart ont quant à eux étudié l’influence des mouvements d’eau dans les phénomènes de bioadhésion. Ils ont constaté que ces mouvements étaient un facteur significatif dans la mucoadhésion (Mortazavi et Smart, 1993). Ceci explique l’intérêt porté aux polymères hydrophiles et aux hydrogels. Un système divisé d’HPMC contenant de l’indométhacine a ainsi permis d’obtenir une libération prolongée sur huit heures, *via* une gélification du système (Bodmeier et Paeratakul, 1991). Morishita et ses collaborateurs ont, quant à eux, mis au point des microparticules polymères d’insuline, composées de PEG et de polyméthacrylate. Le système est réputé multifonctionnel et se convertit, *in situ*, en hydrogel. Il est pH-dépendant, et possède des propriétés d’inhibition de l’activité enzymatique mais aussi des caractéristiques mucoadhésives (Morishita *et al.*, 2006).

## V. Caractérisation de la bioadhésion

En vue de concevoir une formulation bioadhésive, il faut également anticiper les méthodes d’étude. Celles-ci devront prendre en compte les nombreux paramètres impactant les différents mécanismes, en mimant les conditions *in vivo*, et permettre de discriminer les formules en termes de mucoadhésion. De nombreuses équipes s’y sont intéressées. Françoise Falson-Rieg, Vincent Faivre, et Fabrice Pirot, auteurs de *Nouvelles formes médicamenteuses*, ont répertorié les principales méthodes *in vitro* et *in vivo* mises au point.

## 1. Méthodes *in vitro*

Les techniques *in vitro* sont relativement faciles à mettre en œuvre et moins coûteuses que les méthodes *in vivo*. Elles permettent ainsi de discriminer des formules et de sélectionner les plus pertinentes pour des tests *in vivo*. Leur point critique est la reconstitution des propriétés viscoélastiques et chimiques du mucus. Les techniques les plus souvent utilisées sont développées dans ce paragraphe.

### 1.1 Techniques rhéologiques

L’interaction entre le mucus et un polymère bioadhésif entraîne un réarrangement des macromolécules conduisant à la variation de la viscosité. La viscosité newtonienne  $\eta_t$ , alors mesurée, résulte de la viscosité apparente individuelle du mucus  $\eta_m$  additionnée à celle du polymère  $\eta_p$  et à la composante due à la bioadhésion  $\eta_b$ :

$$\eta_t = \eta_m + \eta_p + \eta_b$$

En fixant la concentration, la température et la vitesse de cisaillement, le rhéo-épaississement dû à l’interaction mucus-polymère ( $\eta_b$ ) peut être déterminé. La force de bioadhésion par unité d’aire  $F$  (en N/m<sup>2</sup>) peut alors être déterminée selon l’équation faisant intervenir la vitesse de cisaillement  $\sigma$  :

$$F = \eta_b \cdot \sigma$$

$F$  est une force additionnelle de friction intermoléculaire. Elle évolue dans le même sens que la force du lien bioadhésif. Il est également possible de s’intéresser aux propriétés viscoélastiques dynamiques des systèmes en mesurant le module complexe de cisaillement  $G^*$ , en pascal (Pa), pour des contraintes de cisaillement croissantes. Madsen *et al.* ont montré que cette méthode était non destructive (Madsen *et al.*, 1998). Bien que les résultats dépendent pour beaucoup du ratio polymère/mucus, cette technique permet d’étudier la nature des interactions mises en jeu.

## 1.2 Technique du sac retourné

Il s'agit ici de dénombrer les particules ayant adhéré sur la muqueuse intestinale. Une portion d'intestin est prélevée, retournée et ligaturée au niveau des deux extrémités. Une solution PBSG est introduite dans le sac ainsi formé puis, ce dernier est introduit dans un récipient contenant une quantité connue de particules dans une solution saline. Après un temps donné d'incubation à 37°C, sous agitation, le support biologique est récupéré et la masse de particules restées dans le tube est évaluée, après rinçage et lyophilisation. La quantité retenue par bioadhésion en est déduite (Figure 4, Santos *et al.*, 1999).

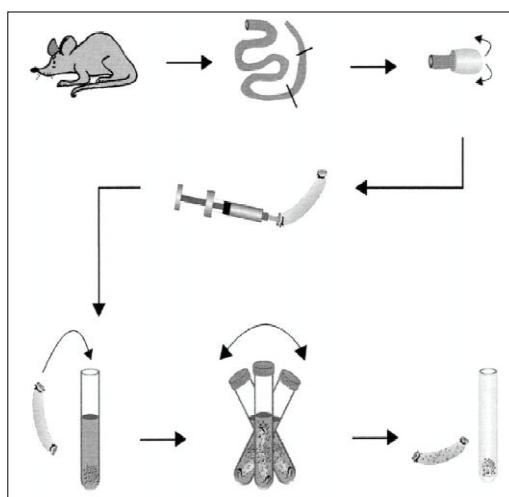


Figure 4 : Etude de la bioadhésion par la méthode du sac retourné (Santos *et al.*, 1999)

Cette technique suppose que les particules aient suffisamment d'affinité avec la solution PBSG pour ne pas rester concentrées à l'interface air/liquide. Elles ne doivent pas non plus se dissoudre dans le milieu et doivent supporter un processus de lyophilisation. Toutes les formulations ne sont donc pas compatibles avec cette méthode.

## 1.3 Techniques spectroscopiques et microscopiques

L'observation des variations de spectres de fluorescence de l'isothiocyanate de fluorescéine et du pyrène peut refléter la variation de

la viscosité du système et traduire l'interaction mucus/polymère (Park et Robison, 1984). Il faut toutefois prendre en compte l'impact que le marqueur peut avoir sur la formulation et son comportement. D'autres auteurs ont eu recours à la spectroscopie électronique de spin pour suivre la microviscosité (Kearney *et al.*, 1984) ou à la Résonnance Magnétique Nucléaire ou RMN pour évaluer les effets de la force ionique et du pH (Barett-Bee *et al.*, 1982). Les mouvements d'eau ont également pu être observés par cette dernière technique (Marshall *et al.*, 2001). Enfin, Patel *et al.* ont étudié l'adsorption d'un polymère sur les cellules buccales par microscopie à force atomique (Patel *et al.*, 2000).

## 1.4 Technique de la gouttière

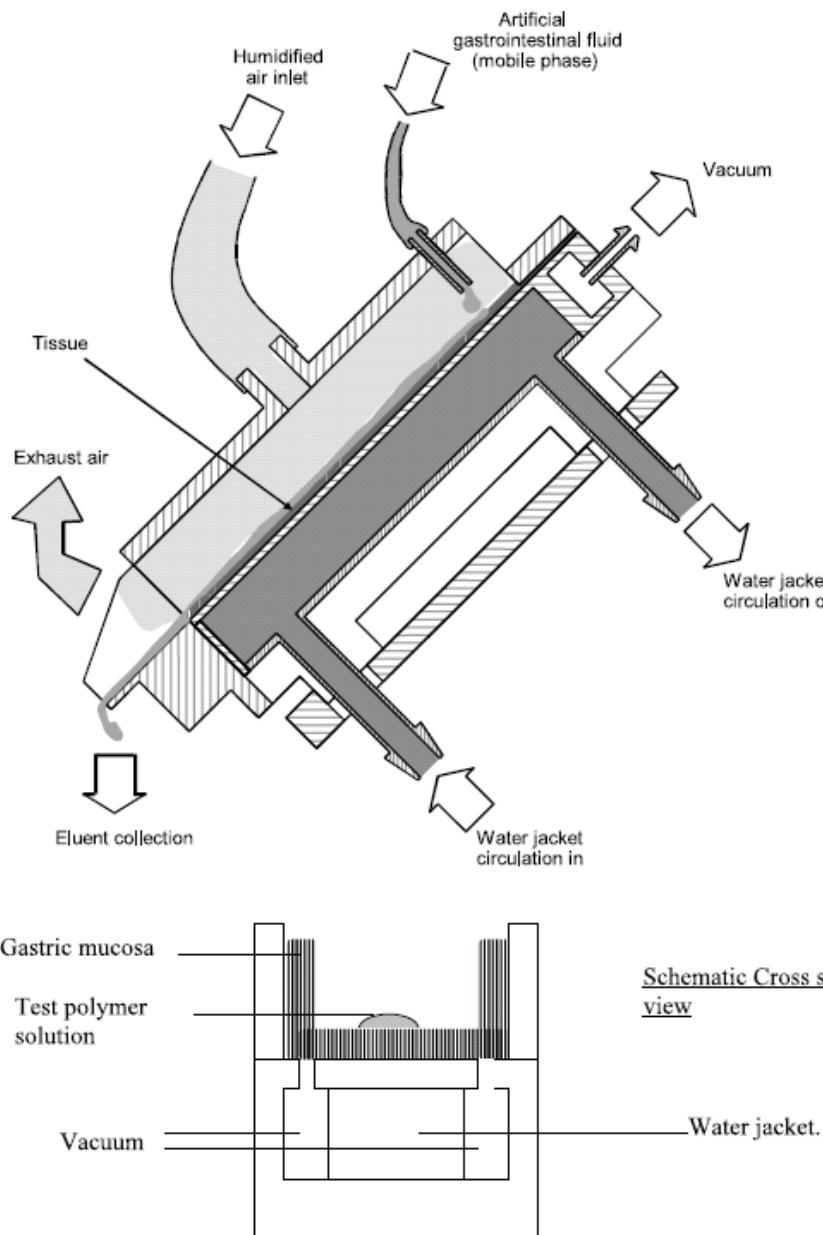


Figure 5 : Schéma du montage utilisé pour l'étude de la bioadhésion par la technique de la gouttière (Riley *et al.*, 2002).

Le support biologique est monté sur un appareil, le pôle apical des cellules vers le haut, et retenu par dépression. Le plan est incliné et une surface connue de la muqueuse est ainsi exposée (Figure 5, Riley *et al.*, 2002). Un liquide à 37°C, mimant le fluide biologique, permet de rincer la muqueuse en continu. Cette technique a notamment été utilisée par Riley et son équipe afin d'étudier la mucoadhésion de microparticules polymère

marquées au carbone 14. Les particules ont été déposées à la surface du tissu, à l'extrémité haute de la gouttière et entraînées vers l'extrémité basse par le flux constant, mimant les conditions *in vivo* de l'intestin. Les fractions de particules éluées ont été collectées toutes les 30 secondes pendant une heure. Au bout de ce temps, la muqueuse est récupérée et divisée en six bandes de même surface. Les particules restées adhérées sur les bandes ont été solubilisées et les échantillons ainsi préparés ont été analysés par scintillation, tout comme les fractions éluées.

## 1.5 Technique du cylindre tournant

Bernkop-Schnürch et ses collaborateurs ont mis au point une méthode permettant d'estimer le temps d'attachement/dissolution/désintégration d'une forme galénique liée à un support biologique dans un environnement dynamique, mimant ainsi les conditions physiologiques du TGI. La forme galénique est déposée sur un échantillon de muqueuse, lui-même fixé sur un cylindre en acier inoxydable (Figure 6, Bernkop-Schnürch et Steininger, 2000). Ce montage est alors immergé dans un milieu de dissolution thermostaté à 37°C et mis en rotation. Cette technique permet de prendre en compte l'aspect cohésif de la formule.

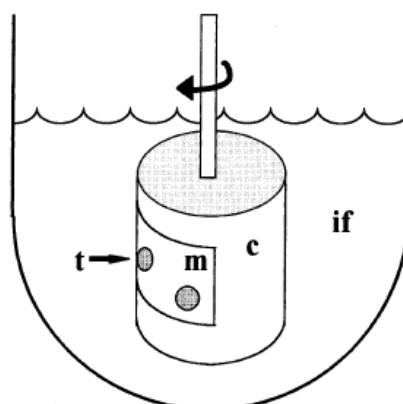


Figure 6 : Représentation schématique du test du cylindre tournant  
– c indique le cylindre, if, le fluide intestinal, m la muqueuse et t le comprimé (Bernkop-Schnürch et Steininger, 2000)

## 1.6 Angle de contact

L'étalement du polymère sur le support biologique conditionne la qualité de la bioadhésion. Mikos *et al.* ont observé au goniomètre une particule déposée sur une muqueuse. Ils ont attendu cinq minutes afin que l'état d'équilibre soit atteint, avant de mesurer le diamètre  $d$  ainsi que la hauteur  $h$  de la particule et d'évaluer le ménisque et l'angle de contact  $\theta$  (Figure 7, Mikos *et al.*, 1991).

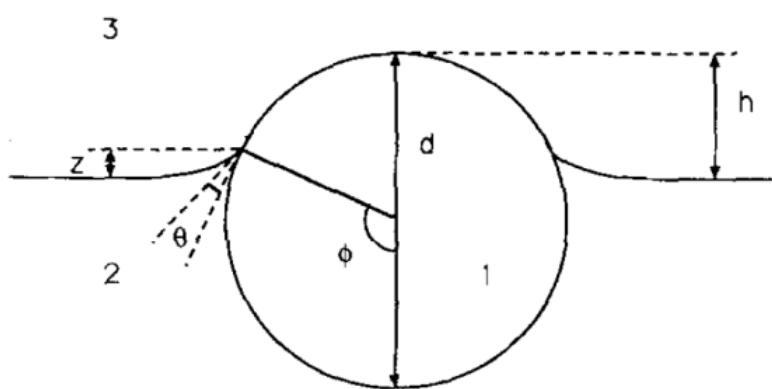


Figure 7 : Représentation schématique de la position de la microparticule de polymère à la surface air-mucus -  $d$  est le diamètre de la particule,  $h$  sa hauteur,  $z$  correspond à la hauteur du ménisque,  $\vartheta$  et  $\varphi$  sont des angles pertinents (Mikos *et al.*, 1991)

Cette expérimentation les a conduits à prendre en considération l'importance de la force hydrodynamique des flux de fluides biologiques auxquels les particules bioadhésives doivent résister. Ainsi, des particules de grande et de petite taille n'auront pas le même pouvoir bioadhésif (Mikos *et al.*, 1991). Lehr *et al.* ont montré que considérer l'énergie de surface permettait d'expliquer l'étalement plus ou moins bon du polymère sur la surface biologique (Lehr *et al.*, 1992). Ces deux notions sont en effet importantes dans la bioadhésion car elles interviennent en préambule de l'interpénétration des macromolécules.

Bien que facile à mettre en œuvre, cette technique est peu utilisée car l'interprétation des résultats ainsi générés reste difficile.

## 1.7 Force de détachement

La mesure fait intervenir un appareil de mesure de force, relié à un support sur lequel est fixé le polymère évalué. Sur une partie mobile, qui vient au contact du polymère, se trouve le support biologique. Les deux surfaces sont mises en contact l'une de l'autre pendant un temps donné puis, progressivement, le support mobile s'éloigne de la partie fixe du montage pendant que la force permettant le détachement est évaluée. Cette force peut être mesurée soit à la verticale à l'aide d'une « *spring balance* » (Ishida *et al.*, 1981), soit à l'horizontale (Chung *et al.*, 1988), ou bien à l'aide d'une balance numérique (Saettone *et al.*, 1989) ou encore d'un tensiomètre universel (Duchêne et Ponchel, 1992) (Leung et Robinson, 1988 ; Chickering et Mathiowitz, 1995 ; Duchêne et Ponchel, 1992 et 1997).

Les techniques permettant d'évaluer la mucoadhésion des formules sont donc multiples. Toutes ne sont pas aisées à mettre en œuvre et certaines requièrent un matériel spécifique. Par ailleurs, compte tenu des nombreux paramètres impactant les différents mécanismes de la bioadhésion, il est souvent difficile d'obtenir des résultats reproductibles avec des tests *in vitro*. Une étude *in vivo* est donc indispensable pour affiner les résultats.

## 2. Méthodes *in vivo*

Des techniques *in vivo* faisant intervenir la  $\gamma$ -scintigraphie ou l'autoradiographie ont été réalisées pour mettre en évidence la mucoadhésion de formulations. Pour ces techniques, l'administration peut se faire par voie orale ou directement dans l'intestin *via* une perfusion de l'organe. Cette dernière approche a notamment été réalisée chez le rat par Sakuma et son équipe (Sakuma *et al.*, 1999). Si le support biologique s'y prête, comme dans la cavité buccale, il est aussi possible de déposer le polymère directement sur le tissu d'intérêt et de procéder à des prélèvements cellulaires réguliers. Il suffit alors d'observer les cellules au

microscope en présence d'un colorant (Kockisch *et al.*, 2001) ou grâce à l'interaction de la lectine biotinylée avec la muqueuse, en l'absence de polymère adsorbé (Patel *et al.*, 1999). Asane et son équipe ont, eux, utilisé le sulfate de barium comme radiotraceur (Asane *et al.*, 2011).

Une étude *in vivo* présente l'avantage de prendre en compte aussi bien les effets dus aux mécanismes de bioadhésion que ceux attribués à d'autres phénomènes et qui contribuent à la variation du temps de résidence, tels que le péristaltisme ou le turnover du mucus (Collaud *et al.*, 2007). En outre, Säkkinen *et al.* ont montré que les résultats *in vitro* et *in vivo* pouvaient se contredire. Il faut toutefois prendre en compte les différences anatomiques et physiologiques entre les espèces : selon l'origine du support biologique, les résultats peuvent différer (Hägerström *et al.*, 2000). En outre, le rat, le chien et le cochon seraient de mauvais modèle, en particulier lorsque le transit intestinal intervient dans la mesure de la bioadhésion (Davis, 2005). Selon Stanley S. Davis, le meilleur model pour étudier la bioadhésion chez l'Homme, serait l'Homme lui-même. Il s'agit donc de faire un compromis judicieux entre les conditions à mimer et le matériel disponible, tout en gardant à l'esprit les limites de la technique mise en œuvre.

## VI. Synthèse

L'objectif de ces six mois d'étude est de mettre au point une formulation capable d'établir un contact étroit avec l'épithélium intestinal et de libérer un PA spécifiquement à ce niveau, sans pour autant qu'il y ait de passage dans la circulation sanguine. Il s'agit donc d'élaborer une formulation qui serait administrée par voie orale, resterait intacte après le passage dans l'estomac et permettrait la libération du PA tout le long de l'intestin et jusque dans le colon, pour une action pharmacologique locale et ciblée. Ces caractéristiques peuvent être atteintes notamment grâce à

la variation des conditions physiologiques tout au long du TGI. De plus, une exposition suffisante (aussi bien en termes de surface que de temps) sera recherchée. Un système divisé, microparticulaire et bioadhésif semble être l'approche la plus judicieuse afin de couvrir la plus grande surface biologique possible et de prolonger significativement le temps de résidence du PA dans l'intestin, *via* une interaction entre la formulation et le tissu recouvert de mucus. Pour concevoir ces particules, plusieurs grandes familles de polymères sont envisagées : des polysaccharides, des dérivés de cellulose et des polyacrylates. Ils ont tous en commun des propriétés mucoadhésives mais diffèrent par leur sensibilité au pH et aux enzymes. Afin de développer une formulation LP performante, une association de polymères répondant aux deux stimuli pourrait être prometteuse. Outre leurs propriétés mucoadhésives, les polysaccharides peuvent résister au pH intestinal et être dégradés par l'activité enzymatique de la flore commensale du colon. Le chitosan, en revanche, ne sera pas retenu, compte tenu de son action sur les jonctions serrées, engendrant une promotion de l'absorption, ce qui est contraire à l'objectif de cette étude. Enfin, le polymère sélectionné sera d'autant plus intéressant qu'il est biocompatible, non toxique et d'un coût raisonnable.

En vue de caractériser la mucoadhésivité des particules, une méthode se référant à la force de détachement sera employée *via* une analyse par texturométrie. La technique du sac retourné sera aussi envisagée.

# **PARTIE**

# **EXPERIMENTALE**

## I. MATERIELS ET METHODES

### 1. Matériels

#### 1.1 Principe actif

Le PA modèle utilisé appartient à la classe III du *Biopharmaceutics Classification System* ou BCS. Il est fourni par Oril Industrie, le fabricant de PA des Laboratoires SERVIER et se présente sous forme d'une poudre blanche. Dans une eau à pH inférieur à 2,5 la solubilité de la molécule est d'environ 20 mg/mL. Dans un tampon phosphate à pH 2,5, elle est supérieure à 100 mg/mL. Le log D, à pH 7,4, est égal à -1,4 et sa fraction absorbée, évaluée sur cellules Caco-2, est inférieure à 30 %. La molécule possède deux valeurs de pKa : 3,5 et 7,4.

#### 1.2 Polymères

Au vu de leurs propriétés mucoadhésives mises en évidence dans la littérature, les polymères sélectionnés sont cinq dérivés de cellulose, deux polymères d'acide acrylique, un copolymère d'acide méthacrylique et trois polysaccharides. Ils sont répertoriés dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Polymères mucoadhésifs étudiés et leur provenance

Famille	Nom commun	Nom commercial	Fournisseur	Commentaires
Dérivé cellulosique	HPC	Klucel® EXF	Aqualon	Fine granulométrie
	HPMC	Méthocel® K4M	Colorcon	Haut poids moléculaire
	HPMC Accétate Succinate High Fraction	Aqoat® AS-HF	ShinEtsu (distribué par Seppic)	soluble à pH > 6,5
	HPMC Phtalate	HP55®	ShinEtsu (distribué par Seppic)	
Dérivé acrylique	HPMC Phtalate	HP55S®	ShinEtsu (distribué par Seppic)	Viscosité supérieure à l'HP55
	Carbomère	Carbopol® 980 NF	Gattefossé	
	Polycarbophil	Noveon® AA1	Gattefossé	
Polysaccharide	Poly(methacrylic acid - ethyl acrylate) 1:1	Eudragit® L100-55	Evonik	
	Amidon modifié	Amylo® N-460	Roquette	Amidon riche en amylose
	Alginate de propylène glycol	Kelcoloid®	ISP Switzerland AG	
	Gomme gellane	Kelcogel®	CP Kelco	

## 2. Méthodes

### 2.1 Préparation des formules

Les formulations sont réalisées par atomisation ou *spray-drying*. Cette technique de séchage rapide est couramment employée en industrie pour passer d'une forme liquide à une forme sèche.

#### 2.1.1 Choix des solvants pour atomisation

La solubilité du PA a été évaluée dans les solvants organiques compatibles avec l'utilisation de l'atomiseur BÜCHI® B-290. Les solvants testés sont : l'acétate d'éthyle, l'acétone, le dichlorométhane (DCM), l'éthanol et le méthanol. Une concentration de 5 % (m/v) en PA est ciblée.

La solubilité des polymères est ensuite testée dans les solvants retenus suite aux essais de solubilité du PA. La concentration ciblée est de 16 %

(m/v) en polymère. Si un solvant seul ne suffit pas à solubiliser le polymère, l'eau ou une combinaison de deux solvants sont testées.

### 2.1.2 Préparation des solutions à atomiser

Les premières particules simples sont préparées à partir d'un mélange binaire PA/polymère afin de réaliser un criblage des polymères sélectionnés. Des particules ternaires, nues et composées de type cœur-couronne, sont fabriquées dans un deuxième temps afin d'étudier l'intérêt d'une combinaison des polymères retenus lors du criblage, l'objectif étant d'optimiser la formule. Selon la morphologie ciblée, la préparation des solutions à atomiser et les paramètres du procédé varient.

#### 2.1.2.1 Solubilisation

Une fois le solvant sélectionné, des solutions sont réalisées avec un ratio 1:4 (PA/polymère) et une concentration totale de 20 % (m/v) pour les particules sans couronne.

Les particules de type cœur-couronne HPC/alginate PG/PA-HP55S® et HPMC/alginate PG/PA-HP55S® sont toutes deux fabriquées à partir de deux solutions distinctes, mais atomisées simultanément. Le cœur des particules à base d'HPMC est préparé à partir d'un mélange HPMC/alginate PG (2:1) solubilisé dans l'eau milliQ, auquel est ajouté le PA, préalablement solubilisé dans du méthanol. Le cœur des particules à base d'HPC est préparé à partir d'un mélange HPC/alginate PG/PA directement solubilisé dans un mélange eau/méthanol (5:4). Environ 16 gouttes de colorant bleu hydrophile sont incorporées dans la solution destinée au cœur de la particule. Le ratio final HPC/alginate PG/PA ou HPMC/alginate PG/PA est de (8:4:3) et la concentration de cette première solution est initialement d'environ 2,5 % (m/v). Pour la couronne, une solution d'HP55S® est réalisée dans un mélange éthanol/DCM (1:1). Le volume de cette seconde solution varie selon le volume requis pour la première solution mais la quantité de polymère est fixe et correspond à la

quantité de PA contenue dans le cœur de la particule. Le ratio final est ainsi ramené à 1:5 (PA/polymère).

Toutes les solutions sont préparées à l'aide d'un agitateur Rayneri et d'un mobile d'agitation dispersant réglé à une vitesse de 700 à 1100 rpm.

### 2.1.2.2 Viscosité

La viscosité de la solution à atomiser est mesurée à l'aide d'un rhéomètre Thermo-Haake® RS 600. Pour le bon fonctionnement de l'atomiseur, un seuil de viscosité est fixé à 300 cP. En cas de dépassement du seuil, la solution est diluée avec le même solvant ou mélange de solvants que lors de sa préparation.

### 2.1.3 Atomisation

Ce processus est réalisé à l'aide d'un *mini spray-dryer* Büchi® B-290. Cet appareil est parfaitement adapté à l'échelle du laboratoire et aux petits volumes des échantillons travaillés en Recherche et Développement. Le principe mis en jeu repose sur un séchage par pulvérisation et évaporation de solvant.

#### 2.1.3.1 Microparticules binaires

Le procédé d'atomisation est réalisé à l'aide d'une buse binaire standard. La température d'entrée dans la chambre de séchage ( $T_{in}$ ) et le débit de la pompe sont adaptés selon la solution atomisée. La température, initialement réglée à 10°C au-dessus de la température d'ébullition du solvant ou mélange de solvants peut être augmentée au cours du procédé, si besoin est. Elle varie ainsi entre 75°C et 160°C. Le débit dépend de la viscosité de la solution et varie, quant à lui, entre 5 et 20 % de sa capacité totale (30 mL/min). La température de sortie de la chambre de séchage ( $T_{out}$ ) et le rendement sont relevés afin de permettre le suivi du bon déroulement du processus.

### 2.1.3.2 *Microparticules ternaires, nues et de type cœur-couronne*

Pour ce deuxième axe d'étude, des particules ternaires, nues et de type cœur-couronne, sont fabriquées à partir des quatre polymères retenus lors du criblage (Tableau 3) et comparées.

Tableau 3 : Associations de polymères réalisées

	Cœur	Couronne d'HP55S®	Morphologie attendue de la particule
<b>Formule 1</b>	HPMC + Alginate PG + PA	Oui	Cœur-couronne
<b>Formule 2</b>	HPMC + Alginate PG + PA	Non	Nue
<b>Formule 3</b>	HPC + Alginate PG + PA	Oui	Cœur-couronne
<b>Formule 4</b>	HPC + Alginate PG + PA	Non	Nue

La buse binaire telle que précédemment utilisée permet d'obtenir les particules nues. Une buse ternaire est utilisée pour la fabrication des particules de type cœur-couronne, comme le montre la Figure 8. Le colorant introduit dans la formulation destinée au cœur de la particule et l'absence de colorant dans la couronne a pour objectif de visualiser une éventuelle différence de coloration entre la formule nue et son équivalent de type cœur-couronne. En effet, la couronne d'HP55S® supposée recouvrir le cœur coloré des particules devrait en théorie atténuer la couleur bleue. Ceci pourrait être un premier signe attestant une morphologie cœur-couronne.

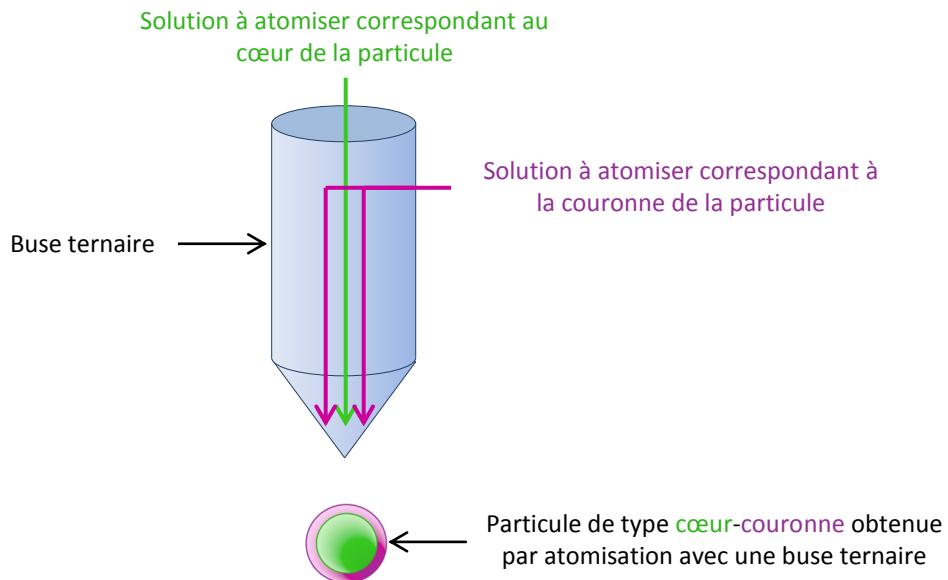


Figure 8 : Principe de fonctionnement de la buse ternaire

Lors du procédé, la température d'entrée dans la chambre de séchage ( $T_{in}$ ) et le débit de la ou des pompes sont adaptés selon la ou les solutions atomisées, comme pour le criblage. La température d'entrée varie ainsi entre 75°C et 220°C, et le débit, entre 5 et 15 % de la capacité totale de la pompe (30 mL/min). Le bon déroulement du procédé se fait là aussi grâce au suivi de la température de sortie de la chambre de séchage ( $T_{out}$ ) et au rendement calculé après atomisation, lorsqu'il est accessible.

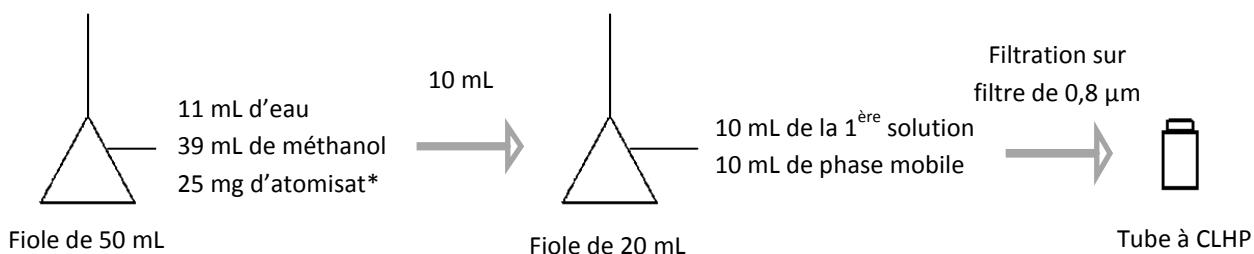
## 2.2 Caractérisation des atomisats

### 2.2.1 Teneur en principe actif

La teneur en PA des atomisats est déterminée par Chromatographie Liquide Haute Performance ou CLHP après extraction du PA. Le ratio PA/polymère déduit de cette mesure est comparé au ratio théorique de 1:4 (PA/polymère) pour les atomisats simples et 1:5 (PA/polymère) pour les composites ternaires cœur-couronne. Le protocole d'extraction du PA est schématisé dans la Figure 9. Dans un premier temps, 25 mg d'atomisat simple ou 30 mg d'atomisat si les particules sont de type

cœur-couronne, sont introduits dans une fiole de 50 mL. Les ratios PA/polymère de ces deux types d'atomisat étant en théorie de 1:4 et 1:5 (PA/polymère) respectivement, la quantité de PA extraite et dosée devrait alors être la même.

Un mélange d'eau et de méthanol est employé pour solubiliser les différentes poudres. Le méthanol, très bon solvant pour le PA, permet d'optimiser son extraction. Une suspension est obtenue pour l'alginate PG, l'amidon modifié et la gomme gellane, des polymères de nature plutôt hydrophile. Les autres atomisats, davantage lipophiles, sont entièrement solubilisés dans le méthanol. Dans un deuxième temps, une dilution au demi, à l'aide de la phase mobile servant à l'analyse par CLHP, est réalisée à partir de la précédente solution homogène ou suspension sous agitation. La solution-fille est ensuite filtrée (pores de 0,8 µm de diamètre) puis introduite dans des tubes à CLHP. La concentration théorique attendue en PA dans les solutions-filles est de 0,05 mg/mL.



\* Echantillon de 30 mg pour un atomisat de type cœur-couronne

Figure 9 : Protocole utilisé pour doser le principe actif dans les atomisats

La teneur en PA est exprimée en ratio PA/polymère. Le calcul fait intervenir la masse d'atomisat initialement introduite et la concentration en PA déterminée par CLHP :

$$\text{Ratio PA/Polymère} = \frac{\text{Concentration en PA}}{\text{Masse d'atomisat}} \cdot 100$$

L'analyse par CLHP a été mise au point par le Département Analytique. L'appareil utilisé est une chaîne Waters® comprenant une pompe TSP

P100, un injecteur TSP AS100 et un détecteur Waters®, couplé au logiciel Atlas®.

Les conditions chromatographiques sont présentées dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Conditions chromatographiques permettant de doser le principe actif

<b>Phase stationnaire</b>	Colonne en acier inoxydable de 15 cm de longueur et 4,6 mm de diamètre interne. Phase stationnaire de type Zorbax® Eclipse XDB Phenyl, taille des particules 5 µm.
<b>Phase mobile</b>	Phase aqueuse/acétonitrile (70:30) Phase aqueuse : 1000 volumes d'eau purifiée, 2 volumes de triéthylamine et acide orthophosphorique qsp pH 3,5
<b>Volume injecté</b>	20 µL
<b>Nombre d'injection</b>	2
<b>Température de la colonne</b>	40°C
<b>Température des échantillons</b>	4°C
<b>Débit de la pompe</b>	1 mL /min
<b>Temps d'analyse</b>	5 minutes (temps de rétention d'environ deux minutes)
<b>Détection</b>	Spectrophotométrie UV ( $\lambda = 240$ nm)
<b>LOD</b>	< 0,01 %
<b>LOQ</b>	< 0,015 %

Trois témoins ont été préparés indépendamment les uns des autres. Trois solutions de PA dosées à 0,05 mg/mL ont été réalisées dans un mélange de 100 µL de TFA dans 1000 mL d'eau purifiée.

## 2.2.2 Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

Les échantillons d'atomisats sont observés par Microscopie Electronique à Balayage (MEB). L'appareil utilisé est un microscope Hitachi® TM-1000.

Un faisceau d'électrons est envoyé sur un échantillon placé dans une enceinte sous vide. Au contact de la matière, des électrons secondaires sont émis. Cette émission secondaire est traitée par informatique et permet la construction des images. La surface de l'échantillon peut ainsi être observée en trois dimensions et à de forts grossissements (jusqu'à un facteur 10 000).

Afin d'améliorer le contraste des images et de faciliter leur observation, les échantillons sont métallisés à l'or à l'aide d'un appareil de type Emitech® K550X. Cette étape intermédiaire a été réalisée avec un courant de 25 mA pendant deux minutes.

### 2.2.3 Diffractométrie de rayon X (DRX)

La structure cristalline des atomisats a été étudiée par Diffractométrie de Rayons X (DRX). En effet, les rayons X sont plus ou moins diffractés par la matière, lorsque celle-ci possède des domaines cristallins.

Des rayons X sont dirigés sur un échantillon de poudre, à un angle incident  $\theta$ . Un détecteur mobile permet de mesurer l'intensité des rayons diffractés par la matière, à différents angles.

Pour un pic de diffraction, à une longueur d'onde donnée  $\lambda$ , l'équation de Bragg ci-dessous permet de relier la déviation  $2\theta$  à la distance inter-réticulaire  $d$  et d'estimer l'espace entre les plans cristallins.

$$\text{Equation de Bragg : } \lambda = 2d \sin \theta$$

La mesure est réalisée grâce à une unité de diffraction PanalyticalXpert Pro®. Les radiations sont générées à partir d'une source de Cu-K $\alpha$  à une longueur d'onde de 0,154 nm. La tension du courant ainsi créée est de 45 kV et son intensité est de 40 mA. La détection se fait pour des angles de déviation  $2\theta$  compris entre 3° et 55° avec un pas de 0,017°.

### 2.2.4 Essai de dissolution

Les essais de dissolution sont réalisés avec un appareil à pales Sotax®, conforme à celui décrit dans la Pharmacopée Européenne. La cinétique de libération est étudiée à pH variable sur huit heures. Il s'agit d'une méthode développée par le Département Analytique et adaptée au PA utilisé dans cette étude, après vérification de sa stabilité dans les conditions expérimentales, sur environ 20 heures. Le milieu acide

représentant les conditions les plus critiques pour la molécule, l'essai de stabilité du PA a été réalisé avec une solution de tampon HCl à 0,01N et à une concentration en PA de 50 µg/mL. Des dosages ont été réalisés régulièrement par CLHP, selon les conditions présentées dans le Tableau 5 et avec le même matériel que pour le dosage du PA dans les atomisats. Cette technique permet d'identifier et de quantifier le PA mais aussi les produits de dégradation de la molécule.

Tableau 5 : Conditions chromatographiques de l'étude de stabilité du principe actif

<b>Phase stationnaire</b>	Colonne en acier inoxydable de 15 cm de longueur et 4,6 mm de diamètre interne. Phase stationnaire de type Zorbax® Eclipse XDB Phenyl, taille des particules 5 µm.
<b>Phase mobile</b>	Gradient d'élution utilisant une phase mobile A et une phase mobile B et allant de 15 % de phase mobile B à 100 %. Phase mobile A : 1000 volumes d'eau purifiée, 2 volumes de triéthylamine et acide orthophosphorique qsp pH 3,5 Phase mobile B : Acétonitrile
<b>Volume injecté</b>	20 µL
<b>Nombre d'injection</b>	2
<b>Température de la colonne</b>	Température ambiante
<b>Température des échantillons</b>	4°C
<b>Débit de la pompe</b>	1 mL /min
<b>Temps d'analyse</b>	18 minutes
<b>Détection</b>	Spectrophotométrie ( $\lambda = 240$ nm)
<b>LOD</b>	< 0,01 %
<b>LOQ</b>	< 0,015 %

L'essai de dissolution est tripliqué pour chaque formule.

Des gélules 000 contenant 125 mg d'atomisat sont introduites dans un bain de dissolution contenant 500 mL de tampon HCl 0,01N pendant 70 minutes. Au bout de ce temps, 85 mL de tampon phosphate à pH 10,7 sont ajoutés pour atteindre un pH 6,8 dans le milieu de dissolution. La température du bain est réglée à  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$  et la vitesse de rotation des pales est de  $50 \pm 2$  rpm. Des prélèvements d'un millilitre sont introduits dans des tubes à CLHP à 0, 30, 60, 70, 75, 90, 120, 180, 240, 360 et 480 minutes. L'analyse se fait en *offline* par CLHP, selon la méthode indiquée

pour les dosages des atomisats. Une analyse *online* par spectrophotométrie n'a pu être mise en œuvre compte tenu de l'absorbance de certains polymères à la longueur d'onde optimale pour doser le PA.

### 2.2.5 Texturométrie

Le pouvoir mucoadhésif est étudié sur de l'intestin de porc grâce à un texturomètre TA.XTplus Texture Analyser de Stable Micro Systems®. L'échantillon d'intestin est conservé jusqu'à trois jours après prélèvement dans une solution tamponnée de Krebs-Ringer ajustée à pH 7,4 par ajout de NaOH, sous contrôle d'un pH-mètre de type METTLER SevenMulti®. Ce tampon, quant à lui, peut être conservé à 4°C pendant un mois. A partir de l'échantillon porcin, des pièces de 3 cm de longueur sont coupées, tout le long de l'intestin grêle, et ouvertes dans le sens de la longueur. Le contenu du bol alimentaire éventuellement présent est retiré. La pièce biologique est ensuite plongée dans une solution de Krebs-Ringer jusqu'au moment de l'essai, afin de conserver la viabilité des cellules. Pour effectuer la mesure de mucoadhésivité des atomisats, la pièce d'intestin est posée, côté apical vers le haut, sur un support en plexiglas. Une plaque également en plexiglas et percée en son centre, est vissée sur le support, fixant ainsi la muqueuse. Ce dispositif expose alors une surface circulaire d'environ 16,6 cm<sup>2</sup> de muqueuse intestinale, recouverte de mucus (Figure 10). Le montage est placé sur la plateforme de l'appareil, sous sa partie mobile, un cylindre de 2,1 cm de diamètre qui est abaissé à quelques millimètres de la muqueuse (Figure 10).

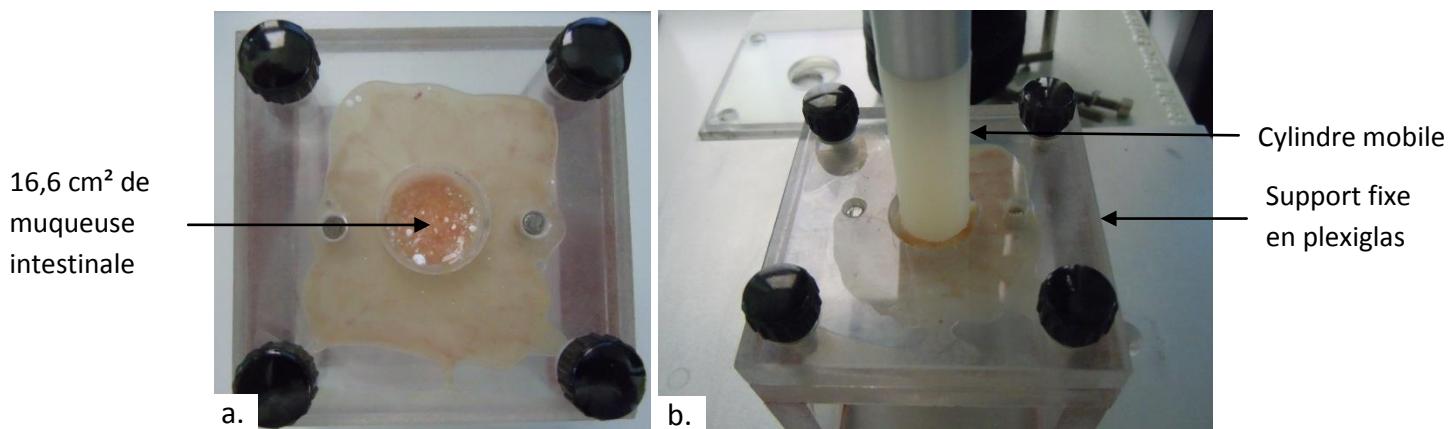


Figure 10 : a. Montage de l'échantillon d'intestin de porc sur le support en plexiglas ; b. Mise en place du support en plexiglas sur la plateforme du texturomètre avant lancement du test

Pour effectuer les mesures de mucoadhésivité des atomisats, 50 mg de poudre sont déposés sur la muqueuse puis 500 µL de solution de Krebs-Ringer sont ajoutés, cinq minutes avant de lancer l'essai. Trois mesures par atomisat sont ainsi réalisées afin d'en déduire une courbe moyenne. Un blanc consistant en l'introduction de 500 µL de solution de Krebs-Ringer sur la muqueuse est réalisé. Un témoin négatif est également effectué à l'aide de 50 mg de stéarate de magnésium en lieu et place de l'atomisat. Cette poudre, couramment utilisée dans l'industrie pharmaceutique à titre de lubrifiant, est considérée comme étant non bioadhésive. Ce test permettra d'évaluer la capacité de l'essai à discriminer les formules en termes de mucoadhésion.

Lors de l'essai, les paramètres fixés sont :

La vitesse de descente du mobile en pré-test :	0,05 mm/s
La vitesse de pénétration du mobile dans l'échantillon :	1,00 mm/s
La vitesse de remontée du mobile en post-test :	0,05 mm/s
Le type de mesure :	Par la force
Le seuil de détection :	0,02 N
La force maximale imposée :	1 N
Le temps de contact :	120 s

Les résultats sont donnés sous la forme d'un graphique représentant la force en newton en fonction du temps en seconde. Une photo est faite après mesure afin d'observer l'aspect de la formulation et une éventuelle gélification de l'échantillon.

## 2.2.6 Technique du sac retourné

Un des inconvénients de la mesure du pouvoir mucoadhésif des formules par texturométrie est son éloignement par rapport aux conditions *in vivo*. En effet, bien qu'elle mette en jeu un échantillon biologique vivant, la mesure intervient essentiellement au niveau de l'interface « cylindre mobile/formule dispersée dans le mucus ». A cette interface, la muqueuse intestinale est donc absente. Une technique plus proche des conditions *in vivo* a, de ce fait, été envisagée. Il s'agit de la technique du sac retourné, employée par l'équipe de Santos, en 1999. Cette méthode a été testée avec la formule d'HPMC de type cœur-couronne.

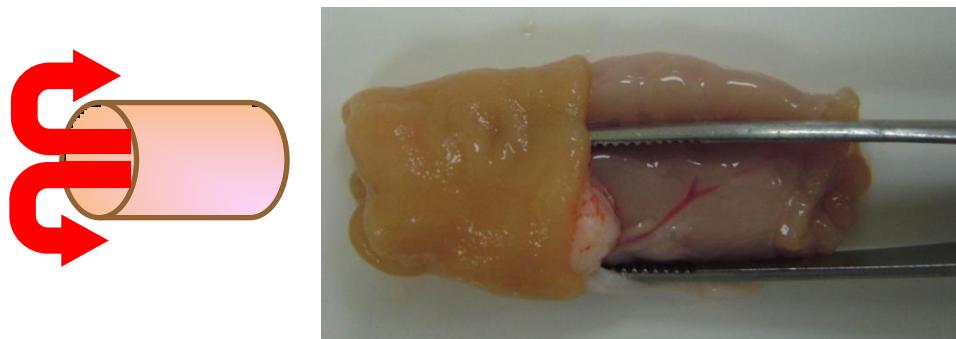


Figure 11 : Schéma du retournement de l'intestin et photo correspondant à cette étape

La partie proximale d'un intestin de porc (duodénum et jéjunum) a été prélevée le jour même du test. Des tronçons de 4 cm de long sont préparés et retournés, de façon à ce que le pôle apical des cellules soit à l'extérieur, comme le montre le schéma et la photo de la Figure 11.

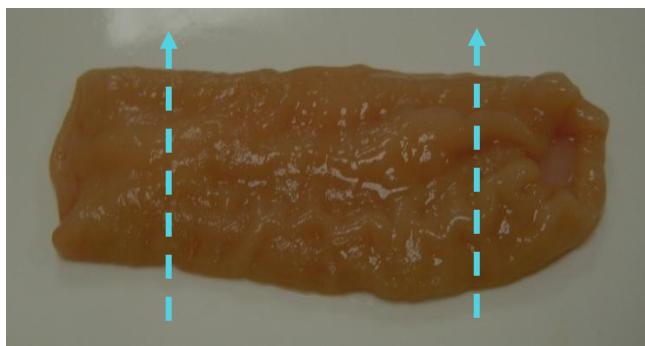


Figure 12 : Echantillon biologique retourné et emplacement des ligatures

Une des extrémités est alors ligaturée à l'aide d'un fil de soie. La seconde extrémité est également ligaturée, après ajout d'1 mL de solution de Krebs-Ringer, comme le montre la Figure 12.

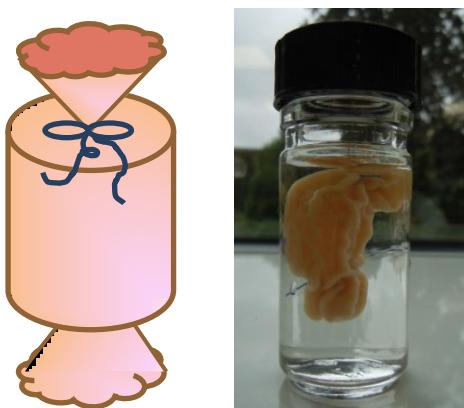


Figure 13 : Schéma et photo du sac formé et introduit dans le contenant

Le montage est ensuite introduit dans un contenant avec 19 mL de la même solution de Krebs-Ringer (Figure 13). Ceci permet d'assurer une isosmolarité entre l'intérieur du sac ainsi formé, et le milieu dans lequel est plongé le montage.



Figure 14 : Photo du montage, après agitation pendant 10 minutes au Turbula®

À l'ajout des 50 mg de poudre à étudier, le récipient est fermé et mis sous agitation au Turbula® pendant 5, 10, 15 ou 30 minutes. Deux essais sont réalisés pour chaque temps. La Figure 14 montre l'échantillon récupéré après 10 minutes d'agitation.



La pièce biologique est ensuite récupérée et le PA resté dans le récipient (Figure 15) est dosé selon la méthode de dosage utilisée pour évaluer la teneur en PA des atomisats. Les résultats sont moyennés sur les deux essais réalisés pour chacun des quatre temps étudiés.

Figure 15 : Contenant, sans la pièce biologique, dans lequel est dosé le PA

### 2.2.7 Analyse thermogravimétrique (ATG)

Lors de l'optimisation de la formule, la quantité résiduelle de solvant a été évaluée par thermogravimétrie, à l'aide d'un analyseur thermogravimétrique TA Instrument®.

Un échantillon d'environ 3-5 mg d'atomisat est introduit dans une capsule adaptée à l'appareil et préalablement tarée. L'échantillon est alors placé automatiquement dans le four et subit une montée en température allant de la température ambiante (20-25°C) à 110°C avec une rampe de 10°C/min. Il reste ensuite 30 minutes à 110°C.

L'essai permet d'obtenir une courbe représentant une perte en masse, en pourcentage par rapport à la masse initiale de l'échantillon, en fonction du temps, en minutes. Le traitement de la courbe permet d'obtenir la perte totale en masse, correspondant à la quantité de solvant résiduel dans l'atomisat.

## II. RESULTATS

### 1. Microparticules binaires

#### 1.1 Préparation des formules

##### 1.1.1 Choix du solvant d'atomisation

Le PA est soluble dans l'éthanol, le DCM et le méthanol pour des concentrations allant jusqu'à 5 % (m/v).

La solubilité des différents polymères a donc été évaluée dans ces trois solvants, seuls ou en association, ainsi que dans l'eau dans le cas des polymères très hydrophiles. Les résultats des solubilités obtenues sont présentés dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Résultats des essais de solubilité des polymères sélectionnés à 16 % (m/v)

Polymère	Ethanol	Méthanol	DCM	Eau purifiée	Association
<b>Alginate PG</b>	Non	Non	Non	Oui	
<b>Amidon modifié</b>	ND*	ND*	ND*	Oui	
<b>Carbomère</b>	Non	Non	Non	Oui	Eau/Méthanol 2:1
<b>Gomme gellane</b>	Non	Non	Non	Oui	
<b>HPC</b>	Oui	Oui	Oui	ND*	
<b>HPMC</b>	Non	Non	Non	Gonflement	
<b>HPMC AS</b>	Non	Non	Non	ND*	Ethanol/DCM 1:1
<b>HPMC P (HP55<sup>®</sup>)</b>	Non	Non	Non	ND*	Ethanol/DCM 1:1
<b>HPMC P (HP55S<sup>®</sup>)</b>	Non	Non	Non	ND*	Ethanol/DCM 1:1
<b>Polycarbophil</b>	ND*	ND*	ND*	Oui	
<b>Polyméthacrylate</b>	Oui	oui	Non	ND*	

\*ND : Non Déterminé

La solution d'alginate PG est donc réalisée dans l'eau purifiée, tout comme celles d'amidon modifié, de gomme gellane, d'HPMC et de polycarbophil. Pour ces dernières, le PA, dont la solubilité est limitée dans l'eau bien qu'il soit qualifié de soluble selon la classification BCS, a été dissout dans 10 mL de méthanol avant d'être incorporé à la solution aqueuse. La solution de carbomère à atomiser est préparée dans un mélange

eau/méthanol (2:1). Les dérivés accétaire succinate de l'HPMC, l'HP55® et l'HP55S® sont dissous dans un mélange équimolaire d'éthanol et de DCM. Quant aux solutions à atomiser d'HPC et de polyméthacrylate, elles sont réalisées dans le méthanol.

### 1.1.2 Atomisation

Avant atomisation, une mesure de la viscosité des solutions préparées a été effectuée. Lorsque la viscosité était supérieure à 300 cP la solution a été diluée. Les concentrations finales des solutions atomisées sont présentées dans le Tableau 7.

La solution à atomiser de polyméthacrylate a été réalisée dans un premier temps à une concentration totale de 20 % (m/v). Lors de l'atomisation, des filaments sont apparus rapidement dans la chambre de séchage. Le processus a donc été interrompu et la solution diluée au demi, bien que la viscosité soit déjà inférieure au seuil-limite. Le procédé est remis en marche avec cette nouvelle solution. Un atomisat floconneux est obtenu avec une température  $T_{in}$  fixée à 110°C. Le procédé est à nouveau arrêté et la température  $T_{in}$ , abaissée à 75°C. Un second atomisat floconneux est obtenu. Pour la suite de ces travaux, le premier atomisat floconneux obtenu sera identifié par l'appellation « Polyméthacrylate 10 % 110°C ». Le second sera appelé « Polyméthacrylate 10 % 75°C ». Devant cet aspect floconneux, une dernière atomisation est réalisée avec ce polymère, à partir d'une solution à nouveau diluée au demi et présentant donc une concentration totale en PA et polymère de 5 % (m/v). La Figure 16 permet de constater la différence d'aspect qu'il y a entre les trois atomisats réalisés à partir du même polymère.

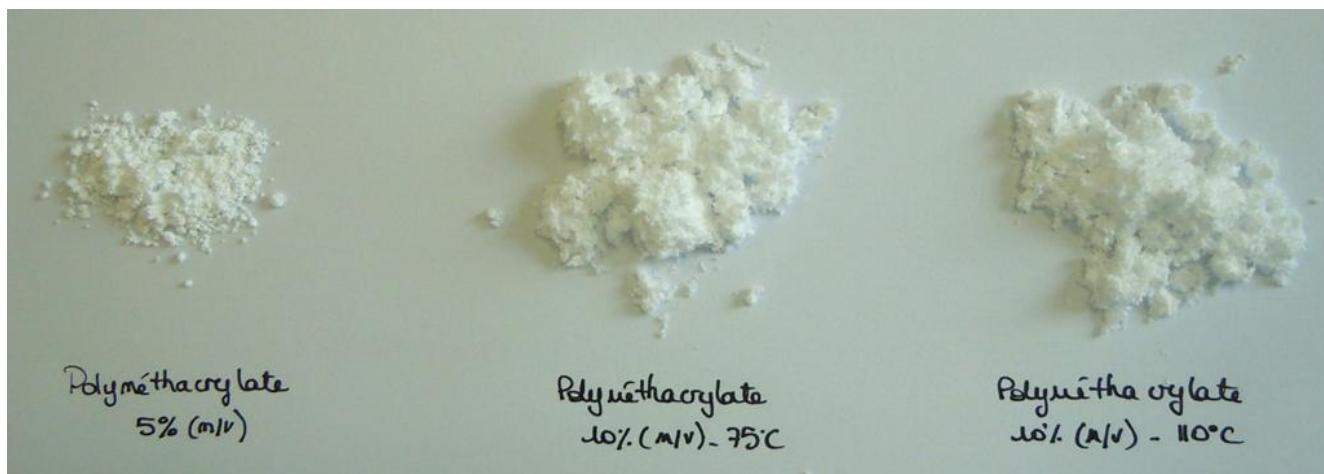


Figure 16 : Aspects des trois atomisats de polyméthacrylate

Compte tenu des deux dilutions réalisées, pour remédier à l'apparition de mèches dans la chambre de séchage, le rendement n'a pu être déterminé pour ces trois atomisats. La viscosité de la solution à 5 % (m/v) n'a pas été mesurée au vu de celle de la solution avant dilution et répondant déjà aux exigences rhéologiques du procédé. Le Tableau 7 résume les paramètres relevés pour les différentes solutions atomisées.

Tableau 7 : Caractéristiques avant (concentration de la solution à atomiser ; solvant), pendant ( $T_{in}$  ;  $T_{out}$ ) et après le processus d'atomisation (rendement ; ratio PA/polymère de l'atomisat)

Polymères	Concentration de la solution à atomiser	Solvant	Viscosité	$T_{in}$	$T_{out}$	Rendement	Ratio PA/polymère de l'atomisat
Alginate PG	1,9 % (m/v)	Eau/Méthanol (39:1)	316 cP	110°C	60°C	61 %	1:4
Amidon modifié	2,5 % (m/v)	Eau/Méthanol (29:1)	5 cP	110°C	44°C	68 %	1:5
Carbomère	2,7 % (m/v)	Eau/méthanol (2:1)	202,4 cP	110°C	59°C	41 %	1:4
Gomme gellane (1)	1,4 % (m/v)	Eau/Méthanol (54:1)	169 cP	160°C	93°C	15 %	1:2
Gomme gellane (2)	1,3 % (m/v)	Eau/Méthanol (59:1)	211,7 cP	120°C	66°C	44 %	1:3
HPC	2,5 % (m/v)	Méthanol	9,3 cP	70°C	35°C	40 %	1:4
HPMC	1,1 % (m/v)	Eau/Méthanol (69:1)	246 cP	117°C	60°C	57 %	1:4
HPMC AS	2,5 % (m/v)	Ethanol/DCM (2:1)	11 cP	100°C	51°C	68 %	1:4
HPMC P (HP55 <sup>®</sup> )	2,5 % (m/v)	Ethanol/DCM (1:1)	9,3 cP	110°C	47°C	74 %	1:4
HPMC P (HP55S <sup>®</sup> )	2,5 % (m/v)	Ethanol/DCM (1:1)	11,9 cP	90°C	44°C	65 %	1:4
Polyméthacrylate	5,0 % (m/v)	Méthanol	ND**	75°C	46°C	-*	1:4
Polyméthacrylate	10,0 % (m/v)	Méthanol	13,5 cP	75°C	47°C	-*	1:4
Polyméthacrylate	10,0 % (m/v)	Méthanol	13,5 cP	110°C	72°C	-*	1:4
Polycarbophil	2,5 % (m/v)	Eau/Méthanol (29:1)	8 cP	120°C	61°C	67 %	1:4

\* - : Rendement non calculé car la même solution a été utilisée pour les trois atomisations de polyméthacrylate, mais à des dilutions et températures  $T_{in}$  différentes

\*\*ND : Viscosité non déterminée car déjà satisfaisante pour la solution plus concentrée réalisée à partir du même polymère.

La teneur en PA déterminée par CLHP est comparée à la masse d'atomisat ayant servi au dosage afin de ramener le résultat sous forme de ratio PA/polymère.

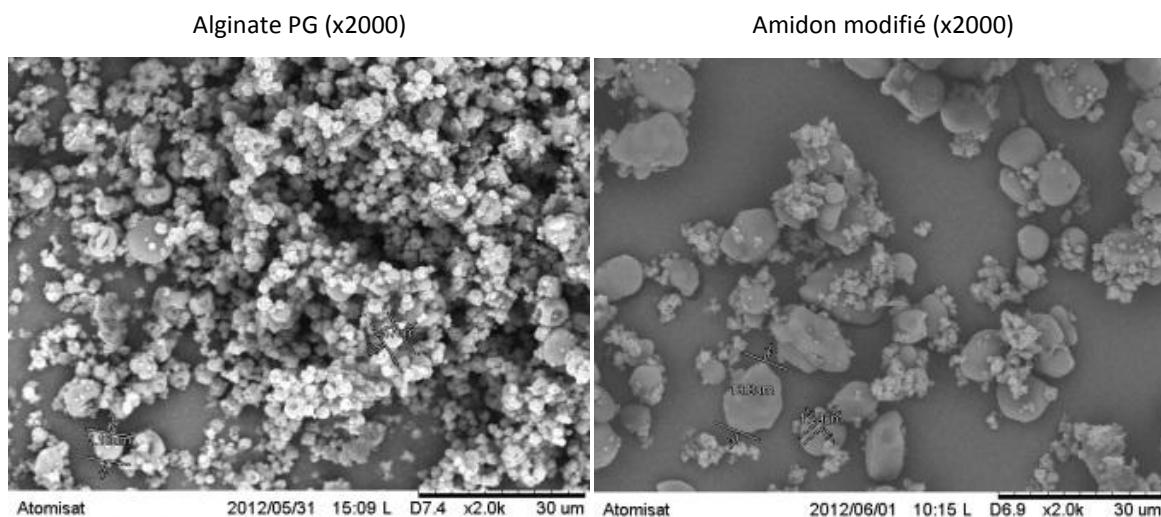
Le rendement du processus d'atomisation varie entre 74 % pour la solution d'HP55® et 15 % pour la solution de gomme gellane. Pour cette dernière, l'atomisat récupéré est significativement plus concentré en PA que ce qui est attendu. Une deuxième atomisation a été réalisée avec une solution de gomme gellane afin de confirmer ou d'infirmier les résultats. A nouveau, le ratio PA/polymère de l'atomisat est supérieur au ratio théorique attendu : il est de 1:3 (PA/polymère). Lors du processus, une pellicule s'est formée le long des parois de la chambre de séchage. Quelques copeaux se sont détachés et ont été entraînés dans le collecteur de poudre. Ils ont été isolés de l'atomisat et ont fait l'objet d'un dosage. Au vu de la surconcentration de la poudre d'atomisat en PA, la teneur en PA présente dans les copeaux était attendue comme inférieure au ratio théorique. Or, le ratio PA/polymère déterminé est de 1:4 (PA/polymère). Il correspond ainsi au ratio théorique souhaité. L'hypothèse d'une surconcentration dans l'atomisat et d'une sous-concentration dans les copeaux est donc à écarter. Cependant, les copeaux ont été en contact avec l'atomisat surdosé lors de l'atomisation. Ils ont pu alors se charger en PA. D'autre part, lors du protocole d'extraction, les copeaux n'ont pas été entièrement solubilisés, ce qui peut engendrer une erreur sur le dosage. Enfin, l'atomisat composé d'amidon modifié présente, quant à lui, un sous dosage en PA. En effet, celui-ci est de 1:5 (PA/polymère). Le processus d'atomisation s'étant bien passé, sans phénomène particulier à relever, aucune explication n'a pu être proposée.

## 1.2 Imagerie par Microscopie Electronique à Balayage

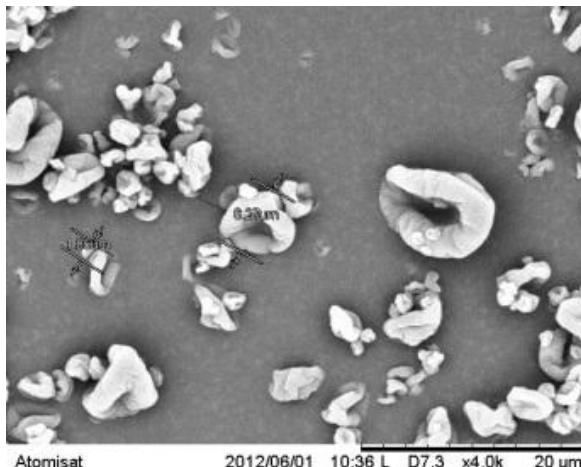
Les particules ont également été étudiées par MEB (Tableau 8). La morphologie particulière du PA, des aiguilles allant jusqu'à 100 µm de long, n'est retrouvée dans aucun des atomisats. Les atomisats

d'alginate PG, d'amidon modifié, de polyméthacrylate 10 % 110°C et d'HPMC présentent des sphères pleines. La distribution de taille des particules d'alginate PG est plutôt homogène et le diamètre des particules est d'environ 5 µm. Celle des composites composés d'amidon modifié et d'HPMC semble être bimodale : 1 et 10 µm de diamètre pour la première, 1 et 15 µm pour la seconde. L'atomisat de polyméthacrylate 10 % 110°C se présente sous la forme de filaments emprisonnant des particules sphériques de 10 à 20 µm de diamètre. Celui de polyméthacrylate 10 % 75°C montre des sphères vides et pleines d'environ 10 µm de diamètre et les mêmes filaments. Ceci coïncide avec l'aspect floconneux de ces deux atomisats. Le dernier atomisat de polyméthacrylate semble montrer une distribution bimodale de la taille des particules (1 et 10 µm environ) mais pas de filament. Les atomisats d'HPMC P (HP55® et d'HP55S®), d'HPMC AS et de gomme gellane se ressemblent et montrent des sphères vides dont le diamètre ne semble pas dépasser 10 µm. Enfin, les particules des atomisats de carbomère, d'HPC et de polycarbophil sont discoïdales et de forme concave. Le diamètre des particules est compris entre 5 et 15 µm.

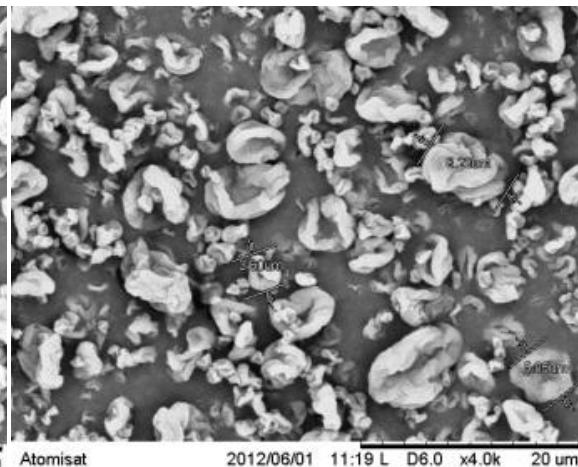
Tableau 8 : Images obtenues par microscopie électronique à balayage pour les atomisats binaires PA/polymère



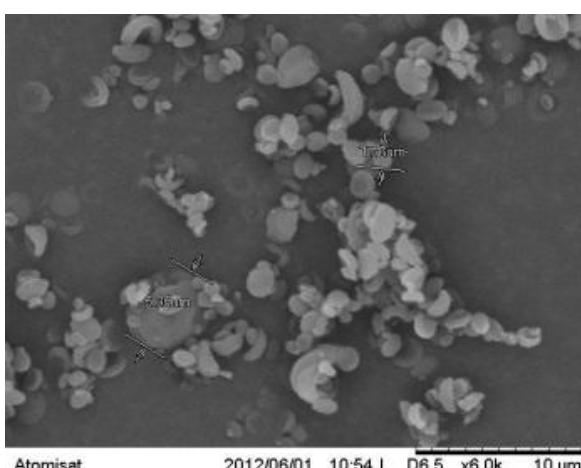
Carbomère (x4000)



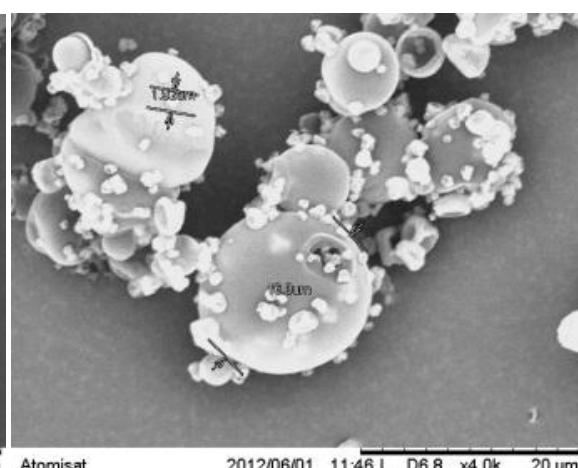
Gomme gellane (x4000)



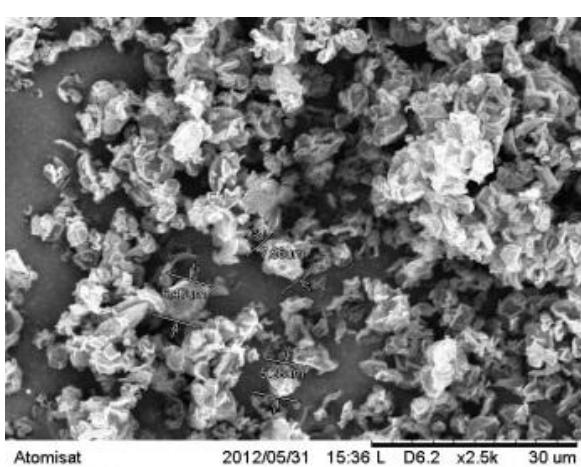
HPC (x6000)



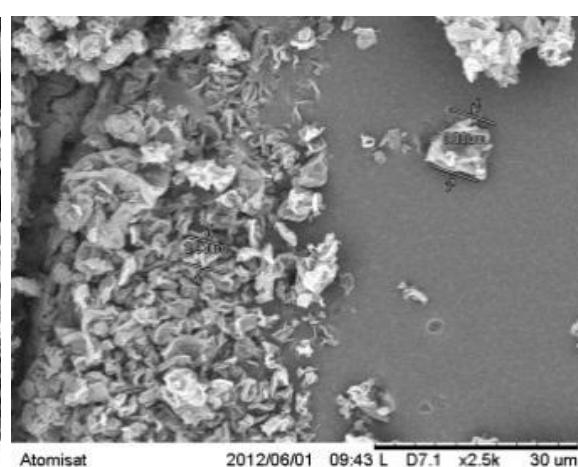
HPMC (x4000)



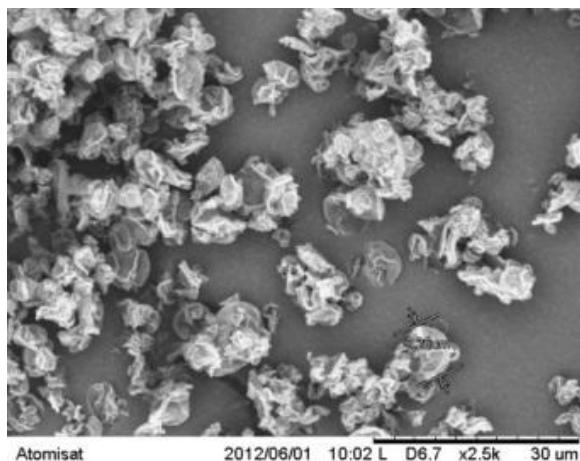
HPMC AS (x2500)



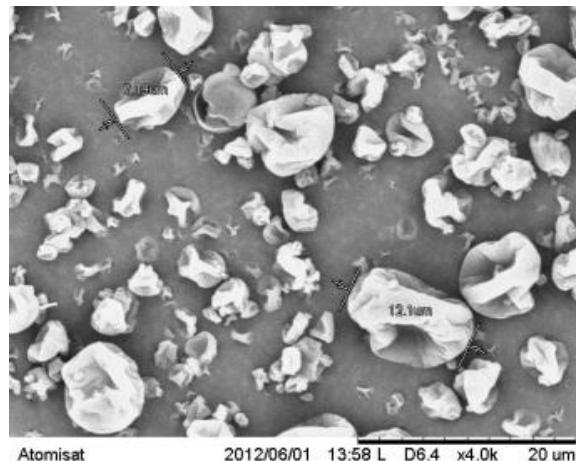
HPMC P (HP55®) (x2500)



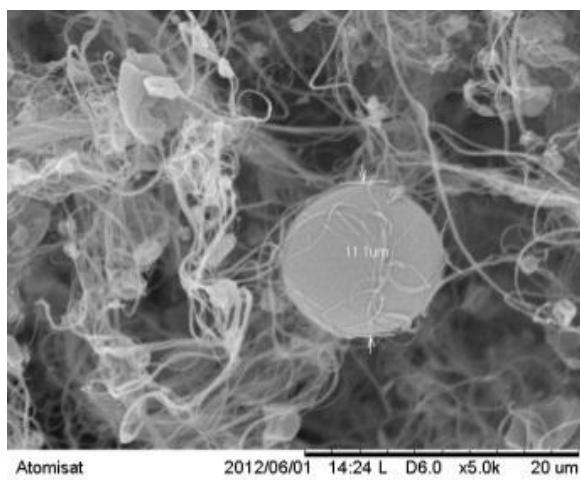
HPMC P (HP55S®) (x2500)



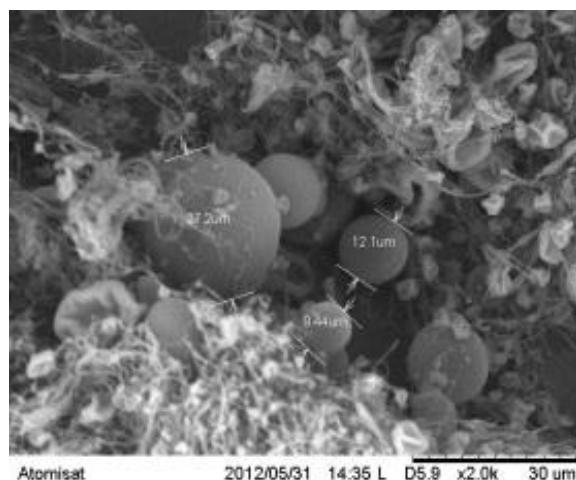
Polycarbophil (x4000)



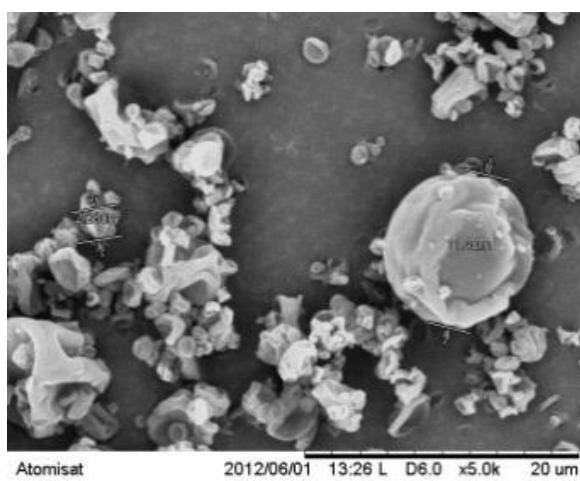
Polyméthacrylate 10 % 75°C (x5000)



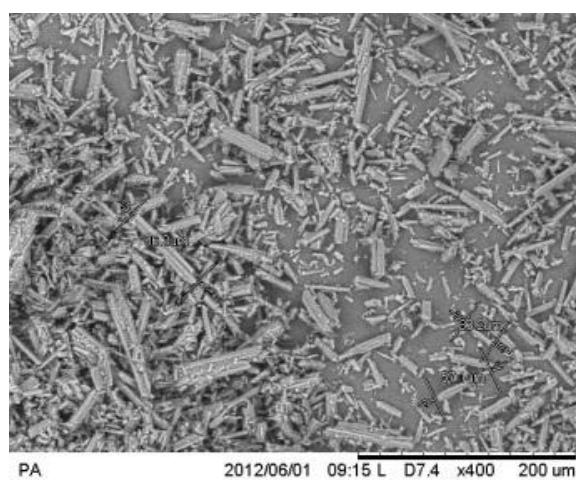
Polyméthacrylate 10 % 110°C (x2000)



Polyméthacrylate 5 % (x5000)



PA (x400)



### 1.3 Analyse par Diffraction de Rayons X

Le profil obtenu par DRX du PA, initialement à l'état cristallin, est comparé aux profils obtenus pour les différents atomisats (Figure 17). Les pics caractéristiques n'ont été retrouvés dans aucun des spectres des composites. Le PA est donc amorphe dans les différentes formulations réalisées.

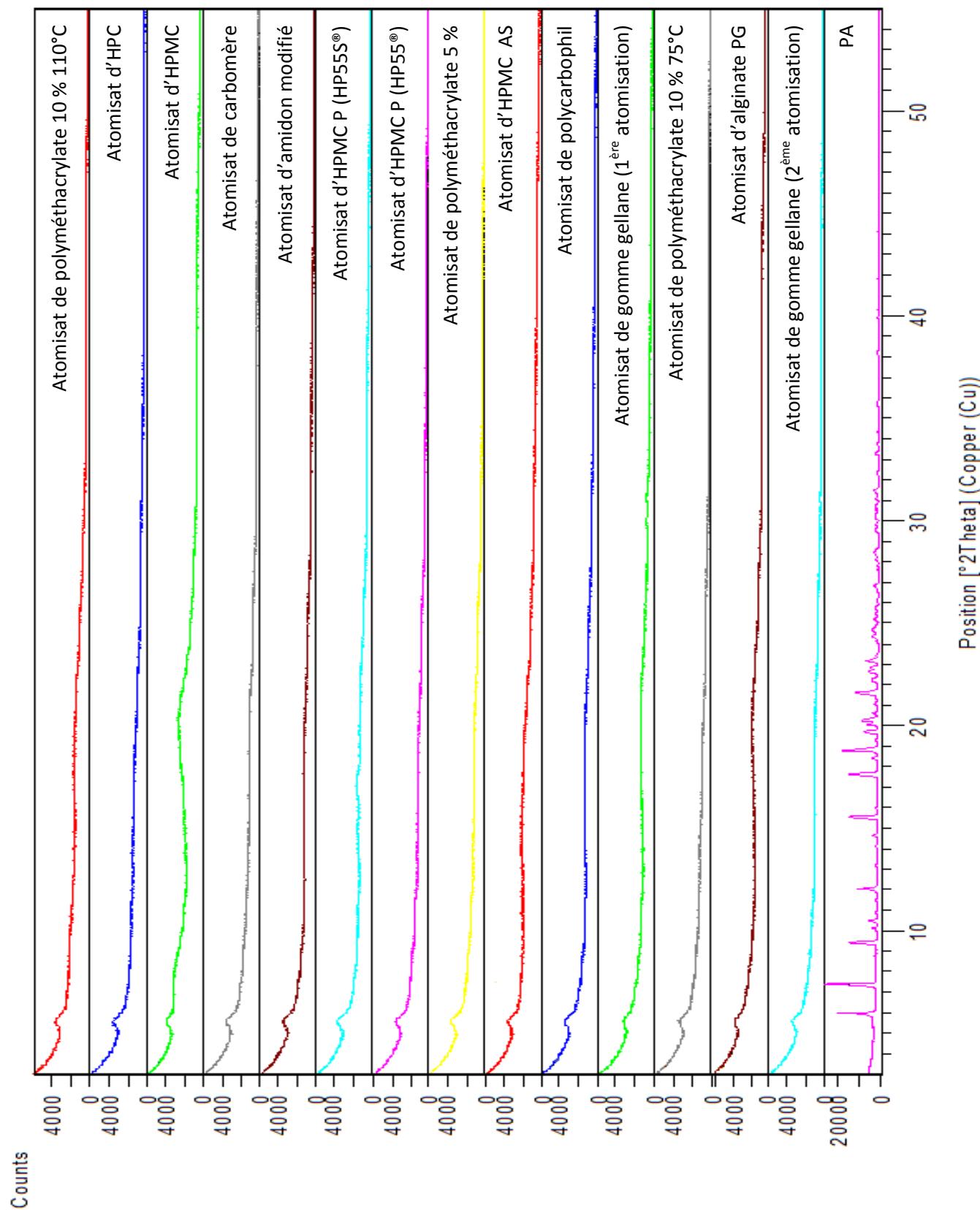


Figure 17 : Diffractogrammes obtenus à partir des atomisats binaires PA/polymère et comparés au spectre caractéristique de la forme cristalline initiale du PA

## 1.4 Cinétique de libération

### 1.4.1 Stabilité du PA dans les conditions de l'essai

En vue d'appliquer la technique d'essai de dissolution mise au point par le Département Analytique, la stabilité du PA a été étudiée dans les conditions les plus critiques pour la molécule. La Figure 18 présente l'évolution de la concentration en PA dans une solution de tampon HCl 0,01N, sur environ 20 heures. Celle-ci évolue de 49,5 µg/mL à 48,2 µg/mL. Ceci représente une perte de 2,1 % de la dose initiale en PA. En accord avec le Département Analytique, la stabilité du PA a été jugée satisfaisante dans ces conditions et compatible avec la méthode. L'essai de dissolution a donc pu être mis en œuvre.

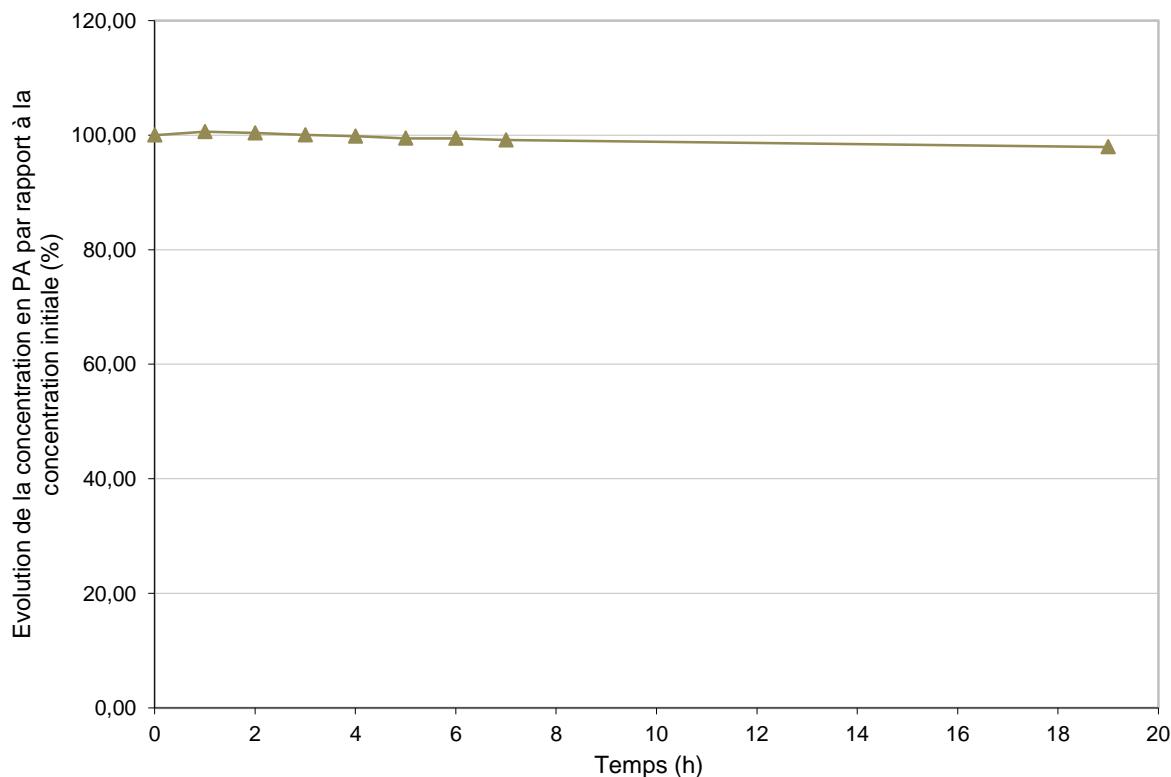


Figure 18 : Evolution de la concentration du PA à 37°C en condition critique d'essai de dissolution

### 1.4.2 Profils de libération des formules

La cinétique de libération du PA, à partir des différents atomisats obtenus et placés en gélule, a été mesurée à pH variable. Les courbes

représentant le pourcentage de PA libéré en fonction du temps sont présentées dans les Figure 19, Figure 20, et Figure 21. Elles ont été regroupées selon le profil cinétique observé.

La pompe permettant de prélever les échantillons dans le bain de dissolution s'est désamorcée lors de la variation de pH, pour les formules à base de gomme gellane, de polycarbophil et de carbomère. L'échantillonnage automatique a été stoppé à 70 minutes pour ces formules et des prélèvements manuels ont été réalisés jusqu'à 240 minutes pour certaines. Les essais concernant ces formules ont été répétés, mais le même désamorçage de la pompe a été observé au changement de pH. Il est possible que ce soit la variation de viscosité, suite au changement de pH, qui entraîne cet incident. Cependant, les prélèvements réalisés suffisent à observer une tendance concernant la cinétique de libération.

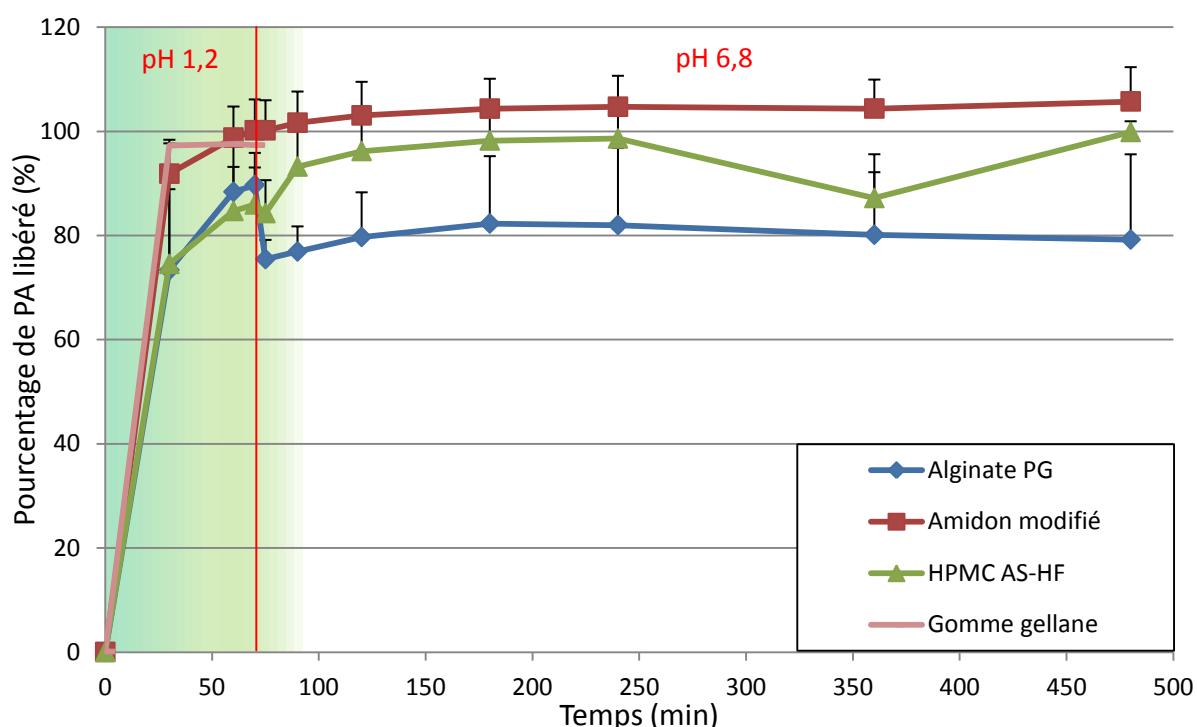


Figure 19 : Cinétique de libération de type libération immédiate - n=3 pour chaque point

Quatre formules présentent une cinétique de libération immédiate (Figure 19). Les atomisats composés d'amidon modifié ou de gomme gellane

libèrent plus de 90 % de la dose en PA au bout 30 minutes, en milieu acide. Les formules composées d'HPMC AS et d'alginate PG libèrent quant à elles un peu plus de 70 % de la dose au bout de 30 minutes dans les mêmes conditions. Par ailleurs, une diminution significative et brutale de la concentration en PA, à partir de la formule composée d'alginate PG, est observée dans le bain de dissolution au changement de pH. En effet, elle passe de 90 % à 75 % de la dose totale en cinq minutes.

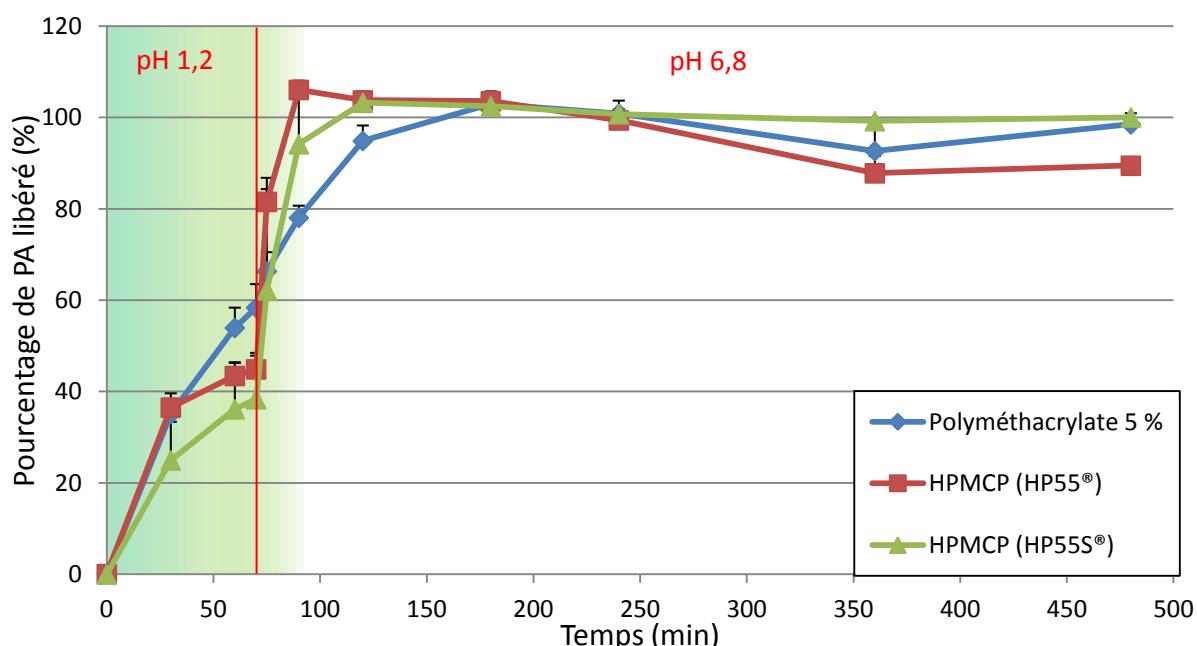


Figure 20 : Cinétique de libération du PA à partir des atomisats - profils de type gastro-résistant - n=3 pour chaque point

Les atomisats à base des dérivés phtalate de l'HPMC (HP55® et HP55S®) libèrent environ 40 % de la dose totale de PA après 70 minutes en milieu acide (Figure 20). A l'ajout des 85 mL de tampon phosphate pH 10,7, un changement de pente est observé pour les deux courbes. La libération du PA passe de 40 % à 100 % environ en 20 minutes. En ce qui concerne la formule à base de polyméthacrylate à 5 % (m/v), 60 % de la dose est libérée au bout de 70 minutes dans les mêmes conditions. Le changement d'inflexion de la courbe est également présent, bien que moins marqué. La libération totale du PA se fait au bout de 180 minutes.

Les courbes de cinétique des atomisats composés de carbomère, de polyméthacrylate 10 %, d'HPC, d'HPMC et de polycarbophil montrent une pente plus faible et traduisent une libération du PA davantage retardée (Figure 21).

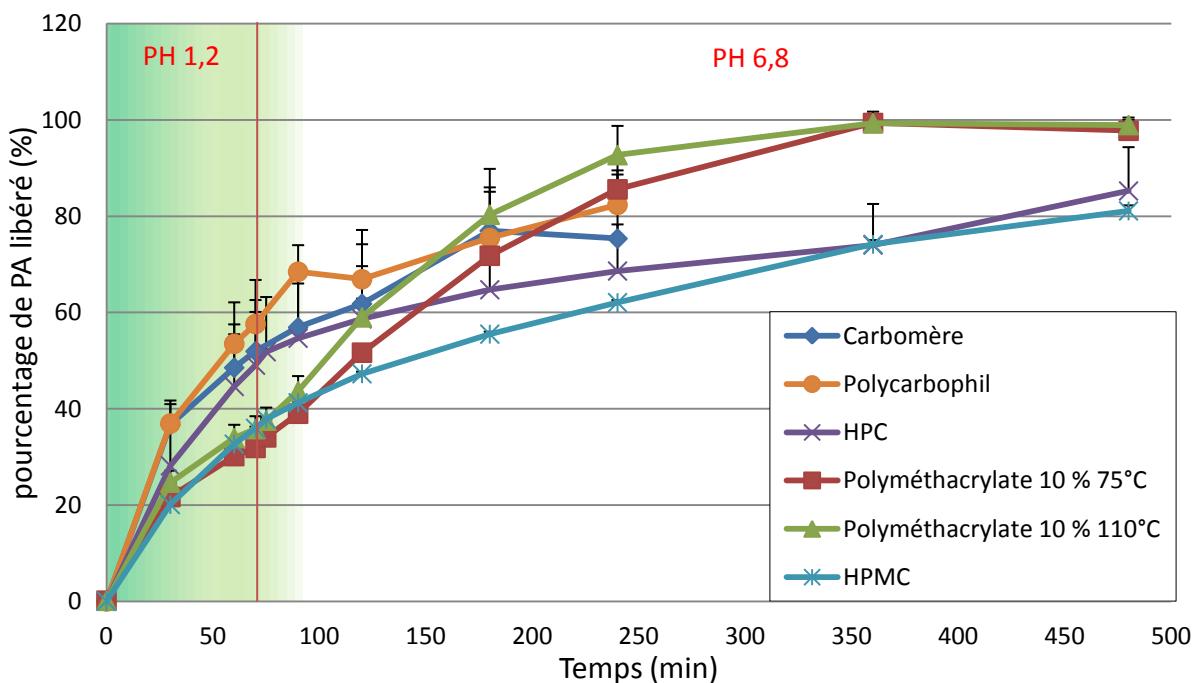


Figure 21 : Cinétique de libération du PA à partir des atomisats - profils de type Libération Prolongée - n=3 pour chaque point

Les formules composées d'HPMC ou de polyméthacrylate 10 % permettent une libération d'environ 40 % du PA après 90 minutes d'essai de dissolution. Au changement de pH, une légère accélération de la libération du PA conduit à une libération totale de la dose au bout de 360 minutes, pour les formules de polyméthacrylate à 10 % (m/v), atomisées à 75°C et 110°C. La formule composée d'HPMC n'atteint pas ce seuil, même à l'issue de l'essai et libère à peine plus de 80 % de la dose initiale de PA, après 480 minutes. En outre, dans les trois ballons de dissolution contenant cette formule, une matrice gonflée est retrouvée (Figure 22).



Figure 22 : Photos des matrices résiduelles d'HPMC récupérées en fin d'essai de dissolution : a. à T=0 ; b. à T=15 minutes

Quant aux formules composées de carbomère, d'HPC et de polycarbophil, elles libèrent autour de 60 % de la dose de PA au bout de 90 minutes. La cinétique de libération du PA à partir de la formule d'HPC évolue ensuite plus lentement et tend à rejoindre les valeurs observées pour l'atomisat d'HPMC. Bien que les profils de libération du carbomère et du polycarbophil s'arrêtent au bout de 70 minutes, conséquence du désamorçage de la pompe de prélèvement, ils permettent d'observer une libération de PA plus importante que l'HPC. Toutefois, elle ne dépasse pas les 90 % de la dose au bout de 240 minutes.

## 1.5 Mucoadhésion par texturométrie

Afin d'étudier la mucoadhésion des différentes formules et en vue de discriminer ces dernières, des tests ont été réalisés à l'aide d'un texturomètre. Les résultats se présentent sous la forme d'un graphique représentant la force, en newton ou millinewton, en fonction du temps, en seconde (Figure 23a).

Un zoom est réalisé sur la portion d'intérêt de la courbe, c'est-à-dire lorsqu'elle présente des valeurs de force négatives. La force qui est alors mesurée empêche la partie mobile de l'appareil de remonter et peut être

assimilée à une adhésion. Une fonction d'intégration permet de quantifier le travail d'adhésion (Figure 23b).

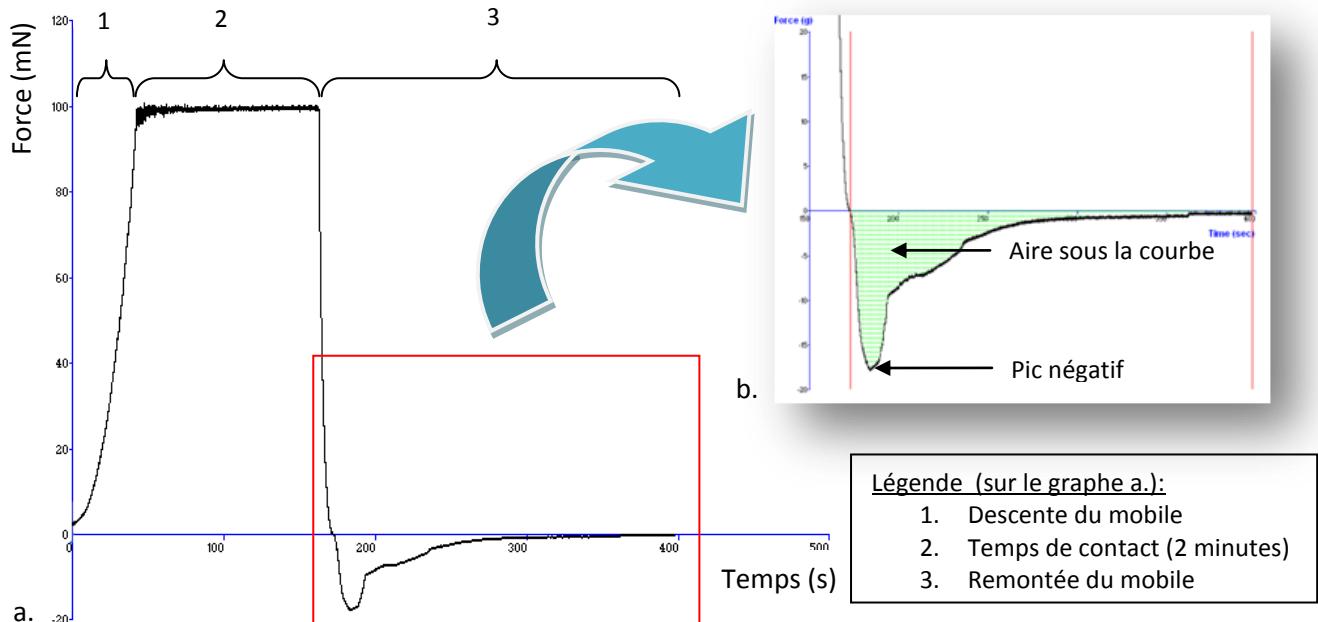


Figure 23 : Traitement du graphique obtenu par texturométrie : a. Graphique complet ; b. Zoom sur la partie négative de la courbe (encadrée en rouge sur le graphe a.)

L'évaluation du pouvoir mucoadhésif de chaque formule est réalisée conjointement selon le profil moyen du graphique obtenu par informatique, en comparaison avec le témoin négatif (Figure 24b), la moyenne des aires sous la courbe faite à partir de trois essais distincts, le pic négatif moyen également obtenu à partir de trois essais distincts et des photos après test.

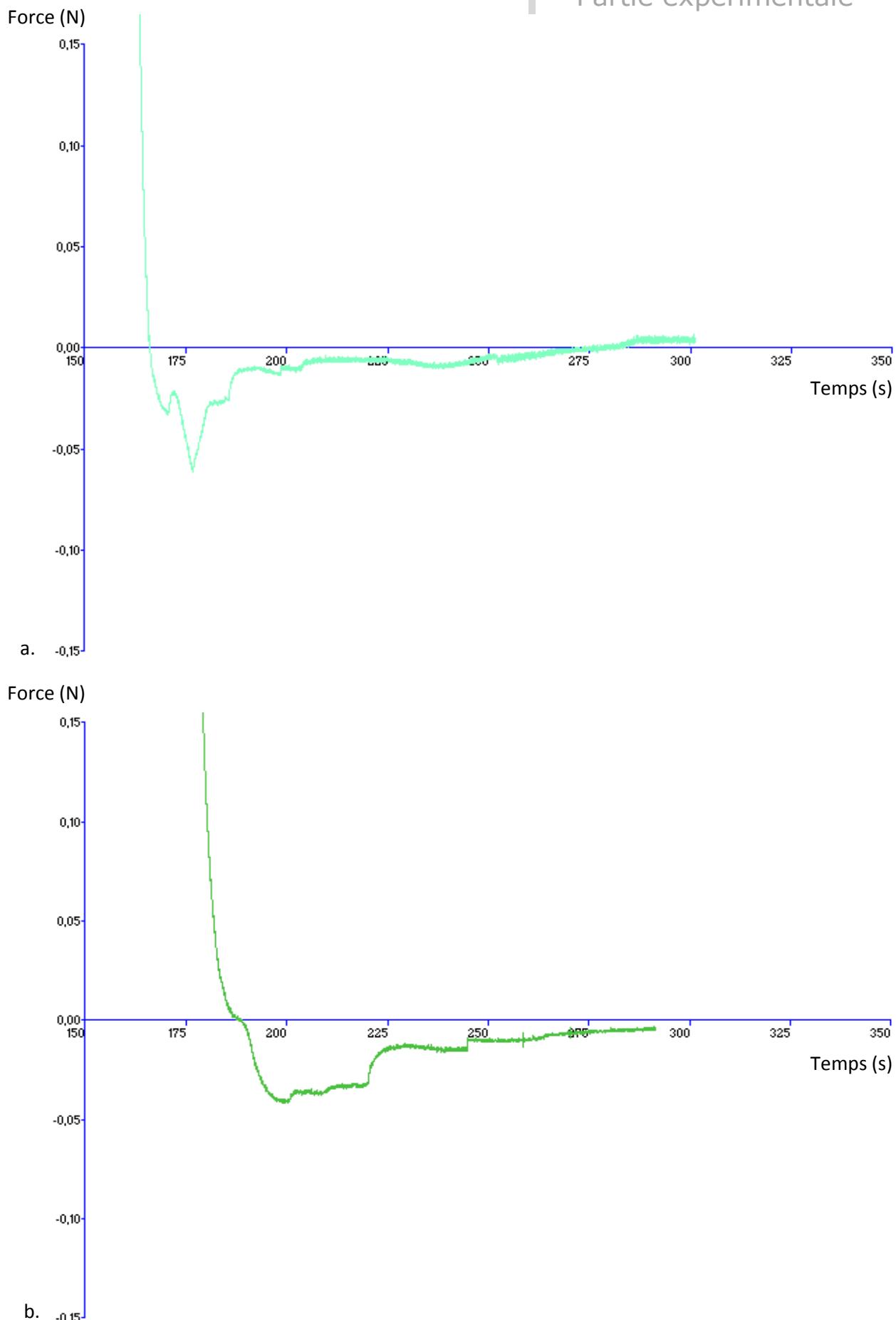
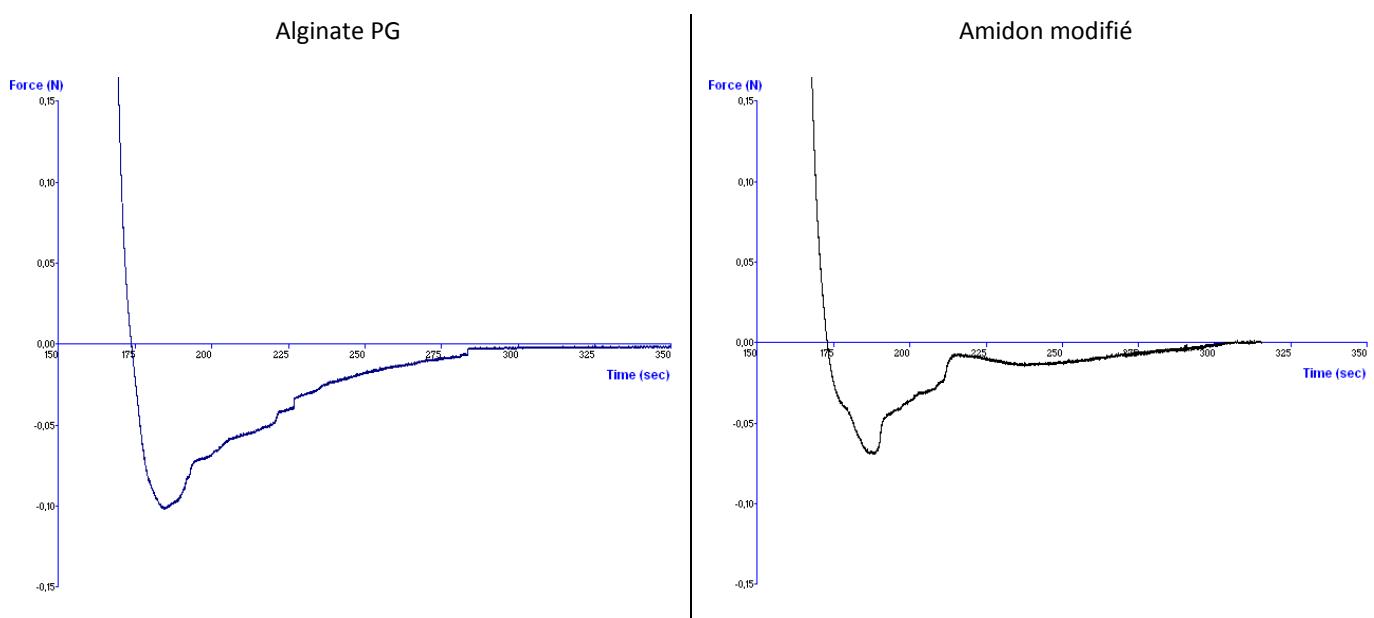


Figure 24 : Graphiques moyennés obtenus après trois essais de mucoadhésivité : a. Sans formule (blanc) ; b. Avec stéarate de magnésium (témoin négatif)

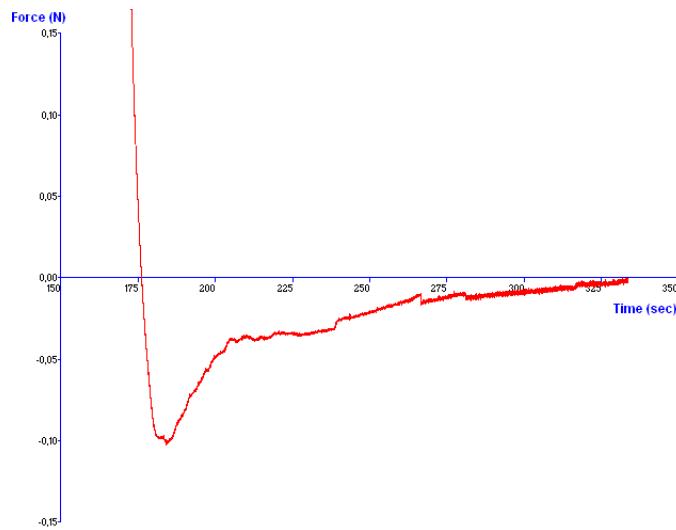
La mesure effectuée à partir d'une pièce d'intestin de porc seule, recouverte de solution de Krebs-Ringer, a permis d'observer une certaine mucoadhésion attribuée au mucus lui-même (Figure 24a). Elle varie d'un intestin à l'autre et d'un échantillon biologique à l'autre, même s'il s'agit du même animal.

Selon les graphiques obtenus à l'issue des tests (Tableau 9), la portion de la courbe sous l'axe des abscisses est importante pour les atomisats composés d'alginate PG, de carbomère, de polyméthacrylate 5 %, d'HPMC Phtalate HP55S® et d'HPC. Les courbes à partir des formules composées de gomme gellane et de polycarbophil présentent une aire sous la courbe légèrement supérieure au témoin négatif. Enfin, les profils obtenus pour les atomisats d'amidon modifié, d'HPMC Accétate Succinate, de polyméthacrylate 10 % et d'HPMC Phtalate HP55® présentent des aires moins importantes.

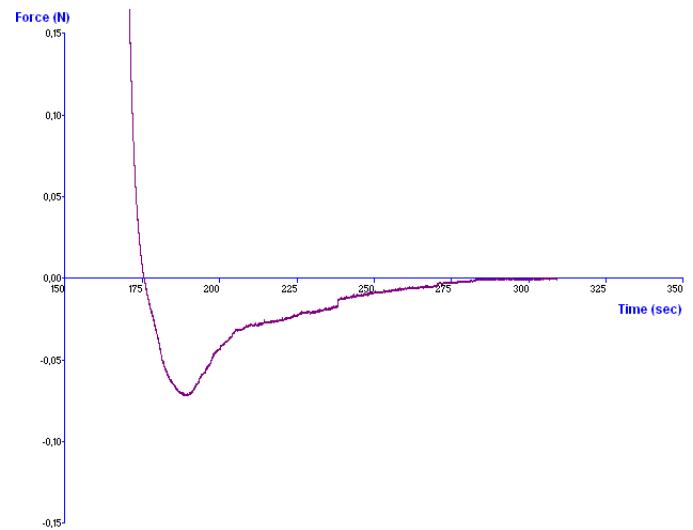
Tableau 9 : Courbes obtenues à l'issue des essais de mucoadhésion par texturométrie pour le criblage des polymères



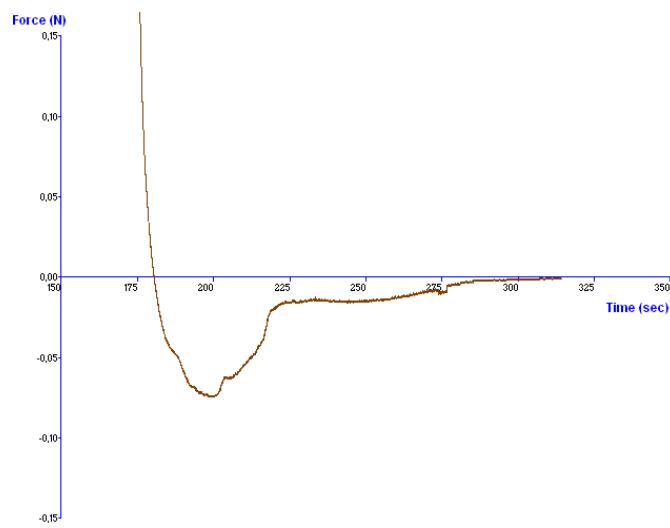
Carbomère



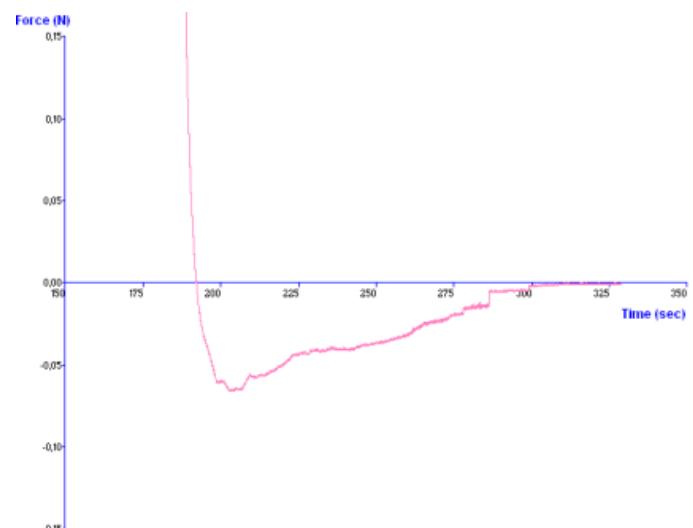
Gomme gellane



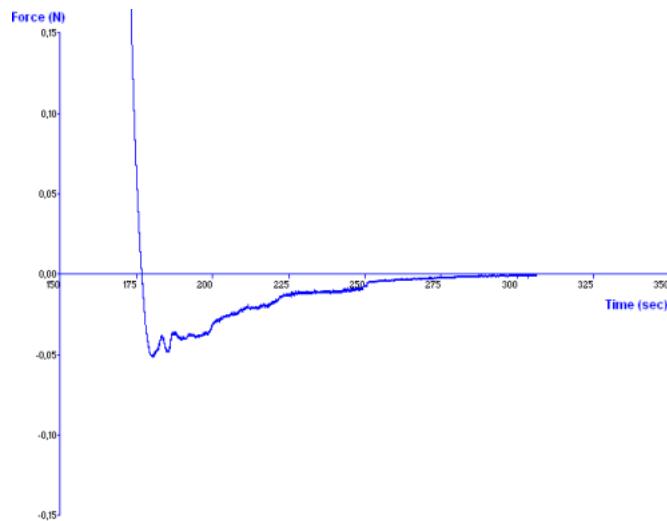
HPC



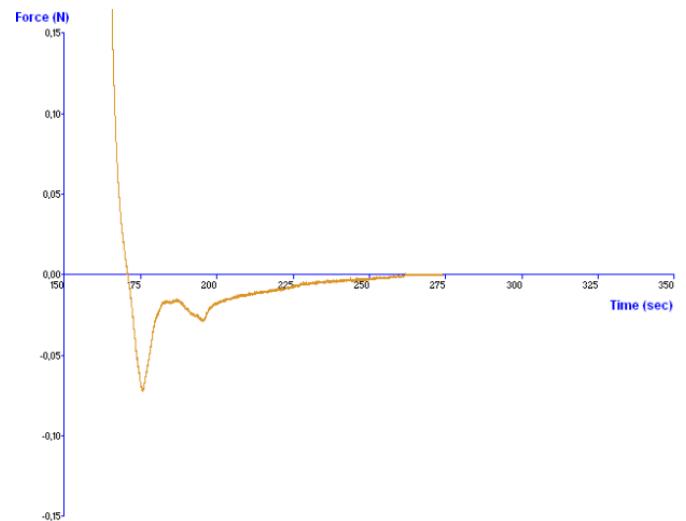
HPMC



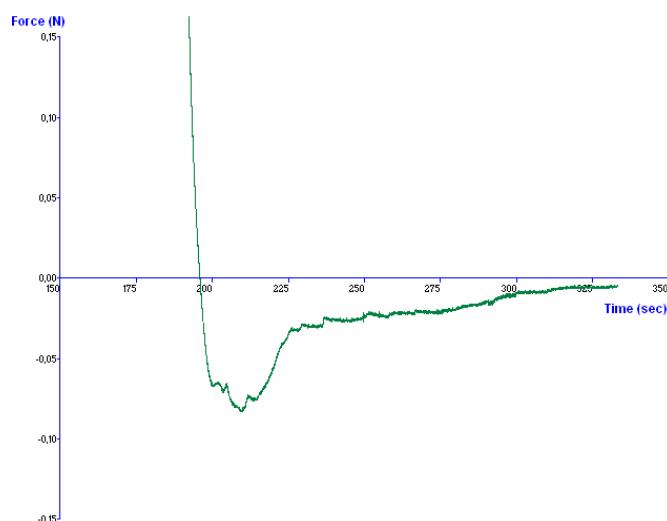
HPMC AS



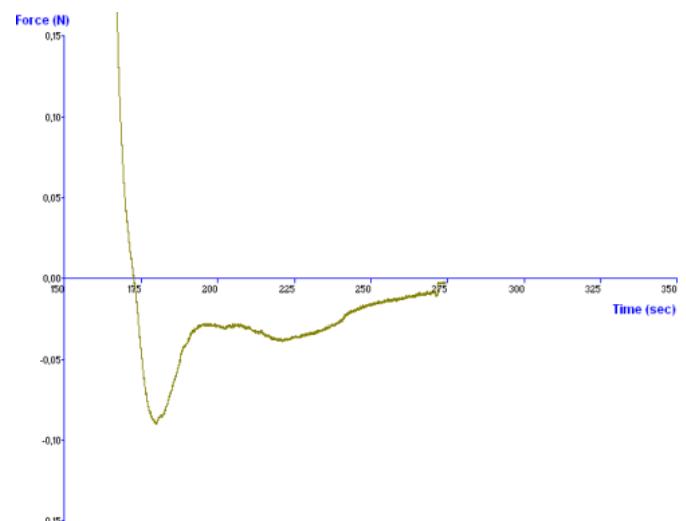
HPMC P HP55®

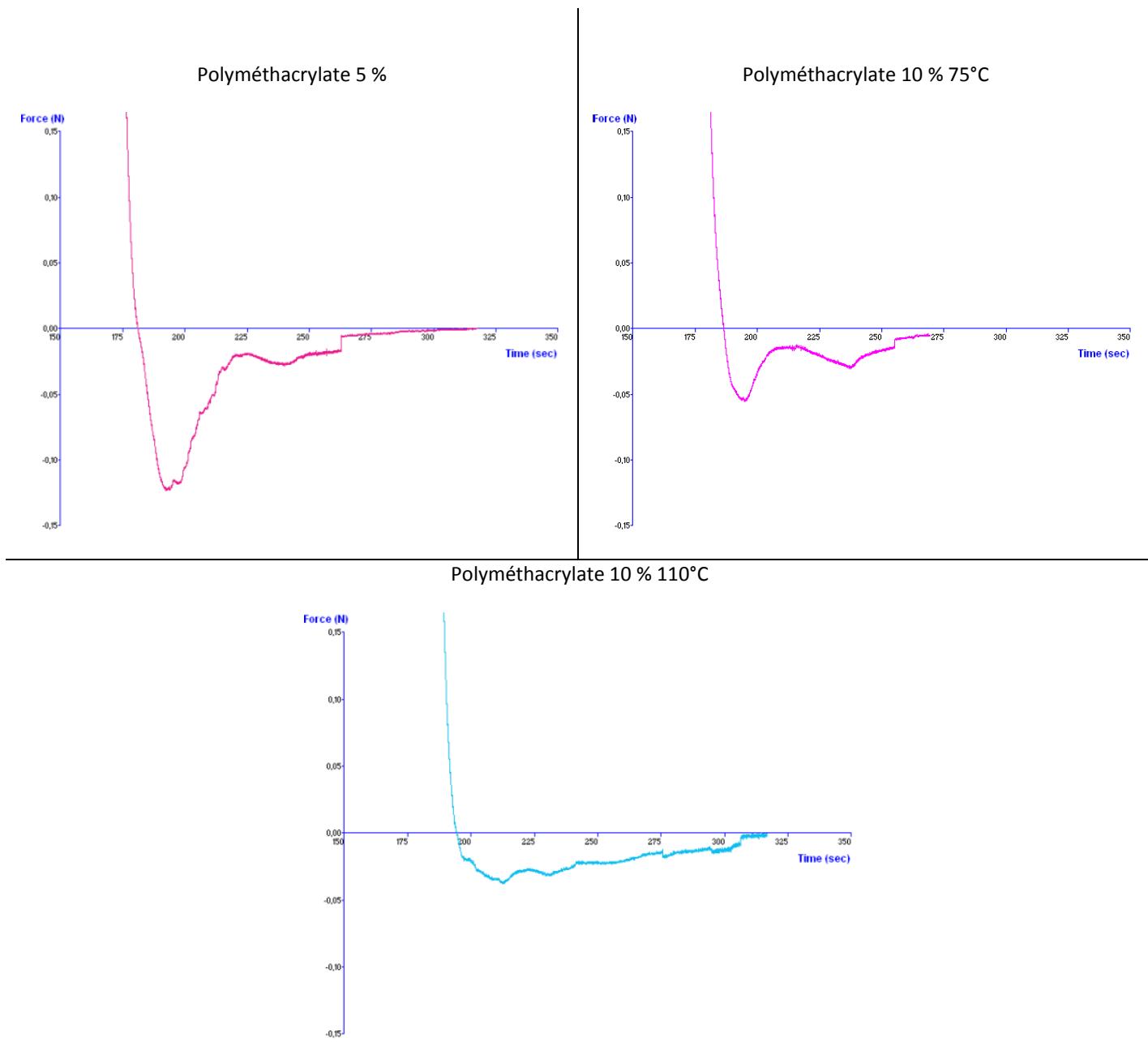


HPMC P HP55S



Polycarbophil





Le Tableau 10 répertorie les moyennes des pics négatifs pour chaque polymère, réalisées à partir de trois essais par texturométrie. Le tableau classe les polymères du pic d'adhésion le plus faible au plus important, correspondant à une adhésion croissante. Ainsi, le polyméthacrylate de l'atomisat à 5 %, l'HPMC AS et l'alginate PG sont les trois polymères dont les atomisats donnent les pics d'adhésion les plus importants. Les atomisats de polyméthacrylate 10 %, atomisés à 75°C ou 110°C

présentent, quant à eux, les pics d'adhésion les moins importants, ne dépassant pas  $-7,0 \times 10^{-2}$  N.

Tableau 10 : Pics d'adhésion en fonctions du polymère composant l'atomisat binaire

Polymère	Polyméthacrylate 10 % 75°C	Amidon modifié	Polyméthacrylate 10 % 110°C	HPMC P HP55®	Stéarate de magnésium	Blanc	Gomme gellane	Polycarbophil	HPC	HPMC P HP55S®	Carbomère	HPMC	Alginate PG	HPMC AS	Polyméthacrylate 5 %
Pic négatif ( $\times 10^{-2}$ N) (Valeur absolue)	6,3	6,6	6,7	7,2	7,7	8,9	9,0	9,2	9,4	9,6	11,6	11,9	12,0	12,2	14,2

Pic d'adhésion de plus en plus important

A partir des aires sous la courbe déterminées par le logiciel, il est possible d'obtenir une moyenne ainsi qu'un coefficient de variation permettant de faciliter la comparaison des formules entre elles. Les résultats sont présentés Figure 25 sous forme d'un histogramme. Le test réalisé à partir du stéarate de magnésium permet d'évaluer la pertinence de la mucoadhésion mesurée. La ligne rouge représente la valeur moyenne de l'aire sous la courbe observée pour le témoin négatif. Le rectangle rosé, de part et d'autre de cette ligne rouge permet de prendre en compte le coefficient de variation obtenu pour ce composé et d'étudier la significativité des résultats.

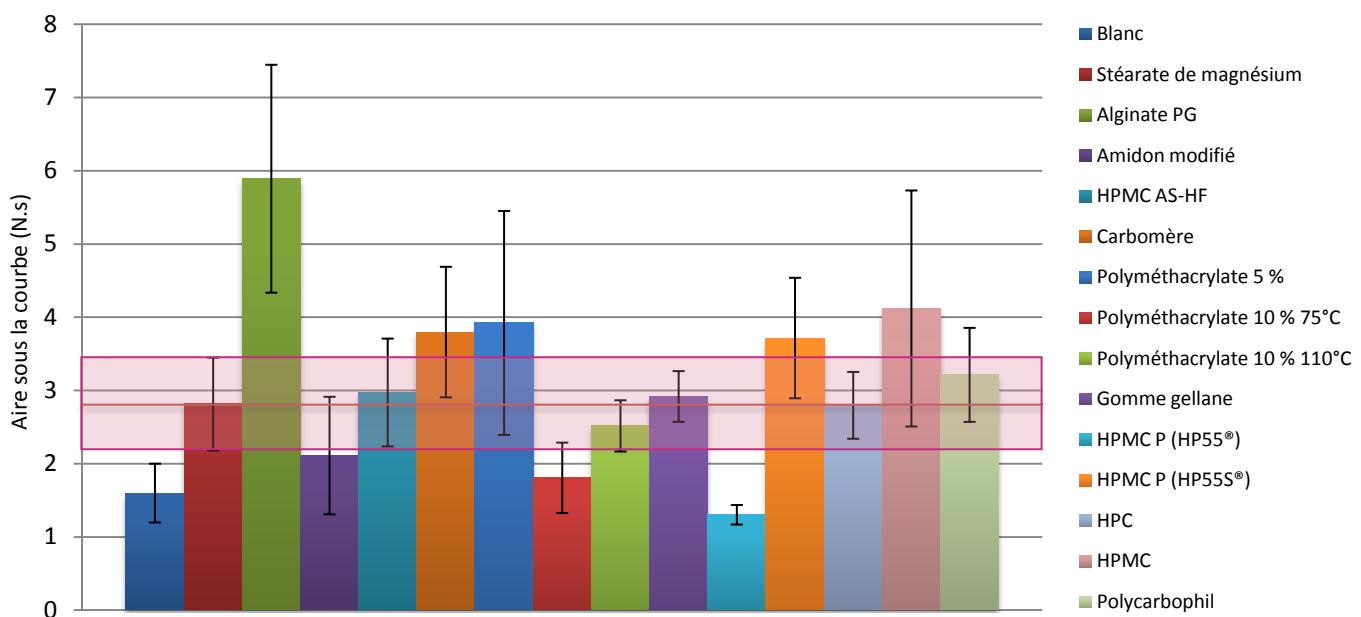


Figure 25 : Histogramme représentant le caractère mucoadhésif des différentes formules binaires – la ligne rouge et le rectangle rosé expriment respectivement la moyenne et les écart-types obtenus pour le témoin négatif

Selon l'histogramme Figure 25, l'atomisat composé d'alginate PG est la seule formule à montrer une bioadhésion significativement différente du témoin négatif, avec une aire sous la courbe de 5,89 N.s. Les valeurs obtenues à partir des formules d'HPMC AS (2,97 N.s), de carbomère (3,79 N.s), de polyméthacrylate 5 % (3,92 N.s), de gomme gellane (2,92 N.s), d'HPMC P HP55S® (3,71 N.s), d'HPMC (4,12 N.s) et de polycarbophil (3,21 N.s) sont également supérieures à la moyenne observée pour le stéarate de magnésium (2,81 N.s) ou le blanc (1,60 N.s).

Une observation visuelle post-test est indispensable pour interpréter les résultats. En effet, selon les aires sous la courbe une mucoadhésion significativement supérieure au blanc est constatée avec le stéarate de magnésium, alors que la photo montre une absence de solubilisation de la poudre (Figure 26). En revanche, avec l'atomisat d'HPMC ou d'alginate PG, la poudre a formé un gel plus ou moins visqueux au cours du test (Figure 27 et Figure 28).

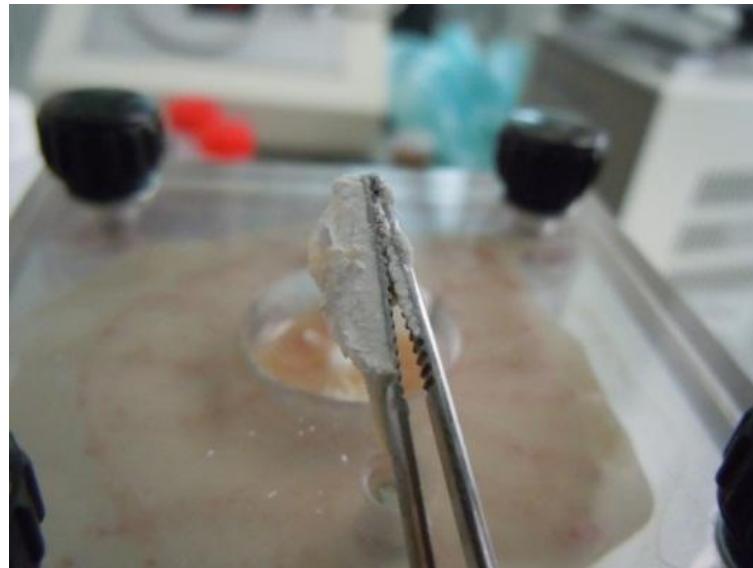


Figure 26 : Echantillon récupéré sur le cylindre mobile, après le test de mucoadhésion réalisé avec le stéarate de magnésium



Figure 27 : Test de mucoadhésion de l'alginate PG (support en plexiglas, après test)

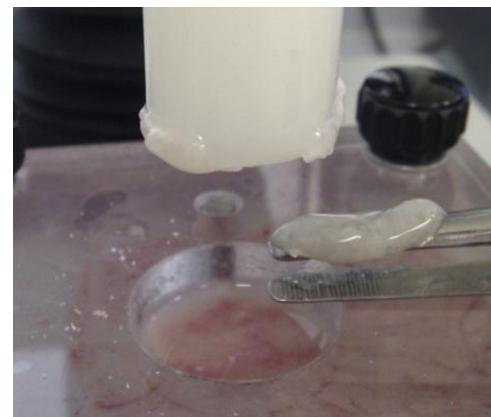


Figure 28 : Echantillon récupéré sur le cylindre mobile, après le test de mucoadhésion réalisé avec l'atomisat d'HPMC

A l'issue de la caractérisation de ces atomisats binaires PA/polymère, quatre polymères ont montré des résultats particulièrement intéressants et prometteurs au vu de la problématique de départ. L'HPC et l'HPMC ont en effet permis de ralentir la cinétique de libération du PA et de conférer à l'atomisat un pouvoir mucoadhésif supérieur au témoin négatif. En outre, la matrice d'HPMC gélifiée, retrouvée au terme de l'essai de dissolution et les résultats satisfaisants obtenus par texturométrie confirment l'intérêt

d'un hydrogel dans la mucoadhésion. Parmi les polysaccharides, seul l'alginate PG s'est démarqué par une mucoadhésion significativement supérieure au témoin négatif. En revanche, la formule PA/alginate PG engendre une libération immédiate incompatible avec l'objectif du projet. Enfin, un des dérivés phtalate d'HPMC, l'HP55S<sup>®</sup>, a été retenu pour son comportement pH-dépendant et la mucoadhésion intéressante qu'il a pu conférer à la formule.

Quatre nouvelles associations ont été préparées à partir des quatre polymères retenus, en vue d'obtenir une synergie et de potentialiser les caractéristiques des atomisats. Deux polymères ont été associés au PA dans le cœur : HPC/alginate PG/PA (8:4:3) et HPMC/alginate PG/PA (8:4:3). Les dérivés cellulosiques sont ainsi supposés ralentir la libération du PA et permettre aux particules d'adhérer au mucus. L'alginate PG devrait optimiser le pouvoir mucoadhésif déjà apporté par l'HPC ou l'HPMC. Enfin, ces formules ternaires ont été comparées avec et sans couronne d'HP55S<sup>®</sup>. Les formules sans coque sont qualifiées de nues, les formules avec coque seront appelées « microparticules ternaires de type cœur-couronne ». En présence d'une couronne, la quantité d'HP55S<sup>®</sup> est déterminée de manière à obtenir *in fine* un ratio PA/polymère (1:5). Le dérivé phtalate d'HPMC est supposé empêcher la libération du PA dans le milieu stomacal grâce à son comportement pH-dépendant. Il devrait également permettre à la particule d'adhérer au mucus.

## 2. Microparticules ternaires, nues et de type cœur-couronne

### 2.1 Préparation des formules

Une buse binaire standard est employée pour la préparation des microparticules ternaires nues. Une buse ternaire est supposée conférer la morphologie de type cœur-couronne souhaitée, aux les microparticules ternaires correspondantes. Chaque atomisation est caractérisée par la concentration de la solution destinée au cœur, le volume à atomiser, la morphologie de la particule, dépendant de la buse utilisée, les températures d'entrée et de sortie de la chambre de séchage, le rendement du procédé et le ratio PA/polymère de l'atomisat. Toutes ces données sont répertoriées dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Caractéristiques avant, pendant et après le processus d'atomisation de l'optimisation de la formule

Formule	Concentration de la solution à atomiser en phase interne	Volume à atomiser (phase interne- phase externe)	Morphologie	$T_{in}$	$T_{out}$	Rendement du procédé	Ratio PA/polymère
1	1,25 % (m/v)	600 mL – 600 mL	Cœur-couronne	150°C	67°C	54 %	1:5
2	1,26 % (m/v)	600 mL	Nue	110°C	63°C	49 %	1:4
3	1,66 % (m/v)	450 mL – 450 mL	Cœur-couronne	110°C	52°C	67 %	1:5
4	1,67 % (m/v)	NC*	Nue	110°C	50°C	NC*	1:4

\*NC : Non Connu.

Pour satisfaire au critère de viscosité imposé par le procédé, les solutions à atomiser pour le cœur ont dû être fortement diluées. Leurs concentrations sont ainsi comprises entre 1,25 % (m/v) et 1,67 % (m/v). Quant au rendement, il varie entre 49 % pour la formule

HPMC/alginate PG/PA (formule 2) et 67 % pour la formule HPC/alginate PG/PA-HP55S® (formule 3).



Pour la formule d'HPMC/alginate PG/PA-HP55S® (formule 1), la température d'entrée dans la chambre de séchage a dû être augmentée à 150°C et les débits d'alimentation diminués, compte tenu de l'apparition d'un dépôt liquide sur les parois de la chambre de séchage (Figure 29).

Figure 29 : Dépôt liquide apparu en cours d'atomisation pour la formule HPMC/alginate PG/PA-HP55S®



Figure 30 : De gauche à droite, atomisats composés de : Particules nues à base d'HPC ; Particules recouvertes à base d'HPC ; Particules nues à base d'HPMC ; Particules recouvertes à base d'HPMC

La Figure 30 montre des échantillons de 50 mg d'atomisat. Elle permet d'observer et de comparer l'aspect des poudres des nouvelles formules. Les atomisats de particules recouvertes d'une coque d'HP55S® présentent un volume moins important que ceux dont les particules sont nues. Leur densité est donc plus élevée que pour les atomisats nus d'HPC/alginate PG/PA. En revanche, la différence de couleur attendue en introduisant le colorant uniquement dans une partie de la particule n'a pas permis de distinguer les particules sans coque des particules supposées recouvertes d'HP55S®.

## 2.2 Imagerie par Microscopie Electronique à Balayage

Les morphologies des deux types d'atomisats réalisés, particules nues et de type cœur-couronne, ont été comparées par Microscopie Electronique à Balayage.

Les atomisats d'HPC se présentent tous deux sous la forme de particules sphériques, pleines, d'environ 10-15  $\mu\text{m}$  de diamètre, recouvertes de particules dont le diamètre ne dépasse pas le micromètre. Les images ne montrent donc pas de différence significative entre la forme de type cœur-couronne (Figure 31) et l'atomisat nu d'HPC (Figure 32).

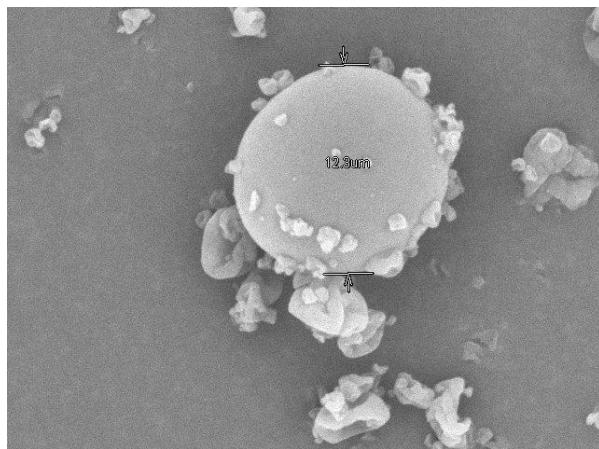


Figure 31 : Atomisat cœur-couronne HPC/alginate PG/PA-HP55S® (X 6000)

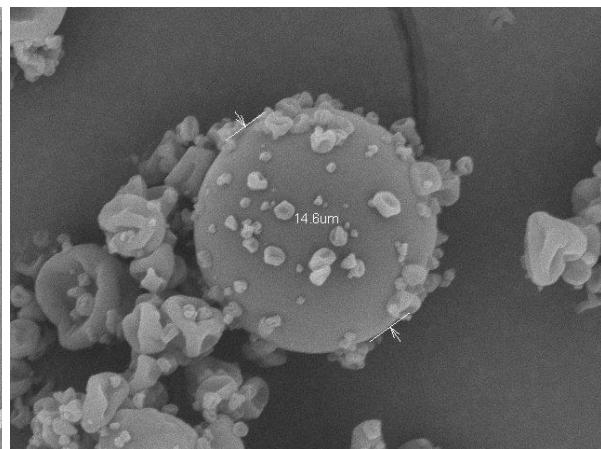


Figure 32 : Atomisat simple HPC/alginate PG/PA (X 6000)

En ce qui concerne les atomisats d'HPMC, les morphologies des particules semblent différentes. L'atomisat simple HPMC/alginate PG/PA se présente sous la forme de particules sphériques vides dont le diamètre varie entre 1  $\mu\text{m}$  et 15  $\mu\text{m}$  (Figure 33).

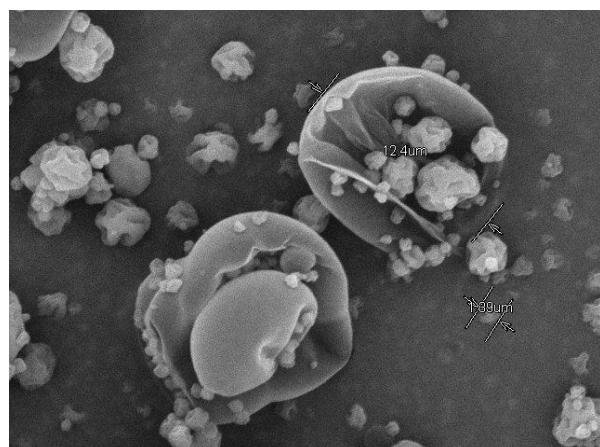


Figure 33 : Atomisat simple HPMC/alginate PG/PA (X 6000)

Alors que des doutes peuvent être émis quant à la structure cœur-couronne de l'atomisat supposé complexe d'HPC, une morphologie particulière est retrouvée avec la formule 1 d'HPMC/alginate PG/PA et d'HP55S®. Les images obtenues par MEB montrent en effet des particules renfermant d'autres particules d'un diamètre inférieur (Figure 34 et Figure 35). Selon le protocole utilisé, la coque serait composée du dérivé phtalate

de l'HPMC et les particules internes seraient composées du mélange ternaire HPMC/alginate PG/PA.

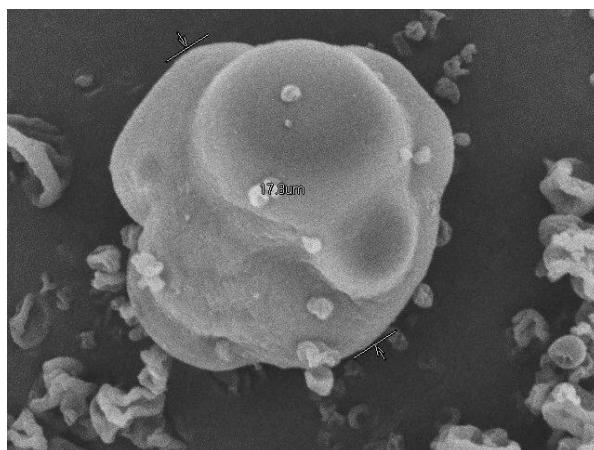


Figure 34 : Atomisat cœur-couronne HPMC/alginate PG/PA-HP55S® - Particule fermée (X 6000)

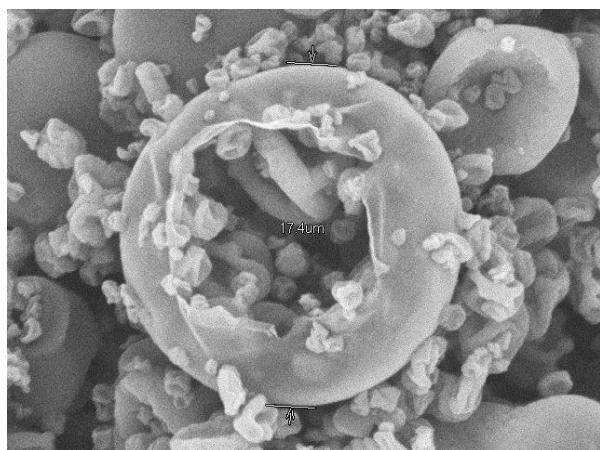


Figure 35 : Atomisat cœur-couronne HPMC/alginate PG/PA-HP55S® - Particule perforée (X 6000)

Tout comme lors du criblage des polymères, les cristaux de PA, en forme d'aiguille, ne sont pas retrouvés dans les images réalisées à partir des nouveaux atomisats.

## 2.3 Analyse par Diffractométrie de rayons X

Les diffractogrammes obtenus ont été comparés à celui correspondant au PA, initialement sous forme cristalline (Figure 36).

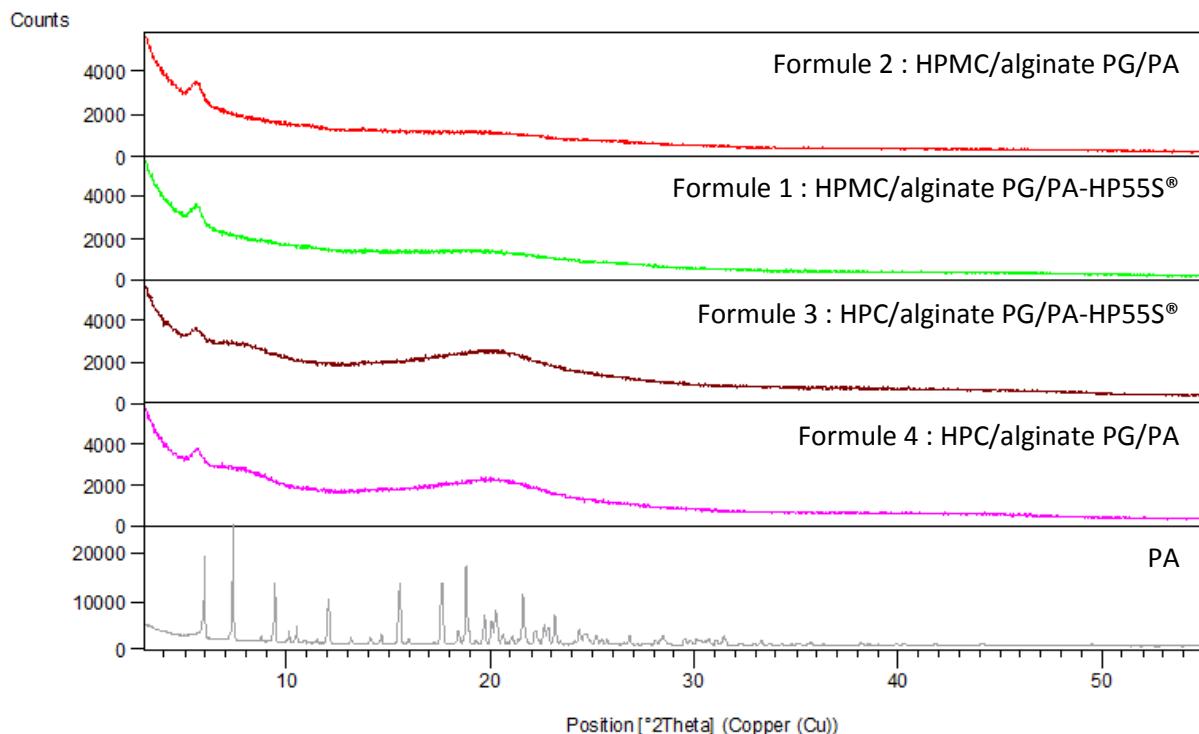


Figure 36 : Diffractogrammes correspondant aux atomisats ternaires plus ou moins recouverts d'HP55S® et comparés au spectre du PA sous forme cristalline

Aucun des quatre spectres correspondant aux quatre nouvelles formules testées ne montre les pics caractéristiques de la forme cristalline du PA. Cette absence traduit l'état amorphe dans lequel se trouve le PA, dans les atomisats.

## 2.4 Cinétique de libération

L'essai de dissolution a été réalisé dans les mêmes conditions que précédemment, avec les formules ternaires. Les profils obtenus sont présentés dans la Figure 37. Cette fois-ci, aucun désamorçage n'a été constaté.

Deux types de profil sont observés. La formule complexe d'HPC/alginate PG/PA-HP55S<sup>®</sup> montre un profil de type libération immédiate. L'association de trois polymères ne semble pas influencer la cinétique de libération. L'alginate PG et l'HP55S<sup>®</sup> semblent même masquer les propriétés LP de l'HPC, que la formule binaire HPC/PA avait révélé. La totalité de la dose de PA est ainsi libérée au bout de 150 minutes environ. A l'inverse, les formules nues d'HPC/alginate PG/PA et d'HPMC/alginate PG/PA ainsi que l'atomisat de type cœur-couronne d'HPMC/alginate PG/PA-HP55S<sup>®</sup> ralentissent la libération du PA. Seulement 40 % de la dose est libéré au bout de 70 minutes. La totalité de la dose PA est libérée au bout de 480 minutes pour la formule nue d'HPC/alginate PG/PA. Les deux autres formules ne dépassent pas une libération de 90 % de la dose totale, même à l'issue de l'essai.

Un dernier constat est fait à partir des résultats obtenus. Le comportement pH-dépendant attendu pour les formules comportant une couronne d'HP55S<sup>®</sup>, un polymère ayant montré une sensibilité à la variation de pH lors du criblage des polymères, n'a pas été observé au cours de l'essai de dissolution. En effet, le changement d'inflexion de la courbe est faible ou inexistant.

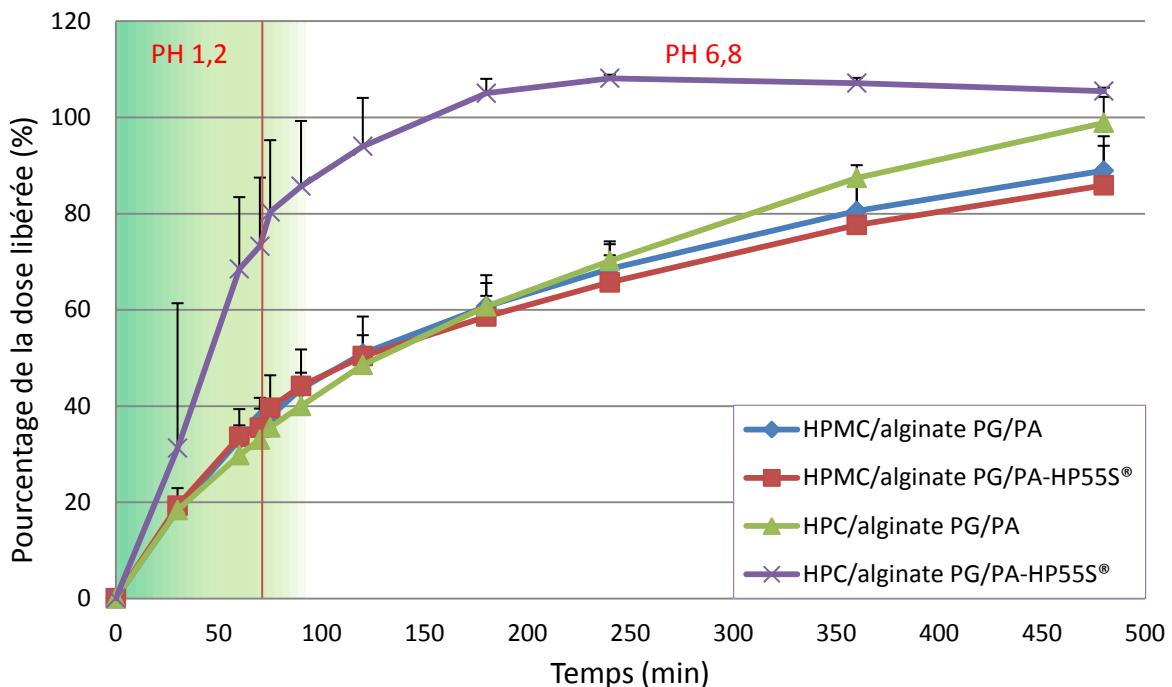


Figure 37 : Cinétique de libération du PA à partir des atomisats des formules ternaires plus ou moins recouvertes d'HP55S® - n=3 pour chaque formule

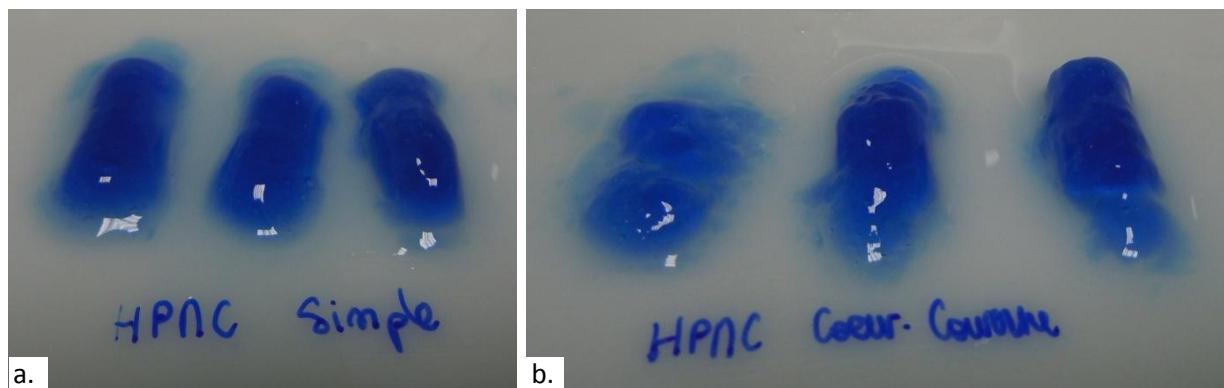


Figure 38 : Matrices gélifiées obtenues à l'issue de l'essai de dissolution : a. Formule ternaire nue d'HPMC ; b. Formule ternaire de type cœur-couronne d'HPMC

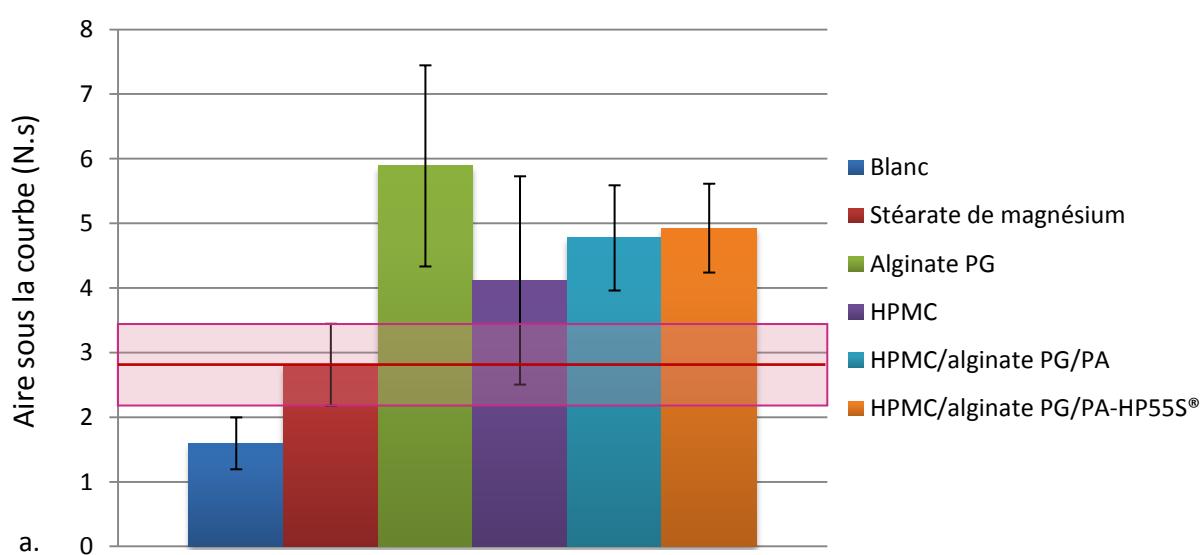
Tout comme pour la formule binaire HPMC/PA, les formules optimisées à base d'HPMC ont montré une gélification à l'issue de l'essai de dissolution (Figure 38). Cette particularité peut laisser présager la formation *in situ* d'un hydrogel et permettre une mucoadhésion efficace. Par ailleurs, les photos montrent une matrice continue pour la formule nue mais qui se désagrège pour la formule comportant l'HP55S®. Cette gélification sans prise en masse est d'un intérêt particulier dans le projet puisque cela

pourrait permettre de recouvrir une surface plus importante, par rapport à une matrice gélifiée monolithique telle que pour l'atomisat d'HPMC/alginate PG/PA.

## 2.5 Mucoadhésion

### 2.5.1 Texturométrie

La Figure 39 permet de comparer les différentes moyennes des aires sous la courbe obtenues pour les quatre nouvelles formules, par rapport au blanc, au témoin négatif et aux formules binaires d'HPMC, d'HPC ou d'alginate PG. Seules les formules composées d'HPMC montrent une mucoadhésion significativement supérieure aux deux références avec des valeurs de 4,77 N.s pour la formule nue et 4,93 N.s pour la formule de type cœur-couronne. Ces valeurs sont également supérieures aux résultats obtenus pour l'atomisat binaire d'HPMC/PA (Figure 39a.). Elles restent cependant inférieures aux valeurs observées pour l'atomisat alginate PG/PA. Les formules à base d'HPC, quant à elles, ne dépassent pas la valeur obtenue pour le témoin négatif (Figure 39b.). Aucune amélioration du pouvoir mucoadhésif n'a pu être observée entre la formule binaire HPC/PA et la formule cœur-couronne à base d'HPC. Une diminution de ce pouvoir a même été constatée entre la formule binaire et la formule nue HPC/alginate PG/PA.



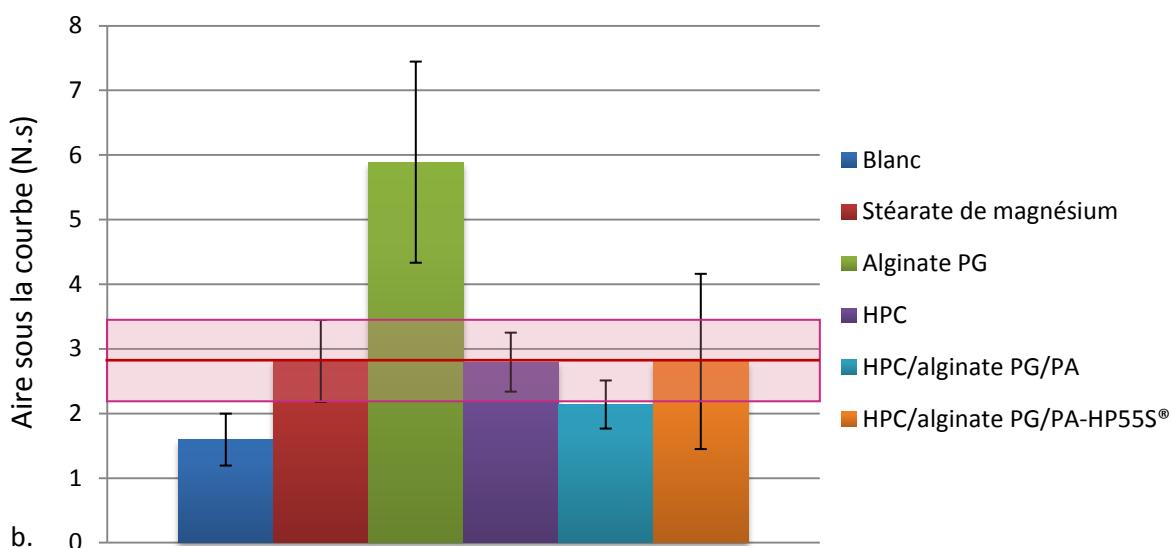


Figure 39 : Histogrammes représentant le caractère mucoadhésif des différentes formules ternaires plus ou moins recouvertes d'HP55S® : a. Comparaison des formules ternaires et binaire à base d'HPMC et d'alginate PG ; b. Comparaison des formules ternaires et binaires à base d'HPC et d'alginate PG – la ligne rouge et le rectangle rosé expriment respectivement la moyenne et les écart-types obtenus pour le témoin négatif

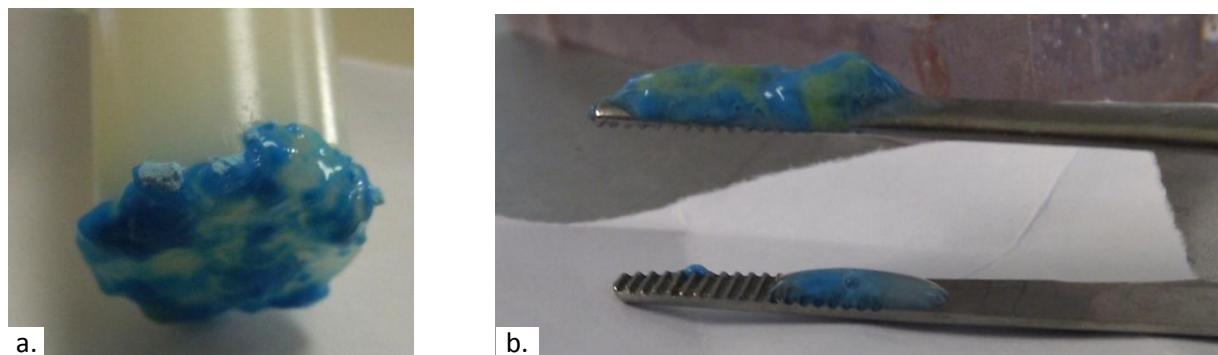


Figure 40 : Gélification après test des échantillons : a. atomisat de type cœur-couronne d'HPMC ; b. Atomisat de type cœur-couronne d'HPC

Les photos réalisées après test pour les formules complexes d'HPMC et d'HPC sont présentées dans la Figure 40. Une gélification et une association avec le mucus du tissu intestinal sont observées pour les deux formules.

## 2.5.2 Technique du sac retourné



Lors de l'essai, la formule s'est localisée de façon préférentielle au niveau de l'interface « solution Krebs-Ringer/air », comme le montre la Figure 41, limitant ainsi l'interaction de la formule avec la muqueuse intestinale. Malgré ce constat, l'essai a été réalisé pour des temps d'agitation au Turbula® de 5, 10, 15 et 30 minutes.

Les dosages ont été réalisés par CLHP et les résultats sont présentés dans le Tableau 12.

Figure 41 : Montage utilisé lors de la technique du sac retourné, après agitation au Turbula®

La quantité de PA dosée dans le récipient, après que la pièce biologique ait été retirée, correspond au PA n'ayant pas bioadhéré. Cette quantité, lorsqu'elle est déduite de la masse de PA initialement introduite lors de l'essai, permet d'estimer la proportion de PA contenue dans les particules ayant bioadhéré. A partir de la teneur en PA de l'atomisat, il est ainsi possible de remonter à la quantité totale d'atomisat ayant bioadhéré à la muqueuse. Ceci est présenté sous la forme d'une fraction dans la dernière colonne du Tableau 12.

Tableau 12 : Résultats des essais du sac retourné réalisés à partir de la formule composée d'HPMC, en fonction du temps d'agitation

Temps d'agitation (min)	Concentration en PA dans le contenant ( $\mu\text{g/mL}$ )	Fraction ayant bioadhérée par rapport à la quantité initiale introduite
5	17,2	- 19/634
10	16,6	1/956
15	16,8	- 5/764
30	16,5	8/683

Les résultats obtenus lors de l'essai, tous temps d'agitation confondus, n'ont pas permis de montrer une mucoadhésion significative.

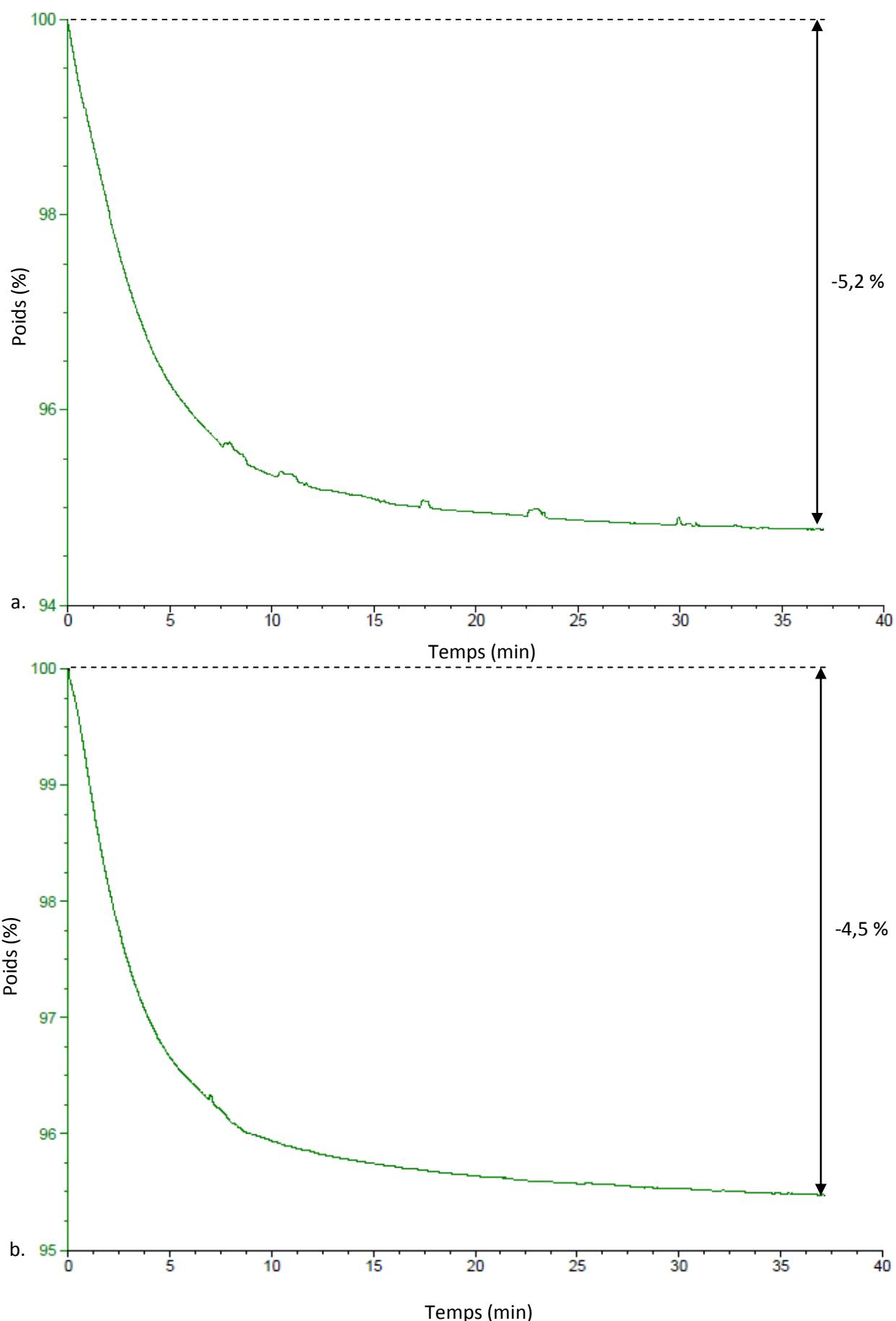
Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que la poudre a une affinité limitée avec la solution Krebs-Ringer, limitant ainsi le contact de la formule avec la muqueuse.

Un essai a été réalisé avec la formule d'HPC de type cœur-couronne, avec 10 minutes d'agitation au Turbula®. Là non plus, les résultats n'ont pas permis de mettre en évidence un phénomène de mucoadhésion (résultats non présentés), ni même d'effectuer une quelconque comparaison de la mucoadhésion entre les formules.

Compte tenu de l'incapacité du test, dans ces conditions, à montrer un éventuel caractère mucoadhésif, par ailleurs observé par texturométrie, l'essai n'a pas été poursuivi.

### 2.6 Analyse thermogravimétrique

Cet essai a été réalisé uniquement pour les quatre nouvelles formules. Les résultats se présentent sous la forme de graphiques. A partir de ces derniers, il est possible de déduire la quantité résiduelle de solvant contenue dans les différents atomisats.



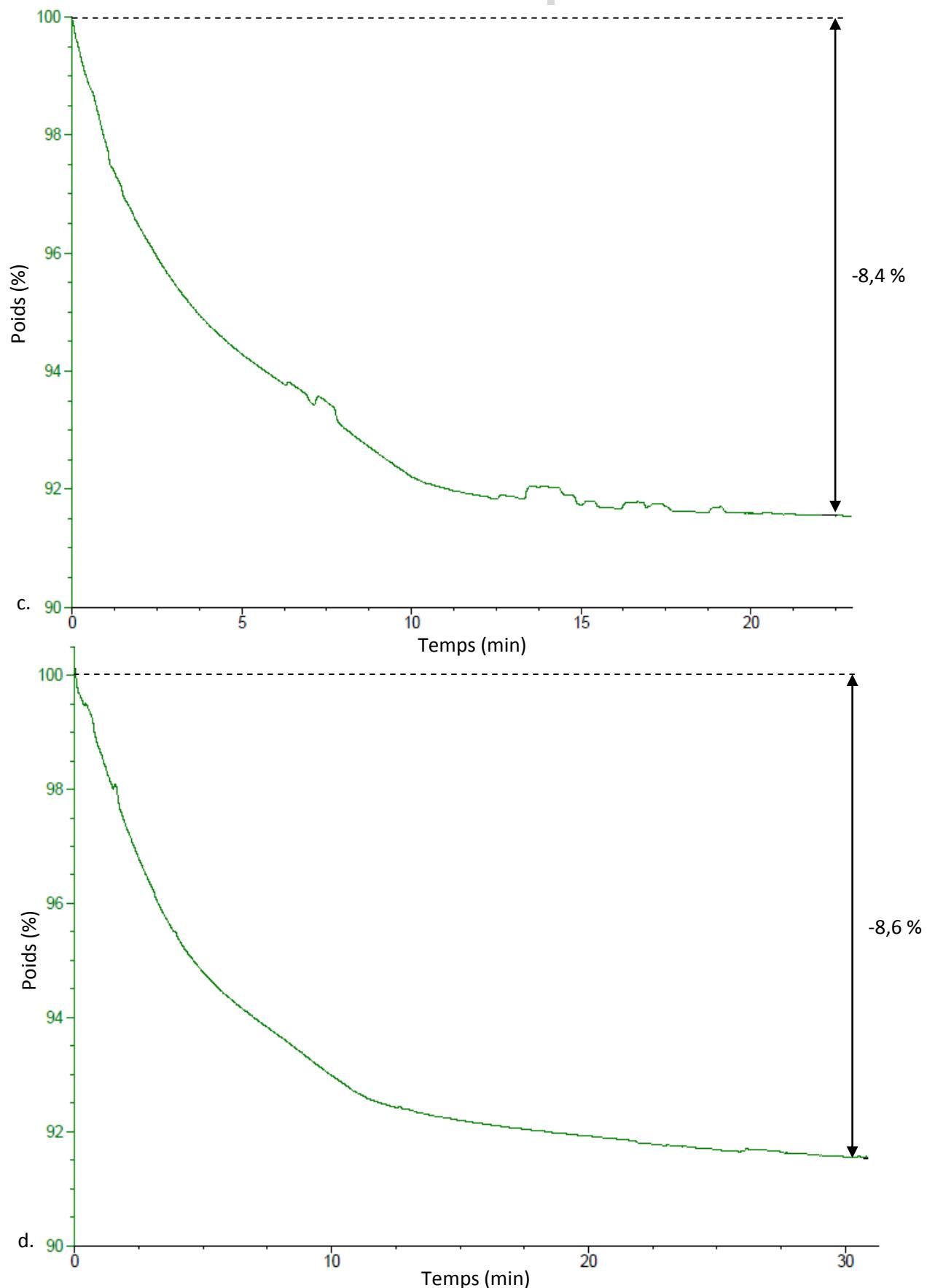


Figure 42 : Graphiques résultant de l'analyse thermogravimétrique : a. Formule nue HPC/alginate PG/PA ; b. Formule de type cœur-couronne HPC/alginate PG/PA-HP55S® ; c. Formule nue HPMC/alginate PG/PA ; d. Formule de type cœur-couronne HPMC/alginate PG/PA-HP55S®

Les graphiques de la Figure 42 montrent pour chaque formule, la quantité de solvant qui a pu être évaporée. Cette perte se situe entre 8,4 et 8,5 % de l'échantillon d'atomisat pour les formules nue et de type cœur-couronne d'HPMC. Elle n'est que de 4,5 % à 5,2 % pour les formules équivalentes d'HPC. Le méthanol, l'éthanol, le DCM ou l'eau se trouvent donc à l'état de trace résiduelle dans les quatre atomisats.

### III. DISCUSSION

En vue de libérer un PA tout le long de l'intestin, la conception d'une formule à libération prolongée et mucoadhésive est étudiée. Lors de la recherche bibliographique, 11 polymères ont été retenus. Parmi ceux-ci se trouvent des polysaccharides, des dérivés acryliques ou des dérivés de cellulose. A partir de cette première sélection, 13 atomisats en mélange binaire PA/polymère ont été réalisés puis évalués. Il s'agit d'une étude préliminaire permettant de sélectionner les polymères les plus intéressants afin d'envisager une association. Les critères retenus sont la compatibilité avec la technique d'obtention des particules et les caractéristiques des atomisats ainsi réalisés. Par la suite, les polymères ayant montré les meilleurs résultats ont été associés dans une particule nue ou de type cœur-couronne en vue d'optimiser ses caractéristiques *via* une synergie des polymères.

D'un point de vue procédé, l'amidon modifié (Amylo® N-460) et la gomme gellane (Kelcogel®), en mélange binaire PA/polymère, montrent une certaine incompatibilité avec le principe d'atomisation. Ce constat se base sur les observations faites en cours de procédé, l'aspect de l'atomisat obtenu et leur teneur en PA. L'atomisation est en effet un procédé peu compatible avec les polysaccharides. Le processus peut conduire au désordre de la maille cristalline du sucre, à la formation de polymorphes ou pseudo-polymorphes et à la perte de la cristallinité de la macromolécule (Corrigan, 1995). L'évaporation rapide de l'eau lors de l'atomisation, produit un matériau alors amorphe. Le caractère collant des gouttelettes créées peut être prédict par une étude de la température de transition vitreuse (Adhikari *et al.*, 2005). Le poly(méthyle acrylate-éthyle acrylate) (Eudragit® L100-55) à 10 % (m/v) dans la solution à atomiser a également montré des difficultés et l'atomisat obtenu est de type floconneux, aux deux températures testées (75°C et 110°C). Cependant, après dilution au demi, la solution a pu être atomisée sans autre

contrainte. En ce qui concerne les autres composites binaires, aucune difficulté n'a été rencontrée et le dosage en PA correspond à la théorie.

D'un point de vue caractérisation, tous les atomisats réalisés pour le criblage des polymères ont été dosés et analysés en termes de mucoadhésivité, de cinétique de libération du PA, de morphologie (imagerie MEB) et d'état cristallin du PA (DRX).

Les diffractogrammes obtenus par DRX permettent d'étudier l'état physique du PA dans les composites. Les spectres obtenus pour les différents atomisats binaires ont été comparés au spectre obtenu pour les cristaux de PA utilisé. Les pics de diffraction liés à la structure cristalline initiale du PA ne sont retrouvés dans aucun des spectres des composites. Le PA se trouve donc à l'état amorphe dans les particules des atomisats. Ceci peut s'expliquer par la rapidité du processus de séchage employé. En effet, l'évaporation du solvant, lors de l'atomisation, est presque instantanée, ce qui laisse peu de chance aux molécules de recristalliser (Gharsallaoui, 2007). L'observation faite au MEB permet de comparer la morphologie des atomisats entre eux et celle du PA, initialement à l'état cristallin. Les cristaux de PA se présentent sous forme d'aiguilles allant jusqu'à 100 µm de long tandis que les particules d'atomisat sont toutes plus ou moins sphériques et leur diamètre ne dépasse pas 20 µm. L'imagerie MEB ne montre donc pas plus de cristaux de PA que la DRX n'en a révélés.

Parmi les polysaccharides, l'amidon modifié, l'alginate PG (Kelcoloïd®) et la gomme gellane ont été testés sous forme d'atomisat binaire PA/polymère. Selon les résultats obtenus lors des essais de dissolution, tous trois montrent une cinétique de libération de type libération immédiate. En ce qui concerne l'atomisat composé d'alginate PG, une reprécipitation du PA dans le milieu de dissolution intervient au changement de pH. Ceci peut être expliqué par deux phénomènes. D'une part une recristallisation du PA. En effet, celui-ci possède deux fonctions

basiques dont les pKa sont de 3,5 et 7,4. A pH 2 les deux fonctions sont donc protonnées alors qu'une seule ne l'est à pH 6,8 expliquant ainsi la diminution de la solubilité. D'autre part, le polymère est également soluble à pH acide. Lorsque le milieu est alcalinisé, la solubilité du polymère diminue elle aussi. Par ailleurs, au vu de la gélification observée lors des essais de mucoadhésivité, il est possible que le polysaccharide ait partiellement gélifié en piégeant du PA. Ces agrégats ont ensuite été retenus sur le filtre, lors des prélèvements automatiques, faussant ainsi la mesure. Enfin, le pouvoir mucoadhésif des trois atomisats constitués de polysaccharides a été évalué par texturométrie. Sur ce critère, les résultats ne se rejoignent pas. Alors que l'amidon modifié et la gomme gellane présentent une mucoadhésion non significativement différente du témoin négatif, des résultats encourageants ont été obtenus pour l'alginate PG. Les photos prises après test montrent ainsi une gélification de la formule et laisse présager de bonnes propriétés mucoadhésives *in vivo*.

Parmi les dérivés acryliques, le poly(méthyle acrylate-éthyle acrylate), le carbomère (Carbopol® 980 NF) et le polycarbophil (Noveon® AA1) ont été étudiés. Les trois polymères ont répondu à la problématique de libération prolongée. En effet, les solutions de polyméthacrylate à 10 %, de carbomère et de polycarbophil ont permis de modifier la libération du PA lors des essais de dissolution mis en place. Il est intéressant de constater un comportement différent entre la solution à atomiser à 5 et à 10 % (m/v) de polyméthacrylate, bien que le ratio PA/polymère soit le même et que dans les deux conditions, le PA soit amorphe. Dans le premier cas, la cinétique de libération traduit un comportement pH-dépendant mais non qualifiable de gastro-résistant, tandis que dans la seconde situation, le profil est de type LP et ce, quelle que soit la température  $T_{in}$  employée (75°C ou 110°C). Deux observations peuvent permettre d'expliquer cette différence. La solution de départ étant plus diluée, les contacts entre les molécules de PA et de polymère sont plus

limités et lors de l'atomisation les deux molécules peuvent se retrouver non intimement liées. Le PA est alors moins retenu que pour les atomisats à 10 % (m/v). Par ailleurs, l'aspect de la poudre peut aussi être mis en cause. Les poudres floconneuses obtenues avec les solutions concentrées semblent avoir une moins bonne mouillabilité. En termes de mucoadhésion, le comportement des formules à base de polyméthacrylate varie à nouveau en fonction de la concentration de la solution atomisée. Alors que l'atomisat réalisé à partir de la solution à 5 % (m/v) montre une mucoadhésion supérieure à celle du témoin négatif, celle des deux autres poudres reste inférieure au témoin. L'hypothèse d'une mouillabilité différente pourrait expliquer cette observation. L'étude de la mucoadhésion du PA atomisé seul et du polymère atomisé seul pourrait être pertinente en vue d'expliquer davantage ces constatations. En ce qui concerne le carbomère, il a montré des propriétés mucoadhésives intéressantes avec une aire sous la courbe plus importante que celle du témoin négatif ou du blanc. Le polycarbophil ne sera en revanche pas retenu selon ce critère.

La dernière catégorie de polymère investiguée concerne les dérivés de cellulose. Parmi eux, l'HPMC acétate succinate (Aqoat® AS-HF), deux dérivés phtalate d'HPMC (HP55® et 55S®), l'HPC (Klucel® EXF) et l'HPMC (Méthocel® K4M) ont été étudiés. Selon les essais de dissolution, l'HPMC acétate succinate n'est pas parvenu à modifier la libération du PA comme souhaité et suit une cinétique de libération de type libération immédiate. En revanche, les dérivés phtalate ont conféré un comportement pH-dépendant intéressant aux atomisats binaires. Selon la Pharmacopée Européenne, une formule peut être qualifiée de gastro-résistante lorsque moins de 20 à 30 % de la dose de PA est libérée pendant 1 à 2 heures à pH acide. Cette notion ne peut donc pas être employée dans le cas présent mais ce comportement pH-dépendant pourrait être optimisé. Une piste envisageable serait l'obtention d'une forme cristalline du PA dans la particule polymère ou une augmentation de la proportion de polymère par

rapport à la dose de PA. L'HPC et l'HPMC ont permis, quant à eux, d'obtenir une cinétique de libération sur plus de 8 heures. Ils répondent donc parfaitement au critère de libération prolongée voulu pour le projet. Pour l'HPMC, une matrice gonflée et gélifiée a été retrouvée à la fin de l'essai. Cette gélification est d'autant plus intéressante que la formation *in situ* d'un hydrogel a montré un grand intérêt en matière de mucoadhésion (Peppas et Sahlin, 1996, Shalaby *et al.*, 1992, Peppas et Kavimandan, 2006). Selon le critère de mucoadhésion, l'HPMC AS et l'HP55<sup>®</sup> ne seront pas retenus. En revanche, les trois autres polymères confèrent aux composites binaires correspondants d'intéressantes propriétés mucoadhésives.

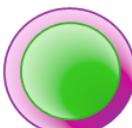
L'interprétation des résultats obtenus par texturométrie s'est faite conjointement avec les graphiques, les pics d'adhésion, les aires sous la courbe et les observations visuelles. Cette compilation d'informations est d'autant plus importante qu'elle peut permettre d'expliquer, par exemple, pourquoi le stéarate de magnésium montre une mucoadhésion d'après l'aire sous la courbe, alors que la poudre est réputée hydrophobe et qu'elle est essentiellement utilisée dans l'industrie pharmaceutique pour ses propriétés lubrifiantes. En effet, lors de l'essai, l'échantillon de stéarate de magnésium s'est colmaté sur la partie mobile et a été recouvert de mucus. Le travail d'adhésion mesuré a donc été davantage dû au mucus emporté qu'au stéarate de magnésium lui-même. En ce qui concerne les atomisats binaires, il en ressort deux polymères faisant l'unanimité : l'alginate PG et l'HPMC. Toutefois, il faut bien prendre en compte qu'il s'agit d'un test *in vitro* connaissant des limites. D'une part, les conditions *in vivo* comme la température ou le flux des fluides biologiques, ne sont pas mimées. D'autre part, les pièces biologiques utilisées varient d'un individu à l'autre et d'une portion intestinale à l'autre. Les résultats observés ne permettent donc qu'une première estimation et ne se substituent en rien à une étude *in vivo*. Cependant, les

différents critères évalués lors du test ont plutôt tendance à concorder et à donner de bons résultats pour les mêmes polymères.

A l'issue de l'interprétation des résultats obtenus lors du criblage des polymères, l'amidon modifié, la gomme gellane, et le polyméthacrylate atomisé à partir d'une solution à 10 % (m/v) sont écartés pour leur incompatibilité avec le procédé et des résultats peu satisfaisants en termes de cinétique de libération et de mucoadhésion. L'HP55<sup>®</sup>, le polycarbophil et l'HPMC AS ne sont pas retenus non plus compte tenu de leur faible mucoadhésion lors du test *in vitro*. En revanche, le carbomère, l'HPC et l'HPMC ont montré des propriétés mucoadhésives intéressantes, couplées à un comportement LP. Les deux derniers ayant une cinétique de libération davantage ralentie que le premier, ils sont sélectionnés pour la suite de ces travaux. Le polyméthacrylate atomisé à partir d'une solution à 5 % (m/v) a également retenu notre attention au vu de son comportement pH-dépendant, lors des essais de dissolution, et de ses propriétés mucoadhésives mises en évidence par texturométrie. Cependant, ces résultats ne sont pas aussi intéressants que l'HP55S<sup>®</sup>. De ce fait, le polyméthacrylate ne sera pas sélectionné pour l'optimisation de la formule, contrairement au dérivé phtalate d'HPMC et à l'alginate PG, suite aux résultats concluants de mucoadhésion. L'alginate étant de nature polysaccharidique, il pourrait être utilisé pour permettre la libération du PA jusque dans le colon, grâce à sa sensibilité à la dégradation enzymatique (Shukla et Tiwari, 2012).

Les quatre polymères sont donc associés dans quatre nouvelles formules, donnant, en théorie les morphologies décrites dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Morphologies théoriquement attendues en fonctions des nouvelles associations réalisées et de la buse utilisée

	<b>Particule avec couronne d'HP55S® (buse ternaire)</b>	<b>Particule nue (buse binaire)</b>
<b>Cœur</b> <b>HPC/alginate PG/PA</b>		
<b>Cœur</b> <b>HPMC/alginate PG/PA</b>		

Les mêmes observations et analyses que pour le criblage des polymères sont réalisées sur ces nouvelles formules.

Lors du procédé d'atomisation des atomisats avec couronne d'HP55S®, les débits ont dû être diminués compte tenu d'une alimentation double en solution : l'une pour la coque, l'autre pour le cœur. Observant un dépôt liquide s'accumulant sur les parois de la chambre de séchage, la température  $T_{in}$  a aussi été modifiée dans certains cas. Elle a pu être augmentée entre 10 et 20°C, afin d'accélérer l'évaporation des solvants et résoudre ce problème. Le ratio PA/polymère conforme à la théorie (1:5 (PA/polymère) pour les morphologies de type cœur-couronne et 1:4 (PA/polymère) pour les formules nues) montre le bon déroulement du procédé d'atomisation et laisse penser que les formules sont bien compatibles avec la technique. Tout comme pour les atomisats binaires du criblage de polymères, et pour les mêmes raisons, l'analyse par DRX n'a pas montré de cristaux de PA dans les nouvelles formules. Les images obtenues par MEB ont révélé des sphères pleines ou vides et une distribution de taille polydisperse pour les deux atomisats d'HPC, nu ou supposé recouvert d'HP55S®, et l'atomisat HPMC/alginate PG/PA. Une morphologie un peu particulière a été observée pour l'atomisat HPMC/alginate PG/PA-HP55S®. Des particules irrégulières d'une vingtaine

de micromètres et renfermant d'autres particules d'un diamètre inférieur ont été mises en évidence. S'agit-il d'une coque d'HP55S® renfermant des particules d'HPMC/alginate PG/PA comme souhaité ou bien les deux solutions utilisées pour cette atomisation se sont-elles mélangées lors de leur pulvérisation simultanées, créant ainsi des coques d'HPMC/alginate PG/HP55S®/PA renfermant des particules de même composition ? Ceci est d'autant plus concevable que la cinétique de libération pH-dépendante espérée avec la coque d'HP55S® n'a pas été observée (Ce point est davantage discuté plus loin). Bien que les formules semblent compatibles avec le procédé d'atomisation, une optimisation de la technique devrait donc être mise en œuvre à l'aide d'un plan d'expérience dont les paramètres variants seraient la température d'entrée dans la chambre de séchage ( $T_{in}$ ), le débit des deux pompes d'alimentation, le débit d'air, la taille de la buse ou la concentration des solutions, compte tenu de l'incidence de ce dernier paramètre sur la qualité des atomisats de poly(méthyle acrylate-éthyle acrylate). En outre, l'incorporation d'un marqueur dans la coque et/ou dans le cœur pourrait permettre de statuer sur le mélange éventuel des solutions en cours d'atomisation. Un fluorophore pourrait être utilisé en lieu et place du PA afin d'identifier sa position et l'homogénéité de sa répartition au sein de la particule, grâce à une observation au microscope confocal. Il faut toutefois noter que la nature et les affinités différentes de ces deux molécules peuvent éventuellement intervenir et avoir des répercussions sur leur emplacement dans l'atomisat ou, à plus grande échelle, sur les propriétés fonctionnelles de la formule.

Concernant les propriétés fonctionnelles de ces nouveaux atomisats, justement, les essais de dissolution ont montré des profils de libération prolongée du PA sur 8 heures ou plus pour les formules nues à base d'HPC ou d'HPMC ainsi que pour la formule complexe d'HPMC. La formule complexe d'HPC ayant montré une cinétique de type libération immédiate, son intérêt dans le projet peut être remis en question. Cependant, savoir

expliquer la perte des propriétés LP de l’HPC et l’absence de comportement pH-dépendant attendu avec l’HP55S<sup>®</sup>, pourrait permettre d’avancer dans la problématique. Est-ce la conséquence d’un mélange de polymères en proportions relatives inadéquates ou d’une incompatibilité de l’HPC et de l’alginat PG avec l’HP55S<sup>®</sup>? Ce dernier s’est-il bien déposé en surface de la particule ou s’est-il incorporé dans le cœur ? Par ailleurs, les écart-types plus importants pour cette formule que pour les trois autres, lors du changement de pH, traduisent un comportement plutôt hétérogène de l’atomisat HPC/alginate PG/PA. De manière générale, le comportement pH-dépendant souhaité pour les formules de type cœur-couronne n’est pas observé. En outre, les profils de libération du PA des deux formules d’HPMC se superposent. Comment expliquer cette similarité ? Le PA se trouverait-il en surface et sa libération immédiate masquerait-elle la sensibilité de la particule aux fluctuations du pH ? Le ratio choisi est-il insuffisant ou les paramètres d’atomisation seraient-ils inappropriés ? Selon cet essai de dissolution, le seul point qui diffère entre la formule nue d’HPMC et son équivalent comportant de l’HP55S<sup>®</sup>, est l’aspect de la matrice gélifiée récupérée au bout de 480 minutes. La matrice semble faite d’un seul bloc pour la formule nue tandis qu’elle se désagrège pour la seconde formule. La présence d’HP55S<sup>®</sup> permettrait-elle d’individualiser les microparticules ? Si cela se confirme, cette caractéristique pourrait répondre de manière pertinente à la problématique initiale, un système divisé étant plus approprié pour optimiser le contact en termes de surface. Pour répondre à toutes ces questions, il serait donc nécessaire de poursuivre les investigations.

Selon l’essai par texturométrie, le pouvoir mucoadhésif est augmenté pour les formules à base d’HPMC, par rapport à l’atomisat binaire HPMC/PA. Toutefois, il est surprenant d’observer une similarité du comportement des deux formules, malgré la présence d’HP55S<sup>®</sup> dans l’une. Le polymère serait-il en quantité trop faible pour influencer la mucoadhésion de l’atomisat ? En ce qui concerne les formules à base d’HPC, les conclusions

sont tout autres. Pourquoi l'association HPC/alginate PG diminue-t-elle le pouvoir mucoadhésif au lieu de le potentialiser ? S'agit-il, là aussi, d'une incompatibilité des polymères entre eux ? D'après ce critère mucoadhésif, l'HPC perd donc de son intérêt et l'HPMC confirme sa pertinence dans l'étude. Cependant, il serait pertinent de poursuivre l'étude des formules d'HPC afin de comprendre ce qui a pu engendrer la dégradation des propriétés de certains atomisats.

Une autre technique *in vitro* a été tentée pour évaluer la mucoadhésion des nouvelles formules. Il s'agit de la technique du sac retourné, mise au point en 1999 par l'équipe de Santos (Santos *et al.*, 1999). L'essai n'a pas été concluant, dans les conditions expérimentales utilisées. En effet, la mouillabilité limitée de la poudre dans la solution de Krebs-Ringer a restreint le contact des formules avec la muqueuse intestinale, ne permettant pas une mesure pertinente de l'interaction entre la formulation et le support biologique. La solution Krebs-Ringer a été sélectionnée dans l'essai pour sa capacité à conserver la viabilité des cellules de l'échantillon d'intestin. Une nouvelle tentative pourrait être mise en œuvre avec un milieu assurant le même rôle pour le tissu mais offrant aux atomisats une meilleure mouillabilité (milieux biorelevants : SGF, FeSSIF, FaSSIF). *In vivo*, les sels biliaires entre autres, pourraient améliorer la mouillabilité de la poudre et permettre une meilleure interaction avec la muqueuse.

Les composants intervenant dans la fabrication des microparticules peuvent aussi être discutés. Pour des raisons de solubilité, certaines solutions à atomiser ont en effet été réalisées dans des solvants organiques. D'après la directive européenne Q3C, issue de l'*International Conference of Harmonization*, le DCM et le méthanol appartiennent à la classe 2 et l'éthanol à la classe 3. Les solvants de la classe 2 montrent une certaine toxicité et leur présence dans la formulation finale devra être limitée (Exposition Journalière Admissible, ou *Permitted Daily Exposure*, en anglais) à 0,1 mg par jour. La classe 3 regroupe les solvants organiques les moins toxiques et présentant peu de risque pour la santé

du patient. Une dose maximale de 50 mg par jour est acceptable (ICH, 2011 ; Snodin et McCrossen, 2012). La quantification des traces résiduelles de solvant organique est donc un élément pertinent dans l'étude menée. L'eau résiduelle dans le composite peut aussi impacter l'évaluation des qualités de l'atomisat, à commencer par le rendement. L'analyse thermogravimétrique réalisée sur les quatre formules optimisées révèle en effet la présence de solvant, organique ou aqueux, qui peut aller de 4,5 à 8,6 % de la masse totale. Cette technique, en revanche, ne permet pas d'identifier les solvants en question ni de préciser leur proportion exacte, les uns par rapport aux autres. Il serait par conséquent intéressant d'étudier les traces résiduelles de solvants par RMN liquide, une technique qui pourrait fournir ces données manquantes. Malheureusement, faute de temps, ceci n'a pas pu être réalisé. Enfin, l'un des composants de la formule est un dérivé phtalate. Or, la communauté scientifique a constaté un lien entre la baisse de la fertilité *via* une toxicité testiculaire et les phtalates, durant la dernière moitié du vingtième siècle (Latini *et al.*, 2006). Leur toxicité aigüe est jugée faible (LD50 comprise entre 1 et 30 g/kg de masse corporelle ou plus). Cependant, à court et long terme, des effets indésirables et dose-dépendants ont été observés au niveau du foie, des reins et, pour certains composés, au niveau de la thyroïde. Ils restent tous non mutagènes et non génotoxiques mais nécessitent une surveillance. Si le composant est amené à faire partie de la formulation, il faudra donc quantifier la proportion de phtalate libre présente dans l'HP55S® d'abord, puis dans l'atomisat, et la relativiser par rapport à la dose efficace en PA afin de déterminer la dose journalière d'exposition pour le patient.

Une seule formule ressort donc de la seconde partie de l'étude, portant sur l'association de deux ou trois polymères dans une même particule. Il s'agit du composite HPMC/alginate PG/PA-HP55S®, pour lequel une morphologie particulière des particules, une cinétique de libération du PA prolongée et un caractère mucoadhésif supérieur à celui mesuré pour

l'association binaire HPMC/PA ont pu être observés. Ceci pourrait être la conséquence d'une synergie des polymères, améliorant les propriétés des l'atomisats binaires. Cependant, de nombreux points concernant des anomalies observées ou l'optimisation du procédé, entre autres, restent à éclaircir. Ces travaux offrent donc une multitude de possibilités d'investigation à poursuivre...

# **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

Cibler la libération d'un PA au niveau de l'intestin, sans promotion de l'absorption est une stratégie envisagée par les scientifiques pour des pathologies locales de l'intestin, telles que le cancer colorectal, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ou les colites recto-hémorragique, entre autres. Les Laboratoires SERVIER se sont intéressés à cette technologie au travers d'une étude menée sur six mois. L'objectif visé a été la mise au point d'une formule pharmaceutique capable de cibler l'intestin et de permettre d'établir et de maintenir une concentration locale efficace en PA tout en préservant le pool sanguin. Des équipes scientifiques confrontées à une problématique similaire ont travaillé sur des systèmes mucoadhésifs et/ou à libération prolongée utilisant des formulations à base de polymères (Milojevic *et al.*, 1996, Dodou *et al.*, 2005, McConnell *et al.*, 2008, Shukla et Tiwari, 2012). Les polymères, qui ont été retenus pour cette étude, ont montré dans la littérature, l'une ou l'autre ou les deux caractéristiques. Il s'agit de l'amidon modifié (Amylo® N-460), de l'HPMC AS (Aqoat® AS-HF), d'un carbomère (Carbopol® 980 NF), d'un polyméthacrylate (Eudragit® L100-55), de deux dérivés phtalate d'HPMC (HP55® et HP55S®), de la gomme gellane (Kelcogel®), de l'alginate PG (Kelcoloid®), de l'HPC (Klucel® EXF), de l'HPMC (Méthocel® K4M) et du polycarbophil (Noveon® AA1). Selon la littérature encore, une formule dispersée et capable de se convertir *in situ* en hydrogel pourrait permettre d'optimiser le contact, en termes de temps et de surface, avec la muqueuse. C'est donc cette stratégie qui a été choisie et 13 composites binaires PA/polymère ont été obtenus par atomisation. A l'issue de la caractérisation de ces atomisats, quatre polymères ont été retenus : l'HPC, l'HPMC, l'alginate PG et l'HP55S®. Ils se sont en effet illustrés en termes de modulation de la libération du PA et/ou de mucoadhésion, lors du criblage des polymères. Dans une seconde partie de l'étude, ces quatre polymères ont été associés. L'alginate PG a été mélangé à l'HPC ou l'HPMC en vue de décupler le pouvoir mucoadhésif de ces polymères, eux-mêmes sélectionnés pour contrôler la libération du PA. Des mélanges d'HPC/alginate PG/PA et d'HPMC/alginate PG/PA (8:4:3) ont ainsi été

atomisées seuls ou avec une solution d'HP55S®. Cette dernière est supposée recouvrir les particules et leur conférer un comportement pH-dépendant et mucoadhésif. La particule aurait alors la capacité de résister au pH acide de l'estomac, d'adhérer aux muqueuses intestinales et de libérer progressivement le PA tout le long de l'intestin. Les particules ternaires nues ont été préparées avec une buse binaire et exhibent un ratio PA/polymère final (1:4). Les particules ternaires supposées de type cœur-couronne ont été préparées avec une buse ternaire et montrent un ratio PA/polymère final (1:5). La caractérisation de ces quatre nouvelles formules a permis de mettre en évidence l'une d'elle. L'atomisat d'HPMC/alginate PG/PA-HP55S® a en effet montré une cinétique de libération ralentie et un pouvoir mucoadhésif amélioré par rapport au composé binaire d'HPMC/PA. De plus, les particules observées au MEB ont montré une morphologie un peu particulière. Il pourrait s'agir d'une association de type cœur-couronne comme souhaité. De plus ample informations, notamment sur la composition des différentes parties de la particule, seraient cependant nécessaires pour statuer de manière plus tranchée sur cette particularité.

Ces six mois d'étude ont donc permis d'identifier une formule qui pourrait répondre à la problématique de départ. Il reste toutefois quelques points à éclaircir et des paramètres à optimiser. Une analyse par RMN liquide, l'observation de l'atomisat par microscopie confocale en présence d'un fluorophore ou l'application d'un plan d'optimisation du procédé devront être, entre autres, les prochains axes d'étude à mener. Une fois ceci réalisé, la poudre devra être qualifiée selon ses propriétés primaires (solubilité, teneur en eau, hygroscopie, masse volumique vraie), secondaires (distribution granulométrique, surface spécifique, porosité intra- et interparticulaire, masse volumique apparente) et fonctionnelles (aptitude à l'écoulement, à la densification, à l'acquisition de cohésion, comprimabilité, lyodisponibilité et biodisponibilité) (Wehrlé, 2007). Comme la revue bibliographique a pu le montrer, la porosité et la

mouillabilité de la poudre ont un impact significatif sur le pouvoir mucoadhésif de la formule. Ce seront donc deux autres paramètres auxquels il faudra s'intéresser. La nature de la molécule active influençant significativement le comportement de la formulation, il faudra sélectionner un candidat compatible avec la formule, ayant l'activité pharmacologique souhaitée, une solubilité et une absorption limitées lui permettant de pénétrer plus ou moins dans les cellules d'intérêt, sans atteindre le pool sanguin. Le système devrait alors être en mesure de vectoriser un PA, de contrôler et de prolonger sa libération tout le long de l'intestin. La formulation ainsi conçue répondrait alors parfaitement à la problématique de départ.

# BIBLIOGRAPHIE

- Adhikari B., Howes T., Lecomte D., Bhandari B.R., 2005. A glass transition temperature approach for the prediction of the surface stickiness of a drying droplet during spray-drying. *Powder Technol.*, 149, 168-179.
- Andrews G.P., Laverty T.P., Jones D.S., 2009. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 71, 505-518.
- Asane G.S., Rao Y.M., Bhatt J.H., Shaikh K.S., 2011. Optimization, Characterisation and Pharmacokinetic Studies of Mucoadhesive Oral Multiple Unit Systems of Ornidazole. *Sci. Pharm.*, 79, 181-196.
- Barett-Bee K., Bedford G., Loftus P., 1982. The use of high-resolution carbon 13 NMR in the study of mucus. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 144, 109-111.
- Bernkop-Schnürch A., 2005. Thiomers: a new generation of mucoadhesive polymers. *Adv. Drug Del. Rev.*, 57, 1569-1582.
- Bernkop-Schnürch A., Gabor F., Szostak M.P., Lubitz W., 1995. An adhesive drug delivery system based on K99-fimbriae. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 3, 293-299.
- Bernkop-Schnürch A., Steininger S., 2000. Synthesis and characterisation of mucoadhesive thiolated polymers. *Int. J. Pharm.*, 194, 239-247.
- Bhattarai N., Gunn J., Zhang M., 2010. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv. Drug Del. Rev.*, 62, 83-99.
- Bigucci F., Luppi B., Carchiara T., Sorrenti M., Bettinetti G., Rodriguez L., Zecchi V., 2008. Chitosan/pectin polyelectrolyte complexes: Selection of suitable preparative conditions for colon-specific delivery of vancomycin. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 35, 435-441.
- Bodmeier R., Paeratakul O., 1991. A novel multiple-unit sustained release indomethacin-hydroxypropyl methylcellulose delivery system prepared by ionotropic gelation of sodium alginate at elevated temperatures. *Carbohydr. Polym.*, 16, 399-408.
- Carelli V., di Colo G., Nannipieri E., Poli B., Serafini M.F., 2000. Polyoxyethylenopoly(methacrylic acid-co-methyl methacrylate) compounds for site-specific peroral delivery. *Int. J. Pharm.*, 202, 103-112.
- Ch'ng H.S., Park H., Kelly P., Robinson J.R., 1985. Bioadhesive polymers as platforms for oral controlled drug delivery: II. Synthesis and evaluation of some swelling, water-insoluble bioadhesive polymers. *J. Pharm. Sci.*, 74, 399-405.
- Charoenthai N., Kleinebudde P., Puttipipatkhachorn S., 2007. Use of Chitosan-Alginate as Alternative Pelletization Aid to Microcrystalline Cellulose in Extrusion/Spheronization. *J. Pharm. Sci.*, vol. 96, 9, 2469-2484.
- Chickering D.E., Mathiowitz E., 1995. Bioadhesive microspheres: a novel electrobalance-based method to study adhesive interactions between individual microspheres and intestinal mucosa. *J. Contr. Rel.*, 34, 251-261.
- Chung B.H., Cha B.J., Peppas N.A., 1988. Effects of gum on physical properties of oral adhesive tablets. *J. Kor. Pharm. Sci.*, 18, 5-8.
- Clear N.J., Milton A., Humphrey M., Henry B.T., Wulff M., Nichols D.J., Anziano R.J., Wilding I., 2001. Evaluation of the Intelisite capsule to deliver theophylline and frusemide tablets to the small intestine and colon. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 13, 375-384.
- Collaud S., Warloe T., Jordan O., Gurny R., Lange N., 2007. Clinical evaluation of bioadhesive hydrogels for topical delivery of hexylaminolevulinate to Barrett's esophagus. *J. Contr. Rel.*, 123, 203-210.
- Corrigan O.I., 1995. Thermal analysis of spray dried products. *Thermochim. Acta*, 248, 245-258.
- Davis S.S., 2005. Formulation strategies for absorption windows. *Drug Discov. Today*, 10, 249-257.
- Derjaguin B.V., Toporov Y.P., Mueller V.M., Aleinikova I.N., 1977. On the relationship between the electrostatic and the molecular component of the adhesion of elastic particles to a solid surface. *J. Colloid Interf. Sci.*, 58, 528-533.

- Dodou D., Breedveld P., Wieringa P.A., 2005. Mucoadhesives in the gastrointestinal tract: revisiting the literature for novel applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 60, 1-16.
- Duchêne D., Ponchel G., 1992. Principle and investigation of the bioadhesion mechanism of solid dosage forms. *Biomaterials*, 13, 709-714.
- Duchêne D., Ponchel G., 1997. Bioadhesion of solid oral dosage forms, why and how ? *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 44, 15-23.
- Ensign L.M., Cone R., Hanes J., 2012. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: the gastrointestinal mucus barriers. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 64, 557-570.
- European Pharmacopoeia, seventh ed.
- Falson-Rieg F., Faivre V., Pirot F., 2004. Nouvelles formes médicamenteuses. Paris : Tec & Doc Cachan : Ed. médicales internationales, 1-24.
- Fawcett D.W., Jersh R.P., Salzmann J.-L., 2002. Histologie : L'essentiel. Paris : Maloine, 477 p.
- Gharsallaoui A., Roudaut G., Chambin O., Voilley A., Saurel R., 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Res. Int.*, 40, 1107-1121.
- Glavas Dodov M., Calis S., Crcarevska M.S., Geskovski N., Petrovska V., Goracinova K., 2009. Wheat germ agglutinin-conjugated chitosan-Ca-alginate microparticles for local colon delivery of 5-FU: Development and *in vitro* characterization. *Int. J. Pharm.*, 381, 166-175.
- Grabovac V., Guggi D., Bernkop-Schnürch A., 2005. Comparison of the mucoadhesive properties of various polymers. *Adv. Drug Del. Rev.*, 57, 1713-1723.
- Hägerström H., Paulsson M., Edsman K., 2000. Evaluation of mucoadhesion for two polyelectrolyte gels in simulated physiological conditions using a rheological method. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 9, 301-309.
- Huang B.-B., Li G.-F., Luo J.-H., Duan L., Nobuaki K., Akira Y., 2008. Permeabilities of rebamipide *via* rat intestinal membranes and its colon specific delivery using chitosan capsule as a carrier. *World J. Gastroenterol.*, vol. 14, 31, 4928-4937.
- ICH Q3C (R5), 2011. Guideline for Residual Solvents.
- Ishida M., Machida Y., Nambu N., Nagai T., 1981. New mucosal dosage form of insulin. *Chem. Pharm. Bull.*, 29, 810-816.
- ISP, 2005. Pharmaceuticals Product Guide.
- Kearney P., Kellaway I.W., Evans J.C., Rowlands C., 1984. Probing the mucus barrier with spin labels. *J. Pharm. Pharmacol.*, 36, 26-30.
- Kockisch S., Rees G.D., Young S.A., Tsibouklis J., Smart J.D., 2001. A direct staining method to evaluate the mucoadhesion of polymers from aqueous dispersion. *J. Contr. Rel.*, 77, 1-6.
- Kockisch S., Rees G.D., Young S.A., Tsibouklis J., Smart J.D., 2003. Polymeric Microspheres for Drug Delivery to the Oral Cavity: An *In Vitro* Evaluation of Mucoadhesive Potential. *J. Pharm. Sci.*, vol. 92, 8, 1614-1623.
- Krauland A.H., Guggi D., Bernkop-Schnürch A., 2004. Oral insulin delivery: The potential of thiolated chitosan-insulin tablets on non-diabetic rats. *J. Contr. Rel.*, 95, 547-555.
- Latini G., Del Vecchio A., Massaro M., Verrotti A., De Felice C., 2006. Phthalate exposure and male infertility. *Toxicology*, 226, 90-98.
- Lehr C.-M., 2000. Lectin-mediated drug delivery: The second generation of bioadhesives. *J. Contr. Rel.*, 65, 19-29.
- Lehr C.-M., Bouwstra J.A., Boddé H.E., Juginger H.E., 1992. A surface energy analysis of mucoadhesion: contact angle measurements on polycarbophil and pig intestinal mucosa in physiologically relevant fluids. *Pharm. Res.*, 9, 70-75.
- Lejoyeux F., Poncel G., Wouessidjewe D., Peppas N.A., Duchêne D., 1989. Bioadhesive tablets, influence of the testing medium composition on bioadhesion. *Drug Del. Ind. Pharm.*, 15, 2037-2048.

- Leung S.-H.S., Robinson J.R., 1988. The contribution of anionic polymer structural features to mucoadhesion. *J. Contr. Rel.*, 5, 223-231.
- Lin Y.-H., Sonaje K., Lin K.M., Juang J.-H., Mi F.-L., Yang H.-W., Sung H.-W., 2008. Multi-ion-crosslinked nanoparticles with pH-responsive characteristics for oral delivery of protein drugs. *J. Contr. Rel.*, 132, 141-149.
- Lin W.-C., Yu D.-G., Yang M.-C., 2005. pH-Sensitive polyelectrolyte complex gel microspheres composed of chitosan/sodium tripolyphosphate/dextran sulfate: swelling kinetics and drug delivery properties. *Colloid Surface B*, 44, 143-151.
- Llabot J.M., Manzo R.H., Allemandi D.A., 2004. Drug release from carbomer: Carbomer sodium salt matrices with potential use as mucoadhesive drug delivery system. *Int. J. Pharm.*, 276, 59-66.
- Ludwig A., 2005. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Adv. Drug Del. Rev.*, 57, 1595-1639.
- Madsen F., Eberth K., Smart J.D., 1998. A rheological examination of the mucoadhesive/mucus interaction: the effect of mucoadhesive type and concentration. *J. Contr. Rel.*, 50, 167-178.
- Mahadevan U., 2007. Gastrointestinal medications in pregnancy. *Best Pract. Res. Cl. Ga.*, vol. 21, 5, 849-877.
- Makhlof A., Tozuka Y., Takeuchi H., 2009. pH-Sensitive nanospheres for colon-specific drug delivery in experimentally induced colitis rat model. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 72, 1-8.
- Marshall P., Snaar J.E.M., Ng Y.L., Bowtell R.W., Hampson F.C., Dettmar P.W., Meli C.D., 2001. A novel application of NMR microscopy: measurement of water diffusion inside bioadhesive bonds. *Magn. Reson. Imaging*, 19, 487-488.
- McConnell E.L., Short M.D., Basit A.W., 2008. An *in vivo* comparison of intestinal pH and bacteria as physiological trigger mechanisms for colonic targeting in man. *J. Contr. Rel.*, 130, 154-160.
- McGirr M.E.A., McAllister S.M., Peters E.E., Vickers A.W., Parr A.F., Basit A.W., 2009. The use of Intelisite® Companion device to deliver mucoadhesive polymers to the dog colon. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 36, 386-391.
- Mikos A.G., Mathiowitz E., Langer R., Peppas N.A., 1991. Interaction of polymer microspheres with mucin gels as a means of characterizing polymer retention on mucus. *J. Colloid Interf. Sci.*, 143, 366-373.
- Mikos A.G., Peppas N.A., 1988. Flory interaction parameter  $\chi$  for hydrophilic copolymers with water. *Biomaterials*, 9, 419-423.
- Milojevic S., Newton J.M., Cummings J.H., Gibson G.R., Botham R.L., Ring S.G., Stockham M., Allwood M.C., 1996. Amylose as a coating for drug delivery to the colon: Preparation and *in vitro* evaluation using glucose pellets. *J. Contr. Rel.*, 38, 85-94.
- Morishita M., Goto T., Nakamura K., Lowman A.M., Takayama K., Peppas N.A., 2006. Novel oral insulin delivery systems based on complexation polymer hydrogels: Single and multiple administration studies in type 1 and 2 diabetic rats. *J. Contr. Rel.*, 110, 587-594.
- Mortazavi S.A., Smart J.D., 1993. An investigation into the role of water movement and mucus gel dehydration in mucoadhesion. *J. Contr. Rel.*, 25, 197-203.
- Nguyen H.-N., Wey S.-P., Juang J.-H., Sonaje K., Ho Y.-C., Chuang E.-Y., Hsu C.-W., Yen T.-C., Lin K.-J., Sung H.-W., 2011. The glucose-lowering potential of exendin-4 orally delivered via a pH-sensitive nanoparticle vehicle and effects on subsequent insulin secretion *in vivo*. *Biomaterials*, 32, 2673-2682.
- Park K., Robison J.R., 1984. Bioadhesive polymers as platforms for oral controlled drug delivery: method to study bioadhesion. *Int. J. Pharm.*, 19, 107-127.
- Patel D., Smith A.W., Grist N., Barnett P., Smart J.D., 1999. An *in vitro* mucosal model predictive of bioadhesive agents in the oral cavity. *J. Contr. Rel.*, 61, 175-183.

- Patel D., Smith J.R., Smith A.W., Grist N., Barnett P., Smart J.D., 2000. An atomic force microscopy investigation of bioadhesive polymer adsorption onto human buccal cells. *Int. J. Pharm.*, 200, 271-277.
- Peppas N.A., Buri P.A., 1985. Surface, interfacial and molecular aspects of polymer bioadhesion on soft tissues. *J. Contr. Rel.*, 2, 257-275.
- Peppas N.A., Kavimandan N.J., 2006. Nanoscale analysis of protein and peptide absorption: Insulin absorption using complexation and pH-sensitive hydrogels as delivery vehicles. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 29, 183-197.
- Peppas N.A., Sahlin J.J., 1996. Hydrogels as mucoadhesive and bioadhesive materials: a review. *Biomaterials*, 17, 1553-1561.
- Pillai C.K.S., Paul W., Sharma C.P., 2009. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Prog. Polym. Sci.*, 34, 641-678
- Pinto J.F., 2010. Site-specific drug delivery systems within the gastro-intestinal tract: From the mouth to the colon. *Int. J. Pharm.*, 395, 44-52.
- Pithavala Y.K., Heizer W.D., Parr A.F., O'Connor-Semmes R.L., Brouwer K.L.R., 1998. Use of Intelisite® capsule to study ranitidine absorption from various sites within the human intestinal tract. *Pharm. Res.*, 15, 1869-1875.
- Ponchel G., Irache J.-M., 1998. Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract. *Adv. Drug Del. Rev.*, 34, 191-219.
- Ponchel G., Touchard F., Duchêne D., Peppas N.A., 1987. Bioadhesive analysis of controlled-release systems, fracture and interpenetration analysis in poly(acrylic acid)-containing systems. *J. Contr. Rel.*, 5, 129-141.
- Rathbonne M.J., Hadgraft J., 1991. Absorption of drugs from the human oral cavity. *Int. J. Pharm.*, 74, 9-24.
- Riley R.G., Smart J.D., Tsibouklis J., Young S.A., Hampson F., Davis A., Kelly G., Dettmar P.W., Wilber W.R., 2002. An *in vivo* model for investigating the gastric mucosal retention of <sup>14</sup>C-labelled poly(acrylic acid) dispersions. *Int. J. Pharm.*, 236, 87-96.
- Romero A.P., Caramella C., Ronchi M., Ferrari F., Chulia D., 1991. Water uptake and force development in an optimized prolonged release formulation. *Int. J. Pharm.*, 73, 239-248.
- Rouge N., Buri P., Doelker E., 1996. Drug absorption sites in the gastrointestinal tract and dosage forms for site-specific delivery. *Int. J. Pharm.*, 136, 117-139.
- Saettone M.F., Chetoni P., Torracca M.T., Burgalassi S., Giannaccini B., 1989. Evaluation of mucoadhesive properties and *in vitro* activity of opthalmic vehicles based on hyaluronic acid. *Int. J. Pharm.*, 51, 203-212.
- Säkkinen M., Marvola J., Kanerva H., Lindevall K., Ahonen A., Marvola M., 2006. Are chitosan formulations mucoadhesive in the human small intestine? An evaluation based on gamma scintigraphy. *Int. J. Pharm.*, 307, 285-291.
- Sakuma S., Sudo R., Suzuki N., Kikuchi H., Akashi M., Hayashi M., 1999. Mucoadhesion of polystyrene nanoparticles having surface hydrophilic polymeric chains in the gastro-intestinal tract. *Int. J. Pharm.*, 177, 161-172.
- Santos C.A., Jacob J.S., Hertzog B.A., Freedman B.D., Press D.L., Harnpicharnchai P., Mathiowitz E., 1999. Correlation of two bioadhesion assays: the everted sac technique and the CAHN microbalance. *J. Contr. Rel.*, 61, 113-122.
- Sashiwa H., Aiba S.-I., 2004. Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials. *Prog. Polym. Sci.*, 29, 887-908.
- Shalaby W.S.W., Blevins W.E., Park K., 1992. Use of ultrasound imaging and fluoroscopic imaging to study gastric retention of enzyme-digestible hydrogels. *Biomaterials*, 13, 289-296.
- Shukla R.K., Tiwari A., 2012. Carbohydrate polymers: Applications and recent advances in delivering drugs to the colon. *Carbohydr. Polym.*, vol. 88, 2, 399-416.
- Snodin D.J., McCrossen S.D., 2012. Guidelines and pharmacopoeial standards for pharmaceutical

impurities: Overview and critical assessment. *Reg. Toxicol. Parmacol.*, 63, 298-312.

Streubel A., Siepmann J., Bodmeier R., 2006. Drug delivery to the upper small intestine window using gastroretentive technologies. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 6, 501-508.

Tamburic S., Craig D.Q.M., 1997. A comparison of different in vitro methods for measuring mucoadhesive performance. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 44, 159-167.

Thibodeau G.A., Patton K.T., 2002. Anatomy and physiology. St. Louis, MO: Mosby, 1354-1372.

Vandamme T.F., Lenourry A., Charrueau C., Chaumeil J., 2002. The use of polysaccharides to target drugs to the colon. *Carbohydr. Pol.*, 48, 219-231.

Wang L., Khor E., Lim L.-Y., 2001. Chitosan-Alginate-CaCl<sub>2</sub> System for Membrane Coat Application. *J. Pharm. Sci.*, vol. 90, 8, 1134-1142.

Wehrlé P., 2007. *Pharmacie galénique : formulation et technologie pharmaceutique*. Paris : Maloine, 359 p.

Wirth M., Gerhardt K., Wurm C., Gabor F., 2002. Lectin-mediated drug delivery: influence of mucin on cytoadhesion of plant lectins in vitro. *J. Contr. Rel.*, 79, 183-191.

Woodley J.F., 2000. Lectins for gastrointestinal targeting – 15 years on. *J. Drug Target.*, 7, 325-333.

Woodley J., 2001. Bioadhesion, new possibilities for drug administration? *Clin. Pharmacokinet.*, 40, 77-84.

Wu, Z. M., Zhou, L., Guo, X. D., Jiang, W., Ling, L., Qian, Y., Luo, K. Q., Zhang, L. J., 2012. HP55-coated capsule containing PLGA/RS nanoparticles for oral delivery of insulin. *Int. J. Pharm.*, 425, 1-8.

Yang L.B., Chu J.S., Fix J.A., 2002. Colon-specific drug delivery: New approaches and in vitro /in vivo evaluation. *Int. J. Pharm.*, 235, 1-15.

Yu L.X., Crison J.R., Amidon G.L., 1996. Compartmental transit and dispersion model analysis of small intestinal transit flow in humans. *Int. J. Pharm.*, 140, 111-118.

# **TABLES DES ILLUSTRATIONS**

# I. Figures

FIGURE 1 : ANATOMIE DU TRACTUS GASTRO-INTESTINAL (THIBODEAU ET PATTEN, 2002).....	20
FIGURE 2 : PARAMETRES INHERENTS AU POLYMER INFLUENÇANT LA MUCOADHESION .....	24
FIGURE 3 : PRINCIPALES POSSIBILITES D'INTERACTION DE TYPE LIGAND-RECEPTEUR. (1) LIAISON DU CONJUGUE AVEC LES GLYCOPROTEINES DU MUCUS (CERCLES OUVERTS) OU DES MEMBRANES CELLULAIRES OU DES GLYCOLIPIDES (FLECHE NOIRE) ; (2) LIAISON AVEC UN LIGAND SPECIFIQUE DE LA SURFACE DE CERTAINES CELLULES (EX : CELLULES M) ; (3) RECONNAISSANCE PAR LES MUCINES SECRETEES A DES SITES SPECIFIQUES (EX : CELLULES CANCEREUSES) (PONCHEL ET IRACHE, 1998) .....	31
FIGURE 4 : ETUDE DE LA BIOADHESION PAR LA METHODE DU SAC RETOURNE (SANTOS ET AL., 1999) .....	36
FIGURE 5 : SCHEMA DU MONTAGE UTILISE POUR L'ETUDE DE LA BIOADHESION PAR LA TECHNIQUE DE LA GOUTTIERE (RILEY ET AL., 2002). .....	38
FIGURE 6 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU TEST DU CYLINDRE TOURNANT – C INDIQUE LE CYLINDRE, <i>IF</i> , LE FLUIDE INTESTINAL, <i>M</i> LA MUQUEUSE ET <i>T</i> LE COMPRIME (BERNKOP-SCHNÜRCH ET STEININGER, 2000).....	39
FIGURE 7 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA POSITION DE LA MICROPARTICULE DE POLYMER A LA SURFACE AIR-MUCUS - <i>D</i> EST LE DIAMETRE DE LA PARTICULE, <i>H</i> SA HAUTEUR, <i>Z</i> CORRESPOND A LA HAUTEUR DU MENISQUE, $\theta$ ET $\phi$ SONT DES ANGLES PERTINENTS (MIKOS ET AL., 1991) .....	40
FIGURE 8 : PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT DE LA BUSE TERNAIRE.....	50
FIGURE 9 : PROTOCOLE UTILISE POUR DOSER LE PRINCIPE ACTIF DANS LES ATOMISATS.....	51
FIGURE 10 : A. MONTAGE DE L'ECHANTILLON D'INTESTIN DE PORC SUR LE SUPPORT EN PLEXIGLAS ; B. MISE EN PLACE DU SUPPORT EN PLEXIGLAS SUR LA PLATEFORME DU TEXTUROMETRE AVANT LANCEMENT DU TEST .....	56
FIGURE 11 : SCHEMA DU RETOURNEMENT DE L'INTESTIN ET PHOTO CORRESPONDANT A CETTE ETAPE .....	57
FIGURE 12 : ECHANTILLON BIOLOGIQUE RETOURNE ET EMPLACEMENT DES LIGATURES .....	58
FIGURE 13 : SCHEMA ET PHOTO DU SAC FORME ET INTRODUIT DANS LE CONTENANT .....	58
FIGURE 14 : PHOTO DU MONTAGE, APRES AGITATION PENDANT 10 MINUTES AU TURBULA® .....	58
FIGURE 15 : CONTENANT, SANS LA PIECE BIOLOGIQUE, DANS LEQUEL EST DOSE LE PA .....	59
FIGURE 16 : ASPECTS DES TROIS ATOMISATS DE POLYMETHACRYLATE .....	62
FIGURE 17 : DIFFRACTOGRAMMES OBTENUS A PARTIR DES ATOMISATS BINAIRES PA/POLYMER ET COMPARES AU SPECTRE CARACTERISTIQUE DE LA FORME CRISTALLINE INITIALE DU PA .....	69
FIGURE 18 : EVOLUTION DE LA CONCENTRATION DU PA A 37°C EN CONDITION CRITIQUE D'ESSAI DE DISSOLUTION.....	70
FIGURE 19 : CINETIQUE DE LIBERATION DE TYPE LIBERATION IMMEDIATE - <i>N</i> =3 POUR CHAQUE POINT .....	71
FIGURE 20 : CINETIQUE DE LIBERATION DU PA A PARTIR DES ATOMISATS - PROFILS DE TYPE GASTRO-RESISTANT - <i>N</i> =3 POUR CHAQUE POINT.....	72
FIGURE 21 : CINETIQUE DE LIBERATION DU PA A PARTIR DES ATOMISATS - PROFILS DE TYPE LIBERATION PROLONGEE - <i>N</i> =3 POUR CHAQUE POINT.....	73
FIGURE 22 : PHOTOS DES MATRICES RESIDUELLES D'HPMC RECUPEREES EN FIN D'ESSAI DE DISSOLUTION : A. A <i>T</i> =0 ; B. A <i>T</i> =15 MINUTES.....	74
FIGURE 23 : TRAITEMENT DU GRAPHIQUE OBTENU PAR TEXTUROMETRIE : A. GRAPHIQUE COMPLET ; B. ZOOM SUR LA PARTIE NEGATIVE DE LA COURBE (ENCADREE EN ROUGE SUR LE GRAPHE A).....	75
FIGURE 24 : GRAPHIQUES MOYENNES OBTENUS APRES TROIS ESSAIS DE MUCOADHESIVITE : A. SANS FORMULE (BLANC) ; B. AVEC STEARATE DE MAGNESIUM (TEMOIN NEGATIF).....	76
FIGURE 25 : HISTOGRAMME REPRESENTANT LE CARACTERE MUCOADHESIF DES DIFFERENTES FORMULES BINAIRES – LA LIGNE ROUGE ET LE RECTANGLE ROSE EXPRIMENT RESPECTIVEMENT LA MOYENNE ET LES ECART-TYPES OBTENUS POUR LE TEMOIN NEGATIF.....	82
FIGURE 26 : ECHANTILLON RECUPERE SUR LE CYLINDRE MOBILE, APRES LE TEST DE MUCOADHESION REALISE AVEC LE STEARATE DE MAGNESIUM.....	83
FIGURE 27 : TEST DE MUCOADHESION DE L'ALGINATE PG (SUPPORT EN PLEXIGLAS, APRES TEST) .....	83
FIGURE 28 : ECHANTILLON RECUPERE SUR LE CYLINDRE MOBILE, APRES LE TEST DE MUCOADHESION REALISE AVEC L'ATOMISAT D'HPMC.....	83
FIGURE 29 : DEPOT LIQUIDE APPARU EN COURS D'ATOMISATION POUR LA FORMULE HPMC/ALGINATE PG/PA-HP55S® .....	86

FIGURE 30 : DE GAUCHE A DROITE, ATOMISATS COMPOSES DE : PARTICULES NUES A BASE D'HPC ; PARTICULES RECOUVERTES A BASE D'HPC ; PARTICULES NUES A BASE D'HPMC ; PARTICULES RECOUVERTES A BASE D'HPMC .....	87
FIGURE 31 : ATOMISAT CŒUR-COURONNE HPC/ALGINATE PG/PA-HP55S® (X 6000) .....	88
FIGURE 32 : ATOMISAT SIMPLE HPC/ALGINATE PG/PA (X 6000) .....	88
FIGURE 33 : ATOMISAT SIMPLE HPMC/ALGINATE PG/PA (X 6000) .....	88
FIGURE 34 : ATOMISAT CŒUR-COURONNE HPMC/ALGINATE PG/PA-HP55S® - PARTICULE FERMEE (X 6000) .....	89
FIGURE 35 : ATOMISAT CŒUR-COURONNE HPMC/ALGINATE PG/PA-HP55S® - PARTICULE PERFORÉE (X 6000) .....	89
FIGURE 36 : DIFFRACTOGRAMMES CORRESPONDANT AUX ATOMISATS TERNAIRES PLUS OU MOINS RECOUVERTS D'HP55S® ET COMPARES AU SPECTRE DU PA SOUS FORME CRISTALLINE .....	90
FIGURE 37 : CINÉTIQUE DE LIBÉRATION DU PA A PARTIR DES ATOMISATS DES FORMULES TERNAIRES PLUS OU MOINS RECOUVERTES D'HP55S® - N=3 POUR CHAQUE FORMULE .....	92
FIGURE 38 : MATRICES GELIFIÉES OBTENUES A L'ISSU DE L'ESSAI DE DISSOLUTION : A. FORMULE TERNAIRE NUÉ D'HPMC ; B. FORMULE TERNAIRE DE TYPE CŒUR-COURONNE D'HPMC .....	92
FIGURE 39 : HISTOGRAMMES REPRÉSENTANT LE CARACTÈRE MUCOADHESIF DES DIFFÉRENTES FORMULES TERNAIRES PLUS OU MOINS RECOUVERTES D'HP55S® : A. COMPARAISON DES FORMULES TERNAIRES ET BINAIRE A BASE D'HPMC ET D'ALGINATE PG ; B. COMPARAISON DES FORMULES TERNAIRES ET BINAIRES A BASE D'HPC ET D'ALGINATE PG – LA LIGNE ROUGE ET LE RECTANGLE ROSE EXPRIMENT RESPECTIVEMENT LA MOYENNE ET LES ÉCART-TYPES OBTENUS POUR LE TÉMOIN NÉGATIF .....	94
FIGURE 40 : GELIFICATION APRÈS TEST DES ÉCHANTILLONS : A. ATOMISAT DE TYPE CŒUR-COURONNE D'HPMC ; B. ATOMISAT DE TYPE CŒUR-COURONNE D'HPC .....	94
FIGURE 41 : MONTAGE UTILISÉ LORS DE LA TECHNIQUE DU SAC RETOURNÉ, APRÈS AGITATION AU TURBULA® .....	95
FIGURE 42 : GRAPHIQUES RÉSULTANT DE L'ANALYSE THERMOGRAVIMÉTRIQUE : A. FORMULE NUÉ HPC/ALGINATE PG/PA ; B. FORMULE DE TYPE CŒUR-COURONNE HPC/ALGINATE PG/PA-HP55S® ; C. FORMULE NUÉ HPMC/ALGINATE PG/PA ; D. FORMULE DE TYPE CŒUR-COURONNE HPMC/ALGINATE PG/PA-HP55S® .....	98

## II. Tableaux

TABLEAU 1 : FACTEURS ANATOMIQUES ET PHYSIOLOGIQUES, DU TRACTUS GASTRO-INTESTINAL DE L'HOMME, INFLUENÇANT L'ABSORPTION ET LE MÉTABOLISME D'UN PRINCIPE ACTIF (ADAPTE DE ROUGE <i>ET AL.</i> , 1996) .....	19
TABLEAU 2 : POLYMERES MUCOADHESIFS ÉTUDES ET LEUR PROVENANCE .....	46
TABLEAU 3 : ASSOCIATIONS DE POLYMERES RÉALISÉES .....	49
TABLEAU 4 : CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES PERMETTANT DE DOSER LE PRINCIPE ACTIF .....	52
TABLEAU 5 : CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES DE L'ÉTUDE DE STABILITÉ DU PRINCIPE ACTIF .....	54
TABLEAU 6 : RÉSULTATS DES ESSAIS DE SOLUBILITÉ DES POLYMERES SÉLECTIONNÉS A 16 % (M/V) .....	60
TABLEAU 7 : CARACTÉRISTIQUES AVANT (CONCENTRATION DE LA SOLUTION A ATOMISER ; SOLVANT), PENDANT ( $T_{IN}$ ; $T_{OUT}$ ) ET APRÈS LE PROCESSUS D'ATOMISATION (RENDEMENT ; RATIO PA/POLYMERÉ DE L'ATOMISAT) .....	63
TABLEAU 8 : IMAGES OBTENUES PAR MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE A BALAYAGE POUR LES ATOMISATS BINAIRES PA/POLYMERÉ .....	65
TABLEAU 9 : COURBES OBTENUES A L'ISSU DES ESSAIS DE MUCOADHESION PAR TEXTUROMÉTRIE POUR LE CRIBLAGE DES POLYMERES .....	77
TABLEAU 10 : PICS D'ADHESION EN FONCTIONS DU POLYMERÉ COMPOSANT L'ATOMISAT BINAIRES .....	81
TABLEAU 11 : CARACTÉRISTIQUES AVANT, PENDANT ET APRÈS LE PROCESSUS D'ATOMISATION DE L'OPTIMISATION DE LA FORMULE .....	85
TABLEAU 12 : RÉSULTATS DES ESSAIS DU SAC RETOURNÉ RÉALISÉS A PARTIR DE LA FORMULE COMPOSÉE D'HPMC, EN FONCTION DU TEMPS D'AGITATION .....	95
TABLEAU 13 : MORPHOLOGIES THÉORIQUEMENT ATTENDUES EN FONCTIONS DES NOUVELLES ASSOCIATIONS RÉALISÉES ET DE LA BUSE UTILISÉE .....	106