

UNIVERSITE LOUIS PASTEUR STRASBOURG I

2007

Thèse

Présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR

Discipline : Sciences Pharmaceutiques

Par

Malgorzata SMOLA

Contribution à l'étude de la formulation et de l'analyse
physicochimique de formulations pédiatriques
microémulsionnées

Soutenue publiquement le 7 mars 2008

Membres du jury :

Pr. Thierry F. Vandamme (ULP, Strasbourg, France)	Directeur de thèse
Pr. Adam Sokolowski (PWr, Wroclaw, Pologne)	Co-Directeur de thèse
Pr. Stanislaw Kucharski (PWr, Wroclaw, Pologne)	Rapporteur externe
Pr. Denis Poncelet (ENITIAA, Nantes, France)	Rapporteur externe
Pr. Eric Marchioni (ULP, Strasbourg)	Rapporteur interne
MC. Mohamed Skiba (UR, IUT d'Evreux, Rouen, France)	Examineur

REMERCIEMENTS

Ma thèse s'est déroulée dans d'excellentes conditions humaines et scientifiques, au sein du laboratoire de Pharmacie Biogalénique (ULP) à Strasbourg et de Génie Chimique (PWr) à Wrocław.

Je tiens avant tout à remercier mes deux Directeurs de thèse, Monsieur le Professeur Thierry Vandamme et Monsieur le Professeur Adam Sokolowski de m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire, de m'avoir confiée un sujet intéressant, ainsi que pour leur gentillesse, leurs conseils précieux, leur soutien et leur disponibilité. Je les remercie pour la collaboration qu'ils ont mise en place entre leur discipline, l'ingénierie chimique et la pharmacie galénique, à chaque étape de cette thèse.

Je souhaite également remercier très sincèrement Monsieur le Professeur Stanislaw Kucharski, Monsieur le Professeur Denis Poncelet, Monsieur le Professeur Éric Marchioni et Monsieur le Maître de Conférence Mohamed Skiba, pour avoir accepté d'être membre de mon jury et pour avoir jugé ce travail.

La bourse du Gouvernement Français m'a permis de réaliser cette thèse en cotutelle franco-polonaise. Je tiens à remercier Monsieur l'Ambassadeur et Monsieur l'Attaché Scientifique pour leur générosité et pour m'avoir offert l'opportunité de venir en France pour mon doctorat.

Je remercie également Monsieur le Professeur Jean-Yves Pabst pour notre collaboration, ses conseils ainsi que pour sa gentillesse.

Je voudrais remercier Monsieur le Docteur Philippe André pour notre coopération, sa disponibilité et son aide précieuse lors des études microbiologiques de nos formulations.

Je n'omettrai pas de remercier Madame le Docteur Minjie Zhao pour sa sympathie, sa disponibilité, son aide mais également pour la patience dont elle a fait preuve envers moi durant les études analytiques.

J'aimerais remercier Monsieur Le Docteur Claude Boymond pour toute son aide, son soutien et ses conseils indispensables pendant les TP de pharmacie galénique ainsi que pour sa gentillesse, son humour et toutes nos conversations franco-polonaises.

Je voudrais remercier Damien Habrant et Jérôme Klein de m'avoir appris le fonctionnement de la balance de Langmuir.

Un grand merci aux autres doctorants et étudiants qui m'ont accompagnée durant cette thèse, ainsi qu'aux personnes extérieures au laboratoire pour l'aide qu'ils m'ont apportée.

Merci à Niuniu pour tout ; à Jean Pierre pour sa présence, ses conseils sur la vie, son aide morale, merci d'avoir toujours cru en moi; à Marta, mon amie, qui m'a accompagnée depuis le début de cette thèse, pour toute son aide, sa disponibilité, son écoute, sa patience, son esprit « zen », sa sérénité « totale » et son amitié absolue ; enfin merci à ma famille et à tous mes proches d'être toujours là pour moi : DZIEKUJE.

Table des Matières

GLOSSAIRE.....	13
INTRODUCTION GENERALE	17
CHAPITRE 1 : ETUDE DU POUVOIR CONSERVATEUR ANTIMICROBIEN DE LA 2-PYRROLIDONE (SOLUPHOR[®] P).....	23
INTRODUCTION.....	25
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE.....	27
1. Les excipients	27
2. Solubilisation	28
3. Conservation antimicrobienne.....	29
4. Essai de l'efficacité de la conservation antimicrobienne, définition.....	30
5. Détermination de la CMI et de la CMB	30
5.1. Définitions des CMI et CMB.....	30
5.2. Principe de la détermination	31
PARTIE EXPERIMENTALE	33
1. Détermination du pouvoir conservateur antimicrobien du 2-pyrrolidone (Soluphor [®] P) 33	
1.1. La 2-pyrrolidone (Soluphor [®] P).....	33
1.2. Essais microbiologiques de l'efficacité de la conservation antimicrobienne.	33
1.2. A. Microorganismes d'essai	34
1.2. B. Solutions et milieux utilisés.....	36
1.2. C. Matériel utilisé.....	37
2. Reproduction de la publication du chapitre 1	37
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	61

CHAPITRE 2 : MICROEMULSIONS INVERSES HYDROPHILE/ LIPOPHILE (H/L) DESTINEES AU MASQUAGE DU GOUT DE SUBSTANCES AMERES POUR LA VOIE ORALE CHEZ LES NOURRISSONS ET LES ENFANTS EN BAS AGE	63
INTRODUCTION.....	65
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE.....	67
1. Seuil absolu.....	67
2. Phénomènes d'adaptation.....	68
3. Facteurs influençant le goût.....	69
4. Conclusion.....	70
5. Reproduction de la première publication du chapitre 2.....	71
OBJECTIFS DE L'ETUDE	123
PARTIE EXPERIMENTALE	125
1. Contexte : reflux gastro-intestinal et pharmacologie du chlorhydrate de ranitidine	125
1.1. Le reflux gastro-oesophagien	125
1.2. Le chlorhydrate de ranitidine	126
1.2. A. Structure chimique et activité des anti-H2	126
1.2. B. Pharmacologie.....	127
2. FORMULATION D'UNE MICROEMULSION H/L	128
2.1. Introduction.....	128
2.2. Microémulsion de chlorhydrate de ranitidine	130
2.2. A. Introduction.....	130
2.2. B. La microémulsion.....	130
2.2. C. Paramètres influençant la formation et la stabilité des microémulsions.....	131
2.2. D. Prédétermination de la zone de stabilité de la microémulsion par la méthode du diagramme de phase ternaire	131
2.2. E. Composition du produit fini.....	132
2.2. F. Détail et description des matières premières.....	133
3. Reproduction de la seconde publication du chapitre 2	136
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	155

CHAPITRE 3 : FORMULATION D'UNE SOLUTION LIQUIDE A USAGE ORAL PEDIATRIQUE CONTENANT DE LA VITAMINE D3 ET DU FLUORURE DE SODIUM	157
INTRODUCTION.....	159
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE.....	161
1. Les formulations colloïdales et la résorption gastro-intestinale.....	161
2. Microémulsions et systèmes autoémulsifiables.....	162
3. Systèmes micellaires.....	163
PARTIE EXPERIMENTALE	165
1. Matières premières	165
2. Rappel sur l'activité antimicrobienne du Soluphor® P.....	165
3. Détermination de la solubilité de la vitamine D ₃ dans du Soluphor®P	166
3.1. Méthode de dosage de la vitamine D ₃	167
3.1. A. Conditions chromatographiques.....	167
3.1. B. Préparation des échantillons.....	167
3.2. Résultats obtenus	167
3.3. Discussion.....	169
4. Choix des autres excipients à utiliser	169
4.1. Ajout de l'antioxydant (gallate de propyle) et du surfactant (Vitamine E TPGS)..	169
4.2. Fluorure de sodium	170
4.3. Édulcoration- aromatisation.....	170
5. Formulation de la solution finale.....	171
5.1. Mode opératoire.....	171
6. Préparation des échantillons pour l'étude de stabilité	173
6.1. Préparation des solutions	173
6.2. Description de la méthode de dosage.....	174
6.2. A. Dosage du cholécalférol.....	174
6.2. B. Dosage du fluorure de sodium.....	175
7. Résultats d'études de stabilités de 4 nouvelles formules de la solution buvable	177
8. Choix de la formule finale	179

9. Résultats des études de stabilités de la formulation choisie pour la solution buvable ...	180
10. Problèmes rencontrés et perspectives	181
10.1. Interaction entre l'agent antioxydant et le Soluphor [®] P	181
10.2. Résolution du problème existant.....	183
10.2. A. Augmentation de la quantité de gallate de propyle d'un facteur 10	183
10.2.B. Remplacement du gallate de propyle par de l'acide sorbique	184
10.3. Perspectives.....	186
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	187
CHAPITRE 4 : DEFINITION ET MISE AU POINT D'UN NOUVEAU SYSTEME D'ADMINISTRATION DE MEDICAMENTS LIQUIDES DESTINES A LA VOIE ORALE CHEZ LES NOURRISSONS.....	189
INTRODUCTION.....	191
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE.....	194
1. Physiologie de la déglutition	194
1.1. Les temps de la déglutition	194
1.1. A. Temps préparatoire buccal	195
1.1. B. Temps bucco-pharyngé	195
1.1. C. Temps oesophagien	197
1.2. La déglutition chez le nourrisson.....	198
1.2. A. Les principales différences anatomiques.....	198
1.2. B. Les différents moments de déglutitions.....	198
1.2. C. De la succion-déglutition à la déglutition de l'adulte.....	199
2. Le phénomène de « fausse route ».....	200
2.1. Mauvaise pratique.....	200
2.2. Matériel mal adapté.....	201
OBJECTIFS DE L'ETUDE	202
PARTIE EXPERIMENTALE	203
1. Seringue « traditionnelle » commercialisée.....	203

2. Modifications de la vitesse de diffusion et de la direction	204
3. Modifications permettant de mieux maîtriser le volume du jet.....	205
4. Adaptation du dispositif d'administration à la formulation.....	207
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	208

CHAPITRE 5 : ADMINISTRATION PULMONAIRE DE POUDRES

AUTOEMULSIONNABLE	211
--------------------------------	------------

INTRODUCTION.....	213
--------------------------	------------

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	216
-------------------------------------	------------

1. Granulométrie des particules et évaluation des propriétés aérodynamiques	216
---	-----

1.1. Impact de la granulométrie sur l'administration pulmonaire.....	216
--	-----

1.2. Évaluation aérodynamique des poudres.....	217
--	-----

2. Formulations médicamenteuses administrées par inhalation	219
---	-----

3. Dispositifs d'inhalation	221
-----------------------------------	-----

3.1. Les nébuliseurs.....	221
---------------------------	-----

3.2. Les aérosols doseurs (AD).....	222
-------------------------------------	-----

3.3. Les inhalateurs à poudre sèche (IPS).....	223
--	-----

4. Techniques de micronisation	224
--------------------------------------	-----

PARTIE EXPERIMENTALE	228
-----------------------------------	------------

1. Matériel et méthodes	228
-------------------------------	-----

1.1. Matières premières.....	228
------------------------------	-----

1.2. Sélection de surfactants. Critères de choix.	229
--	-----

2. Solubilité des principes actifs dans les mélanges de surfactants.....	231
--	-----

3. Formulation des systèmes microémulsionnés	234
--	-----

3.1. Etape 1. Miscibilité des mélanges de surfactants avec l'eau	235
--	-----

3.1. A. Etape 1. Résultats, aspect des solutions	236
--	-----

3.1. B. Etape 1. Discussion	238
-----------------------------------	-----

3.2. Etape 2. Diagrammes de phases des mélanges de surfactants en présence des substances actives	239
3.2. A. Principe des diagrammes de phase.....	239
3.2. B. Etape 2. Résultats, diagrammes de phase.....	240
3.3. Etape 3. Préparation des microémulsions pour la nébulisation	242
4. Nébulisation des microémulsions, production de microparticules solides.....	245
4.1. Principe de la nébulisation	245
4.2. Équipement de nébulisation.....	246
4.3. Expériences de nébulisation	249
4.3. A. Sélection des conditions de nébulisation.....	249
4.3. B. Poudres obtenues.....	250
5. Détermination de tailles de particules par analyse granulométrique.....	251
5.1. Principe de la diffraction laser	251
5.2. Granulométrie des poudres obtenues par nébulisation	252
6. Dosage des principes actifs dans les poudres obtenues par nébulisation	254
6.1. Instrumentation pour la chromatographie liquide haute performance (CLHP).....	254
6.2. Droites d'étalonnage pour le dosage des principes actifs	255
6.3. Dosage des principes actifs dans les poudres	256
6.3. A. Préparation des solutions.....	256
6.3. B. Résultats des dosages	256
7. Etude des comportements aérodynamiques par la cascade d'Andersen.....	258
7.1. Principe de la cascade d'Andersen	258
7.2. Conditionnement des poudres pour l'inhalation	260
7.2. A. Dispositifs d'administration	260
7.2. B. Conditionnement des poudres dans des gélules.....	261
7.3. Etude des poudres par la cascade d'Andersen	262
7.3. A. Récupération des poudres sur les tamis par le solvant.	262
7.3.A. Echantillons produits par l'analyse des poudres issues des microémulsions	263
7.3. C. Dosage par CLHP des substances actives sur les différents tamis de la cascade d'Andersen	264
7.3. D. Discussion	266
8. Analyse des poudres sur une balance de Langmuir.....	268
8.1. Notions sur les monocouches.....	268
8.3. Principe de la balance de Langmuir. Méthode utilisé.....	270

8.3. Etude de la solution de référence de DPPC	273
8.4. Analyse des poudres obtenues	273
8.4. A. Salbutamol base, échantillons E3 et E7.....	273
8.4. B. Budésonide, échantillons E6 et E8.	275
8.4. C. Conclusion.....	276
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	278
REPRODUCTION DE LA PUBLICATION DU CHAPITRE 5.....	280
CONCLUSION GENERALE	301
ANNEXES.....	305
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	321

Glossaire

Amphiphile : substance qui possède un double affinité, que l'on définit comme une dualité polaire/apolaire. La molécule amphiphile typique comporte une partie hydrophile et une partie hydrophobe.

Balance Hydrophile-Lipophile (HLB) : permet de caractériser l'efficacité des tensioactifs pour stabiliser les émulsions. La HLB est comprise entre 0 (forte tendance lipophile) et 18 (forte tendance hydrophile).

Concentration Micellaire Critique (CMC) : concentration minimale pour que le surfactif forme des agrégats appelés micelles qui sont responsables des propriétés de solubilisation et de détergence.

Cotensioactif : parallèlement aux tensioactifs, les co-tensioactifs sont utilisés pour faciliter la solubilisation de principe actifs peu solubles : le propylène glycol, la glycérine, le PEG, le sorbitol sont les plus connus.

Emulsifiant : surfactif dont la fonction est de faciliter la formation d'une émulsion (en diminuant la tension) et de la stabiliser.

Emulsion : système diphasique relativement stable composé de deux liquides non miscibles : l'un en forme de gouttes (phase interne ou discontinue), dispersé dans l'autre (phase externe ou continue). On utilise les initiales H/L pour une phase interne hydrophobe dispersée dans une phase continue hydrophile et L/H dans le cas inverse.

Excipient : toute substance autre que la substance active ou la pro-drogue qui rentre dans le procédé de manufacture ou qui est contenu dans la forme pharmaceutique finale. Un excipient peut avoir de multiples effets : liant, désintégrant, diluant, lubrifiant, émulsifiant, solubilisant, conservateur, ...

Micelle : composé d'agrégation de plusieurs molécules de surfactif. Les micelles sont responsables des propriétés de solubilisation et de la détergence. Les micelles apparaissent à partir de la Concentration Micellaire Critique (CMC).

Microémulsion : phase liquide dispersée au sein d'une phase liquide continue, obtenue en présence d'un tensioactif et d'un co-tensioactif. On utilise les initiales H/L pour une phase interne hydrophobe dispersée dans une phase continue hydrophile et L/H dans le cas inverse.

Solubilisant : excipient dont la fonction est de permettre d'améliorer la solubilité de la substance active au sein de la formulation.

Solution micellaire : solution d'un composé surfactif de concentration supérieure à sa Concentration Micellaire Critique (CMC).

Surfactant : les anglo-saxons utilisent le mot « surfactant » (surface-active-agent) pour désigner un surfactif (tensioactif).

Surfactif (Tensioactif) : substance qui possède une activité interfaciale ou superficielle. Quand elle est adsorbée à la surface ou à l'interface, Elle affecte (réduit) la tension superficielle. Les amphiphiles sont surfactifs quand leurs affinités polaires et non-polaires sont plus ou moins équilibrées.

Suspension : dispersion relativement stable d'un solide dans un liquide. La stabilité se réfère à la sédimentation ou à la floculation.

Tensioactif non-ionique (ou surfactif non-ionique) : tensioactif qui ne s'ionise pas en solution aqueuse, car il possède un groupe hydrophile du type alcool, phénol, ester, éther ou amide. Certains d'entre eux possèdent des chaînes hydrophiles de type polyéther ou poly-oxyde d'éthylène

Introduction Générale

Alors que l'administration des médicaments chez l'adulte est très précisément étudiée pour atteindre une efficacité optimale en l'absence d'effets toxiques, les connaissances qui devraient permettre d'atteindre un tel niveau de contrôle chez l'enfant manquent cruellement. En conséquence, les pédiatres se trouvent parfois dans l'obligation de prescrire des médicaments mal adaptés en termes de dosage, de posologie, de voie d'administration, d'indication précise et de formulation.

L'histoire de la médecine révèle des exemples tragiques liés à l'administration de médicaments mal adaptés, à des nouveau-nés, des enfants ou des adolescents. Ainsi, dans un souci de sécurité, les pédiatres sont devenus relativement « conservateurs » dans leur utilisation des thérapies médicamenteuses. Cette approche permet souvent d'éviter de commettre des erreurs, mais représente un frein au développement de nouvelles modalités thérapeutiques dédiées aux traitements des enfants et des nourrissons. Des recherches ciblées sur les thérapies pédiatriques qui auraient pour objectif d'optimiser et de sécuriser l'administration de médicaments à cette population nécessiteront la compréhension détaillée des phénomènes d'absorption, de bio-distribution, de métabolisme et d'élimination des médicaments à tout âge de la vie. Les enfants ne peuvent pas être considérés comme de « petits adultes » et tous les paramètres précédents ne peuvent pas être prédits à partir des données expérimentales obtenues chez l'adulte.

Malheureusement, alors que de nouveaux systèmes pour la délivrance de médicaments pourraient trouver des applications en résolvant des problèmes particuliers liés à la formulation de substances actives pédiatriques, le coût inhérent à de telles recherches, la taille réduite du marché des traitements pédiatriques et les problèmes éthiques liés à l'enrôlement d'enfants dans les essais cliniques représentent des freins très importants à ces études.

Une formulation pédiatrique idéale pour la voie orale devrait être facilement administrable, stable, efficace, très bien tolérée, de faible coût de production et avoir une bonne palatabilité, c'est à dire posséder un goût et une odeur acceptable. Il s'agit donc d'un problème possédant de multiples paramètres, la plupart desquels seront discutés dans ce manuscrit.

Les formulations de médicaments sont souvent des systèmes complexes, contenant de nombreux composants en addition aux substances pharmacologiquement actives. L'*International Pharmaceutical Excipient Council* (IPEC) définit un *excipient* comme toute substance, autre que la substance active ou la pro-drogue, qui rentre dans le procédé de manufacture ou qui est contenue dans la forme pharmaceutique finale. Un excipient peut avoir de multiples effets, il peut être un liant, un désintégrant, un diluant, un lubrifiant, un émulsifiant, un agent solubilisant, un conservateur antimicrobien,... En plus de l'activité recherchée, l'excipient idéal doit d'une part être chimiquement stable, non réactif vis à vis de la substance active et des autres excipients, inerte vis à vis du corps humain et enfin être bien caractérisé pour être accepté par l'industrie et les instances de régulations. D'autre part, puisque la meilleure formulation est la formulation la plus simple, un excipient *multifonctionnel* sera d'autant plus apprécié.

La partie I traite de l'étude de la 2-pyrrolidone, un produit commercialisé par la société BASF sous le nom de Soluphor[®] P, pour démontrer les propriétés antimicrobiennes de ce composé. La 2-pyrrolidone permet de solubiliser très efficacement de nombreuses substances actives insolubles en milieu aqueux. Cet excipient permet de s'affranchir de l'utilisation d'agents conservateurs comme ceux de la famille des parabènes, fortement déconseillés dans les formulations pédiatriques. Une étude détaillée nous conduira à mettre en évidence les propriétés antimicrobiennes du Soluphor[®] P sur de nombreuses bactéries, de nombreux champignons et spores de bacillus. L'utilisation de ce solvant organique dans des formulations orales de produits hydrophobes est donc particulièrement intéressante puisque c'est un excipient bi-fonctionnel : excipient solubilisant et conservateur-antimicrobien.

Alors que la très vaste majorité des formulations commercialisées et destinées à la voie orale sont des formes solides (comprimés ou gélules), il existe de nombreux systèmes de formulations liquides pour la voie orale, comme les sirops, les solutions, les émulsions ou les suspensions. Seules les formules liquides sont adaptées à une utilisation pédiatrique, puisque les enfants de moins de 6 mois ne peuvent pas avaler de formes solides. Il est important de noter que les formules liquides permettent souvent d'atteindre de meilleures bio-disponibilités pour des molécules actives très peu hydrosolubles. Dans ce cadre, les microémulsions normales ou inverses sont particulièrement intéressantes. Ce sont des systèmes constitués

d'une phase aqueuse et d'une phase huileuse émulsionnées, thermodynamiquement stables, transparents, de faible viscosité, et qui présentent une excellente isotropie. Les microémulsions ont fait l'objet d'une grande attention récemment en raison de leur simplicité de préparation et de leur capacité à solubiliser des substances actives présentant une large gamme de lipophilie. Nous étudierons dans ce manuscrit (Partie II) la formulation d'un principe actif, le chlorhydrate de ranitidine, dans un système microémulsionné inverse, dans lequel la phase aqueuse représente la phase interne de l'émulsion. Le choix de ce système a pour but d'éviter un contact direct entre le principe actif très amer et les récepteurs des papilles gustatives présents au niveau de la langue. Notre formulation devrait donc permettre d'améliorer la palatabilité du médicament, et donc de répondre à un critère essentiel des formulations pédiatriques à savoir qu'un enfant est physiologiquement et psychologiquement plus sensible au goût qu'un adulte, refusant par conséquent d'avaler une formule qui présente un mauvais goût ou une odeur désagréable.

Dans la partie III du manuscrit, un autre type de système de formulation a été considéré, pour mettre en application nos observations sur les propriétés de la 2-pyrrolidone en tant qu'excipient multifonctionnel. Le Soluphor[®] P a été utilisé comme phase organique dans une formulation aqueuse/organique micellaire de vitamine D et de fluorure de sodium. L'objectif de cette étude était le développement d'une formulation simple pour la voie orale chez le nourrisson, renfermant deux substances actives, l'une soluble dans l'eau, le fluorure de sodium, l'autre très hydrophobe, la vitamine D₃. Dans cette étude pratique, le Soluphor[®] P s'est avéré être un excellent excipient solubilisant et une nouvelle fois un conservateur-antimicrobien efficace de la formule. Ce solvant organique, totalement miscible à l'eau et de faible viscosité, devrait être une alternative intéressante aux excipients les plus utilisés dans la même catégorie, comme la *N*-methyl-2-pyrrolidone (NMP), le propylène glycol, l'éthanol ou les polyéthylènes glycols qui ont parfois un pouvoir solubilisant insuffisant.

Les erreurs dans l'utilisation des médicaments révèlent souvent une information insuffisante des familles ou la mauvaise conception des systèmes d'administration des formulations liquides. Chaque année, 40 % des intoxications relevées au Centre Antipoison sont le fait des médicaments. Les enfants sont davantage exposés que les adultes au mésusage des médicaments, pour deux raisons principales : les parents constituent un intermédiaire

supplémentaire entre le prescripteur, le pharmacien et le patient, et il existe peu de formes galéniques propres à l'enfant. Ces « erreurs d'utilisation » sont définies comme toute erreur qui peut empêcher l'enfant de recevoir le médicament adéquat, à la posologie correcte, à l'horaire préconisé et par la bonne voie d'administration. Dans le cadre de nos études, nous nous sommes intéressés à la conception d'un système de délivrance des formulations liquides pédiatriques qui puisse permettre de limiter les erreurs d'administration tout en prenant en compte la physiologie de déglutition propre aux très jeunes enfants. Ces réflexions nous ont conduits à proposer dans la partie IV du manuscrit divers systèmes de seringues qui permettent de contrôler précisément le débit et la dose de médicament administré.

Dans la cinquième et dernière partie du manuscrit, nous aborderons une autre voie d'administration pédiatrique que la voie orale, à savoir la voie pulmonaire. Dans ce cadre, la préparation et la formulation de particules microémulsionnables sera abordée. Comme dans les parties précédentes, plusieurs cas concrets seront étudiés pour la formulation du salbutamol base et du budésonide. Une attention particulière sera apportée à l'étude et au contrôle des tailles de particules produites.

Chaque partie du document comprendra une introduction bibliographique permettant de situer la problématique abordée et d'exposer nos objectifs, puis les résultats expérimentaux seront discutés. Dans les cas où une publication scientifique ou un brevet a été rédigé à partir des résultats présentés, celui-ci sera reproduit en fin de chapitre.

Nous espérons par ce manuscrit, que le lecteur puisse être renseigné sur plusieurs aspects d'une problématique complexe et insuffisamment étudiée : l'administration par voie orale et pulmonaire de substances actives pour la pédiatrie. L'objectif de cette thèse est de proposer de nouvelles pistes originales et prometteuses vers l'utilisation de nouveaux excipients multifonctionnels, vers de nouvelles formulations liquides microémulsionnées inverses, vers des formulations offrant une meilleure palatabilité, vers des systèmes d'administration plus sûrs et enfin vers des formulations pulmonaires mieux contrôlées.

Chapitre 1

Étude du pouvoir conservateur antimicrobien de la 2-pyrrolidone (Soluphor[®] P)

INTRODUCTION

Les excipients font, par définition, partie intégrante du médicament et peuvent influencer très largement son mode d'action. Un excipient peut, en effet, modifier de façon importante l'activité d'un principe actif et justifie le soin à apporter au choix des adjuvants pour la formulation médicamenteuse.¹

Outre la mise en formulation d'une substance active, la conservation antimicrobienne de la formulation présente également un très grand intérêt. Dans le cas où les préparations pharmaceutiques elles-mêmes ne possèdent pas de propriétés antimicrobiennes intrinsèques, des agents de conservation antimicrobiens peuvent être ajoutés. Ceci est particulièrement nécessaire pour les préparations aqueuses où, dans des conditions normales de conservation et d'emploi, en récipients multidoses, peut se développer une contamination microbienne présentant un risque de détérioration de la préparation et un danger d'infection pour le malade.

Au cours de la phase de développement d'une préparation pharmaceutique, il doit être démontré que l'activité antimicrobienne de la préparation telle quelle ou, si nécessaire, additionnée d'un ou de plusieurs agents de conservation, assure une protection appropriée contre les effets nocifs d'une contamination microbienne.

En Janvier 2004, une étude publiée dans *Journal of Applied Toxicology* avait révélé la présence de parabènes dans des tissus mammaires cancéreux. Dans cette étude, le Professeur Philippa Darbre de l'Université de Reading au Royaume-Uni avait retrouvé des parabènes, du méthylparaben principalement dans le tissu mammaire et avait relié la présence des parabènes au développement des cancers du sein.² La coïncidence était suffisamment troublante pour alimenter la polémique. Face à la perplexité de ces résultats et des avis divergents des multiples comités d'experts qui se sont déjà réunis, l'Europe impose actuellement des tests supplémentaires. Ce sont les raisons pour lesquelles, les Commissions Européennes réexaminent actuellement la possible utilisation des parabènes en alimentaire, en cosmétique et pour les médicaments.

Dans le domaine des médicaments, les parabènes sont principalement employés dans les formes liquides buvables, injectables et dermiques. Suite à la publication en 2004 de l'étude de *Darbre et al.*, l'Afssaps a mis en place en juin 2004 un groupe d'experts. Celui-ci a

revu l'ensemble des données afin d'évaluer le potentiel cancérigène et tératogène de cette famille de composés.

Les parabènes sont difficilement substituables par d'autres produits en raison de leur efficacité anti-microbienne et de leur relative innocuité : ils ne sont ni toxiques, ni génotoxiques, ni cancérigènes, ni tératogènes et ne s'accumulent pas dans les tissus dans les conditions réglementaires (utilisation dans les concentrations maximales autorisées); aussi, les méthylparabén, éthylparabén, propylparabén et butylparabén n'ont aucune raison d'être interdits. Afin de ne pas inciter à l'utilisation d'autres parabènes, mal documentés, seuls ces quatre parabènes devraient être autorisés dorénavant.³

Néanmoins, notamment pour les formulations pédiatriques, l'utilisation d'agents conservateurs de la famille de parabènes peut paraître délicate (allergie de l'enfant).⁴ Il est donc important d'essayer de trouver une autre façon de garantir la protection antimicrobienne pour les préparations multidoses.

Cette première partie de la thèse contribue à l'étude d'un nouvel excipient (2-pyrrolidone) commercialisé et destiné actuellement à solubiliser des molécules peu solubles en milieux aqueux. En marge de ses propriétés solubilisatrices, lors de l'utilisation de cet excipient, nous lui avons découvert, des propriétés antimicrobiennes. Ces propriétés antimicrobiennes ont été étudiées sur des bactéries (*staphylococcus aureus*, *pseudomonas aeruginosa*, *escherichia coli*), des champignons (*candida albicans* et *aspergillus niger*) et des spores de types bacillus (*bacillus cereux*, *bacillus sphaericus* et *basillus subtilis*). Cette étude a permis de déterminer la concentration minimale inhibitrice et bactériostatique de cet excipient pour une application pédiatrique par voie orale. Cette nouvelle utilisation potentielle de la 2-pyrrolidone a été validée en utilisant de la vitamine D₃ et du fluorure de sodium comme modèles de principes actifs.

Les résultats sont exposés dans un projet de publication reproduit à la fin de ce chapitre et intitulé : « *Studies on the evaluation of preservative efficacy of 2-pyrrolidone for oral paediatric formulations* ». Ce projet de publication démontre l'efficacité de la conservation antimicrobienne du 2-pyrrolidone dans des formulations pédiatriques et du pouvoir bactéricide et fungistatique de cet excipient.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Dans cette partie nous présenterons brièvement la définition des excipients, leur rôle dans les médicaments et leur efficacité antimicrobienne dans les formulations ainsi que quelques notions concernant la solubilisation.

1. Les excipients

Les excipients sont des substances associées étroitement aux principes actifs des médicaments. Dans la préparation pharmaceutique, ils doivent:^{1,5}

- avoir une innocuité parfaite, en tout cas dans la gamme des concentrations utilisées en galénique.
- ne pas conduire à une quelconque toxicité. En fait, un certain nombre d'excipients sont réputés à effet notoire dû souvent à des phénomènes allergiques ou à des intolérances individuelles (insuffisance enzymatique par exemple) ;
- pouvoir stabiliser un principe actif (conservation) ;
- solubiliser le principe actif (par ex.. une substance lipophile dans une huile ou une émulsion) ;
- permettre une solubilisation correcte et ciblée (par exemple dans un verre, dans l'estomac ou plus avant dans le tube digestif) ;
- donner lieu à une forme pharmaceutique (gélule, suppositoire, gel, gouttes, liquide, etc.) en rapport avec le mode d'administration (per os, IV, IM, injectable, transcutané, etc.) ;
- lui donner une sapidité nécessaire, quand le goût du principe actif est désagréable, ou pour une application pédiatrique ;
- permettre le ciblage ;
- modifier la biodisponibilité, la demi-vie ;
- garantir la préservation antimicrobienne
- etc....

Le galénique est l'art de formuler les médicaments. Il va permettre de présenter le principe actif à des doses différentes et sous différentes formes galéniques (les formes d'administration du principe actif au patient).

2. Solubilisation

La solubilisation est une technique utilisée par le galéniste à chaque fois qu'un principe actif insoluble ou peu soluble dans l'eau ou dans un excipient doit être mis en solution.

Elle nécessite le recours à des solubilisants, agents tensioactifs de qualité pharmaceutique, des solvants et des cosolvants organiques, les acides et les cyclodextrines ainsi qu'à des modes opératoires précis et bien appropriés.⁶

Toutes les classes d'agents tensioactifs (non ionique, anionique, cationique) ont été utilisées pour réaliser des solubilisations. Cependant, pour des raisons de toxicité évidentes, les deux dernières classes sont moins recommandées dans le domaine de la pharmacie ou de dermatopharmacie.⁷

Dès 1955 Mac Bain a défini la solubilisation comme la mise en solution d'une substance dans un milieu où elle est normalement insoluble grâce à la présence de "**particules organisées**"_conférant au milieu des propriétés de solution colloïdale.

Outre le fait de présenter le principe actif insoluble sous une forme physique liquide, facilement manipulable, stable, permettant la prise de doses précises et répétables, la solubilisation peut conduire à des modifications de propriétés physico-chimiques ou d'activité du principe actif lui-même. Pour être absorbé, la grande majorité des principes actifs pharmaceutiques doivent au préalable être dissous dans les liquides de l'organisme.⁸ Un grand nombre d'entre eux ne sont pas directement hydrosolubles (vitamines, certains antibiotiques...). L'utilisation d'un bon solvant organique non toxique agissant en tant qu'agent solubilisant est souvent donc une étape cruciale pour la formulation galénique.

3. Conservation antimicrobienne

Les conservateurs antimicrobiens sont des substances destinées à prolonger la durée de validité des spécialités pharmaceutiques, en réduisant la prolifération microbienne.

Les spécialités présentant les risques les plus élevés de contamination microbienne sont les préparations aqueuses, telles que les solutions, les suspensions et les émulsions pour administration par voie orale. Lors de la fabrication de la spécialité, l'efficacité de la conservation antimicrobienne doit être contrôlée dans le produit fini par l'essai recommandé par la Pharmacopée Européenne Vème Edition (Ph.E.5).

Les produits qui ne contiennent pas d'agent conservateur et ne sont pas dotés d'une efficacité antimicrobienne qui leur est propre ne peuvent pas être présentés en récipients multidoses, sauf justification fondée. Les agents de conservation antimicrobienne ne peuvent en aucun cas se substituer aux principes de Bonnes Pratiques de Fabrication.

Parfois, il est possible d'éviter l'ajout des agents conservateurs en formulant une préparation aqueuse de saveur sucré et de consistance visqueuse. La forte teneur en sucre assure dans ce cas une protection antimicrobienne.

La concentration utilisée doit être justifiée en termes d'efficacité et d'innocuité. L'essai décrit à la Pharmacopée Européenne (P.E.) doit être mis en œuvre pour garantir que l'efficacité recherchée est atteinte. L'innocuité du conservateur doit être illustrée par des résultats expérimentaux ou bibliographiques.

Dans certaines circonstances, l'utilisation d'agents de conservation antimicrobienne peut s'avérer non recommandée et les « guidelines » donnent des informations complémentaires.

4. Essai de l'efficacité de la conservation antimicrobienne, définition

L'essai consiste en la contamination artificielle de la préparation, dans son récipient définitif, au moyen d'un inoculum de microorganismes appropriés prescrit, au maintien de la préparation inoculée à une température déterminée, au prélèvement d'échantillons à partir du récipient à intervalles de temps donnés et au dénombrement des microorganismes dans les échantillons ainsi prélevés.

Les propriétés de conservation de la préparation sont adéquates si, dans les conditions de l'essai, une diminution importante ou, selon le cas, l'absence d'augmentation du nombre de microorganismes dans la préparationensemencée se produit après les temps et aux températures prescrits. Les critères d'acceptation de la Pharmacopée Européenne 5.0 Édition, en terme de diminution du nombre de microorganismes en fonction du temps, varient pour les diverses catégories de préparations et selon le degré de protection recherchée (Ph.E.5.0. tableau 5.1.3.-3., § 2.2.2).

5. Détermination de la CMI et de la CMB

5.1. Définitions des CMI et CMB

Ces deux paramètres, caractérisant le pouvoir antimicrobien d'un agent conservateur sont décrits par les définitions suivantes :

- Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

Elle se définit comme la plus petite concentration d'antibiotique ou de produit qui inhibe toute culture visible d'une souche bactérienne après 18-24 h de culture à 37°C. Cette valeur caractérise l'effet bactériostatique de l'antibiotique ou du produit. Plus la CMI d'un antibiotique est faible, plus son effet antimicrobien est prononcé.

- Concentration Minimale Bactéricide (CMB)

Elle se définit comme la plus petite concentration d'antibiotique ou de produit capable de laisser 0,01% (France) ou 0,1% (USA) de survivants après 18-24 h de culture à 37°C. Cette valeur caractérise l'effet bactéricide de l'antibiotique ou du produit.

5.2. Principe de la détermination

Différentes techniques pour déterminer la CMI sont possibles : en milieu gélosé ou en milieu liquide avec différentes concentrations de substances.

La technique que nous avons utilisée pour déterminer la CMI et la CMB est la technique en milieu liquide (cf. Figure 1-1) et en milieu gélosé.

Dans un premier temps, la technique consiste à ensemercer avec la même quantité de bactéries une série de tubes à différentes concentrations d'agent conservateur (dans le cas présent, nous allons utiliser la 2-pyrrolidone commercialisée sous le nom de Soluphor® P) réalisées dans du bouillon MUELLER-HINTON. Après 18-24 heures d'incubation à 37°C, le premier tube où aucune croissance microbienne n'est observée donne par définition la CMI (en mg/mL).

Dans un deuxième temps, des prélèvements sont effectués dans les tubes sans croissance visible (aux concentrations respectives de 2 à 32 mg/l dans la figure 1) puis sont déposés en stries sur gélose MUELLER-HINTON. On mesure ensuite les survivants (%) pour chaque strie déposée et on les compare semi-quantitativement à la gamme témoin obtenue au temps 0 par dilution de base 10. La strie qui donnera une densité de colonies de survivants de 0,01% donnera la CMB.

Le rapport CMB/CMI est ensuite calculé pour déterminer le mode d'action de l'antibiotique ou du produit sur le microorganisme :

- **CMB/CMI < ou = à 4** : antibiotiques ou produits bactéricides
- **CMB/CMI > 4**: antibiotiques ou produits bactériostatiques

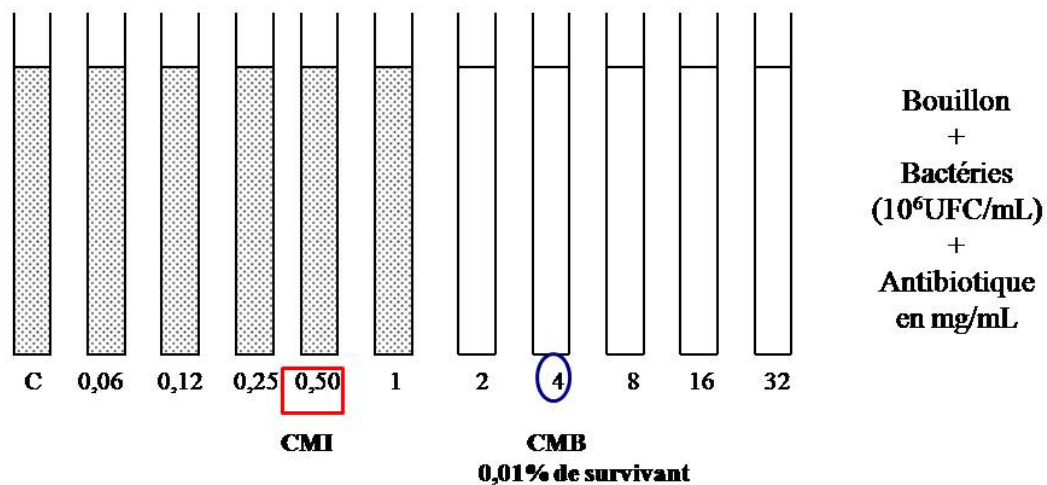


Figure 1-1 : Détermination de la CMI et de la CMB en milieu liquide.

PARTIE EXPERIMENTALE

Dans cette partie de la thèse nous allons décrire les microorganismes et les milieux utilisés pour les tests microbiologiques. Les méthodes, les protocoles expérimentaux ainsi que les résultats obtenus seront exposés dans le projet de publication intitulé : « *Studies on the evaluation of preservative efficacy of 2-pyrrolidone for oral paediatric formulations* » (reproduction à la fin du chapitre 1).

1. Détermination du pouvoir conservateur antimicrobien du 2-pyrrolidone (Soluphor[®] P)

1.1. La 2-pyrrolidone (Soluphor[®] P)

Les principales propriétés du 2-pyrrolidone sont décrites sur sa fiche technique détaillée (Annexe 1-1).

1.2. Essais microbiologiques de l'efficacité de la conservation antimicrobienne.

Les essais microbiologiques ont été réalisés en vue de mesurer l'efficacité de la conservation antimicrobienne selon les instructions de la Pharmacopée Européenne 5.0. L'essai consiste en la contamination artificielle de la préparation au moyen d'un inoculum de microorganismes appropriés.

Les critères pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne dans le cas de préparations orales sont donnés dans le tableau 1-1. En termes de réduction logarithmique du nombre de microorganismes viables par rapport à la valeur obtenue pour l'inoculum. Ces critères représentent l'efficacité qu'il est recommandé d'atteindre.

A l'inverse, la Pharmacopée Européenne n'exige pas de résultats antimicrobiens sur les spores et ne recommande donc pas de spores particulières pour ces tests.

Tableau 1-1 : Critères d'acceptation de l'activité antimicrobienne pour les préparations orales (Ph. E., § 2.2.2).

	Réduction logarithmique	
	14 j	28 j
Bactéries	3	NI*
Champignons	1	NI*

*NI : pas d'augmentation

1.2. A. Microorganismes d'essai

Les microorganismes utilisés pour l'étude microbiologique ont été rassemblés dans le tableau 1-2.

Les deux Staphylocoques Gram+ à coagulase négative (*Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus capitis*) sont moins virulents que *Staphylococcus aureus* mais sont potentiellement pathogènes dans certaines circonstances, notamment en cas d'immunodéficience. Toutes les souches ont été conservées à -80°C dans du bouillon BHI (infusion de cerveau et de cœur) et du glycérol à 20%. A partir des souches congelées, les bactéries ont été ensemencées sur gélose TS en pente puis incubées à 37°C pendant 24h.

Deux souches de champignons ont été commandées au laboratoire MicroBiologics et ont été conservées au réfrigérateur à +4°C dans des fioles sous formes de pastilles.

Deux souches de spores de *Bacillus* (*Bacillus cereus* et *Bacillus sphaericus*) ont été conservées à -80°C dans un mélange de bouillon BHI (infusion de cerveau et de cœur) et de glycérol (20% V/V). A partir des souches congelées contenant des formes végétatives ainsi que des spores, les bactéries ont été ensemencées sur gélose TS en pente à J-3 puis incubées à 37°C pendant 24h. A J-2, ces bactéries ont été repiquées sur des milieux de sporulation en pente puis remises à 37°C pendant 24h. A J-1, des prélèvements et une coloration au vert malachite-oxalate ont été réalisés afin de vérifier la présence de spores. Enfin un dénombrement par étalements sur géloses TS a été fait.

La troisième souche de spores (*Bacillus subtilis*) qui se conserve à +4°C, était prête à l'emploi telle quelle.

Tableau 1-2 : Microorganismes d'essais utilisés : bactéries, champignons et spores.

BACTERIES	
Souches recommandées par la Pharmacopée Européenne	1) <i>Staphylococcus aureus</i> (Gram+), ATCC 6538 ; NCTC 10788 ; NCIMB 9518 ; CIP* 4.83. 2) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Gram-), ATCC 9027; NCIMB 8626; CIP 82.118. 3) <i>Escherichia coli</i> (Gram-), ATCC 8789; NCIMB 8545; CIP 53.126.
Souches fréquemment rencontrées en analyses microbiologiques	1) <i>Enterococcus faecalis</i> (Gram+) 2) deux <i>Staphylococcus</i> Gram + à coagulase négative: a) <i>Staphylococcus epidermidis</i> , (germe commensal des muqueuses et de la peau glabre où il représente 65 à 90% des staphylocoques isolés de la flore normale de l'homme). b) <i>Staphylococcus capitis</i> , (présent au niveau du cuir chevelu).
CHAMPIGNONS	
Souches recommandées par la Pharmacopée Européenne	1) <i>Candidas albicans</i> (6,7X107 UFC/pastille), ATCC 10231; NCPF 3179; IP 48.72 2) <i>Aspergillus niger</i> (5,4X106 UFC/pastille), ATCC 16404; IMI 149007 ; IP 1431.83
SPORES	
Souches rencontrées en analyses microbiologiques	1) <i>Bacillus cereus</i> (souche A1i) 2) <i>Bacillus sphaericus</i> (souche A3i) 3) <i>Bacillus subtilis</i> à 106UFC/ 0,1mL (sus-1A-6)

*CIP : Collection Institut Pasteur

1.2. B. Solutions et milieux utilisés

Les solutions et les milieux utilisés pour l'étude microbiologique sont décrits dans le tableau 1-3 ci-dessous :

Tableau 1-3 : Milieux et solutions d'essai utilisés : solution, bouillon, gélose.

SOLUTIONS ET MILIEUX UTILISES	Conditions de preparation		
Soluphor® P (2-pyrrolidone) Solution mère à 800 mg/L	Volume en mL		
	- Soluphor® P	7,25	
	- Eau distillée	2,75	
Bouillon MUELLER-HINTON (pH 7,4 ± 0,2)	En g/L :	Préparation :	
	- Infusion de viande de bœuf	300,0	Dissoudre 25 g de poudre dans 1 litre d'eau distillée et autoclaver 15 minutes à 121°C. Bouillon 2X concentré : 50 g de poudre dans 1 litre d'eau distillée. Bouillon 4X concentré : 100 g de poudre dans 1 litre d'eau distillée.
- Hydrolysate de caséine	17,5		
- Amidon	1,5		
qsp 1000 mL d'eau distillée			
Gélose MUELLER-HINTON	- Infusion de viande de bœuf	300,0	Dissoudre 35 g de poudre dans 1 litre d'eau distillée et autoclaver 15 minutes à 121° C.
	- Hydrolysate de caséine	17,5	
	- Amidon	1,5	
	- Agar	17,0	
qsp 1000 mL d'eau distillée			
Solution de NaCl à 0,9 %	- NaCl	9,0	A autoclaver pendant 15 minutes à 121°C.
	qsp 1000 mL d'eau distillée		
Gélose Trypticase Soja (TS) en pente stérile (pH = 7,2)	- Peptone tryptique de caséine	15,0	Dissoudre 40 g de poudre dans 1 litre d'eau distillée et autoclaver 15 minutes à 121°C.
	- Peptone papaïnique de soja	5,0	
	- NaCl	5,0	
	- Agar	15,0	
qsp 1000 mL d'eau distillée			
Bouillon SABOURAUD	- Glucose	10,0	Bouillon 2X : dissoudre 50g de poudre dans 1L et autoclaver 15 minutes à 121°C. Bouillon 4X: dissoudre 100g de poudre dans 1L et autoclaver 15 minutes à 121°C.
	- Peptone pepsique de viande	20,0	
	- Chloramphénicol	0,5	
	qsp 1000 mL d'eau distillée		
Gélose SABOURAUD	- Glucose	20,0	Dissoudre 45,5 g de poudre dans 1L d'eau et autoclaver 15 minutes à 121°C.
	- Peptone pepsidique de viande	10,0	
	- Chloramphénicol	0,5	
	- Agar	15,0	
qsp 1000 mL d'eau distillée			

Les bouillons MUELLER-HINTON avaient différentes concentrations.

Toute la verrerie ainsi que les cônes jaunes et bleus ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes sauf indication contraire.

1.2. C. Matériel utilisé

- Photomètre Dr LANGE
- Poste de Sécurité Microbiologique de type 2 : hotte à flux laminaire vertical
- Tubes stériles de 16 et 18 mm de diamètre
- Tubes à hémolyse stériles
- Tubes FALCON[®]
- Pipettes graduées de 1, 5 et 10 mL
- Flacons en verre
- Pipette-man ; cônes jaunes et bleus stériles
- Vortex

2. Reproduction de la publication du chapitre 1

Ci-dessous est reproduite notre projet de publication sur la thématique présentée dans ce chapitre : « *Studies on the evaluation of preservative efficacy of 2-pyrrolidone for oral paediatric formulations* ». Les protocoles expérimentaux et les résultats y sont présentés et discutés pour arriver à la démonstration de l'efficacité de la conservation antimicrobienne du 2-pyrrolidone dans de nouvelles formulations pédiatriques et de son pouvoir bactéricide et fungistatique.

Studies on the evaluation of preservative efficacy of 2-pyrrolidone for oral paediatric formulations

**Malgorzata Smola^{1,2}, Gaëlle Muller³, Julie Sizarols³, Minjie Zhao¹, Philippe André³ and
Thierry Vandamme^{1*}**

¹ Université Louis Pasteur, Faculté de Pharmacie, LC1 UMR 7175, Département de Chimie Bioorganique, 74 Route du Rhin – BP 24, 67401 Illkirch, France.

² Faculty of Chemistry, Technical University of Wrocław, Norwida Street 4/6, build. C-6, 50-373 Wrocław, Poland.

³ Université Louis Pasteur, Faculté de Pharmacie, LC1 UMR 7175, Département de Physicochimie des Interactions Cellulaires et Moléculaires, 74 Route du Rhin – BP 24, 67401 Illkirch, France.

*Corresponding author: vandamme@pharma.u-strasbg.fr

Abstract

Pharmaceutical oral dosage forms intended to children have to be administered under liquid dosage forms. These oral liquid formulations contained into multidose containers require the addition of antimicrobial agents to avoid the growth of microorganisms. Moreover, the oral administration of poorly water soluble drugs requires the use of excipients (organic solvent, cyclodextrins, surfactants, polymers) able to improve their water solubility. 2-pyrrolidone (Soluphor® P) a co-solvent usually used to dissolve drugs for the manufacture of parenteral dosage forms and suggested also for other administration routes, showed antimicrobial activity. To study the extent of its preservative efficacy, we determined the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) first, for bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus capitis*) and for bacterial spores (*Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus subtilis*), then for yeast and mould (*Candida albicans*, *Aspergillus niger*). The results showed that 2-pyrrolidone has a bactericidal and fungistatic efficacy. Challenge tests were realized on oral aqueous paediatric formulations of vitamin D₃ containing 2-pyrrolidone as a co-solvent and all known micro-organisms in such formulations were studied. The preservative efficacy of 2-pyrrolidone was observed at a dosage level of 75 mg/mL.

Keywords: preservative efficacy, antimicrobial, bactericidal, sporistatic, paediatric dosage forms, 2-pyrrolidone, challenge test, micellar solution, Vitamin E TPGS®.

1. Introduction

Beside the issues of immaturity of enzymes or reduced organ functions, encountered by the neonates and infants, which may determine the pharmacokinetics of the administered drugs, children (Tuleu *et al.*, 2005) show difficulties in swallowing solid dosage forms for oral use. For this reason, for this patient group, small sized particulates or liquid dosage forms are preferred to classic tablets or capsules (Nunn *et al.* 2005). The main problems occurring using liquids are (i) the palatability of the solution (Smola *et al.*, 2007a,b), especially when the taste sensation differs interindividually, (ii) the poor water solubility of many drugs, (iii) the shelf stability of the final liquid dosage forms, often prone to degradation reactions (oxidation, reduction, epimerization, hydrolysis, ...) and (iv) the microbiological safety of the product, namely its protection from microbial contaminations occurring from consumer use (Bloomfield, 1990). Amongst the different techniques used to increase the water-solubility of drugs (Liu, 2000), the ones using co-solvents and surfactants are the easiest to use industrially. Unfortunately, for the formulations and developments of paediatric medicines (Breitkreutz, 2005; Breitkreutz and Boos, 2007), the use of co-solvents (e.g. ethanol, glycerol) is not recommended at high levels due to their neurological and laxative effects. Furthermore, the addition of surfactants into multidose dosage forms, necessitating the need of preservatives, can lead to the formation of complex of molecules with these compounds and also to a decrease of their activity (Chakravarty *et al.*, 1957; Sunderland *et al.*, 1984; Watrobska *et al.* 2006). Amongst solubilising excipients used in oral and injectable formulations, 2-pyrrolidone is a pharmaceutical FDA-approved solvent found in many marketed forms of poorly soluble drugs. Nevertheless, even if 2-pyrrolidone is recommended by suppliers to be used to construct oral dosage forms, only few studies have been conducted on this excipient. Beside the well-known solubilising property of this excipient, we found also an antibacterial activity. To validate this new concept in the paediatric field, we used an antirachitic lipophilic model drug such as vitamin D3 and its antioxidizing agent, propyl gallate and sodium fluoride as hydrophilic drug. To prove the extent of this new antimicrobial activity, we determined the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) first for gram-positive bacteria (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus capitis*) gram-negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) spore-forming gram-positive rods (*Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus subtilis*) and then for yeast (*Candida albicans*) and fungus (*Aspergillus niger*). Then challenge tests were realized according to *European*

Pharmacopeia 5.0 (EP) criteria on oral aqueous paediatric formulations containing 2-pyrrolidone as a co-solvent of vitamin D₃. The results presented below suggest that 2-pyrrolidone could find very interesting applications as a potent excipient with antimicrobial activity into liquid dosage forms.

2. Methods and materials

2.1. Solubility determinations

The phase-solubility method developed by Higuchi and Connors (1965) was used to determine the solubility for vitamin D₃ (cholecalciferol, Fluka, Saint Quentin Fallavier, France). Sample vials were prepared in triplicate by adding an excess amount of vitamin D₃ to vials containing either 100 g of 2-pyrrolidone aqueous solutions at various concentrations (w/w: 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50%); or 100 g of 2-pyrrolidone aqueous solutions at 40% (w/w) containing also 1.50 or 3.0% (w/w) of d- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (Vitamin E TPGS® NF Grade, Eastman, Anglesey, United Kingdom). The precipitates were removed through 0.45- μ m TEFE syringe filters (Millipore, Molsheim, France). The vials were then closed with TEFE-lined rubber-stoppers and were rotated at 40 rpm using an end-over-end mechanical rotator (Vankel, VK 750D) at 25°C for 30 minutes. The drug solubility in aqueous solutions at various 2-pyrrolidone/Vitamin E TPGS® ratio was determined using a high performance liquid chromatography (HPLC) assay as stated below.

2.2. Preparation of micellar solutions

The micellar solutions were prepared according to a standard method employing a room temperature homogeneization (Florence, 1981). The three tested compositions of micellar solutions are presented in Table 1. Briefly, d- α tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate and 2-pyrrolidone were heated at 40°C and then the mixture was cooled at 20°C. The vitamin D₃ and propyl gallate (Fluka, Saint Quentin Fallavier, France) were dissolved and homogeneized into this solution. This solution was added and homogeneized with an aqueous solution constituted of a mixture of sodium fluoride, saccharin sodium, aroma of red fruits without vanillin and liquid maltitol (Lycasin® 80/55-sirup, Roquette, Lestrem, France).

2.3. Granulometry analyses

The average size and distribution of surfactant micelles were determined by light scattering (DLS) using a Zeta Sizer Nano Zs (Malvern) with a He-Ne laser light ($\lambda = 633$ nm) and a detection angle of 90° . The viscosities of the micellar solutions were comprised between 0.65 and 0.90 cP.

The measurements were carried out at 25°C . The final sample of micellar solution was diluted in water (MilliQ) to bring the concentration to 0.1ml/1ml. Measurements were made in conventional cuvettes, eliminating the possibility of sample cross-contamination. The intensity average diameter was computed from the intensity autocorrelation data using the cumulate analysis method. Micelle size measurements were performed 5 times for each sample.

2.4. Quantitations of vitamin D₃ and sodium fluoride

2.4.1. Quantitation of vitamin D₃

2.4.1.1. Equipment

Vitamin D₃ was quantified by HPLC. The chromatographic system consisted of a model LC-126 programmable pump, a model LC-507 automatic injector, and a model LC-166 variable wavelength UV – Vis detector. All items were purchased from Beckman System Gold (Villepinte, France). HPLC analysis was carried out at a temperature of $20 \pm 2^\circ\text{C}$ using a Macherey-Nagel C₈ 5 μm (125 x 4.0 mm I.D.) reversed-phase column with spherical particles having pores diameter of 10 nm. Chromatographic data were analysed by Karat Software Version 32.0.

2.4.1.2. Chromatographic conditions

The mobile phase consisted of 100 volumes of a 0.11% (v/v) solution of phosphoric acid (Merck, Darmstadt, Germany) and 900 volumes of acetonitrile (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). The flow rate was 1.4 ml/min and detection wavelength was set at 268 nm. Aliquot of 20 μl were injected onto reversed-phase Lichrospher C8 column. All the solvents used in chromatography were of HPLC grade and deionised water used for the preparations of

the micellar solutions and for HPLC was obtained from a Synergy UV water purification system (Millipore, Molsheim, France). All other chemicals were of analytical reagent grade and used as received.

2.4.1.3. Preparation of standard solutions

Vitamin D₃ ($\geq 99.0\%$) was used for preparing standard solutions in Methanol. The concentrations of these solutions were approximately 8.0 mg per 100 mL; they were stored at +4°C in the dark. Serial dilutions for the analytical HPLC were made in methanol/water (70/30, v/v) to obtain concentrations ranging from 11.50 to 26.83 $\mu\text{g/mL}$. All procedures were performed in a darkened container. In addition, glassware used in this assay was rinsed with acetone before use. The samples of vitamin D₃ in 2-pyrrolidone (solubility determinations) and in micellar solutions (see below) were diluted with a mixture of methanol/water (70/30, v/v) before to be analysed.

2.4.1.4. Method validation

The method was validated for parameters such as linearity, precision, accuracy, and stability following the analytical validation guidelines defined by Caporal *et al.* (1992a, 1992b, and 1997) and Chaminade *et al.* (1995). Three different blank samples were processed and injected into the HPLC system to investigate whether the components of the micellar solutions interfere with analytes. Three calibration curves were constructed according to section 2.4.1.3 and analyzed on 3 consecutive days.

The accuracy and precision were evaluated using samples at five concentration levels. Three replicate samples at each concentration were analyzed in a sequence to evaluate within-day variation. For evaluation of the between-day variation, three replicate samples at each concentration were analyzed on 3 different days. The accuracy was expressed by $[(\text{mean observed concentration})/(\text{spiked concentration})] \times 100\%$ and the precision by relative standard deviation. The recoveries of vitamin D₃ were evaluated by comparing the mean peak area of samples to the mean peak area of pure standards of equivalent concentrations.

2.4.2. Quantitation of sodium fluoride

2.4.2.1. Equipment

An ion analyzer (CyberScan ion 510 Meter, Eutech Instruments, Nijkerk, Netherlands) was used to measure the fluoride concentrations using a fluoride ion-specific combination electrode (Fischer Bioblock Scientific, Illkirch, France). The instrument was calibrated to measure fluoride concentrations between 0.02 ppm and 10 ppm.

2.4.2.2. Preparation of standard solutions and method validation

The fluoride concentrations in micellar solutions were determined after dilution. A set of fluoride standard solutions (ranging between 0.025 and 3.200 µg F/ml) was prepared, using serial dilution from 100 µg F/ml NaF stock solution (Fischer Bioblock Scientific, Illkirch, France). The multivoltage potentials were converted to µg F /g using a standard curve with a coefficient correlation of $r \geq 0.99$. The mean repeatability of the readings, based on duplicate samples, was 92.3%. The total amount of fluoride (mg) in the micellar preparations was calculated from the amount of fluoride in the sample and the total volume of the sample after homogeneization.

2.5 Determinations of the minimum inhibitory concentration (MIC) and of the minimum bactericidal concentration (MBC) of 2-pyrrolidone

2.5.1 Bacterial, yeast and mould strains culture conditions.

Bacterial strains *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 8739); yeast strain *Candida albicans* (ATCC 10231) and mould strain *Aspergillus niger* (ATCC 16404) all recommended by the EP have been used. Furthermore, wild bacterial strains such as *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus capitis* provided from our laboratory and spores from *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus sphaericus* have been also tested. Before use, the

bacteria were kept frozen at -80°C in brain-heart infusion broth (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) supplemented with 20% glycerol.

Bacterial cultures were grown on trypticase soy agar (TSA) (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) at 37°C. Yeast and mould cultures were grown on Sabouraud agar medium (SAB) (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) at 30°C. The inoculum was prepared by suspending overnight cultures at 37°C in Mueller-Hinton (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) broth and adjusting to an OD₆₂₀ of 0.15-0.16 corresponding to 1-3x10⁸ colony-forming units (CFU)/ml. *C. albicans* (ATCC 10231) (6.7x10⁷ CFU/tablet) and *A. niger* (ATCC 16404) (5.4x10⁶ CFU/tablet) were provided by AES laboratoire (Combourg, France). MIC for *C. albicans* and *A. niger* has been realised in Sabouraud medium broth (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

B. sphaericus and *B. cereus* spores were isolated from growth culture on specific medium (meat extract 2.4g; peptone 2.4g; NaCl 1.2g; MnSO₄ 4 H₂O 0.03g; KH₂PO₄ 0.25g; agar 13g; water 1000 mL) while *B. subtilis* spores (10⁶ spores/tablet) was purchased from AES laboratoire, Combourg, France. Briefly, *B. sphaericus* and *B. cereus* spores were obtained after 48h culture at 37°C on a slant of specific medium. Specific medium was flooded with 2 ml of sterile water and shaken 15 s. The water was transferred in a sterile tube and heated 15 min at 80°C. Serial 10⁻¹ dilutions of the spore solutions were enumerated by the plating method on TSA medium. MIC determination has been done in Mueller-Hinton broth (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

2.5.2. Preparation of the samples

The experiments for the determinations of MIC and MBC have been carried out under aseptic conditions and precautions have been taken against microbial contamination. Nevertheless, experimental conditions were such that they do not affect any micro-organisms which were to be revealed in the test. The working conditions in which the tests were performed were monitored regularly by appropriate sampling of the working area and by carrying out appropriate controls (such as those indicated in the appropriate European Community Directives and associated guidance documents on GMP).

2-pyrrolidone and water were sterilized by filtration (0.45 µm pore size filters, Dutscher, Brumath, France) before use. First of all, a solution containing 800 mg/mL was prepared by adding 2.75 mL of deionized water to 7.25 mL of 2-pyrrolidone.

In a first step, a series of test tubes containing different concentrations in descending order of 2-pyrrolidone into Mueller-Hinton broth were inoculated with a same amount of bacteria or spores (10^6 CFU/ml) or into Sabouraud broth for yeast and mould strains. A broth not containing antimicrobial agent was inoculated as a control for organism viability. After 18-24 h of incubation at 37°C, the test tube of the highest concentration in which no microbial growth was observed gives the MIC value (mg/mL). In a second step, 100 µl of samples were taken from each test tube in which no growth was observed. Serial 10^{-1} dilutions of the samples were enumerated by the plating method on Mueller-Hinton agar or Sabouraud agar. After 24h of incubation at 37°C, or 48h at 30°C for *C. albicans* and *A. niger* the numbers of surviving micro-organisms were counted and were compared to the standard ranges (10^6 CFU/mL). MBC value (mg/mL) corresponds to the concentration of the sample tube in which surviving micro-organisms were equivalent to 0.01%. The ratio MBC/MIC allows determining the antibacterial activity as follows:

MBC/MIC \leq 4 characterizes a bactericidal, fungicidal or sporocidal activity.

MBC/MIC $>$ 4 characterizes a bacteriostatic, fungistatic or sporostatic activity.

2.6. Test for efficacy of antimicrobial preservation

The official *EP* Test for the efficacy of antimicrobial preservation is usually applied to preserved oral liquid formulations. Challenge testing was performed using micro-organisms selected from those listed in section 5.1.3. of the *EP* (*S. aureus* (ATCC 6538), *P. aeruginosa* (ATCC 9027), *E. coli* (ATCC 8739), *C. albicans* (ATCC 10231), and *A. niger* (ATCC 16404)). Containers of the product to be examined were inoculated with a suspension of one of the test organism to give an inoculum at 10^6 CFU/g.

Briefly, after micro-organism inoculation, the inoculated product (30g) was maintained at 20°C-25°C in the dark. One g aliquots of the inoculated product were removed at 0, 14 and 28 days. To each was added 9mL of a neutralizing solution (Polysorbate 80, 30g; lecithin, 3g; histidine monohydrochloride, 1g; sodium chloride, 4.4g; potassium phosphate dibasic, 3.6g; sodium phosphate dibasic, 7.2g; water, 1000 mL). After being allowed to neutralize for 0.3 h at room temperature, broths were diluted until 10^{-5} into the neutralizing solution and filtered through 0.45 µm filters 47 mm (Millipore, Molsheim, France). Each membrane filter was rinsed five times with 10 mL of the neutralizing solution. Finally, each membrane was plated

on an appropriate agar plate. Bacterial plates were incubated at 30°C for 24 h, while yeast and moulds plates were incubated 48 h at 30°C and the CFUs were counted. The control preparations were similarly sampled at 0 h to determine the viable counts of the cultures used and to confirm the ability of the unpreserved formulation to support the viability and/or the microbial growth and also the effectiveness of the neutralizing medium for the inoculum recovery.

3. Results and discussion

3.1. Solubility of vitamin D₃ and its formulation

The vitamin D₃ solubility in water in the presence of 2-pyrrolidone at various concentration is shown in Fig.1. In addition, the solubility enhancement of the drug in the presence of Vitamin E TPGS® is also shown. Vitamin D₃ has a solubility ranging from 0.01 µg/mL in pure water to 77 µg/mL in aqueous solutions containing 40% of 2-pyrrolidone and 79 µg/mL in aqueous solutions containing 40% [w/w] of 2-pyrrolidone and 1.5 % [w/w] of Vitamin E TPGS®. The use of other excipients in the 2-pyrrolidone and Vitamin E TPGS® formulations resulted in only a slight solubility enhancement (data not shown).

These results suggest that the selection of an adequate mixture of a co-solvent/surfactant can lead to a suitable formulation of a poorly soluble neutral drug candidate such as vitamin D₃. As depicted on the Fig.1, the addition of Vitamin E TPGS® in the 2-pyrrolidone formulation was not efficient to improve the water solubility of vitamin D₃. Nevertheless previously we observed that this excipient could improve the water solubility of propyl gallate, the antioxydizing agent, which is poorly soluble in a 2-pyrrolidone aqueous solution (data not shown). Therefore in this case, the concomitant use of an excipient and a co-solvent was justified by the solubilities and the physicochemical natures of the drug, vitamin D₃ and its antioxydizing agent, propyl gallate, used in the formulation (see formulation B and C below).

3.2. Granulometry analyses

DLS method has been extensively used for particle size analysis in the submicrometer range. It covers the size range of about 1 nm to 1 μ m. We applied DLS method to calculate the size distribution of the surfactant micelles formed in aqueous solution with Vitamin E TPGS® as the added surfactant. Data on physical properties of the Vitamin E TPGS® micelle for three formulations (A, B, C) are presented in Table 2. The average size for formulations A, B and C was respectively 6.02 ± 0.4 (by number) and 11.54 nm (by intensity); 7.69 ± 0.4 (by number) and 13.20 nm (by intensity); 6.54 ± 0.4 (by number) and 13.70 nm (by intensity).

Fig.2 shows the typical graphs for granulometry analyses for formulation B (formulation C shows a similar graph). This graph shows the size distribution by intensity of micelles formed with 1.5% [w/w] Vitamin E TPGS® in the final formulation.

As shown in Fig.2, by intensity, there is a wide distribution size for the micelles, ranging from 1.05 nm to 13.2 nm. However, micelles of dimension up to 13 nm constitute 94.8 % of the total micelle population, with the maximum number of micelles observed at a diameter of 0.866 nm.

3.3. Method validation

3.3.1. Vitamin D₃

Analytical separation of vitamin D₃ from the excipients present in the formulations is exemplified in Fig.3. This figure shows the method specificity as none of the added excipients interfered with vitamin D₃ which retention time was 4.9 min. Calibration curves were derived from injections at 5 concentrations of vitamin D₃ (11.85, 15.80, 19.75, 23.70 and 27.65 μ g/mL). The following regression equation was obtained: $(\text{peak area})_{\text{UA}} = 35884[\text{vitamin D}_3]_{\mu\text{g/mL}} + 14265$ with $r^2 = 0.999$ for vitamin D₃. All calibration curves were found to have a good linear regression fit ($r^2 > 0.99$) within the test range. The limit of detection and quantitation were respectively 0.36 ng/mL and 1.20 ng/mL for vitamin D₃. The corresponding relative standard deviation (RSD) was less than 5% for this drug. The limit of detection was calculated on the basis of 3σ and the limit of the quantitation on the basis of 10σ , according to Miller and Miller (1993).

The experiment reproducibility was assayed by performing six replicate injections of a standard mixture of vitamin D₃ at 19.16 µg/ml, leading to calculated peak areas in the range of 0.32% and 0.93% (expressed as coefficient of variation).

3.3.2. Sodium fluoride

Using an ion analyzer, quantitation of sodium fluoride was performed. The calibration linearity was obtained over the test range of 12.0-28.2 µg/ml with coefficients of correlation being over 0.999. The mean repeatability of duplicated samples was 92.3%. For the reproducibility, three groups of six replicate injections of a standard mixture containing 19.3 or 19.8 or 19.9 ppm of sodium fluoride resulted in reproducibility of readings expressed as coefficient of variation comprised between 0.29% and 0.62 %.

3.4. Microbiological properties of 2-pyrrolidone

The observed MICs and MBCs values obtained for 2-pyrrolidone varied from one micro-organism to the other (Table 3) respectively in the range of 20 mg/L to 75 mg/L and of 75 mg/L to 200 mg/L. For MIC, the most sensitive strains were respectively *S. capitis*, *A. niger* and *E. coli* while *Bacillus* spores were the most resistant organism with MIC around 50-75 mg/L. On the other hand, the lowest MBC values were obtained for *P. aeruginosa* and *E. coli*, gram negative bacteria, while the others strains displayed higher values around 200 mg/L. 2-pyrrolidone was a bactericidal compound against gram negative bacteria and *S. aureus*, but was a bacteriostatic or a fungistatic compound for all the others strains tested.

In addition to bacterial strains described in the EP, we have also used different bacterial species which can be found in oral pharmaceutical preparations.

Coagulase-negative staphylococci such as *S. epidermidis* and *S. capitis* belong to the microflora of human skin and mucous membranes, they are easily dispersed by skin scales. They are considered opportunistic pathogens and, in immunocompetent adults, are mostly associated with endocarditis, osteomyelitis, surgical site and foreign body infections (Eiff et al., 2002). *S. epidermidis*, is one of the major causes of nosocomial infections, especially nosocomial bacteraemia. It expresses several virulence factors including those involved in the ability to adhere to and accumulate as a biofilm on a variety of surfaces, including prosthetic

devices and transcutaneous catheters. (Gemmell et al., 2001). *Enterococcus* species are natural members of the human and warmblood animal intestinal flora. *E. faecalis* is the dominant species found in human feces (Murray, 1990). Furthermore, enterococci are frequently isolated in soil, plants, vegetables, and in various foods. Because of their high concentrations in feces and their long survival period in the environment, enterococci have been proposed as water fecal contamination indicators (U.S. EPA, 1986). *Bacillus* species are capable of undergoing sporulation, producing a dormant endospore. These spores are resistant to environmental stresses, including heat, desiccation, toxic chemicals, and extremes of ionic strength. Bacterial spores are the last organisms to remain viable during sterilization processes and environmental extremes that readily kill vegetative bacteria. For that reason, they are employed as biological indicators for monitoring the effectiveness of sterilization processes, such as vaporized hydrogen peroxide treatments (Johnston et al., 2005) autoclaving, and UV irradiation (Mamane-Gravetz et al., 2004).

3.5. Efficacy of antimicrobial preservation

EP (5th Edition, 2005. 5.1.3. *Efficacy of antimicrobial preservation* 447-449 and 2.6.13. *Microbial examination of non-sterile products: test for specified micro-organisms*) gives official quantitative methods for testing the efficacy of antimicrobial preservation in oral preparations. *EP* requires a log 3 reduction at 14 days in the case of bacteria and a log 1 reduction in the case of fungal count. At 28 days *EP* requires that there is “no increase” in bacterial and fungal counts compared to the 14 days count.

Colony counting is not a precision method and for this reason, the criteria are given in integer logarithmic reduction values, a half log reduction value was taken to specify the requirement of “no increase”.

The *EP* criteria for evaluation of antimicrobial activity for oral preparations are given in terms of log reduction in the number of viable micro-organisms against the value obtained for the inoculum, and are summarised in Table 4.

According to the *EP* criteria for *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans* and *A. niger*, 2-pyrrolidone preserved all 3 different oral preparations as well as 14 days and 28 days of

microbial contaminations. The highest preservative effect was obtained with the formulation A. In this case, all the micro-organisms tested, even yeast and mould, showed a high logarithmic reduction, around log 5. Formulations B and C had a similar effect against bacterial strains tested, but were less effective against yeast and mould strains specially at 14 days.

The main difference between the 3 formulations is the presence of propyl gallate in the formula B and C. It is well known that propyl gallate, have antioxidant properties (Pezzuto *et al.*, 2002). The lower efficiency of the antimicrobial activity of 2-pyrrolidone against fungus in formula B and C could be due to by the presence of propyl gallate which reduces the oxidative stress against lipid cellular membranes.

There is no criterion for bacterial spore reduction in the *EP*. No spore number reduction was detected within 14 days and 28 days excepted at 28 days for *B. cereus* spores with the formulation C in which we observed around a log 2 reduction. Such as for *EP* bacterial criteria at 28 days, there was “no increase” in spore count compared to the 14 days count, excluded for *B. subtilis* spores. In this case, a bacterial growth around log 2 was observed after 28 days contact.

Some others antimicrobial preservative compounds are used in pharmaceutical products. Parabens, especially propyl paraben, and p-hydroxybenzoic acid (pHBA) are the most frequently employed in cosmetic and pharmaceutic preparations (Soni *et al.*, 2001). Due to their wide antibacterial properties, low toxicity and chemical stability they have been used in food, drugs, and cosmetic for over 50 years. Parabens are antimicrobially effective in a dosage of 0.1 to 0.2%. Concentrations of use vary from product to product but seldom exceeds 1%. The main drawback is their unsatisfactory action against gram-negative bacteria, especially *Pseudomonas* genus which are capable of metabolising parabens as sources of nutrient materials (Nowak, 1985). Furthermore it has been shown that *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter gergoviae* produced an esterase involved in the hydrolysis of parabens (Valkova *et al.*, 2003). In the same way, Van Dyk *et al.* (2004) described that the treatment of *E. coli* with pHBA acid, induced an over expression of an efflux system involved in pHBA resistance. While Ramos-Gonzalez *et al.* (2001) showed that the mechanism of pHBA tolerance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E was due to an increase of the cell membrane rigidity. On the other side, it has been shown more recently, that parabens had an endocrine activity and had implications for potential risk to human health (Golden *et al.*, 2005). For

these reasons, 2-pyrrolidone could be used as new and safer antimicrobial preservative compound. The main drawbacks of this excipient is its higher MCI and MCB values compared to pHBA MCI, which is approximately 30-40 times more efficient (Cho et al., 1998). But, unlike parabens, 2-pyrrolidone has bactericidal activity against gram negative bacteria. Moreover, 2-pyrrolidone is a cyclic amide which lacks mutagenic or genotoxic activity and its oral LD₅₀ is very high in rats with values greater than 5000 mg/(kg-body weight) in rats being reported (BASF, 1961 and 1981).

For dissolving drugs, 2-pyrrolidone can be used in high concentrations in oral preparation (400 mg/mL). This concentration is greatly higher than the MICs measured against all microorganisms tested. For that reason we propose to use 2-pyrrolidone as the sole preservative agent in oral paediatric formulations in the absence of other preservative compound such as parabens or pHBA.

4. Conclusion

The concomitant use of 2-pyrrolidone and vitamin E TPGS® was beneficial to enhance aqueous solubility of vitamin D₃ and propyl gallate, the antioxidantizing agent. By comparison with conventional antimicrobial agents commonly used for oral formulations, MIC and MBC of 2-pyrrolidone were determined to be high, necessitating large amounts of this compound to provide antimicrobial efficacy for the formulation of a liquid oral drug delivery system. Therefore, the use of 2-pyrrolidone could be justified only in formulations of oral liquid drug delivery systems containing surfactants and it should not be used for liquid oral solutions or suspensions for which common antimicrobial agents are more suitable. To conclude, for formulations containing surfactants, 2-pyrrolidone can be promisingly considered, especially in the field of oral paediatric formulations.

TABLES AND FIGURES

TABLES:

Table 1: Compositions of the micellar solutions.

Compounds	Composition [g]		
	Formulation A	Formulation B	Formulation C
Vitamin D ₃	-	0.0080	0.0080
Sodium fluoride	0.2200	0.2200	0.2200
Propyl gallate	-	0.0200	0.200
Vitamin E TPGS®	-	1.5000	1.5000
Saccharin sodium	0.5000	0.5000	0.5000
Aroma without vanillin	0.4000	0.4000	0.4000
2-pyrrolidone	40.00	40.00	40.00
Lycasin® 80/55-sirup	40.00	40.00	40.00
Purified water	QSP 100.00	QSP 100.00	QSP 100.00

Table 2: Average size of Vitamin E TPGS micelles in formulations at 25°C.

Sample	Size distribution by Intensity (nm) ^a	Size distribution by Volume (nm) ^a	Size distribution by Number (nm) ^a
Formulation A	11.54 ± 0.5	7.97 ± 0.3	6.02 ± 0.4
Formulation B	13.20 ± 0.7	8.20 ± 0.4	7.69 ± 0.4
Formulation C	13.70 ± 0.9	9.18 ± 0.3	6.54 ± 0.4

^amean of 5 values ± SD

Table 3: MICs and MBCs values (mg/mL) of 2-pyrrolidone for different micro-organisms strains.

Strains	MIC	MBC	MIC/MBC	Activity
<i>E. coli</i>	30-50-30	75-75	< 4	bactericidal
<i>S. aureus</i>	40-50-50	100-200	< 4	bactericidal
<i>P. aeruginosa</i>	50-30	75-50	< 4	bactericidal
<i>E. faecalis</i>	50-50	200-200	< 4	bactericidal
<i>S. epidermidis</i>	40-40	200-200	> 4	bacteriostatic
<i>S. capitis</i>	20-20	75-100	> 4	bacteriostatic
<i>B. cereus</i> spores	50-75-75	>200->200->200	> 4	sporostatic
<i>B. sphaericus</i> spores	50-50-75	>200->200->200	> 4	sporostatic
<i>B. subtilis</i> spores	75-75-75	>200->200->200	> 4	sporostatic
<i>C. albicans</i>	40-40-30	200-200-200	> 4	fungistatic
<i>A. niger</i>	40-30-30	>200->200->200	> 4	fungistatic

Table 4: The logarithmic reduction of bacterial cell number for 3 formulations evaluated by the official EP “test for the efficacy of antimicrobial preservation”.

Log reduction								
	14 days				28 days			
	Expected	Obtained			Expected	Obtained		
Formulations Strains		A	B	C		A	B	C
<i>S.aureus</i>	3	5.57	5.70	5.32	3	5.20	5.13	6.43
<i>P.aeruginosa</i>	3	5.43	5.76	6.06	3	5.28	>5.00	6.65
<i>E.coli</i>	3	5.56	5.91	4.56	3	4.96	>5.00	6.08
<i>S.albicans</i>	1	5.73	3.96	>5.00	1	>5.00	5.71	>5.00
<i>A.niger</i>	1	>5.00	1.76	2.44	1	5.74	4.83	3.29
<i>B.cereus</i>	N.C.	<1.00	<1.00	<1.00	N.C.	<1.00	<1.00	1.96
<i>B.sphaericus</i>	N.C.	<1.00	<1.00	<1.00	N.C.	<1.00	<1.00	<1.00
<i>B.subtilis</i>	N.C.	<1.00	<1.00	<1.00	N.C.	<1.00	<1.00	-2.00

N.C.: no criterion

FIGURES:

Figure 1: Solubility of vitamin D₃ in various media: water, water + 2-pyrrolidone and water + 2-pyrrolidone + vitamin E-TPGS®

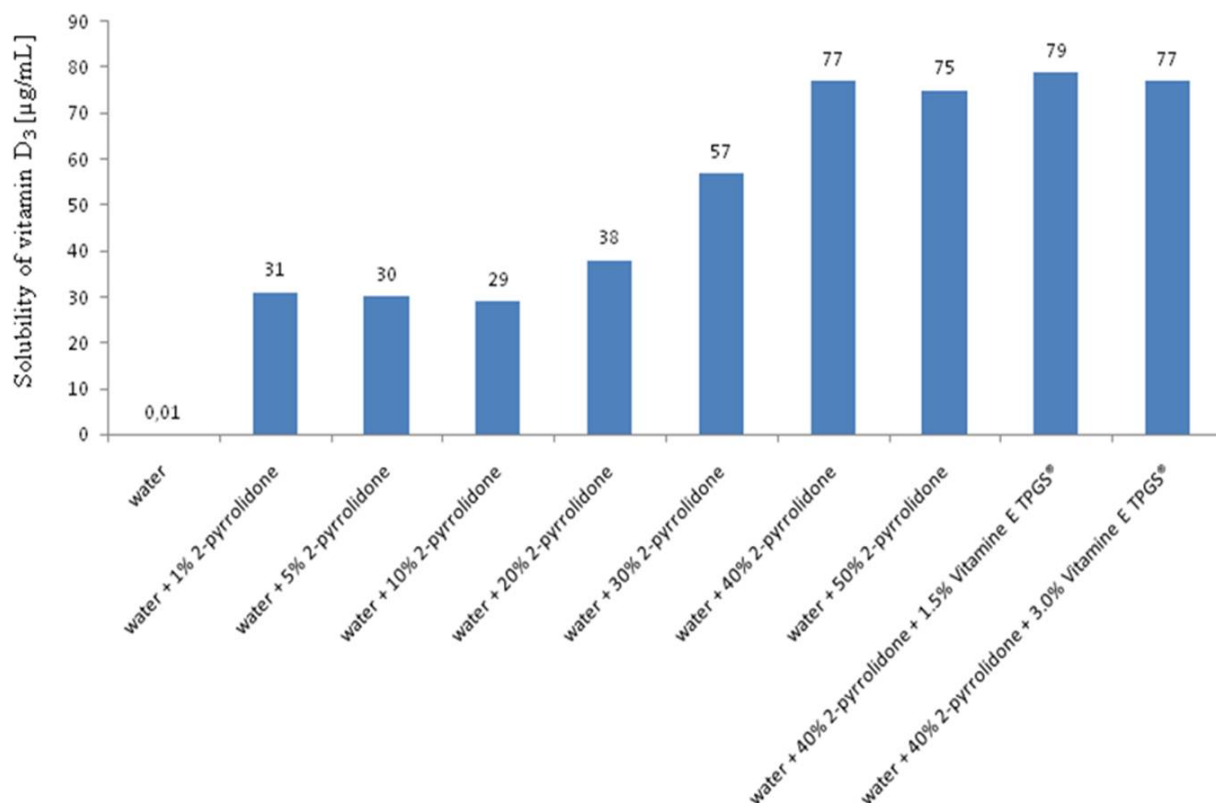


Figure 2: Statistics graph of size distribution (by intensity) of the micelles contained into the final formulation after 5 measurements.

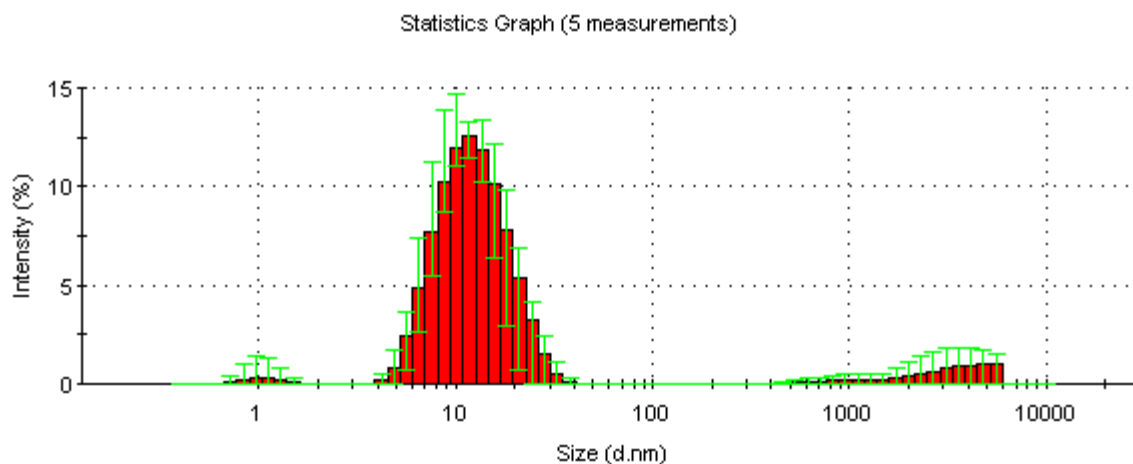
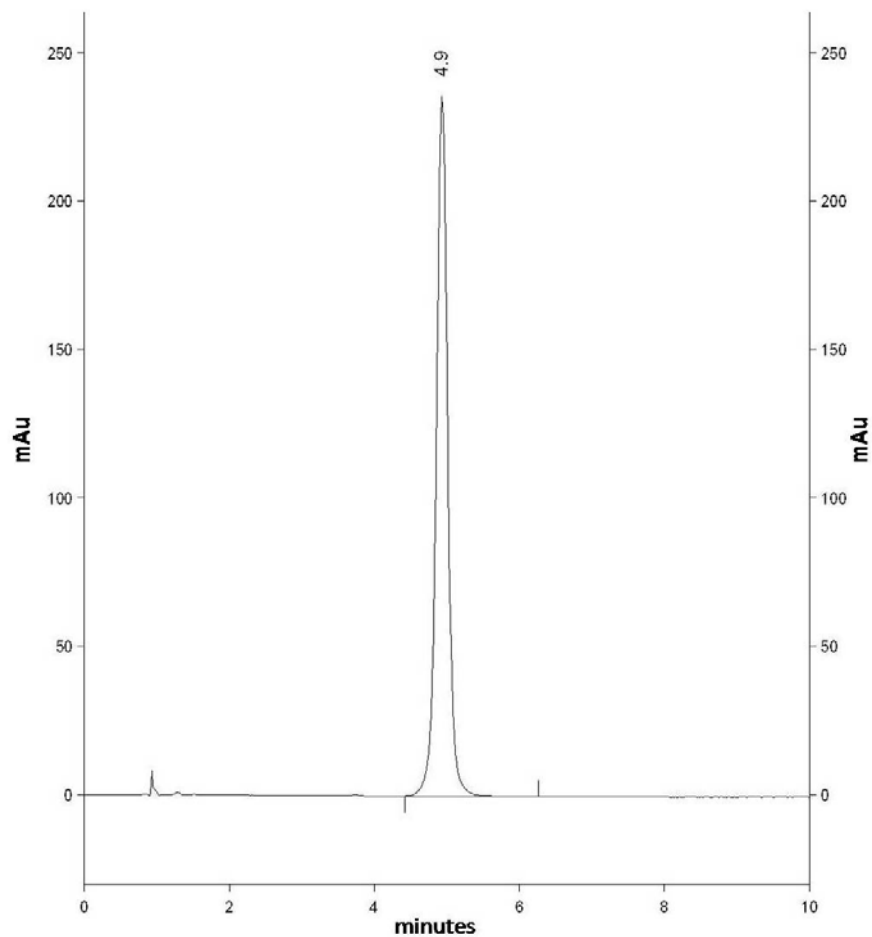


Figure 3: RP-HPLC chromatogram of a standard mixture containing Vitamin D₃ (Rt= 4.9 min).



References

1. BASF AG, Abteilung. Toxikologie, unveroeffentlichte Untersuchung, (XI/407), 07.11.1961
2. BASF AG, Abteilung Toxikologie; unveroeffentliche Untersuchungen (79/409), 09.04.1981
3. Bloomfield, S.F., 1990. Microbial contaminations: spoilage and hazard. In: Danyer, S. and Blair, R. (Ed.), Guide to microbiological Control in Pharmaceuticals. Chichester: Ellis Horwood, pp. 29-52.
4. Breitzkreutz, J., 2005. Kindgerechte arzneiformen. Monatsschrift Kinderheilkunde 8, 153, 726-34.
5. Breitzkreutz, J., Boos, J., 2007. Paediatric and geriatric drug delivery. Expert Opinion on Drug Delivery 4 (1), 37-45.
6. Caporal-Gauthier, J., Nivet, J.M., Algranti, P., Guilloteau, M., Histe, M., Lallier, M., N'Guyen-Huu J.J., Russotto R., 1992a. Guide to analytical validation. Report of an SFSTP commission. I. Methodology. S.T.P. Pharma Pratiques 1992a, 2(4), 205-226.
7. Caporal-Gauthier, J., Nivet, J.M., Algranti, P., Guilloteau, M., Histe, M., Lallier, M., N'Guyen-Huu, J.J., Russotto, R., 1992b. Guide to analytical validation. Report of an SFSTP commission. II. Examples of applications. STP Pharma Pratiques 2(4), 227-239.
8. Caporal, J., Capuzet, E., 1997. Analytical validation: from protocol to report. STP. Pharma Pratiques, 7(5), 360-363.
9. Chakravarty, D., Lach, J.L., Blaug, S.M., 1957. Study of complex formation between polyoxyl 40 stearate and some pharmaceuticals. Drug standard, 25, 137-140.
10. Chaminade, P., Feraud, S., Baillet, A., Ferrier, D., 1995. Validation of a chromatographic analysis method by HPLC. Ruggedness test and validation of the technique. S.T.P. Pharma Pratiques 5(1), 17-35.
11. Cho, J.Y., Moon, J.H., Seong, K.Y., Park, K.H., 1998. Antimicrobial activity of 4-hydroxybenzoic acid and trans 4-hydroxycinnamic acid isolated and identified from rice hull. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62, 2273-2276.
12. Eiff, C., Peters, G., Heilmann, C., 2002. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. Lancet Infect. Dis. 2, 677-685.
13. European Directorate for the Quality of Medicines. Efficacy of antimicrobial preservation. In: European Pharmacopeia 5.0. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines; 2002: 407-409.
14. European Directorate for the Quality of Medicines. Microbiological examination of non sterile products: test for specified microorganisms. In: European Pharmacopeia 5.0. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines; 2002: 4404-4414.
15. Florence, A.T., 1981. Drug solubilisation in surfactant systems. In Techniques of solubilisation of drugs, edited by S.H. Yalkowsky. New York: Marcel Dekker, Inc.
16. Gemmell, C. G., 2001. Coagulase negative staphylococci and their role in infection. In Sussman, M. (Ed.), Molecular Medical Microbiology. Academic Press, London, UK, pp. 889-899.
17. Golden, R., Gandy, J., Vollmer, G., 2005. A review of the endocrine activity of parabens and implications for potential risks to human health. Crit Rev Toxicol. 35, 435-458.
18. Higuchi, T., Connors, K., 1965. Phase-solubility techniques. Adv. Anal. Inst. 4, 117-212.
19. Johnston, M.D., Lawson, S., Otter, J.A., 2005. Evaluation of hydrogen peroxide vapour as a method for the decontamination of surfaces contaminated with *Clostridium botulinum* spores. J. Microbiol. Methods 60, 403-411.
20. Liu, R., 2000. Introduction, Chapter 1 in Water insoluble drug formulation. Interpharm CRC Press, Edited by Rong Liu, 1-4.
21. Mamane-Gravetz, H., Linden, K. G., 2004. UV disinfection of indigenous aerobic spores: implications for UV reactor validation in unfiltered waters. Water Res. 38, 2898-2906.
22. Miller J.C., Miller J.N., 1993. Statistics for analytic chemistry. 3rd ed. Chichester Ellis Horward.
23. Murray, B.E., 1990. The life and times of the *Enterococcus*. Clin. Microbiol. Rev. 3, 46-65.
24. Nowak, G.A., 1985. Microbiology, GMP, Disinfection, water treatment, preservation, 109-196 in Cosmetic Preparation Volume 1; Verlag für Chem Industrie H. ZiolkowskyKG. Augsburg, Germany.
25. Nunn, T., Williams, J., 2005. Formulation of medicines for children. Br. J. Clin. Pharmacol. 59 (6), 674-676.

26. Pezzuto, J.M., Park, E.J., 2002. Autoxidation and antioxidants. In: Swarbrick, J. Boylan, J.C., editors. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, volume 1. New York, Marcel Dekker. Inc., 2002, 97-113.
27. Ramos-González, M.I., Godoy, P., Alaminos, M., Ben-Bassat, A., Ramos, J.L., 2001. Physiological characterization of *Pseudomonas putida* DOT-T1E tolerance to p-hydroxybenzoate. Appl Environ Microbiol., 67(9), 4338-4341.
28. Smola, M., Zhao, M., Vandamme T.F., Sokolowski A., 2007. Design and development of oral paediatric reverse water-in-oil microemulsions as carriers for ranitidine hydrochloride, Minerva Biotechnologica, 19 (1), 7-16.
29. Smola, M., Vandamme, T.F., 2007. Taste masking of unpleasant oral drugs. 2007 Chap4 in Drug Delivery Research Advances, edited by Boris O. Mashkevich, Nova Publishers, 65-84.
30. Soni, M.G., Burdock, G.A., Taylor, S.L., Greenberg, N.A., 2001. Safety assessment of propyl paraben: a review of the published literature. Food Chem Toxicol. 39(6), 513-532.
31. Sunderland, V. B., Watts, D. W., 1984. Kinetics of the degradation of methyl, ethyl and *n*-propyl 4-hydroxybenzoate esters in aqueous solution. Int. J. Pharm. 19 (1), 1-15.
32. Tuleu, C., Gangé, J., Seurin, S., 2005. The need for paediatric formulation: oral administration of nifedipine in children, a proof of concept. J. Drug Delivery Sci. and Techn., 15 (4), 319-324.
33. U.S. EPA, 1986. Bacteriological Ambient Water Quality Criteria for Marine and Freshwater Recreational Waters. PB86-158-045. Springfield, VA: United States Environmental Protection Agency.
34. Van Dyk, T. K., Templeton, L. J., Cantera, K. A., Sharpe, P.L., Sariaslani, F.S., 2004. Characterization of the *Escherichia coli* AaeAB efflux pump: a metabolic relief valve? J. Bacteriol. 186, 7196–7204.
35. Valkova, N., Lepine, F., Labrie, L., Dupont, M., Beaudet, R., 2003. Purification and characterization of PrbA, a new esterase from *Enterobacter cloacae* hydrolyzing the esters of 4-hydroxybenzoic acid (parabens). J. Biol. Chem. 278, 12779–12785.
36. Watrobska-Swietlikowska, D., Sznitowska M., 2006. Partitioning of parabens between phases of submicron emulsions stabilized with egg lecithin. Int. J. Pharm. 312, 174-178.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

D'après les critères fixés par la Pharmacopée Européenne, Vème édition, l'efficacité de la conservation antimicrobienne a été démontrée pour le Soluphor[®]P dans les formulations pédiatriques contenant la vitamine D₃ (insoluble dans l'eau) et le fluorure de sodium. Le Soluphor[®]P a montré une haute efficacité antimicrobienne (bactéricide et fongicide).

Suite à ces résultats satisfaisants, l'idée d'utiliser le Soluphor[®]P comme un agent solubilisant microbien pour les nouvelles formulations pédiatriques sera réalisé dans le 3^{ème} chapitre de cette thèse. Notre objectif est de démontrer sur un cas concret la haute valeur ajoutée de cet excipient multifonction. Puisque le Soluphor[®]P est couramment utilisé chez l'homme pour une administration intraveineuse, les aspects toxicologiques sont déjà connus et maîtrisés, le passage à une utilisation orale devrait en être d'autant plus facilité.

Chapitre 2

**Microémulsions inverses hydrophile/ lipophile (H/L)
destinées au masquage du goût de substances amères
pour la voie orale chez les nourrissons et les enfants
en bas âge**

INTRODUCTION

La voie orale est la voie d'administration préférée des médicaments. Cependant, il existe toujours un problème récurrent : celui du goût de la préparation. Qu'il soit désagréable, amer ou salé, il entraîne souvent une réticence de la part du patient et par conséquent une mauvaise compliance.

Les préparations communément destinées à la voie orale comprennent : les émulsions, les solutions, les suspensions, les gels, les crèmes, les gélules, les pastilles, les comprimés, les gommes à mâcher, les comprimés orodispersibles ou dispersibles dans l'eau et les poudres orales. La plupart des substances actives que l'on trouve dans ces préparations ont un goût désagréable, amer ou salé. C'est pourquoi, soit on évite de faire des formes orales (à l'exception des comprimés pelliculés ou non) avec de telles substances, soit on trouve un procédé pour masquer leur mauvais goût.

En effet, une fois que le médicament est avalé, le goût désagréable est minimisé, voire inexistant. Toutefois, pour les personnes ayant des difficultés de déglutition, notamment les personnes âgées et les enfants, les médicaments les plus adaptés sont : les comprimés orodispersibles ou dispersibles, les poudres, les suspensions, les solutions, les microémulsions et les émulsions. Pour ces mêmes personnes, outre cette spécificité de formulation, se pose le problème d'enlever ou d'atténuer le goût désagréable de la préparation tout en conservant ses propriétés pharmacologiques comme la biodisponibilité et la libération du principe actif dans le tractus digestif au moment opportun.

Dans ce deuxième chapitre de notre thèse nous nous proposons de présenter le travail expérimental mené pour élaborer un médicament destiné à l'administration par voie orale aux nourrissons présentant régulièrement des problèmes de reflux gastro-oesophagiens. La molécule mise en œuvre dans ce cadre est le chlorhydrate de ranitidine qui est un principe actif très amer pour laquelle il est nécessaire de résoudre les 2 problèmes évoqués à savoir : une formulation adéquate et le masquage du goût désagréable.

Dans une **première partie**, ainsi que dans la **première publication mise en annexe**, une présentation générale sera proposée sur la physiologie du goût, les mécanismes de perception et les principales stratégies de masquage de goût.

La **2^{ème} Partie expérimentale** et notre **deuxième publication annexée**, est consacrée à la description des travaux menés et des informations obtenues nous permettant de mettre en avant certaines règles ou, plus modestement, quelques points à ne pas omettre, avant de passer à la formulation proprement dite, d'une spécialité buvable pédiatrique réalisée dans le cadre de cette thèse.

Après avoir situé le contexte de ce travail, nous présenterons les résultats obtenus avec le système colloïdal choisi, qui consiste en des systèmes microémulsionnés hydrophile/lipophile (H/L) dans lesquels la phase aqueuse constitue la phase interne du système. Celui-ci a permis, en effet, d'éviter, de part sa structure, un contact direct entre le principe actif et les récepteurs des papilles gustatives présents au niveau de la langue.

Dans notre **Conclusion** nous avons resitué la technique de microémulsion parmi toutes les stratégies de masquage de goût et évoqué les perspectives d'amélioration de l'acceptation et de l'assimilation des médicaments n'utilisant pas le masquage du goût.

Ce chapitre de thèse comporte donc deux publications annexées :

La première intitulée: «*Taste masking of unpleasant oral drugs*» est une large étude bibliographique expliquant la physiologie et la perception du goût ainsi que les techniques les plus couramment utilisées pour masquer le goût désagréable de médicaments.

La deuxième publication intitulée: «*Design and development of oral paediatric reverse water-in-oil microemulsions as carriers for ranitidine hydrochloride*», est une étude qui a permis de déterminer les concentrations idéales d'agents tensioactifs, d'eau, d'huiles, et d'agents co-tensioactifs à mettre en œuvre afin d'obtenir une microémulsion stable. Dans cette étude, des diagrammes de phases ont également été construits. Les systèmes microémulsionnés les plus intéressants ont été étudiés quant à leur conductivité, leur viscosité, leur réfractométrie et leur taille de gouttelettes constituant la phase aqueuse. Des études de stabilités physicochimiques ont été mises en place afin de déterminer les systèmes les plus intéressants.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Une présentation générale de la « physiologie du goût » pourra être trouvée dans le premier article, en annexe de cette partie. Cette publication est consacrée aux techniques de masquage de goût des médicaments pour la voie orale. L'anatomie des organes du goût (langue, nez) y est présentée ainsi que les quatre saveurs fondamentales (acide, salé, amère, sucré). D'un point de vue physiologique, la transduction des stimuli du goût dans les systèmes nerveux olfactifs et gustatifs y est aussi discutée.

Dans une seconde partie, la publication discute également des principales méthodes de masquage de goût des substances actives, comme l'usage d'excipients en tant qu'arôme. Les techniques de masquage de goût par piégeage de la substance désagréable aux papilles gustatives, y sont aussi présentées : adsorption du composé sur une résine ou inclusion dans un complexe moléculaire servant de vecteur (polymère ou cyclodextrine). Enfin l'usage de formulations galéniques particulières est aussi discuté, comme la dispersion du principe actif dans une phase lipophile au sein d'un système émulsionné.

Ces aspects ne seront pas repris dans le paragraphe suivant. Au contraire, l'accent sera porté ci-dessous sur un aspect qui n'est pas discuté dans la publication en annexe, à savoir les facteurs influençant le goût ainsi que la notion de seuils gustatifs.

1. Seuil absolu

Le seuil absolu d'une substance sapide est la plus petite concentration de cette substance qui permet de reconnaître sa saveur caractéristique. C'est une caractéristique qui permet d'évaluer la capacité d'une substance à procurer une saveur. Cependant, le seuil absolu d'un même composé varie selon les individus.⁹

2. Phénomènes d'adaptation

Comme dans tous les domaines sensoriels, la perception du goût est sujette au phénomène d'adaptation, c'est à dire que si un stimulus se prolonge (si un stimulus est maintenu en contact avec son récepteur), l'intensité de sa perception va diminuer avec le temps, autrement dit le seuil absolu de ce stimulus va augmenter. De plus, il faudra un temps de restauration de la sensibilité après suppression du stimulus. Ainsi, on observe de tels phénomènes d'adaptation simple (désensibilisation à un stimulus par ce même stimulus) dans la sensation gustative.

Toutefois, on observe aussi des phénomènes d'adaptation croisée, c'est à dire l'effet sur le seuil absolu d'une substance A, d'une stimulation prolongée à l'aide d'une solution B. Ces phénomènes peuvent s'observer dans différents cas :

- à l'intérieur de chaque famille de substances, sucrées, salées et acides, ce phénomène d'adaptation croisée est relativement net ;
- à l'intérieur de la famille de substances à l'origine de la saveur amère, ce phénomène ne suit pas de règles fixes, cette adaptation existe entre certaines molécules et n'existe pas avec d'autres. De plus cette adaptation est parfois unidirectionnelle : à titre d'exemple, l'adaptation de la quinine ne réduit pas l'amertume de l'urée, tandis que l'urée élève le seuil d'amertume de la quinine.

On n'observe pas, à proprement dit, de phénomènes d'adaptation croisée entre des molécules appartenant à différentes classes de saveurs. Cependant, on peut observer des phénomènes de « contraste » qui conduisent à une potentialisation, c'est à dire à une baisse du seuil pour la substance testée : ainsi le seuil de l'acide citrique est diminué après adaptation au saccharose, le seuil du saccharose est diminué après adaptation à l'acide picrique. Dans la même optique, le NaCl réduit le caractère salé du KNO_3 , mais potentialise sa composante amère.¹⁰

3. Facteurs influençant le goût

Il existe un certain nombre de facteurs qui vont influencer la perception du goût. D'une part, et cela a été développé précédemment, la nature de la molécule sapide est à l'origine de la saveur. De plus, la capacité de cette molécule à procurer une saveur peut être caractérisée par son seuil absolu.

D'autre part, il existe une forte variation selon les individus. Une même molécule sapide ne sera pas perçue exactement de la même manière par des personnes différentes. C'est à ce niveau, que les facteurs psychologiques ou sociologiques vont intervenir, en plus des différences physiologiques entre les individus.

La température a aussi un rôle dans la perception des saveurs.¹¹ L'effet maximal d'une solution sapide est constaté entre 20°C et 32°C ; il n'y a que la sensibilité à l'acidité qui est inchangée. Par exemple, la sensibilité au sucre augmente entre 10°C et 37°C puis diminue.

Les températures froides diminuent la sensation sucrée, et si elles sont extrêmement froides, elles peuvent même l'annuler. Une crème glacée chaude est immangeable, car trop sucrée, alors que froide elle est très appréciée. On peut aussi rappeler que la durée de stimulation, par les phénomènes d'adaptation, influe sur la perception des saveurs.

Enfin, on peut noter l'influence de la zone excitée. Les cellules réceptrices du goût sont relativement semblables d'un point de vue structural. De plus, la plupart de ces cellules peuvent réagir avec une, deux, trois, voir quatre saveurs sur les quatre, et beaucoup de substances ont une saveur mixte. Ainsi on ne peut pas, de manière absolue, établir une topographie précise de la localisation des différentes cellules réceptrices du goût, ou calicules gustatifs. Cependant, le bout de la langue est surtout sensible au sucré et au salé, les côtés à l'acide, et l'arrière de la langue (près de la racine) à la saveur amère.¹²

4. Conclusion

Si on a pu identifier certaines modalités de la perception du goût, à savoir : quelles sont les structures de base conférant les saveurs, quels sont les mécanismes de transduction des stimuli sapides, il faut bien se rendre compte que l'appareil gustatif est complexe. Les connaissances actuelles peuvent être complétées : en effet, il peut exister d'autres modes de transduction, d'autres types de récepteurs, ... De plus, la perception pratique des saveurs est bien plus complexe. En effet, les molécules peuvent avoir des saveurs mixtes; il est très rare de n'avoir qu'un seul type moléculaire en bouche, la perception des saveurs est différente selon la localisation de la substance sur la langue (les papilles ont des sensibilités différentes), etc... Tout ceci implique une intégration supérieure des informations provenant de l'appareil gustatif proprement dit, cette intégration est sûrement corticale avec des relais thalamiques. C'est à ce niveau que de nombreux paramètres psychologiques vont intervenir. Le phénomène est encore plus amplifié chez le nouveau-né et chez l'enfant qui sont plus sensibles aux saveurs que l'adulte.

Concernant les perspectives d'action sur la perception d'un goût déplaisant, cette étude bibliographique permet d'envisager différentes stratégies d'action. Agir au niveau de la structure moléculaire conférant la saveur désagréable semble être, en théorie, applicable. Cependant, trouver une structure moléculaire utilisable en thérapeutique est déjà difficile et onéreux, et faire entrer en compte le facteur goût dans la recherche de principes actifs paraît inapplicable de nos jours. De même, les connaissances concernant la médication pharmacologique de la perception du goût sont encore insuffisantes pour supposer agir sur ce paramètre. Par contre, et c'est ce qui s'applique actuellement, agir au niveau physiologique pur de la gustation est la meilleure stratégie.

Cette stratégie de masquage du goût se décline selon un certain nombre de techniques que nous avons relevées dans la bibliographie scientifique et que nous décrivons dans le paragraphe suivant.

5. Reproduction de la première publication du chapitre 2

Ci-dessous est reproduite notre publication incluant une présentation générale de la physiologie du goût ainsi que des techniques de masquage du goût des principes actifs désagréables dans les formulations pour la voie orale.

M. Smola, Th.F. Vandamme. « Taste masking of unpleasant oral drugs », Chap 4 in Drug Delivery Research Advances, edited by Boris O. Mashkevich, Nova Publishers, **2007**, 65-84.

Taste masking of unpleasant oral drugs

Malgorzata SMOLA and Thierry VANDAMME

University Louis Pasteur, Faculty of Pharmacy, LC01 UMR 7175 CNRS,

Department of Bioorganic chemistry,

74, Route du Rhin, 67401 Illkirch, France.

Abstract

Since several decade, in the field of the development of oral dosage forms, a lot of attention was focused on the design, the optimization of the processes of manufacture, the choose of the ingredients to improve the bioavailability of the drugs and to ensure in some particular cases a specific release of these ones into the gastrointestinal tract. Besides these progresses, innovations have been also realized in order to provide palatable dosage forms of many drugs – especially bitter and astringent drugs –, thus aiding compliance. To allow this, for solid dosage forms, formulators developed various techniques to mask the bitter taste including the flavoured additives (sweeteners, amino acids and lipids), physical methods (polymers coating, matrix granulation and encapsulation) and chemical methods (formation of inclusion complexes). In this chapter, we review these different techniques and also describe original emulsified dosage forms developed in our laboratory to mask the bitter taste of drugs incorporated into liquid oral dosage forms intended for oral paediatric applications. The e-tongue, an electronic device developed recently to evaluate the taste masking effect of dosage forms and used by developers in order to select the best combination of ingredients which provide “the best” testing formula is also described.

Keywords: *taste masking, drug delivery systems, dosage forms, bitter, and astringent.*

Topics

Introduction

1. What is taste?
 - 1.1. Taste perception
 - 1.2. Sensorial psychophysiology
2. Classification of drugs for taste making
3. Dosage forms for taste making
 - 3.1. Solid dosage forms
 - 3.1.1. Granules, powders
 - 3.1.2. Fast disintegrating drug delivery
 - 3.1.3. Chewable tablets
 - 3.1.4 Jellies
 - 3.2. Liquid formulations
 - 3.2.1. Solutions, liquid suspensions, syrups
 - 3.2.2. Emulsions, microemulsions
4. Strategies for taste masking
 - 4.1. Use of flavour enhancers
 - 4.2. Coating methods
 - 4.3. Complexation with ion exchange resins
 - 4.4. Inclusion complex formation with cyclodextrins
 - 4.5. Other techniques
5. Evaluation and optimization of taste masking effect
6. Application fields
 - 6.1. Infants, children
 - 6.2. Geriatric patients
 - 6.3 Domestic animals

7. Conclusion

References

Introduction

Humans can perceive and distinguish between five components of taste, namely: sourness, saltiness, sweetness, bitterness, and umami (in Japanese).

The bitterness of human pharmaceutical medicines plays a critical role in patient compliance, as the oral administration of bitter drugs is often hampered by their unpleasant taste, leading to noncompliance and thus decreasing therapeutic efficacy, especially in children and the elderly. The quantitative evaluation of the bitterness of medicines is, therefore, an important factor in drug formulation design.

Excessive bitterness of the active pharmaceutical ingredients in oral liquid or suspension formulation, sublingual or buccal formulation is a major taste problem facing pharmaceutical scientists. In the early development stage, bitterness of formulations can have an impact on clinical study design when a double-blinded trial is needed. Later, the bitterness of formulations can influence pharmaceutical selection by physicians and patients and thus affect acceptance and compliance. To inhibit or block the bitterness, both physical and chemical methods have been employed.

Depending on the character of the active substance and the desired dosage form, the methods commonly involved for achieving taste masking include various chemical and physical methods that prevent the drug substance from interaction with taste buds.

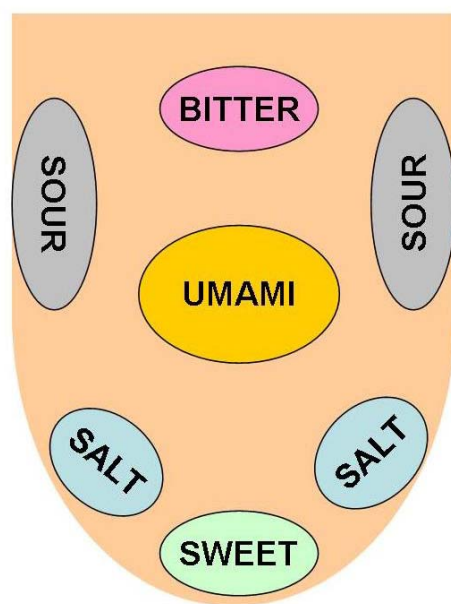
Although various physical methods, such as film coating, have been used in attempts to decrease the perception of bitterness of medicines, some drugs are still administered as a syrup or solution, using additives such as sucrose to reduce the bitterness of the formulation. Unfortunately, this method often fails to suppress the bitterness sufficiently.

Use of capsules, polymer coatings, microencapsulation, complexation, taste-masking excipients, inclusion complex with cyclodextrin, use of ion exchange resins, solubility limiting methods, liposomes, multiple emulsions, use of anesthetic agents, etc have been reported.

1. What is taste?

Taste, smell, touch, sight and hearing are the five senses which all humans and animals use to interpret the world around them. Specifically, taste is the sense for determining the flavour of food and other substances. All over the tongue, there are little bumps called taste buds (Figure 1).

Figure 1: Map of human tongue.



Generally speaking, taste is comprised of five basic qualities (Figure 1): sourness produced by hydrogen ions such as hydrochloric acid, acetic acid, and citric acid; saltiness produced mainly by sodium chloride; sweetness produced by sugars; and bitterness produced by quinine, caffeine and magnesium chloride. The last one is umami, which is the Japanese term for “deliciousness”, and is produced by monosodium glutamate contained in seaweeds, disodium inosinate in meat and fish and disodium guanylate in mushrooms (Pfaffmann, 1959; Kawamura and Kare, 1987).

Biologically, the sensations of taste in humans occur when molecules trigger signals in the mouth that are sent to the brain, where a specific taste sensation is registered. The taste transduction is mediated by specialized neuroepithelial cells, referred to as taste receptor cells, organized into groups of 40-100 cells, which form taste buds. Taste buds are ovoid structures, the vast majority of which are embedded within the epithelium of the tongue. The number of taste buds declines with age. Different taste modalities appear to function by different

mechanisms. For example, a salty taste appears to be mediated by sodium ion flux through apical sodium channels (Keast et al., 2001), while a sour taste seems to be mediated via a hydrogen ion blockade of potassium or sodium channels (Kinnamon and Roper, 1988). Sweet and bitter tastes are transduced by G protein-coupled receptors (Kinnamon and Cummings, 1992). To date, more than 80 putative bitter receptors have been identified (Matsunami et al., 2000). Nevertheless, the taste transduction mechanisms are complex and not fully yet elucidated. Moreover, the classical “taste map” is an over simplification. Sensitivity to all tastes is distributed across the whole tongue and indeed to other regions of the mouth where there are taste buds (piglottis, soft palate), but some areas are indeed more responsive to certain tastes than others.

1.1. Taste perception

The biological definition of taste (gustation) is a chemical reaction derived from sensory responses from the four main taste perceptions: salt, sour, bitter, and sweet. Two other perceptions (umami and trigeminal) should be included when considering taste. Clusters of small organs called taste buds are located in the mouth, mainly on the surface of the tongue. Taste buds (named so because under the microscope they look similar to plant buds) lie in small projections called papillae and contain taste receptors that bind to food molecules down by saliva. These receptors send messages along nerves to the brain, which interprets the flavour as sweet, sour, salty, or bitter.

Taste drives appetite and protects humans from poisons. So, the taste of sugar is well appreciated because people have an absolute requirement for carbohydrates (sugars etc.). Humans get cravings for salt because they must have sodium chloride (common salt) in their diet. Bitter and sour cause aversive, avoidance reactions because most poisons are bitter and off food goes sour (acidic). Why do medicines all taste bitter? Because they are, in fact, poisons and if the administration of these ones is too much, they will harm the patient. People have an absolute need for protein, and amino acids are the building blocks for proteins, so the taste quality umami which is the meaty, savoury taste drives their appetite for amino acids.

Smell (olfaction) contributes also significantly to the taste of something. This is due to aromas being released into the nasal passages as food is being chewed. The brain interprets the combined signals from both the nasal passages and the taste buds into one taste/flavour

response. The human tongue is packed with nerves, and many of these detect subtle differences in the consistency of the food being masticated. Whether the food is creamy, rough, granular, or sticky, the tongue is a master in differentiating those characteristics. A characteristic that is agreeable with one taste/flavour may be unfavourable with a different combination. People perceive flavours in different ways, and this is influenced primarily by the types of foods eaten. People of different ethnicity will have greater or lesser reactions to spicy or sweet foods. Informal taste tests with different flavours have shown that age is also significant in taste preferences. Younger people tend to favour more exciting and dynamic flavours, such as tropical punch, tutti-fruity, and mixed berry. Older generations typically prefer more traditional flavours, such as orange or mint. The indication can also play a part in flavour selection. For example, treatments for indigestion often incorporate a mint flavour, and this has become the flavour that patients expect for this type of medication. Consequently, from one generation of patients to another one generation, changing the flavour to something new may act against the product, even if the effectiveness is the same.

Taste disorders, in which either the sense of taste or smell is impaired, can be the result of allergies and viral or bacterial infections that produce swollen mucus membranes (behind the nose). They also may be due to a brain injury or disease that permanently damages the neural pathway through which taste and smell is transmitted. Lumps or ulcers on the tongue can be also a problem for people of all ages. It is caused by a papillae disorder. In addition, exposure to environmental toxins such as lead, mercury, tobacco, alcohol and insecticides can damage taste buds and sensory cells in the nose or brain.

1.2. Sensorial psychophysiology

Although there is considerable speculation that early flavour experiences influence later food and flavour preferences in humans, much of the published research, which is not extensive, fails to provide strong evidence for such effects. Moreover, previous studies showed that similarities in food preferences between children and their parents or siblings are often small or non-existent. Studies lead in this field demonstrated that there is an effect of early experience on later preference, involving flavours, not specific foods since experimental animal model studies demonstrate that early experiences with odours, a major component of flavour, in specific nursing-like contexts, results in long-term preferences. Research programs designed to investigate the long-term effects of early feeding experiences allowed to conclude

that there is for example a substantial flavour variation inherent in three classes of commercially available infant formulas: traditional milk-based formulas, formulas based on soy proteins, and those based on hydrolyzed proteins. From these research programs, it emerged that although the flavour of each brand has its own characteristic profile, milk based formulas are often described as having low levels of sweetness and “sour and cereal type” whereas soy-based formulas are described as tasting sweeter, more sour and bitter and having a relatively strong “hay/bean” odour. On the contrary, for adults, the formulas appeared to be extremely unpalatable, having offensive taste and off odour of the hydrolyzed formulas due primarily to its sourness and bitterness, perhaps because many amino acids have a taste sour or bitter, and also due to their unique volatile profiles.

2. Classification of drugs for taste making

Many drugs, both in development (> 40%) and already available in the market, have the problem of being only poorly soluble (< 0,1% w/v) in aqueous media. This can lead to poor bioavailability and frequently results in variable dissolution rates. For these reasons, when it is possible, the formulators prefer to manufacture the dosage forms by using soluble (solubility > 3% w/v) drugs in order to avoid the problems of low bioavailability of drugs. Between these two categories, there are the large majority of drugs which are partially-soluble (0.5-3%) in aqueous media and into the digestive tract media (pH comprised from 1.5 to 7.0), particularly for the ionisable drug depending of the dissolution media. When the drug is poorly water-soluble, the formulators try to use adequate formulations or dosage forms in order to improve this solubility. For these reasons, ingenious devices can be implemented such as use of co-solvents, modification of the pH of the solution, micellar solubilization, complexation, adding of hydrotropic compounds, chemical modification of the drug, co-precipitate, co melting, mixtures with oily or fat excipients, etc...If the bioavailability of the drug could be solved by using some of these techniques, it increases the problem of the taste masking since a soluble drug can lead to a problem of taste making which is not necessary encountered with the same poorly soluble molecular structure. Indeed, the poor solubility of a drug can prevent this one to interact with the receptors located on the mouth and therefore to not give the unpleasant taste of the drug.

3. Dosage forms for taste masking

If the taste of an active pharmaceutical ingredient is not too unpleasant, simply adding a flavour may mask its taste. However, if the drug is especially bitter or foul tasting, as is the case for many antibiotics, analgesics and central nervous system (CNS) drugs, coating of the active ingredient particles or forming other controlled-dissolution dosage forms may be required.

Taste exhibits almost complete adaptation to a stimulus – perception of a substance fades to almost nothing in seconds. For example, taste can be suppressed by local anaesthetics applied to the tongue. Amiloride, a blocker of epithelial Na channels, reduces salt taste in humans and adenosine monophosphate (AMP) may block the bitterness of several bitter tasting agents.

3.1. Solid dosage forms

3.1.1. Granules, powders

The use of granules for reconstituting as liquids (e.g. sachets, sprinkle capsules and powders) is very often employed for paediatric and geriatric patients. Taste masking of granules is a very important factor in product development and varied technologies and methodologies for this exist.

A granular composition for taste masking comprising of drug core of a non steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) and methacrylate ester copolymers as coating agents for taste masking was prepared by Hayward *et al.* (1998). The method comprises of coating the drug cores with separate layers of aqueous dispersions of the copolymers. These granules could be used to obtain the chewable tablets, which had good palatability and bioavailability.

The mannitol and lactose having different weight ratios (1:1.5 – 1:5) are used as coating materials for masking bitter taste of solid drug preparations (Kishimoto *et al.* (1997)).

Another composition comprising of a drug with unpleasant taste of polymer solution and D-crystals of monoglycerides was described by Yajima *et al.* (1997). Eudragit E (100 g) was dissolved in melted stearic acid monoglyceride (600 g) and then Erythromycin (300 g) were added to the mixture to obtain a powder, which was again mixed with sorbitol, magnesium oxide and starch to give taste masked granules of Erythromycin (Yajima *et al.* (1997)).

A novel dosage form was invented by Danielson et al (1999). These one comprised granules containing the histamine receptor antagonist which are provided with taste masking coating comprising a water insoluble, water permeable methacrylate ester copolymer in which the coating is applied to the granules in an amount which provides a taste masking effect for a relatively short period during which the composition is being chewed by a patient but which allows substantially immediate release of the histamine receptor antagonist after the composition has been chewed and ingested (Danielson *et al.* (1999)).

The use of polymer having at least one free carboxyl group and polyvinylpyrrolidone was also described as a mean and another interesting method for manufacturing palatable drug granules (Kumar (2002)).

3.1.2. Fast disintegrating drug delivery

The key of the success of orally disintegrating tablets (ODT) is their good taste. If the product does not taste good, patients and physicians will find another ODT or other product that does taste good. ODT technology is relatively new to the pharmaceutical industry and has had a significant impact on patients of all ages. ODT solid dosage forms dissolve or disintegrate in the oral cavity in a relatively short time (within a matter of seconds when placed upon the tongue) and do not need to be swallowed with water. By using these dosage forms, it's easier to take the medicines, especially for children and the elderly, who have traditionally difficulties by swallowing more conventional dosage forms. In fact, the introduction of fast dissolving dosage forms solved some of the problems encountered in administration of drugs to the paediatric and elderly patient, which constitutes a large proportion of the world's population. The single most significant issue with ODT is the bitterness of the drug that can be exposed as the tablet breaks apart. Skilful taste masking is needed to hide this bitterness, and combining this with the right flavour/sweetness levels will result in a superior product. Medicines have always been unique as the only product that consumers took on blind faith. However, consumers have become more knowledgeable and demanding due to many reasons, including direct-to-consumer advertising, medical websites, and the increasing number of medicines available over the counter (OTC). Consequently, consumers now have a greater power of choice than ever before, and as with any other orally consumed product, taste is the deciding factor. In today's competitive world, there are increasing numbers of ODT products

targeting the same indications. This means that a pharmaceutical laboratory's product needs to stand out over its competitor's.

Some drugs have relatively no taste, and simply adding a suitable flavour can “hide” any slightly unpleasant sensations. However, most drugs do require taste masking if they are to be incorporated into an ODT formulation. There are many different ways to produce an ODT, including compressed tablets, compression moulded tablets, freeze-dried (lyophilized) wafers, spray drying, coacervation, microencapsulation into pH sensitive acrylic polymers, and mass extrusion. Some of these technologies have led to products that are approved by the Food and Drug Administration (FDA).

The time for an ODT to disintegrate in the oral cavity also varies by product and the method of manufacturing. Compressed tablets will typically take slightly longer to disintegrate than freeze-dried wafers due to a different bonding mechanism and differences in porosity between the two dosage forms. Compression-moulded tablets would be expected to have disintegration times that are similar to compressed tablets. The method used to determine the disintegration time is critical, and the disintegration method stated both in the United States Pharmacopeia (USP30-NF25) and in European Pharmacopeia (EP) 5.0 for conventional “hard” tablets may not be appropriate. The lack of an appropriate disintegration test for ODT products, results in USP or EP method being the only official method available. However, this test is quite aggressive for ODT products and results in disintegration times as short as a few seconds. Several pharmaceutical companies have developed their own internal, more discriminating method to measure disintegration times of these dosage forms. *In vivo* disintegration times will vary tremendously depending on how the patient processes the dosage form. A patient that actively moves the product around the oral cavity with the tongue will experience a faster disintegration time than one who allows the product to disintegrate without any additional encouragement. It is important to note that even though this type of dosage form has inherent patient-to-patient disintegration time variability, an approved ODT must still meet the typical requirements for bioequivalence, independent of disintegration time.

The method of manufacture can influence the quality of the finished product, and this is especially true for lyophilized wafers. Insoluble drugs pose a significant challenge as they can settle out of suspension prior to being poured into the pockets and freeze dried, resulting in content uniformity issues. This dosage form also cannot be placed into the more convenient and cost-effective bottle packaging, unlike the more robust compressed tablets. Drugs have

varying levels of bitterness and dosage; therefore, some are more challenging to taste mask than others. It may be acceptable to have a small amount of drug taste present in the final product, but it will depend on the relative merits of the product as to how well the product is received by patients. How the product is packaged will also make a difference to the patient. If the ODT product has the advantages of being taken anywhere, at anytime, the access to the drug product is clearly important. Most of the ODT products currently on the market are packed into some form of blister package, and depending on how much protection the product needs both from the environment and access by children, some blistered products are easier to access than others. The significant advantage of not needing water to swallow the product can be negated by the need for scissors to open the blister. Being able to package the product into bottled will reduce the manufacturing costs, and may improve ease of access, but this will only be an option for those ODT technologies that are suitable for the rigors of bottle packaging.

3.1.3. Chewable tablets

The dosage forms which can be produced simply and that the patients can swallow easily maybe important and valuable for the masking of the drug taste. One of the simple way amongst others to achieve such dosage forms is to add appropriate masking agents to powder, liquid or chewable dosage forms. Amongst these ones, a few decades ago, chewing gum was rarely considered when pharmaceutical industry searched for an applicable delivery vehicle for an active pharmaceutical substance. Yet, the 1980s and 1990s saw gum become the most successful nicotine delivery form; unawareness changes to cautious scepticism, and today the merits of chewing gum drug delivery technologies are generally appreciated.

As example to illustrate this, acetaminophen, an antipyretic, has a bitter taste, but is often applied to infants and children due to its safety. Suppository and syrup dosage forms are often used to take the drug more comfortably. Commercial syrups of acetaminophen exhibit fairly strong sweetness and do not suppress the bitterness very much. Chewable dosage form may be useful for improving such problems. Chewable dosage forms to mask bitter taste of acetaminophen were investigated in efforts to obtain oral dosage forms which could be taken easily. Therefore, for acetaminophen, the dosage form easy to swallow with inhibited bitter taste was necessary to achieve good compliance and simple administration way. To improve these matters, acetaminophen-containing chewable tablets using Witepsol® H-15 or cacao

butter as a matrix base and some correctors as bitter masking agents were developed (Suzuki *et al.*, 2003). These chewable tablets can be prepared simply, and were considered to be available to patients having trouble in swallowing because they could be chewed. However, these tablets did not necessarily show comfortable oral feeling, which appeared to be mainly due to the stickiness of the hard fat. Therefore, further examination of the formulations was required to improve oral feeling in addition to bitterness suppression. To optimize these formulations, various kinds of hard fats and many sweetening agents were examined to obtain acetaminophen chewable tablets with suppressed bitter taste and improved oral feeling. The dose of acetaminophen per oral administration was 300-500 mg for adults, but it was adjusted to 10mg/kg for infants. As to hard fats, Witocan® was examined in addition to Witepsol®, Witocan® being utilized as special hard fats in the chocolate and confectionery industry. Currently available sweetening agents such as sucrose, xylitol, saccharin, saccharin sodium, aspartame and sucralose, were used as sweetening agents. These compounds show different sweet taste intensities and oral feeling. Xylitol has sweet taste intensity similar to sucrose but gives a brisk feeling orally. Saccharin and saccharin sodium are 500 times as sweet as sucrose, and aspartame and sucralose showed 200 and 600 times as the sweet taste intensity as sucrose, respectively. Sucrose is often utilized as a sweetening agent against drugs with unpleasant tastes or stimuli (Yin *et al.*, 1996). In addition to the above sweetening agents, commercial bitter-masking powder mixture made from lecithin (Benecoat® BMI-40) (Katsuragi *et al.* 1997) and cocoa powder (Koyama and Kurihara, 1972; Pickenhagen *et al.*, 1975; Aremu *et al.* 1995) were utilized as correctors. Cocoa has been shown possibly useful for suppression of bitter taste of drugs (Popova, 1969; Takano, 2002). Benecoat® BMI-40 is known as a corrector against bitter taste. The corrector system of 1 or 5% (w/w) sucrose plus 5% (w/w) Benecoat BMI-40, or 1% (w/w) sucrose plus 1% (w/w) cocoa powder, or 5% (w/w) sucrose alone gave the best suppression of the bitter taste intensities of acetaminophen-containing Witepsol® H-15 chewable tablets (Suzuki *et al.*, 2003), the obtained tablets being evaluated based on suppression of bitter taste, sweet taste intensity, oral feeling and drug release.

3.1.4 Jellies

Some of the main problems in formulation for infants and children are unsavoury or bitter taste, formulations which are very powdery, and multiple dosages. Powdery medicines in particular often taste unpleasant, even in taste-masked formulations. Recently, a number of jelly products have been developed that aim to improve compliance by aiding swallowing. When the drug is incorporated in the jelly product, swallowing is made easier due to its moderate adhesion and liquidity while drug absorption by the tongue is prevented, and bitterness perception is thereby decreased. The physicochemical characteristics of jellies, such as viscosity, strength, loss of water content have a positive effect on swallowing and on bitterness suppression.

Jellies have been first envisaged in order to suppress the bitterness of dry commercially available syrups containing the macrolides clarithromycin (CAM) or azithromycin (AZM). The bitterness intensities of mixtures of the dry syrups and acidic jellies were significantly greater than those of water suspensions of the dry syrups in human gustatory sensation tests. On the other hand, the mixture with a chocolate jelly, which has a neutral pH, was less bitter than water suspensions of the dry syrups. The bitterness intensities predicted by the taste sensor output values correlated well with the observed bitterness intensities in human gustatory sensation tests. When the concentrations of CAM and AZM in solutions extracted from physical mixtures of dry syrup and jelly were determined by high performance liquid chromatography (HPLC), concentrations in the solutions extracted from mixtures with acidic jellies were higher than those from mixtures with a neutral jelly (almost 90 times higher for CAM, and almost 7 to 10 times higher for AZM). Thus, bitterness suppression was correlated with the pH of the jelly. Finally a drug dissolution test for dry syrup with and without jelly was performed using the paddle method. There was no significance difference in dissolution profile. It was concluded that the appropriate choice of jelly with the right pH is essential for taste masking. Suitable jellies might be used to improve patient compliance, especially in children. The taste sensor may be used to predict the bitterness-suppressing effect of the jelly.

3.2. Liquid formulations

A lot of drugs have an unpleasant taste and in particular when they are administered under a liquid dosage form which is well appropriated for the administration of drugs to kids or old people who can encounter some swallowing problems with solid dosage forms like tablets, capsules, ... For this reason, pharmaceutical liquid and fluid dosage forms like syrups, potions, emulsions and suspensions are preferred. Nevertheless, the administration of such drugs having an unpleasant taste by using these dosage forms proves to be difficult and lead to a decrease of the compliance of such dosage forms in particular for the categories of people mentioned above.

3.2.1. Solutions, liquid suspensions, syrups

The majority of paediatric preparations are formulated as syrups and suspensions although, the aforementioned methodologies have also been used for improving liquid taste and few patents in this area are worth mentioning.

The bitter taste of vitamin B1 derivatives such as dicethimine, was masked by formulating oral liquids with menthol, polyoxyethylene and /or polyoxypropylene (Nakona *et al.* (1999)).

To manufacture oral liquids containing diclofenac and its salts, Osugi *et al.* (1999) suggested to use a mixture of glycine, glycyrrhizin acid or salt thereof, in order to mask the bitter taste and to prevent the irritation of the throat upon oral administration.

The use of prolamine (class of simple proteins having a high proline content and found in the seeds of wheat, rye, maize, and barley ...) for the application as single coating in weight ratio 5% to 100% relative to active substance being coated result in the production of a liquid suspension which effectively masked the taste of orally administered drugs which are extremely bitter. Prolamine coating does not restrict the immediate bioavailability of the active substance and is effective in masking the taste of antibiotics, vitamins, dietary fibres, analgesic, enzymes and hormones.

Pharmaceutical composition comprising polyhydric alcohol based carrier was reported by Swaminathan *et al.* (1997) to mask the bitter taste of a drug like cimetidine formulated into a liquid dosage form containing talin, peppermint oil and glycerol.

A liquid suspension of microcapsules for taste masking was invented by (Morella *et al.* (2001). This one allowed to taste mask a bitter drug as a function of a polymer coating and the pH of suspended medium at which pharmaceutically active ingredients remain substantially insoluble.

The another liquid composition comprising a pharmaceutically active medicament coated with a taste masking effective amount of polymer blend of dimethylaminoethylmethacrylate and neutral methacrylic acid ester and a cellulose ester in an aqueous vehicle was invented by Yu *et al.* (2002). The liquid composition utilizes a reverse enteric coating, which is soluble in acid pH of the stomach generally about 1 to 4 but relatively insoluble at the non-acidic pH of the mouth. The coating provides the rapid release and absorption of the drug, which is generally desirable in the case of liquid dosage forms.

When pharmaceutical compositions comprised of ingredients with an unpleasant taste are formulated, it is important not only to mask the taste by an appropriate pharmaceutical technology but also to evaluate the degree of improvement in taste. The surest method to evaluate taste is sensory testing with human volunteers. However, since the sensory test is difficult to perform, a simple alternative method is required. *In vitro* release tests, such as the paddle method in the Japanese Pharmacopoeia, measurement of the amount of release in a centrifugal tube with shaking or in an injector with continuous inversion and other tests, are often substituted for sensory tests as surrogate methods of evaluation. Clarithromycin (CAM), a macrolide antibiotic, has a strong bitter taste. The effect of CAM concentration on the bitterness was studied by Koyama *et al.* (1990) who reported the threshold of bitterness of CAM solution is 14 mg/l, the concentration at which half of human volunteers recognize bitterness. To mask the bitterness for the commercial CAM paediatric dosage form (dry syrup), several pharmaceutical technologies are used (Yajima, 1996). Manufacturing conditions also affect the degree of bitterness of CAM dry syrup (Yajima, 1999). Since that dosage form consists of matrix comprised of CAM, the elevation of temperature during the drying process enhances the bitterness. In the first stage, the paddle method was used to evaluate the release rate of each batch manufactured under various conditions. No correlation was found between the amount of release and the degree of bitterness, however. In this dosage form, as the amount of release of CAM from dry syrup increases, the bitter taste increases. Thus, perfectly taste-masked batches do not always exhibit a low release pattern. For this reason, a new method for the evaluation of bitterness of CAM dry syrup using a mini-column technique was examined and optimum measurement conditions were defined. The

threshold of bitterness of CAM from dry syrup was also obtained using this method. In the case of CAM paediatric dosage form, it is not enough to put a good coating on the drug particle. For suspension formulations, there are problems which must be solved and each requires quite different considerations. Firstly, the suspension must have an acceptable taste after storage, usually from two weeks to six months. Secondly, only a small amount of the drug must be released from particles which are trapped in the mouth. Thirdly, the drug must be released within the desired period of time in the proper part of the digestive tract after swallowing. Failure to solve any one of these problems will produce an unacceptable suspension.

3.2.2. Emulsions, microemulsions

The emulsions and microemulsions deliver one or more actives in the same dosage form at predetermined rate(s) to enhance disease management and patient compliance.

Taste masking of therapeutic agents is also inherent with the liquid emulsion and microemulsion drug delivery technology, and the ease of oral administration making the system ideal for the geriatric and paediatric markets.

An emulsion is a dispersion of two or more immiscible liquids stabilised by a surfactant or emulsifier coating the droplets and preventing coalescence by reducing interfacial tension or creating a physical repulsion between the droplets. Two common types of emulsions are found in oral drug delivery systems. Water-in-oil emulsions (W/O) and oil-in-water (O/W) or lipid emulsions.

Microemulsions are clear, stable, isotropic mixtures of oil, water and surfactant, frequently in combination with a co-surfactant. These systems are currently of interest to the pharmaceutical scientist because of their considerable potential to act as drug delivery vehicles by incorporating a wide range of drug molecules and for their stability.

Microemulsions are defined as thermodynamically stable dispersions of two non miscible liquids and stabilized by surfactants. They can be obtained at room temperature when all the constituents are mixed together, which is particularly interesting for the thermolabile drugs. Generally, the microemulsions appear limpid since the size of the internal phase is comprised

between 100 and 200 nm. The microemulsions are constituted of four major constituents, namely (i) an aqueous phase, (ii) an oily phase, (iii) a surfactant and (iiii) a co-surfactant.

In our laboratory, we designed the liquid water-in-oil (W/O) microemulsions intended for the oral administration of ranitidine hydrochloride. The unpleasant taste of the drug can be masked by incorporating this active compound in the internal phase of a W/O microemulsion. The direct contact of the drug dissolved in the aqueous phase with the taste buds and the receptors whose are present on the tongue are prevented by the lipid external phase which is able to cover these ones. In order to design these liquid water-in-oil microemulsions, studies have been focused on the stability and on the taste of the excipients used to formulate this new dosage form

To optimize this choice the different excipients has to be done in order to obtain a stable and limpid W/O microemulsion having a pleasant taste.

The oily phase

Different oily phases (Montane® 85, 65 and 20, Labrafil® M 1944CS and Montanox® 85) having various hydrophilic/lipophilic balances have been studied. Several W/O microemulsions have been formulated and had the following compositions : 10 ml of aqueous phase buffered at pH 6.9 containing 1000 mg of ranitidine hydrochloride, the preservative agents and the sweetener, 32.27 ml of an oily phase containing also the antioxidizing agents, 37.05 ml of Montanox® 80 as the surfactant and 16.67 ml of propylene glycol as the co-surfactant.

The surfactants

Several surfactants (Montanox® 65, 80, 40 and 20) having different hydrophilic/lipophilic balances were studied. Several W/O microemulsions have been formulated and had the following compositions : 10 ml of aqueous phase buffered at pH 6.9 containing 1000 mg of ranitidine hydrochloride, the preservative agents and the sweetener, 32.27 ml of Labrafil® M

1944CS containing also the antioxidizing agents, 37.05 ml of the surfactant and 16.67 ml of propylene glycol as the cosurfactant.

The co-surfactants

The determination of the domains of the W/O microemulsions were established by the drawing of a ternary diagram for which the ratio Surfactant/Co-surfactant has been determined (figure 3-11).

Three ratios (1, 10 and 50) and three co-surfactants (glycerol, propylene glycol, Transcutol® P) have been studied.

The sweeteners

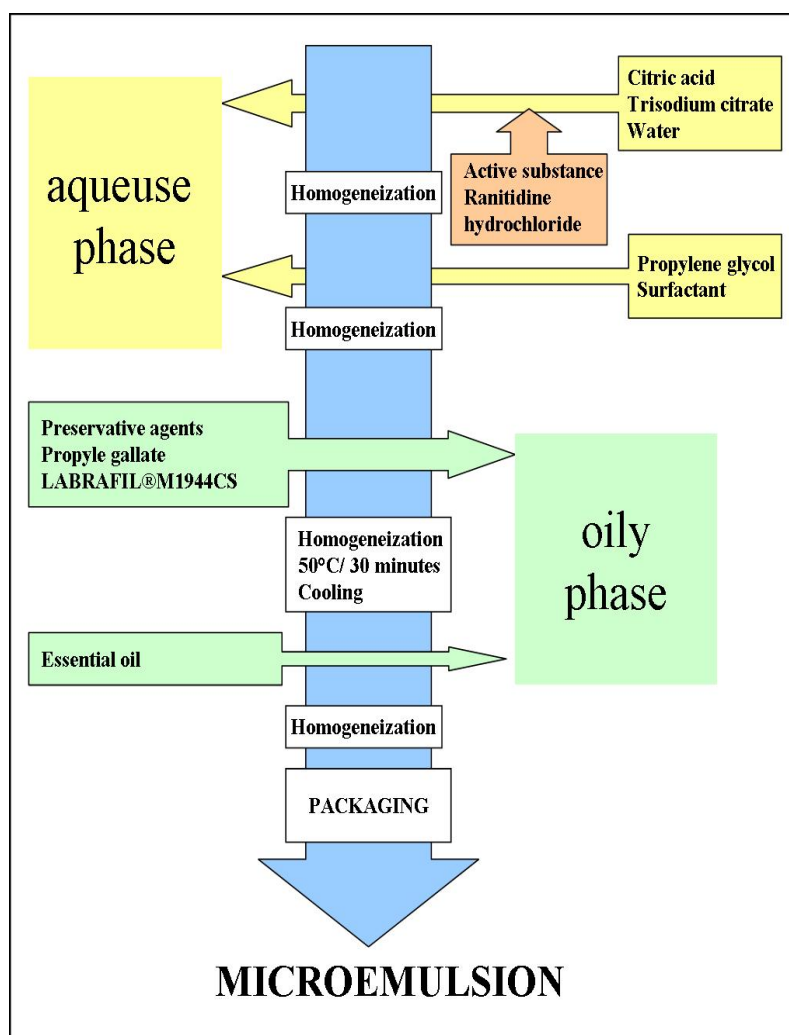
Different sweeteners (saccharose, sodium saccharinate, saccharine, neohesperidine dihydrochalcone (NHDC) and sodium cyclamate) having various sweetening powers have been tested.

The determination of the direction of the microemulsions

The determination of the direction of the microemulsions was realized by the measure of the conduction of the electrical current, by using hydrophilic colouring like methylene blue or lipophilic colouring like soudan red and, by the method of dilution.

The water-in-oil microemulsions were manufactured by making use of different steps as shown in figure 2.

Figure 2: Manufacture scheme of W/O microemulsion containing ranitidine hydrochloride.



The process of the manufacture of the W/O microemulsions takes into account the physicochemical parameters of the different excipients (figure 2). The quality checks of the dosage form comprise the determinations of the viscosity of the microemulsions, of the size of the droplets constituting the internal phase of the dispersed system, the uniformity of the amount delivered and the quantitation of the drug and the preservative agents (figure 2).

The oily phase

The obtained results depending of the different oily phases are presented in table 1.

Table 1: Results of stabilities of the different tested W/O microemulsions by using different oily phases, depending of different hydrophilic/lipophilic balances (HLB).

	Oily phase	Results
1st trial	Montane® 85 (HLB=1.8)	unstable
2nd trial	Montane® 65 (HLB=2.1)	unstable
3rd trial	Labrafil® M 1944CS (HLB=4)	stable
4th trial	Plurol oleique CC (HLB=6)	stable
5th trial	Montane® 20 (HLB=8.6)	stable
6th trial	Montanox® 85 (HLB=11)	stable

From these trials, it was concluded that the ideal constituents of the oily phase must have an hydrophilic/lipophilic balance comprised between 4 and 11 in order to obtain an optimal stability.

Concerning the use of the more appropriate surfactants, the obtained results are presented in table 2.

Table 2: Results of stabilities of the different tested W/O microemulsions by using different surfactants having different HLB

	Surfactants	Results
1st trial	Montanox® 65 (HLB=10.5)	stable
2nd trial	Montanox® 80 (HLB=15)	stable
3rd trial	Montanox® 40 (HLB=15.6)	stable
4th trial	Montanox® 20 (HLB=16.7)	unstable

From these trials, it was concluded that the ideal surfactants must have a hydrophilic/lipophilic balance comprised between 10.5 and 15.6 in order to obtain an optimal stability.

The importance of the area of the domains of W/O microemulsions was different by using the three different co-surfactants mentioned below and is the following (figures 3-11):

Glycerol < Propylene glycol < Transcutol® P.

Figure 3: Pseudo ternary diagram of microemulsion containing Water/ Labrafil® M 1944CS/ Montanox® 80/ Transcutol® P with the ratio of S/CoS = 1.

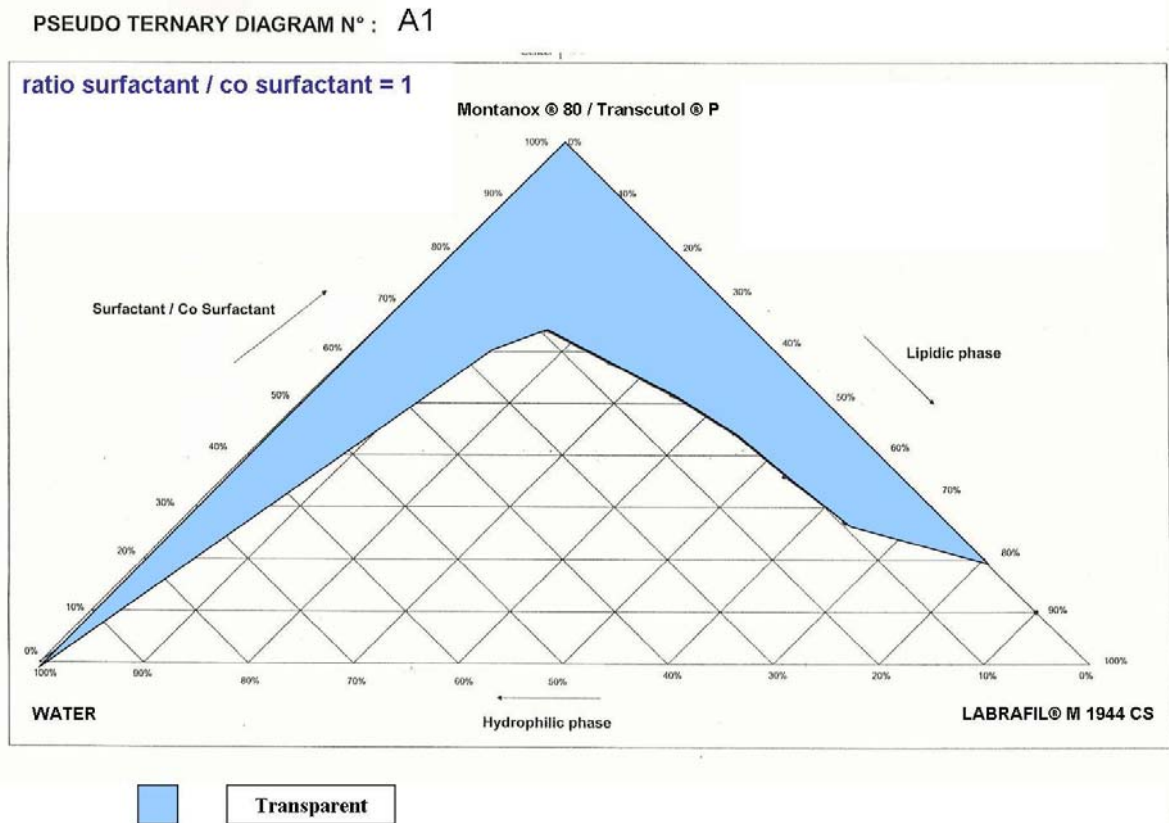


Figure 4: Pseudo ternary diagram of microemulsion containing Water/ Labrafil® M 1944CS/ Montanox® 80/ Transcutol® P with the ratio of S/CoS = 10.

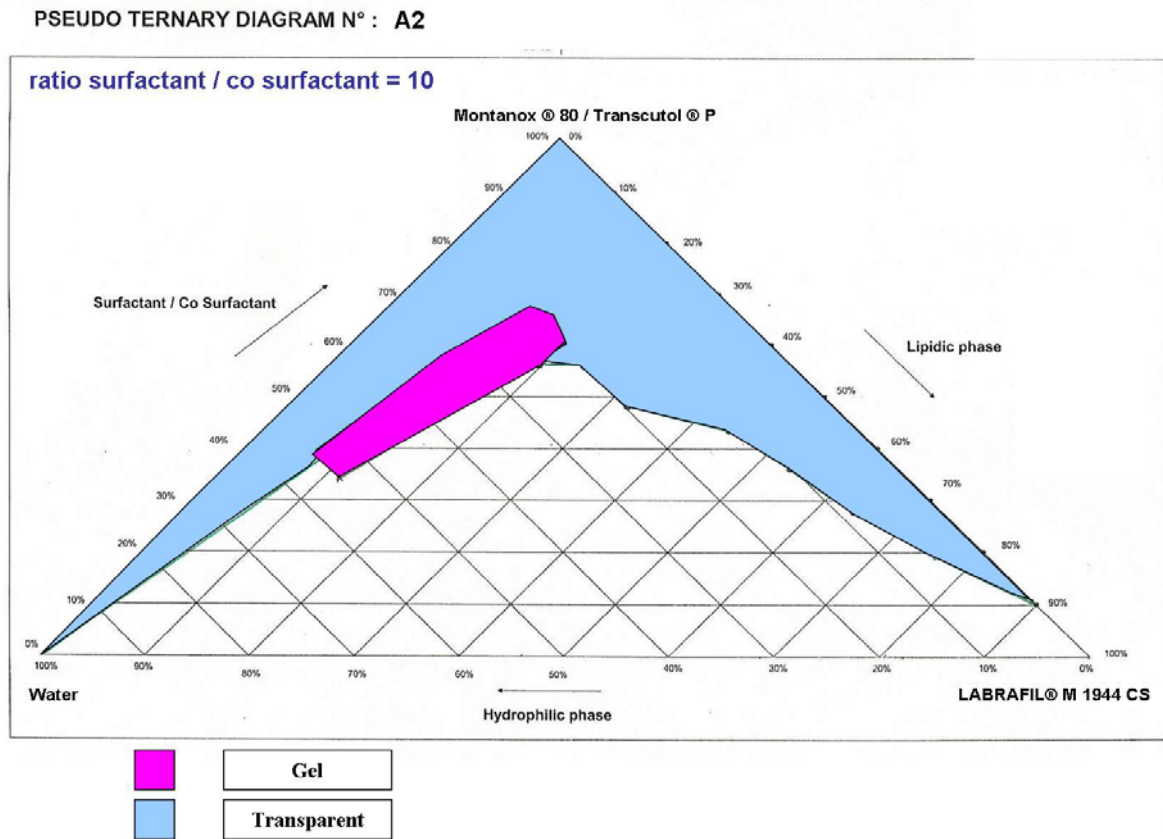


Figure 5: Pseudo ternary diagram of microemulsion containing Water/ Labrafil® M 1944CS/ Montanox® 80/ Transcutol® P with the ratio of S/CoS = 50.

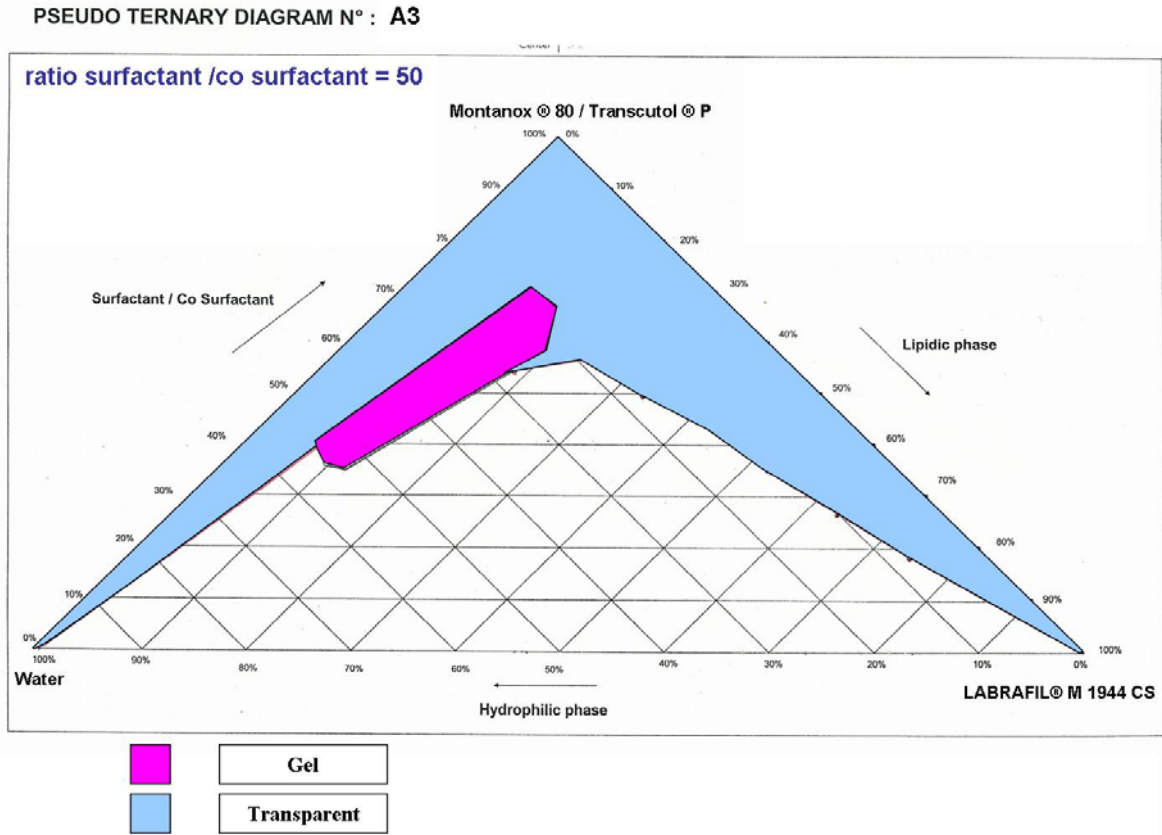


Figure 6: Pseudo ternary diagram of microemulsion containing Water/ Labrafil® M 1944CS/ Montanox® 80/ Propylene glycol with the ratio of S/CoS = 1.

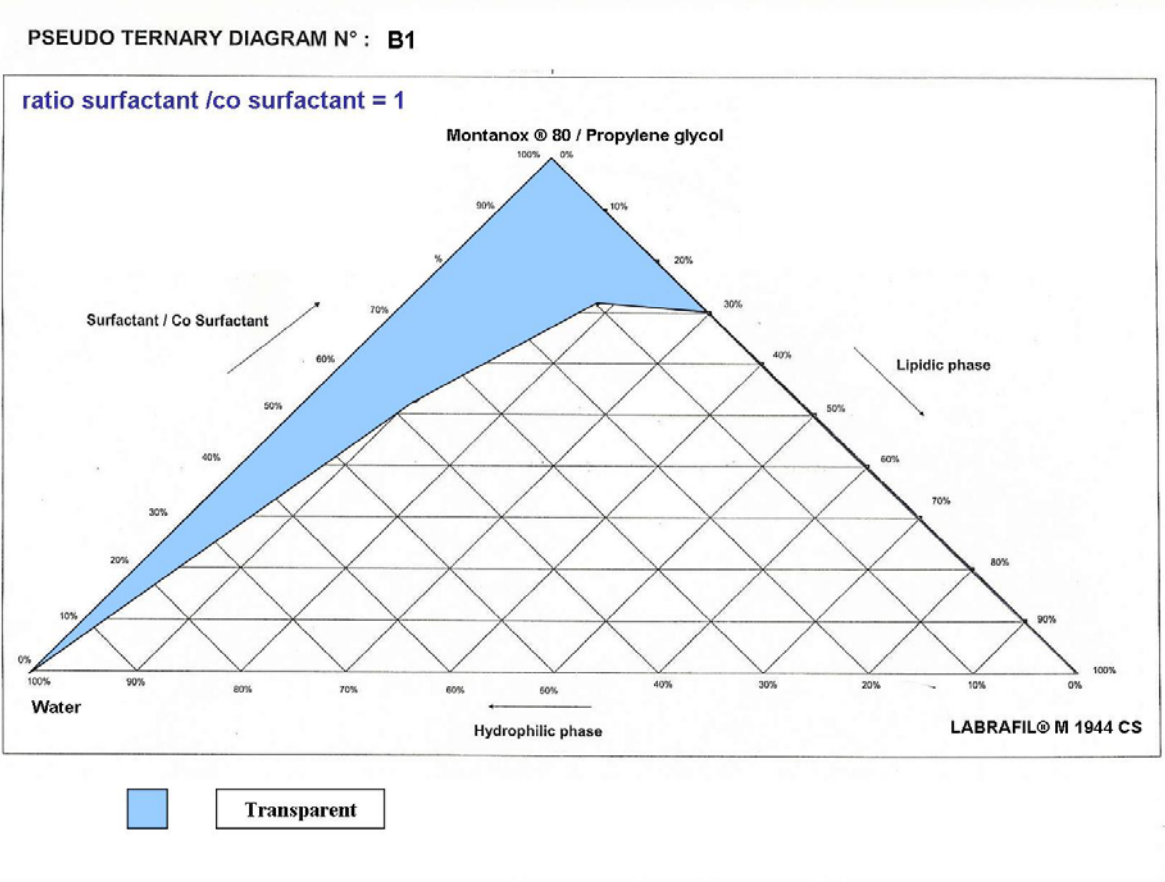


Figure 7: Pseudo ternary diagram of microemulsion containing Water/ Labrafil® M 1944CS/ Montanox® 80/ Propylene glycol with the ratio of S/CoS = 10.

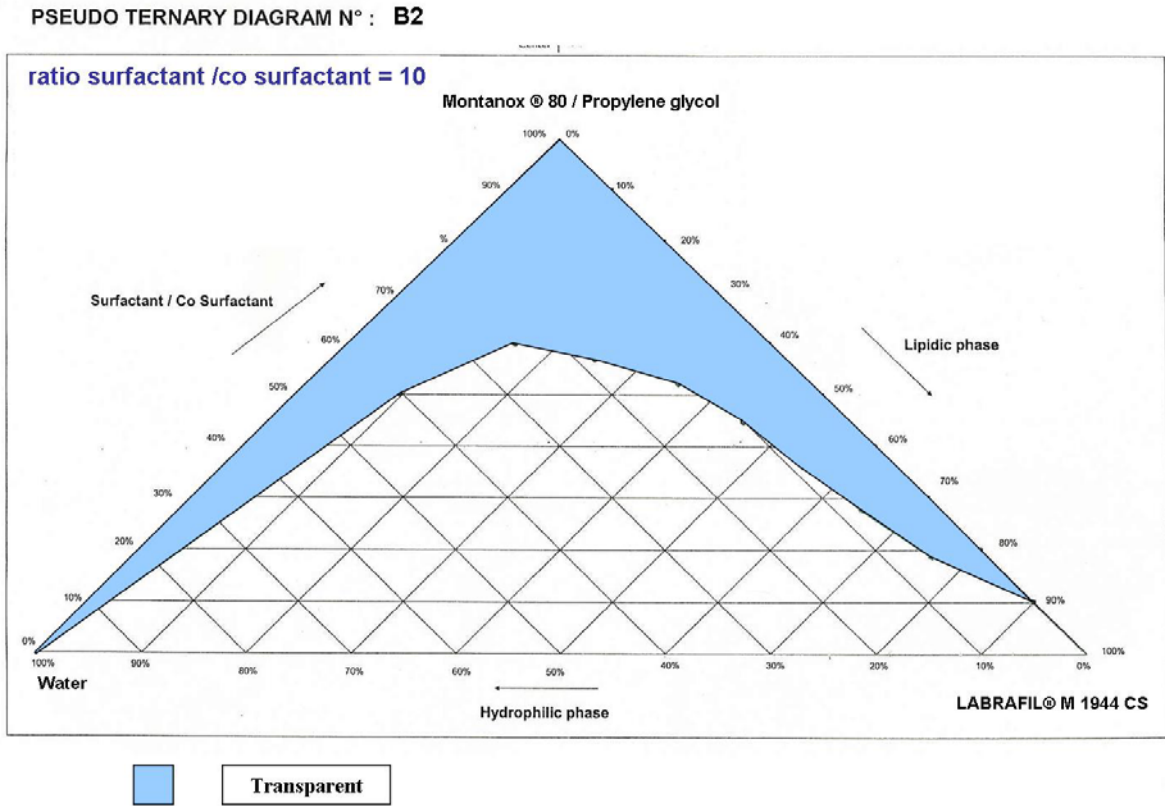


Figure 8: Pseudo ternary diagram of microemulsion containing Water/ Labrafil® M 1944CS/ Montanox® 80/ Propylene glycol with the ratio of S/CoS = 50.

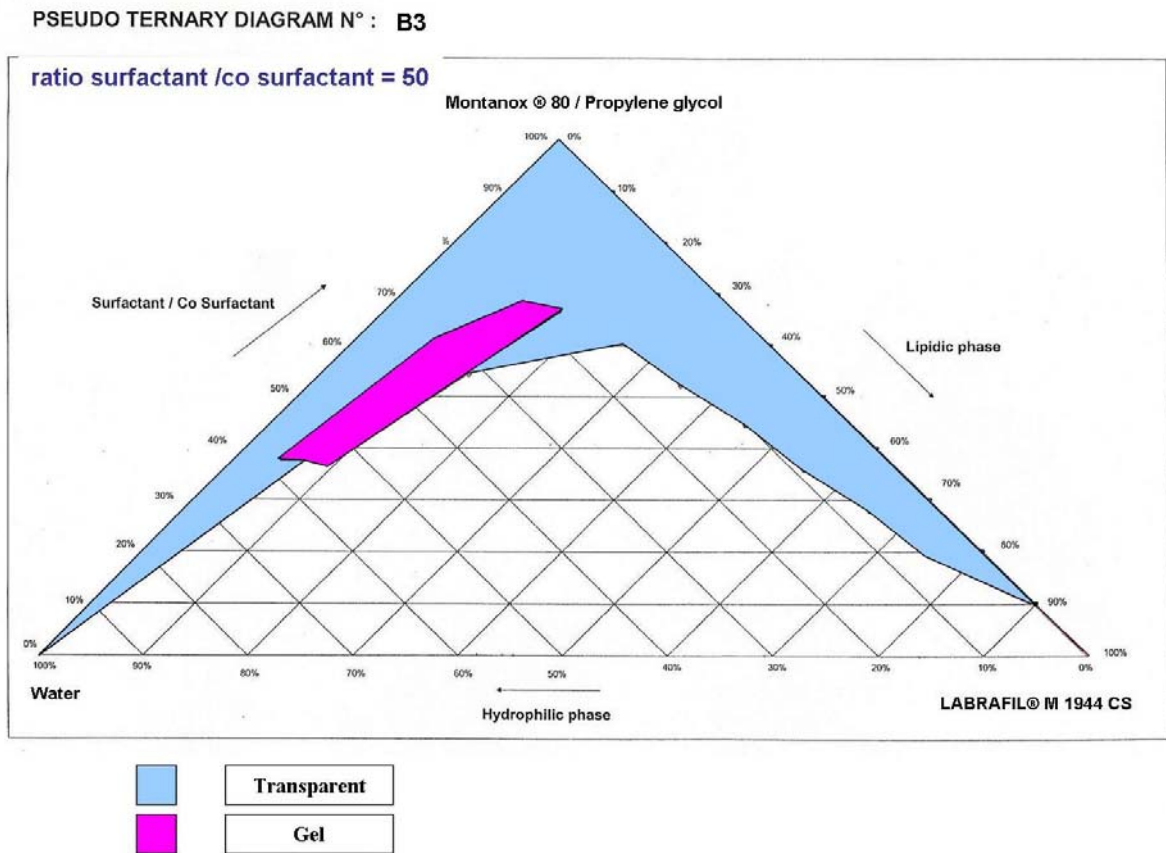


Figure 9: Pseudo ternary diagram of microemulsion containing Water/ Labrafil® M 1944CS/ Montanox® 80/ Glycerol with the ratio of S/CoS = 1.

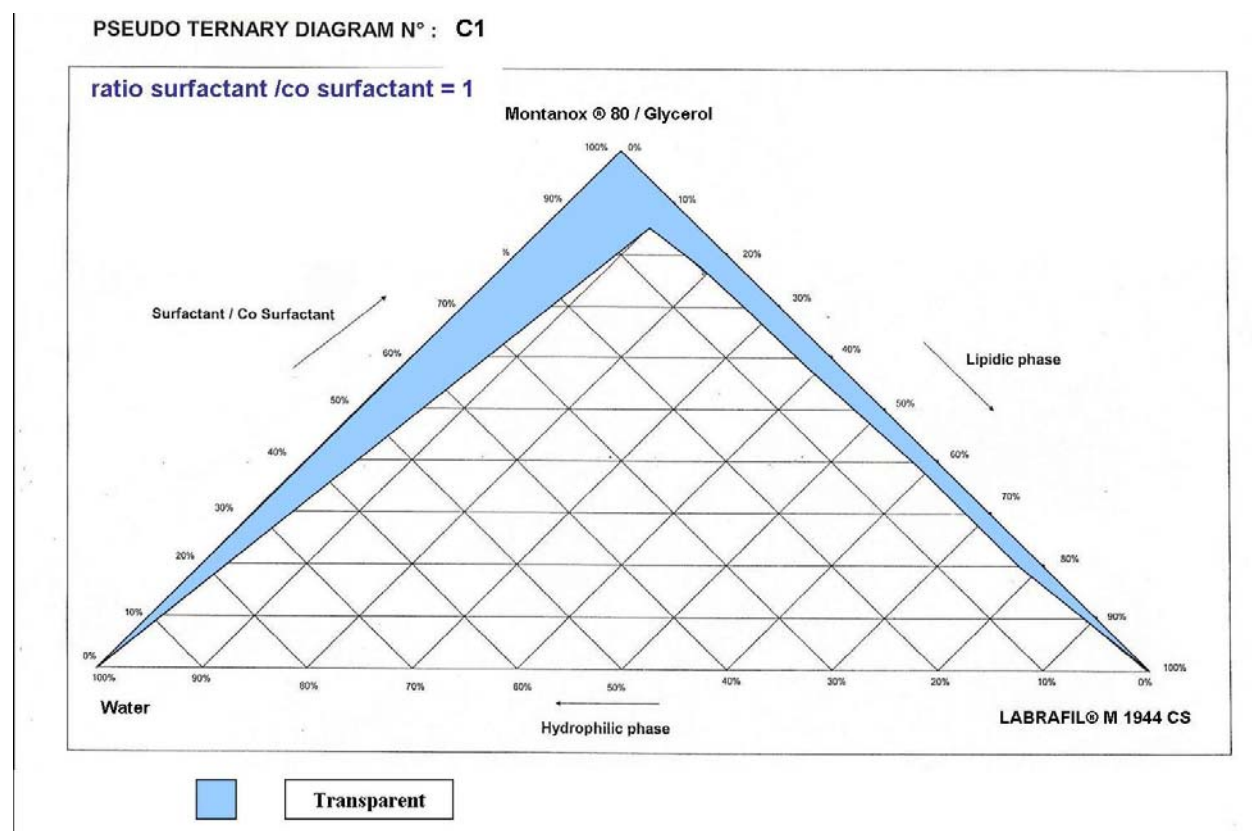


Figure 10: Pseudo ternary diagram of microemulsion containing Water/ Labrafil® M 1944CS/ Montanox® 80/ Glycerol with the ratio of S/CoS = 10.

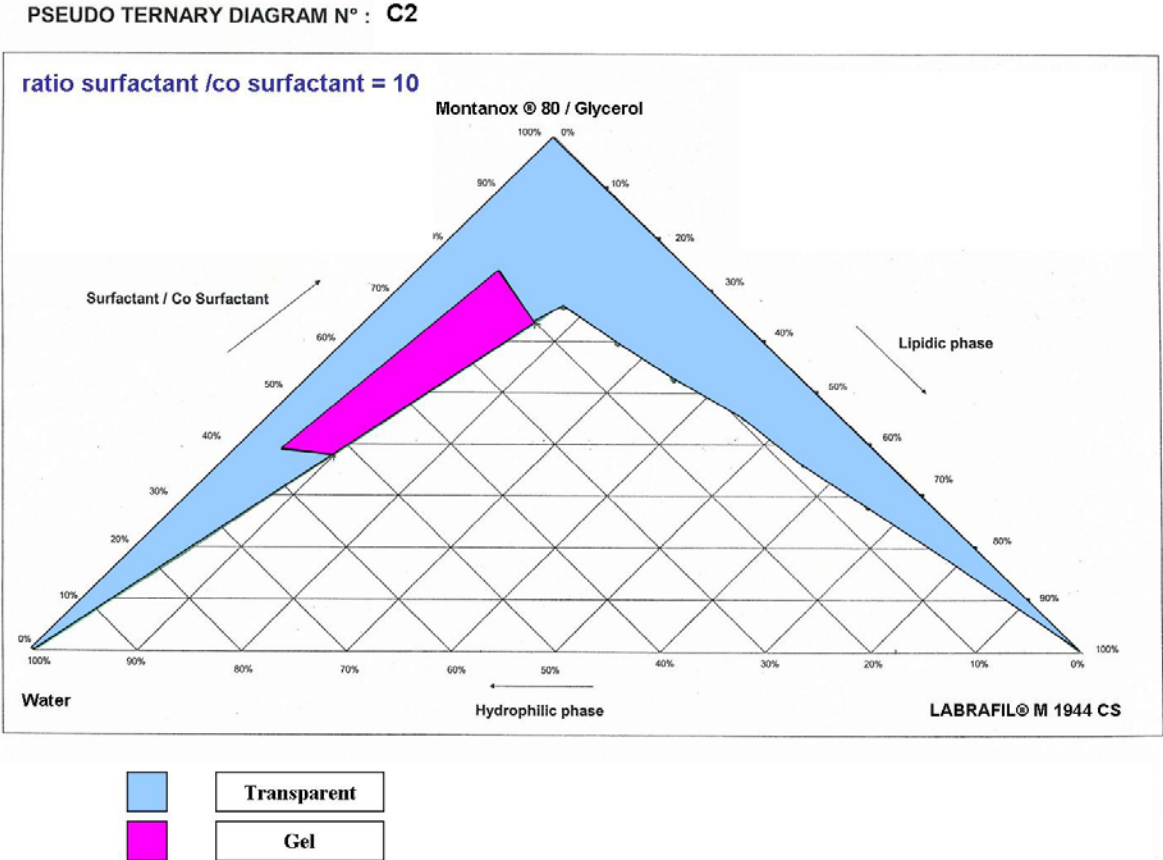
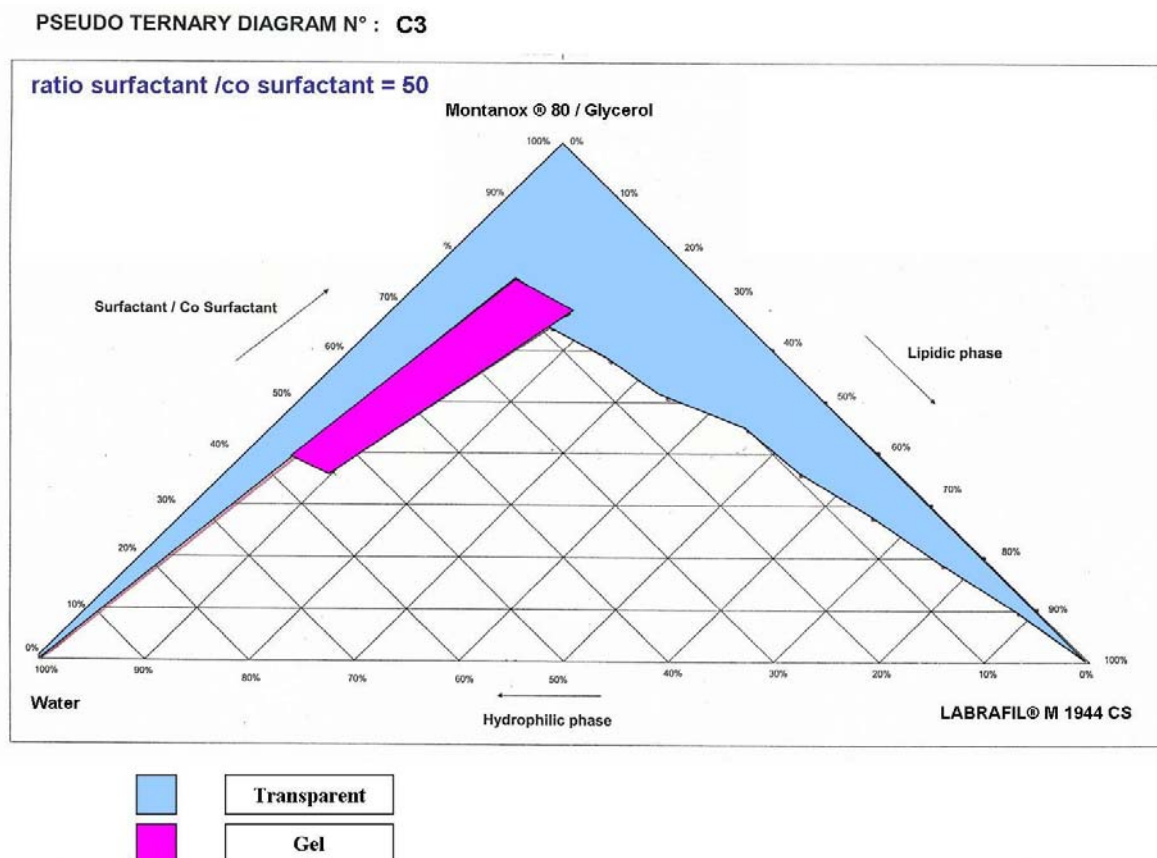


Figure 11: Pseudo ternary diagram of microemulsion containing Water/ Labrafil® M 1944CS/ Montanox® 80/ Glycerol with the ratio of S/CoS = 50.



The influence of the choice of the sweeteners is presented in table 3.

Table 3: Results of stabilities of the different tested W/O microemulsions by using different sweeteners and their taste

	Sweetening power/saccharose	Physical stability of dosage form	Taste
Saccharose	Low	unstable	seamark
Sodium saccharinate	300 times more	unstable	pleasant
Saccharine	500 times more	Stable but degradation of the drug	pleasant
NHDC	1500-1800 times more	unstable	pleasant
Sodium cyclamate	50 times more	stable	pleasant

From these trials, it was concluded that only sodium cyclamate can be used in order to design a stable and pleasant microemulsion dosage form.

The studies of stability of the W/O microemulsions were realized at three different temperatures (8°C, 25°C and 40°C) and allow to conclude that the W/O microemulsions were stable at 8°C and 25 °C and unstable at 40 °C.

The sizes of the internal phases of the different tested W/O microemulsions were determined by using a Malvern Mastersizer 2000 and allow to conclude that the mean size of the internal phase of the W/O microemulsions constituted of Montanox® 80, Labrafil® M 1944CS, Transcutol® P were of 276± 8 nm.

From these studies, it was concluded that a stable and pleasant W/O microemulsions containing ranitidine hydrochloride, can be manufactured to mask the bitter taste of this active compound.

The best formulation was constituted of:

1000 mg of ranitidine hydrochloride, 10.295 g of citric acid/trisodium citrate buffer, 17.10 g of propylene glycol, 30.39 g of Labrafil® M 1944 CS, 40.00 g of Montanox® 80, 0.400 g of sodium cyclamate, 3.20 g of essential oil of lemon.

4. Strategies for taste masking

4.1. Use of flavour enhancers

There is a wide structural diversity in chemicals that elicit sweet taste, e.g. glucose, fructose (carbohydrates), sorbitol (sugar alcohol), saccharin, acesulfame-K (*N*-sulfonamides), cyclamate (sulfamate), aspartame (dipeptide), D-phenylalanine (amino acid), thaumatin, monellin (proteins), stevioside (diterpenoid glycoside), and lead and beryllium salts (ions).

To obtain flavouring and perfuming agents, natural or synthetic sources can be used. The family of natural products include: fruit juices, aromatic oils such as peppermint and lemon oils, herbs, spices and distilled fractions of these ones. They exist as concentrated extracts, alcoholic or aqueous solutions, syrups or spirit. Another family of effective taste masking agents includes: alkaline earth oxide, alkaline earth hydroxide, an alkaline hydroxide and other compositions like phosphorylated amino acid such as phosphotyrosine, phosphoserine, and phosphothreonine and mixtures thereof.

Concerning the essential oils, anethole can effectively mask a bitter taste as well as the aftertaste. For formulations which are intended to be chewed or dissolve in mouth prior to ingestion in solution the unpalatable drug can be masked by using clove oil and calcium carbonate.

4.2. Coating methods

Suitable polymers or lipids used as coating agents, offer an excellent method of concealing the drug from the taste buds. The coated composition may be incorporated into much number of pharmaceutical formulations, including chewable tablets, effervescent tablets, powders, and liquid dispersions.

Microcapsules containing cefuroxime axetil were prepared with various cellulosic polymers having a pH dependent solubility with the final aim to mask its taste while assuring its release in the intestinal cavity (Cuna *et al.* (1997)). The drug release studies and the stability assay of the encapsulated moiety demonstrated that microspheres manufactured with cellulosic polymers represent a useful approach to achieve the proposed objectives.

The low melting point substances can be used for masking bitter taste of the drug (Kato *et al.* (1996)). Beef tallow (a low melting point substance) was mixed with micropulverized active ingredients (e.g. antiulcer methyl benactyzium bromide) and the mixture was nozzle sprayed to form coated spheres having homogeneous particle size.

A special study was conducted by Maccari *et al.* (1990) to assess the bioavailability of a flucoxacillin preparation microencapsulated for taste abatement with 17% ethyl cellulose made up as a granular product for extemporaneous resuspension compared to commercially available Flucoxacillin preparations. Both dosage forms were bioequivalent proving that

Flucoxacillin microencapsulated for taste abatement is as available from the dosage form as the raw unprocessed antibiotics.

A novel method of taste masking using a spray congealing technique was developed by Yajima *et al.* (1996). The spray congealing technique, which uses a spray dryer, is an effective method of taste masking because this method is cost effective and requires no solvent and it can produce a more dense film than other methods without moving materials for drying. Also, since this method is easy to industrialize, many attempts using this technique have been undertaken. They reported spherical matrices containing Clarithromycin (a macrolide antibiotic), amino alkyl-methacrylate, and glyceryl monostearate as the ingredients, the objective being the prevention of drug release in the mouth while ensuring a rapid release in the gastrointestinal tract (GIT).

Microparticles of Imdeloxazine (a bitter tasting drug) were prepared and coated with a mixture comprising of hydrogenated oil and surfactants in a fluidized bed using side spray method (Hiroya Sugao *et al.* (1998)). Drug release from the coated particles was significantly delayed which was overcome by heat treatment.

In order to mask the bitter taste of drugs, a novel microencapsulation process combined with wet spherical agglomeration technique by using modified phase separation method, was described by Udea *et al.* (1993) whereas Yekta Ozer and Atilla Hincal (1993), microencapsulated Beclamide by a simple coacervation method using gelatin.

To ensure that the coating remains intact when in the mouth, but then releases in the appropriate region of the gastrointestinal tract, formulators experiment with an array of polymers and lipids. The materials that are usually used are polymers that are pH-dependent in terms of release. One of the most widely used is Eudragit®, which is an acrylate derivative. Also, cellulose derivatives can be used as well. Examples of pH-dependent polymers used for coating bitter actives are methylmethacrylate, ethyl cellulose and ethylene propylene oxide. When exposed to an acidic medium, they dissolve. So, once the product reaches the stomach, it will release the active drug. Some lipids, such as hydrogenated vegetable oil, are also effective coating materials because of their hydrophobic nature. On the market, for example, Cefitin® (cefuroxime) is manufactured by using lipid coating such as stearic acid for taste masking. Also a melt coating with lipids can be used rather than a straight coating. The

technological difference is that the material is melt rather than dissolved in a solvent that should be evaporated. Choose of a lipid with the right melting point is the key parameter. Because of the fact that the active drug cannot be exposed to very high temperatures, lipids or mixtures of lipids having a relatively low melting point has to be selected. However, these ones cannot to be too low since they could melt in the bottle or in the box. So, to avoid this, usually lipids having a melting point of around 60°C are chosen. Also, in the case of lipids, the release is mostly intestinal because lipids won't dissolve in the stomach as fast. Furthermore, several variables come into play when determining what type of coating material has to be used. There are a lot of important things to consider – the particle size, the solubility, of the active substance, and the melting point. All of that will determine what process and what coating material will be selected. The most critical factors to consider are chemical compatibility, the effects of processing, and bioavailability. Chemical compatibility is the first parameter which has to be taken into account, and the others are the processing requirements as for example, high temperatures that the drug can't tolerate. Most excipients used for coating are relatively inert, so they are not highly reactive. But precautions have to be taken to be careful about incompatibility, and the processing methodology has to be adjusted to be as benign as possible toward the active. Also, care has to be brought of how the drug will be released. Indeed, each coating material has its advantages and disadvantages, depending on the application. The polymers are more diverse, so the options are more numerous with them. The polymer coatings are more advanced, there are many more options than for the uses of lipids, and the manufacturing can be realized at lower processing temperatures.

The plasticity of most polymers is particularly important for formulators to consider when they are developing compressed (as opposed to lyophilized) dosage forms. With microencapsulation using fluid-bed systems as the easiest technology to make microspheres, the coating of the active particles can be damaged if the compaction of these microspheres has been considered to make tablets. So, coating fracture is one of the factors that should be considered. With careful manipulation of the formulation and the tableting process, it is possible to solve a lot of problems of that sort.

On the other hand, a lipid coating has a better mouth-feel because it doesn't have the plasticity that the polymer coating materials have. Melttable materials such as hydrogenated vegetable oils, vegetable waxes or saturated fatty acids such as stearic acid can be utilised as either distinct coatings over the drug particles or as matrix materials containing dispersed drug particles. The matrix particles are the simplest and least expensive particles for taste-making drugs of low to moderate solubility where the dosage is fairly low. The use of stearic acid or stearyl alcohol can allow the incorporation of moderate amounts of ethyl cellulose for improving barrier properties while still providing flow properties necessary for processing.

Granulation or co-granulation using a spray dryer, a high-shear granulator, or other co-processing systems is another approach to taste masking, albeit a less effective one, especially for very bitter actives. The substance active is co-granulated with a certain excipient system, which forms sort of a coating with the active substance. But it's not the most efficient technique, because it still could leave the substance active on the surface and the patient could taste it. This technology is used sometimes with fairly mild substance active. In such cases, formulators typically use lipids to coat the active substance. Basically, the lipids are melted and the drugs are added, and then granulate together. Co-precipitation with polymers is a possibility, but it's not the preferred coating method because it involves dissolving the polymer and the active together in a solvent, and then evaporating it. Also, it would be risky in terms of changing the physical properties of the active.

Fluid-bed apparatus can be used to apply barrier coatings, either as organic solutions or in aqueous suspension. The active ingredient particles, which should generally be above 100 microns in diameter for this process, are fluidised in an upward flow of air. Other equipment fluidises the bed of particles by physically putting them in motion by a spinning rotor. Coating solutions or suspensions are atomised into the fluidised bed of particles. Since the coating is applied slowly, in many small bursts as the particles move through the spray, this technique can provide the most uniform coating on irregularly shaped particles.

Spinning-disk processes can provide the least expensive approach to taste-masking small particles of drug. The product can be a matrix particle formed from a melttable material containing five to forty per cent of drug. The suspension is simply atomised and chilled to form the protected particles. If possible, a narrow size distribution should be formed to reduce

premature dissolution from the fine particles. If the solubility of the active ingredient is reasonably low, this may be a good approach for taste-masking.

For more difficult taste-masking cases, where a definite protective coating is needed, roundish granules of the drug are formed and suspended in the melted or dissolved coating. When this suspension is metered to a specially designed rotary atomiser at a preferred speed, single coated particles are formed, along with finer particles of excess coating which are then separated. This process can easily coat the finest particles needed for taste masking.

4.3. Complexation with ion exchange resins

Pharmaceutically-approved ion-exchange resins that can react with ionised active ingredient molecules to reduce objectionable taste by forming a less soluble drug-resin complex are available. The complex should be unstable in stomach acid to provide release of the active ingredient. Such complexes can be used in suspension or tablet formulations.

Besides other techniques described above, ion exchange resination is another effective approach to taste-masking bitter active substance. By combining the active with a compatible resin, formulators create a chemical complex called a drug resinate. In this approach, the entrapping of the drug is based on bonds that don't really change the chemistry of the drug said. It just creates relatively weak bonds that break based on pH or other triggers.

Not all active substances are suitable candidates for ion exchange resination, however. The primary requirement for using ion exchange resins is that the drug needs to be ionisable. If the drug is ionisable, then there is a reasonable chance that ion exchange resins will do the trick. One of the very useful things about ion exchange resins is that when they form these complexes with the drug, they are almost always reversible. It just takes competing ions, such as chloride found in the gastrointestinal tract to displace the drug back off the resin and right into the solution where it can then get absorbed.

As with microencapsulation, choosing an appropriate co-processing material is key. The real trick for taste masking is to find the right resin that gives a slow enough release so that the patient doesn't taste it, but a fast enough release that once it hits the stomach it can lead to the kind release profile. So, there is really two aspects to it. There is not only the taste masking, but there is also the problem of the release profile. These aspects really govern the choice of

resins that one tends to use. The manufacturing process for ion exchange resination is relatively straightforward. The process for making the complex is really very simple for many drugs, because the loading of the drug onto the resin is thermodynamically favourable. In most cases, the drug is dissolved in water and is mixed with the ion exchange resin. Because the resin is completely insoluble, the mixing can be variable, maybe one hour, maybe six hours, depending on the physicochemical characteristics of the drug. Then, the resin has to be filtered off, washed with water, dried in a vacuum tray dryer or in a tumble dryer in order to obtain the resinate. Formulators also may spray-dry the slurry instead of filtering it. Unlike microencapsulation, which coats the exterior of active substance particles, ion exchange resination causes the drug to penetrate and saturate the resin substrate, essentially creating a homogeneous particle. It is an ionic bond, because the ion exchange resins are either acids or bases. So, if the drug has a basic behaviour, this one can be loaded onto an acidic ion exchange resin – what is called a cation exchange resin. This technology is especially useful for developing compressed orally disintegrating tablets (ODTs). Even if the particle is broken during tableting, it wouldn't make any difference. It would be like breaking a crystal.

The adsorption of bitter drugs onto synthetic ion exchange resins to achieve taste coverage has been well documented. The high potency adsorbates of methapyrilene, dextromethorphan, ephedrine, pseudoephedrine, were prepared by Borodkin et al. (1971), by column procedures using a polymethacrylic acid ion exchange resin. Taste evaluation of the adsorbates showed a significant reduction in the bitterness of the drugs. Coating the adsorbate particle with 4:1 ethylcellulose – hydroxypropylmethylcellulose mixture reduced the bitterness further. Taste coverage was maintained after incorporation of the coated adsorbate into chewable tablets. Strong acid cation resins (sulfonated styrenedivinylbenzene copolymer product) can be used for masking the taste of basic drugs (Roy, 1994). Polystyrene matrix cation exchange resins have been used to mask the bitter taste of chlorpheniramine maleate, ephedrine hydrochloride, and diphenhydramine hydrochloride (Manke, 1991). Extreme bitterness of quinolones has been achieved by ion exchange resin such as methacrylic acid polymer crosslinked with divinylbenzene (Gao, 2003).

4.4. Inclusion complex formation with cyclodextrins

Amongst the different techniques described in this chapter to taste mask, cyclodextrin is the most widely used complexing agent for inclusion complex formation which is capable of masking the bitter taste of the drug either by decreasing its solubility on digestion or decreasing the amount of drug particles exposed to taste buds there by reducing its perception of bitter taste. Due to its low water solubility (18.5 g/L at 25°C), β -cyclodextrin is the preferred compound in this family, for this application. For example, bitter taste of ibuprofen and gymnima sylvestre has been effectively masked by cyclodextrin (Motola1991 and Ueno 1992)

Cyclodextrin complexation is similar to ion exchange resination in terms of relying on temporary molecular bonds to mask bitter actives. Cyclodextrin acts like a bucket. The active substance gets into the bucket, but it doesn't chemically react. It just stays bonded because of strong affinity. It is not a new chemical entity. Cyclodextrins are an unusual set of molecules in that the cyclodextrin molecule itself is a ring. The outer surface of the ring is relatively hydrophilic, whereas the inner surface of that ring is actually hydrophobic. So, if the dosage form contains hydrophobic drug, the drug molecule can sit inside the hole, or inside the ring, of the cyclodextrin. In this case, what the patient get is what it is called a molecular inclusion complex. And of course it no longer tastes like the drug, because what's on the surface is cyclodextrin, which is derived from sugar. Cyclodextrin complexation can be highly effective for taste masking, but as other systems, this technology has its drawbacks. One of these ones is the expenses of this approach since cyclodextrins are not the cheapest of materials. Plus, if it so happens that the drug molecule that doesn't fit inside the cyclodextrin ring, then there is nothing that the formulator can do about it. Either it does or it doesn't. In addition, making a cyclodextrin complex is a much more involved process than microencapsulation or ion exchange resination. Indeed, the formulator has to find the right amount of water present to force the drug to partition into the cyclodextrin. The formulator has to force the drug to get to such a high concentration that the drug ends up going into the cyclodextrin. In fact, the release mechanism for cyclodextrins is water. Therefore, if too much water is added, the drug comes back out again.

The bitter taste of drugs, food components, and any other substances which get in the mouth as dissolved in an aqueous solution, or in the saliva, can be strongly reduced or fully eliminated, if the bitter component forms an inclusion complex with an appropriate

cyclodextrin (CD). The value of the complex association constant (determined by the structure of the bitter “guest” molecule and the size and eventual substitution of the “host” CD molecule), the temperature and the host/guest ratio determine the extent of complexation of the guest molecule (percentage of complexation) at the equilibrium. The complex association constant (K_{ass} for most drug/CD complexes at 36°C buccal cavity temperature is between 10^2 and 10^4 M^{-1}). If the unit dose (of a sublingual or chewing tablet, chewing gum) with a bitter drug (molecular weight of about 150, forming a 1:1 complex with β -CD) is approximately 10 mg, then the β -CD can be taken in a 5- or even 10-fold molar excess. Under such conditions, more than 99% of the bitter drug is complexed, and because the β -CD is present in a large excess, dissolved very quickly in the saliva and results in a saturated CD solution. Therefore, the complexation of the bitter drug is completed very rapidly. Only dissolved substances have taste and only CD complexable drug molecules can become debittered by CDs. Bitter, astringent components of foods (e.g. soya), beverages (e.g. naringin in citrus fruit juice, or chlorogenic acid and polyphenols in coffee) cigarette smoke (nicotine) also can be complexed and their taste reduced or fully eliminated.

4.5. Other techniques

These techniques include incorporation of drugs in vesicles like liposomes, chemical modification (Adjei et al, 1992 and Popescu, 1991) and solubility-limiting methods.

For the drugs whose taste profiles are dependent on aqueous solubility the solubility limiting method can be applied.

In order to reduce aqueous solubility and taste, chemical modification such as derivatization or lipophilic counter ion selection may be an effective method, as example for Erythromycin monohydrate, a bitter tasting drug with a solubility of 2 mg/ml which is chemically converted into erythromycin ethyl succinate, the aqueous solubility being reduced to <50mcg/ml. This form is tasteless and can be administered as a chewable tablet. The use of liposomes, to incorporate drugs into vesicles, is although an ideal technique, yet a challenge to formulate without altering the regulatory status of the product (*in vitro* dissolution kinetics, physical or chemical stability or bioavailability) (Adjei et al, 1992).

In order to inhibit the perception of the bitter taste of a formulation, it can be very helpful to use an anesthetizing agent like sodium phenolate, which numb the taste buds sufficiently within 4-5 seconds (Fuisz, 1991).

The multiple emulsions represent another novel technique for taste masking. The drug must be dissolved in the inner aqueous phase of w/o/w emulsion under condition of good shelf stability. The formulation is designed to release the drug through the oil phase in the presence of gastric fluid (Rosoff, 1988). Another technique has been described to allow masking the bitter taste of a drug by combining multiple emulsions with non ionic surfactants to form composites by hydrophobic interactions (Masahiro,1999).

5. Evaluation and optimization of taste masking effect

Taste is comprised of five basic qualities of sourness, saltiness, sweetness, bitterness, and umami. Amongst these taste qualities, bitterness is usually an undesirable taste, because it is a sign of a harmful substance, while sweetness and umami are signs of nourishment such as saccharide and amino acids. Umami is the fifth independent taste produced by monosodium glutamate (MSG) contained mainly in seaweed and disodium inosinate (IMP) in meat and fish. It is important especially for pharmaceutical and food sciences to express the extent of bitterness, e.g., in the case of developing syrups. To remedy this problem, formulators combine the drug with other ingredients in an effort to mask the bitterness of the drug and provide the patient with a pleasant product experience.

One an active substance is taste-masked, formulation scientists have to determine what additional functional excipients are required for the final dosage form. These include sweeteners, flavouring agents, and super-disintegrants. After all, the active substance may no longer taste bitter, but the final dosage form needs to taste pleasant and have a good mouth-feel. Also, orally disintegrating tablets (ODTs), chewable tablets, and fast-dissolve films must disintegrate, or even dissolve, rapidly in the mouth.

Sweeteners and flavours are very important in any formulation that would come into contact with the tongue. The whole point is balance – the balance of the basic taste, and the balance of the flavour with that basic taste. When the formulator is working on an active component, he has to establish the whole preformulation framework, looking at the physicochemical

characteristics of the active. Also he has to consider the chemical compatibility issues, and then to determine what sweeteners he can use. Sweeteners not only make oral dosage forms palatable but they are able to optimize product performance. Sometimes, sweeteners can be added for taste reasons, and sometimes for stability and functional reasons, such as by using polyols to prevent crystallisation of syrup made of sucrose. But if he is looking just for a balanced taste, he could use a blend of the nutritive sweeteners and the polyols. Also, a strong non-nutritive sweetener such as aspartame or sucralose can be selected. When incorporating flavouring agents into a formulation, pharmaceutical decision-makers tend to favour market expectations over what the base formulation requires. Usually, people think that if the market requires a strawberry flavour, the formulator has just to buy the flavour, to add it to the formulation, and it will come up as strawberry. But often that is not the case. Certain active ingredients have an off-taste, somewhat of a metallic taste, that may work well with certain flavours but not with others. Fortunately, formulators typically add flavouring agents late in the development process, making it easy to change out one flavour for another if there is a disparity between market expectations and base formulation requirements. The flavours are used in very low levels. For a formulator, switching from one flavour to another doesn't really pose any processing challenges. It is just a matter of preference, and it can be changed later on in the project, taking into account stability concerns, of course. The challenges with mouth-feel come from grittiness, so preferably the choice will be fond of a smaller particle size that would be less detectable in the mouth and less likely to be chewed. Particle size is particularly crucial for microencapsulated actives because if they are coated, chewing would break the coating and there would be bitterness out of that. Many sweeteners, especially polyols like sorbitol and xylitol, enhance mouth-feel in addition to improving taste, stability, or functionality. Xylitol is widely used in ODTs because of the cooling sensation and creamy mouth-feel it gives. Formulators generally rely on fast-dissolving excipients to ensure that ODTs and chewable tablets break apart rapidly in the mouth. Fast-dissolving ingredients are basically a blend of superdisintegrants, which would also be used in regular tablets to optimize disintegration.

The formulation departments of pharmaceutical companies bear the responsibility for the selection of ingredients and development of formulations that provide best taste performance for products taken orally. Several challenges exist that further complicate this process for the pharmaceutical formulators. Even if the level of unpleasant taste from oral solid dosage forms can be evaluated by *in vitro* methods, for liquid or semi-solid dosage forms it is not thinkable.

Evaluation of the taste masking effect from coated microspheres can be done by determining the rate of release of the drug from the microspheres. Similarly, for evaluating the taste masking effect by ion exchange resin, the drug release rate can serve as an index of the degree of masking achieved. Other methods include evaluation by a trained flavour profile panel and time intensity method in which a sample equivalent to a normal dose was held in mouth for ten seconds. Bitterness level are recorded immediately and assigned values between nought to three.

To accomplish the task of designing good tasting liquid or semi-solid products, formulators rely heavily on human testing or sensory panels. The use of sensory panels is a complicated procedure due not only to the subjectivity of panel members but also to the potential toxicity of drugs. Problems in recruiting taste panellists, motivation and panel maintenance are significantly more difficult when working with products that have an unpleasant taste attribute (bitter, sour, and numbing). Non-FDA approved compounds cannot be human tasted delaying when the formulators can begin development of taste formulations for new medicines. These hurdles coupled with the requirement that products being tested by sensory panels must be formulated or manufactured under GMP guidelines in a GMP approved facility; the time and cost to develop test batches can be prohibitive. Unfortunately, despite the challenges and expense of developing formulations with acceptable taste and aroma, product acceptance has become an important marketing factor for the pharmaceutical industry for both Over-the-Counter (OTC) and prescription drugs. The need for palatable products is particularly important when formulating oral delivery products for children and elderly patients.

To provide a tool for the formulators who address these difficulties, Soutakagi *et al.* (1998) invented a multichannel taste sensor whose transducer is composed of several kinds of lipid/polymer membrane with different characteristics, which can detect taste in manner similar to human gustatory sensation. Taste information is transformed into a pattern composed of electrical signals of membrane potential of the receptor part. It was reported that suppression of bitterness of Quinine and a drug substance by sucrose could be quantified by using multichannel taste sensor. The present method can be expected to provide new automated method to measure the strength of drug substance in place of sensory evaluation. The software tools provided with the system include an advanced chemometric software package for data measurement and analysis of results. The tools provide the ability to compare the formulation candidates and perform a classification process. The results can be quantitatively compared based on analytical parameters such as concentration, taste intensity

scale, etc.). Other analytical assessment can be performed to define the qualitative aspect of the formulations such as identification, conformity, palatability, etc. The formulation comparison can be related to other samples in a comparative mode or to a “taste” or “flavour” database, which can be defined by the system operator, based on a selected training set of samples.

Therefore, the E-tongue quickly evaluates the bitterness masking efficiency of the different formulation candidates to provide the formulator with the ability to select the best combination of ingredients, which provide the “best” tasting formula. These analytical methods provide a fast, objective and simple assessment of oral formulations such as chewable tablets, liquid, rapid dissolve tablets and films, oral dispersive lozenges, sublingual delivery methods, and nasal delivery products which is highly correlated with the organoleptic taste panel methods. The E-nose and E-tongue provide the formulation scientist the ability to rapidly qualify the acceptability of a formulation taste and flavour and permit the definition of acceptable or “best” tasting products. By objectively measuring the effect of ingredient substitution and formulation selection, it is possible to identify the “best” tasting new formulations in accordance with sensory measurements without the need for human tasting of the experimental formulations. The reported studies conducted by pilot e-Tongues with short life sensors, limited significantly its application. Recently, a taste analyzing system manufactured by Alpha MOS has become commercially available. The taste sensors consist of silicon transistors with an organic coating that governs sensitivity and selectivity of each individual sensor. The life of the sensors could last as long as 1 year.

6. Application fields

6.1. Infants, children

In pharmacology and clinical paediatrics, the focus is on active drug substance (or active pharmaceutical ingredient (API)) when determining dosage, clinical effects and adverse drug reactions. However, the formulation is fundamentally important since it determines, in practice, whether the dose can be successfully delivered to the paediatric patient. Moreover, it

is important to consider the formulation excipients and the potential for any adverse effects in this potentially vulnerable age group.

The development of formulations which are appropriate for children (age-adapted dosage forms) can present significant challenges to the pharmaceutical scientist. Childhood is a period of maturation requiring knowledge of developmental pharmacology to establish dose but the ability of the child to manage different dosage forms and devices also changes. Paediatric formulations must allow accurate administration of the dose to children of widely varying age and weight. Whilst the oral route will be preferred for long term use and the intravenous route for the acutely ill, many of the dosage forms designed for adults, such as oro-dispersible tablets, buccal gels and transdermal patches, would also benefit children if they contained an appropriate paediatric dose. The age at which children can swallow conventional tablets is of great importance for their safety. Liquid medicines are usually recommended for infants and younger children so the ability to mask unpleasant taste with sweeteners and flavours is crucial. Compared to the conception of dosage forms intended for adults, the ones intended for children necessitate more research and clinical feedback because a formulation with poor acceptability may affect compliance, prescribing practice and ultimately commercial viability.

Unlike adults, where oral solid dosage forms such as tablets or capsules will be acceptable to the majority of patients, potential paediatric patients may include neonates, newborn, toddlers, young children and adolescents, and as such, will have widely varying needs. The development of multiple dosage forms for different ages will rarely be commercially viable and liquid formulations, which can be given to a broad age group, present particular pharmaceutical challenges. For example, taste masking a bitter-tasting drug is a major formulation hurdle which can be very costly and may not be totally achievable. Some considerations for the development of acceptable paediatric drug formulations are discussed below.

There are various reasons for the formulation of drugs into appropriate dosage forms; one of the most important relates to accurate measurement of the dose. Many active drugs are very potent and only require milligram or microgram amounts to be administered. For children, the amount of drug required for the dose varies with age and weight. Active drugs must be diluted in a vehicle which allows accurate and convenient dose measurement. Active drugs must also be protected during their shelf life from degradation, for example by oxygen and humidity

and, when administered orally, may require protection from degradation by gastric acid. It may be necessary to conceal taste and smell and to produce liquid preparations of insoluble or unstable drugs.

Concerning the ages and the abilities, there is a change in the magnitude of dose required during childhood and adolescence which may be fifty-fold. There are also significant changes in the ability to handle different dosage forms with small volume liquid medicines being appropriate for oral use in the younger age groups; liquid medicines and fast dissolving “melt” formulations suitable for most ages and tablets and capsules being more convenient to the lifestyle of adolescents. Paediatric practice requires a range of dosage forms that are acceptable at different ages and abilities and a range of strengths or concentrations allowing administration of the correct age-related dose.

The first challenge with oral liquid paediatric formulations concerns the dose and the volume of liquid medicines which may be limited by the solubility of drug substances requiring the addition of co-solvent and surfactant excipients. Physical, chemical and microbiological stability must be assured with buffering agents, antioxidants and preservatives. Of crucial importance is the ability to mask unpleasant taste with sweeteners and flavours. If this is not achievable, more sophisticated formulation approaches such as encapsulation of drug particles, may be required. The more complex formulation approaches bring higher technical challenges and consequently, research and development will be more lengthy and costly. Formulation homogeneity is required and dosing devices such as droppers or syringes may be required for accurate dosing. There are limitations on choice and concentration of excipients for paediatric patients.

To formulate industrial paediatric formulations, there are many gaps and many challenges to face if suitable preparations are to be available for all age ranges. These include:

- Acceptable dose volumes and sizes
- Safety, e.g. risk of aspiration or choking for solid dosage forms
- Excipient acceptability
- Taste (and how best to assess during development).

6.2. Geriatric patients

Traditional tablets and capsules administered with glass water may be inconvenient or impractical for some patients. For these reasons, recent technological developments have presented viable dosage alternatives for patients who may have difficulty in swallowing tablets or liquids. Indeed, some patients, particularly paediatric and geriatric patients, have difficulty in swallowing or in chewing solid dosage forms and are unwilling to take these solid preparations due to fear of choking (Slowson, 1985). For example, a very elderly patient may not be able to swallow a daily dose of antidepressant, antiparkinsonian, antipsychotic, or a H₂-blocker by people undergoing radiation therapy for breast cancer and who may be too nauseous, .etc. Fast dissolving/disintegrating tablets are a perfect fit for all of these patients (Seager, 1998) and have rapidly gained acceptance as an important new way of administering drugs. These are multiple fast-dissolving drug delivery systems on the market worldwide, most of which have been launched in the past 3 to 4 years.

These new dosage forms allow the disintegration and/or dissolution rapidly in the saliva without the need of water. Some tablets are designed to dissolve in saliva remarkably fast, within a few seconds, and are true fast-dissolving tablets. Others contain agents to enhance the rate of tablet disintegration in the oral cavity, and are more appropriately termed fast-disintegrating tablets, as they may take up to a minute to completely disintegrate. When put on tongue, this tablet disintegrates instantaneously, releasing the drug, which dissolves or disperses in the saliva. Some drugs are absorbed from the mouth, pharynx and oesophagus as the saliva passes down into the stomach. In such cases, bioavailability of drug is significantly greater than those observed from conventional tablet dosage form (Chang, 2000).

6.3 Domestic animals

As described above, pharmaceutical drugs often have certain desirable properties but an undesirable smell and/or taste. These properties have a great impact on patient compliance and marketing of the pharmaceutical product. This is especially true for domestic animals (cats, dogs) having an extremely well-developed sense of taste and smell.

In the veterinary field, only a few classes of medicines are concerned by this topic such as anti-inflammatory compounds, antibiotics, anthelmintic agents, etc ... since other ways (skin, transdermal, injectable) to administer drugs can be envisaged. In the contrary of dosage forms intended for humans, in the veterinary field, the formulators have to take into account the price on one hand of the raw materials (drugs, excipients) and on the other hand of the process developed to manufacture dosage forms. To mask the bitter taste of drugs, similar techniques than those developed for human applications can be used such as barrier methods (embedding, coating, and encapsulation), use of flavours (beef, pork, fish, chicken, etc.) and sweeteners and complexation and absorption approaches. Thus, taste masked powders are formed by methods known such as spray drying, granulation and coacervation.

7. Conclusion

The bitterness of veterinary and human pharmaceutical medicines plays a crucial role in patient compliance, as the oral administration of bitter drugs is often hampered by their unpleasant taste, leading to non-compliance and thus decreasing therapeutic efficacy, especially in children and the elderly. The quantitative evaluation of the bitterness of medicines is therefore, an important factor in drug formulation design. To mask the high bitterness intensity of drugs, several innovative approaches have been taken to mask their bitterness in pharmaceutical formulations and then allowing improving the compliance by the patients or the domestic animals. With success, recently, to compare *in vitro* different taste-masked formulations, a taste sensor, called “electronic tongue or E-tongue” with global selectivity, was developed and has been applied to evaluation of the taste of new dosage forms.

References

1. Pfaffmann C (1959) The afferent code for sensory quality. *Am Psychol* 14:226–232.
2. Kawamura, Y. & Kare, M. R., eds. (1987) *Umami: A Basic Taste*. Marcel Dekker, New York, NY.
3. Keast, R.S.J., Breslin, P.A.S. and Beauchamp, G.K. (2001) Suppression of bitterness using sodium salts. *Chimia (Aarau)*, 55, 441–447.
4. Kinnamon, S.C. and Cummings, T.A.(1992). Chemosensory transduction mechanisms in taste. *A. Rev.Physiol.* 54, 715–731.
5. Matsunami, H.; Montmayeur, J.-P.; Buck, L. B. A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature* 404: 601-604, 2000.
6. Rozin P. The acquisition of food habits and preferences. In: Mattarazzo JD, Weiss SM, Herd JA, Miller NE, Weiss SM, editors. *Behavioral health: a handbook of health enhancement and disease prevention*. New York: Wiley; 1984. p. 590– 607.
7. Ray JW, Klesges RC. Influences on the eating behavior of children. *Ann N Y Acad Sci* 1993;699:57– 69.
8. Birch LL. The relationship between children’s food preferences and those of their parents. *J Nutr Educ* 1980;12:14– 8.
9. Pliner P, Pelchat ML. Similarities in food preferences between children and their siblings and parents. *Appetite* 1986;7:333– 42.
10. Burt JV, Hertzler AA. Parental influence on the child’s food preference. *J Nutr Educ* 1978;10:127– 30.
11. Rozin P, Fallon AE, Mandell R. Family resemblance in attitudes to foods. *Dev Psychobiol* 1984;20:309– 14.
12. Bilko A, Altbacker V, Hudson R. Transmission of food preference in the rabbit: the means of information transfer. *Physiol Behav* 1994;56:907– 12.
13. Dominquez HD, Lo’pez MF, Molina JC. Interactions between perinatal and neonatal association learning defined by contiguous olfactory and tactile stimulation. *Neurobiol Learn Mem* 1999;71:272– 88.
14. Hepper PG. Adaptive fetal learning: prenatal exposure to garlic affects postnatal preferences. *Anim Behav* 1988;36:935–6.
15. Woo CC, Leon M. Sensitive period for neural and behavioral response development to learned odors. *Dev Brain Res* 1987;36:309– 13.
16. Schiffman SS, Dackis C. Taste of nutrients: amino acids, vitamins, and fatty acids. *Percept Psychophys* 1975;17:140– 6.
17. Cremer K. Orally Disintegrating Dosage Forms. Industry summary report. Pharma Concepts GmbH & Co; 2001: www.pharma-concepts.com.
18. BASF Corporation, visit www.basf.com.
19. Sinha VR, et al. Cyclodextrins as sustained-release carriers. *Pharm Tech.* 2002;26(10):36-46.
20. Versic RJ. Coacervation for flavor encapsulation. In: Risch SJ, Reineccus GA, eds. *Flavor Encapsulation*. New York, NY: Oxford University Press-USA;1988.
21. Suzuki, H., Onishi, H., Takahashi, Y., Iwata, M., Machida, Y., 2003. Development of oral actaminophen chewable tablets with inhibited bitter taste. *Int. J. Pharm.* 251, 123–132.
22. Katsuragi, Y., Mitsui, Y., Umeda, T., Otsuji, K., Yamasawa, S., Kurihara, K., 1997. Basic studies for the practical use of bitterness inhibitors: selective inhibition of bitterness by phospholipids. *Pharm. Res.* 14, 720–724.
23. Koyama, N., Kurihara, K., 1972. Mechanism of bitter taste reception: interaction of bitter compounds with monolayers of lipids from bovine circumvallate papillae. *Biochim. Biophys. Acta* 288, 22–26.
24. Nakamura, Y., Makita, H., Imasato, Y., 1990. Particulate design for masking the uncomfortable taste of drug preparations. *Pharm.Tech. Jpn.* 6, 841–850.
25. Pickenhagen, W., Dietrich, P., Keil, B., Polonsky, J., Nouaille, F., Lederer, E., 1975. Identification of the bitter principle of cocoa. *Helv. Chim. Acta* 58, 1078–1086.

26. Aremu, C.Y., Agiang, M.A., Ayatse, J.O., 1995. Protein profiles and organoleptic properties of bread from wheat flour and full-fat or defatted fermented cocoa bean powder. *Plant Foods Hum. Nutr.* 48, 287–295.
27. Yin, M., Abbe, K., Yamada, T., 1996. Acidogenic potential of human dental plaque exposed to general cough and cold medicated syrups currently available in Japan. *Tohoku Univ. Dent. J.* 15, 163–170.
28. Takano, M., 2002. Seasoning of drugs for infants and drug interaction. *Chozai To Joho* 8, 741–744.
29. Adjei, A, Doyle R., Reiland, T., In Swarbrick, J., Boylan, J.C., Eds; *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Vol.6, Marcel Dekker, New York, 1992, 117.
30. Billany, M.R.J. In; Aulton M.E., Eds; *Pharmaceutics; The science of Dosage form Design*, International Edition, Churchill Livingstone, New York, 1996, 263.
31. Catania, J. S., Johnson, A. D., U. S. Patent 5633006, 1997.
32. Nelson, S. L., U.S. Patent 5766622, 1998.
33. Eby III, Georage, A., U.S. Patent 5002970, 1991
34. Pandya, H.B., Callan, T. P., U.S. Patent 5.837, 286, 1998.
35. Corbo, M. Desai, J., Patell, M., U.S. Patent 6.663.893, 2003.
36. Friend, D. R., Ng, Steve, Sarabia, R. F., Weber T. P., Geoffroy, J., U.S. Patent, 6, 139.865, 2000
37. Augello, M., Dell, S.M., Reier, G.E., Stamato, H.J., DiMemmo, L. M., U.S. Patent, 6099.865, 2000
38. Cuna, M., Lorenzo, M.L., Vila-Jato, J.L., Torress D., Alonso, M.J., *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 1997, 23(3), 259.
39. Kato, M., Japan Patent, 8259466, 1996.
40. Maccari, M., Calanchi, M., In Kydonieus, A.F., Eds; *Controlled Release Technologies, Methods, Theory and Applications*, 1st edition, Vol. 2, CRS Press, Incl., Boca, Raton, Florida, 1980, 113.
41. Yajima, T., Nogata, A., Damachi, M., Umeki, N., *Chem. Pharm. Bull*, 1996, 44(1), 187.
42. Sugao, H., Yamazaki, S., Shizozawa, H., Yano, K., *J. Pharm. Sci.*, 1998, 87, 96.
43. Udea M., Nakamura, Makata, H. & Kawashima, Y., *J. Microencapsulation*, 1993, 10(4), 461.
44. Yekta, Ozer & A. Atilla, Hincal, J. *Microencapsulation*, 1990, 7(3) 327.
45. Cherukuri, S. R., Chau, T. K., Raman, K. P., Orama, A. M., U.S., Patent, 5004595, 1991
46. Borodkin, S., Sundberg, D.P., *J. Pharm. Sci.*, 1971, 60(10), 1523.
47. Roy, G. M., *Pharm. Tech.*, 1994, 62
48. Manke, S.P. & Kamet, V.S., *Indian J. Pharm. sci.*, 1991, 43, 209
49. Gao, R., Shao, Z. J., Fan, A. C., Witchey-Kshmanan, L. C., Stewart, D. C., U.S. Patent, 6,514,492, 2003
50. Motola, S., Agisim, G. R., Mogavero, A., U.S. Patent 5024997, 1991.
51. Ueno, M., Japan Patent, 0411865, 1992
52. Adjei, A, Doyle, R., Reiland, T., In; Swarbrick, J., Boylan, J.C., Eds; *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Vol. 6, Marcel Dekker, New York, 1992, 130.119.
53. Popescu, M. C., Metz, E. T., U.S. Patent, 5009819, 1991
54. Fuisz, R.C., U.S. Patent, 5028632, 1991.
55. Amita Nanda, R. Kandarapu & Garg, S., *Indian J. Pharm., Sci.*, 2002, 64(1), 10
56. Rosoff, M., In; Liberman, H.A., Rieger, M.M., Banker, G.S., *Pharmaceutical Dosage form, Disperse System*, 1st Edition, Vol.1, Marcel Dekker, New York, 1988, 259.
57. Masahiro, Y., Gakao, M., Japan Patent, 11349492, 1999.
58. Yoshimi, S., Kiyomi, S., Hiroshi, F., Yasuhiko, N, *Chem. Pharm. Bull.*, 1996, 44(2), 399
59. Namiki, T., Tokagi, N. Japan Patent, 09052850, 1997.
60. Lulei, 4., Eraden, G., Nahed, H., *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 1997, 23(10), 1007
61. Bettman, M.J., Percel, P.J., Powell, T.C., U.S. Patent 5639475.
62. Kaneko, K., Kanada, K., Yamada, T., Miyagi, M., Saito, N., Ozeki, T. Yususa, H., Kanaya, Y., *Chem. Pharm. Bull.*, 1997, 45(2), 1063.
63. Hayward, M., U.S. Patent, 37277, 1998.
64. Kishimoto, A., Okamoto, K., Japan Patent, 09143100, 1997.
65. Yajina, T., Ishii, K., Itai, S., Nemoto, M., Sultake, K., Tukui, N., PCT. Int. Appl. WO 963428, 19.
66. Danielson, D. W., Shah, S. A., U.S. Patent, 6, 270807.
67. Kumar, V., U.S. Patent, 6, 372, 259, 2002 Liquids 40-46.

68. Nakano, H., Hasegawa, K., Japan Patent, 11139992, 1999.
69. Osugi, T., Japan Patent 11139970, 1999.
70. Meyer, G., Mazer, T., U.S. Patent, 5599556, 1997.
71. Swaminathan, K., Subramania, S., Harding, R., PCT Int. Applwo, 9733621, 1997.
72. Morella, A., Mario, P., In Hamilton, Heinicke, G., U.S. Patent 6197348, 2001
73. Yu, D., Roche, E., U.S. Patent, 6586012, 2003.
74. Yu, D., Roche, E., U.S. Patent, 648 823, 2002.
75. Soutakagi, K.T., Koichiwada, H.Y., Kenzo, T., J. Pharm. Sci., 1998, 87(5), 552.
76. Nakamura Y., Makita H., Imasato Y., *Pharm. Tech. Japan*, **6**, 841—850 (1990).
77. Shirai Y., Sogo K., Yamamoto K., Kojima K., Fujioka H., Makita H., Nakamura Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 172—177 (1993).
78. Sugao H., Yamazaki S., Shiozawa H., Yano K., *J. Pharm. Sci.*, **87**, 96—100 (1998).
79. Koyama I., Shimano K., Manabe E., Ozawa Y., Goto S., *Yakuzaigaku*, **50**, 1—7 (1990).
80. Yajima T., Nogata A., Demachi M., Umeki N., Itai S., Yunoki N., Nemoto M., *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 187—191 (1996).
81. Yajima T., Umeki N., Itai S., *Chem. Pharm. Bull.*, **47**, 220—225 (1999).
82. Slowson, M., Slowson, S., "What to do when patients cannot swallow their medications", *Pharm. Times*, 1985, 51, 90-96
83. Seager, H., «Drug-deliver Products and the Zydis Fast-dissolving Dosage Form", *J. Pharm. and Pharmacol.*, 1998, 50, 375-382.
84. Bradoo, R., Shahani, S., Poojary, S., Deewan, B. and Sudarshan, S., *JAMA India*, 2001, 4(10) 27-31.
85. Dobetti, L., *Pharma. Tech.*, 2001(suppl.), 44.
86. Reddy, L. H., Ghose, B. and Rajneesh, *Indian J. Pharm. Sci.*, 2002, 64(4): 331- 336.
87. Kuchekar, B. S. and Arumugam, V., *Indian J. Pharm. Edu.*, 2001, 35, 150.
88. Bhaskaran, S., and Narmada, G. V., *Indian Pharmacist*, 2002, 1(2), 9-12.
89. Indurwade, N. H., Rajyaguru, T. H. and Nakhat, P. D., *Indian Drugs*, 2002, 39(8), 405-09.
90. Devrajan, P. V. and Gore, S. P., *Express Pharma Pulse*, 2000, Nov. 23, 7(1), 16.
91. Drews J. *Quest of Tomorrow's Medicines*. New York, NY: Springer-Verlag; New York; 1999
92. Anon. *Flavors and Flavoring*. *Int J Pharm Compounding* 1997; 1:90-92.
93. Chang RK, Guo X, Burnside B, Couch R. *Fast-Dissolving Tablets*, *Pharm Technol* 2000; 24(6):52-58.
94. Reddy, L. H., Ghose, B. and Rajneesh, *Indian J. Pharm. Sci.*, 2002, 64(4): 331- 336.
95. Parakh, S. R. and Gothoskar, A. V., *Pharma. Tech.*, November 2003, 92- 100.
96. Kuchekar, B. S., Badhan, A. C., Mahajan, H. S., *Pharma Times*, June 2003, 35, 7-9.
97. Bechtol, L.D., DeSante, K.A., Foglesong, M.A., Sprading, C.T., Winely, C.L., 1981. The bioavailability of pediatric suspensions of two erythromycin esters. *Curr. Ther. Res.* 29, 52—59.
98. Fukumori, Y., Yamaoka, Y., Ichikawa, H., Fukuta, T., Takeuchi, Y., Osako, Y., 1988. Coating of pharmaceutical powders by fluidized bed process. II. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 1491—1500.
99. FuLu, M.Y., Borodkin, S., Woodward, P., Li, P., Diesner, C., Hernandez, L., Vadnere, M.A., 1991. Polymer carrier system for taste masking of macrolide antibiotics. *Pharm. Res.* 8, 706—712.
100. Katsuragi, Y., Mitsui, Y., Umeda, T., Otsuji, K., Yamasawa, S., Kurihara, K., 1997. Basic studies for the practical use of bitterness inhibitors: selective inhibition of bitterness by phospholipids. *Pharm. Res.* 16, 720—724.
101. Kawamura, Y., Kare, M.R., 1987. *Umami: A Basic Taste*. Marcel Dekker Inc., New York.
102. Keast, R.S., Breslin, P.A., 2002. Modifying the bitterness of selected oral pharmaceuticals with cation and anion series of salts. *Pharm. Res.* 19, 1019—1026.
103. Keast, R.S.J., Breslin, P.A.S., Beauchamp, G.K., 2001. Suppression of bitterness using sodium salts. *Chimia* 55, 441—447.
104. Kinnamon, S.C., Cummings, T., 1992. Chemosensory transduction mechanisms in taste. *Annu. Rev. Physiol.* 54, 715—731.
105. Kinnamon, S.C., Roper, S.D., 1988. Membrane properties of isolated mudpuppy taste cells. *J. Gen. Physiol.* 91, 351—371.
106. Matsunami, H., Montmayeur, J., Buck, L., 2000. A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature* 404, 601—604.

107. Miyanaga, Y., Tanigake, A., Nakamura, T., Bobayashi, Y., Ikezaki, H., Taniguchi, A., Matsuyama, K., Uchida, T., 2002. Prediction of the bitterness of single, binary- and multiple component amino acid solutions using a taste sensor. *Int. J. Pharm.* 248, 207–218.
108. Mullarney, M.P., Hancock, B.C., Carlson, G.T., Ladipo, D.D., Langdon, B.A., 2003. The powder flow and compact mechanical properties of sucrose and three high-intensity sweeteners used in chewable tablets. *Int. J. Pharm.* 257, 227–236.
109. Pfaffmann, C., 1959. The sense of taste. In: Field, J. (Ed.), *Handbook of Physiology*, vol. 1. American Physiological Society, Washington, DC, p.507 (Section 1).

OBJECTIFS DE L'ETUDE

Le principe actif que nous allons utiliser est le chlorhydrate de ranitidine. Celui-ci est déjà commercialisé par les laboratoires Glaxo et Fournier dont les noms de spécialités sont respectivement l'Azantac® et le Raniplex®. Les différentes formes pharmaceutiques disponibles sont les formes orales (comprimés pelliculés, comprimés effervescents et granulés effervescents) et la forme injectable. Les indications thérapeutiques de ces spécialités sont limitées au traitement de :

- L'éradication de *Helicobacter pylori* en cas de maladie ulcéreuse gastro-duodénale (après preuve endoscopique de la lésion et de l'infection), en association à une bithérapie antibiotique,
- L'ulcère gastrique ou ulcère duodéal évolutif,
- L'oesophagite par reflux gastro-œsophagien
- Le syndrome de Zollinger-Ellison.

En effet, les antisécrétoires font partie intégrante du traitement du reflux gastro-oesophagien, ainsi qu'il a été déclaré dans plusieurs conférences tenues sous l'autorité de la Société Européenne de Gastro-entérologie Hépatologie et Nutrition Pédiatriques (ESPGHAN).¹³

Les antisécrétoires disponibles sont de deux types :

- Les inhibiteurs des récepteurs H₂ à l'histamine (cimétidine, ranitidine, famotidine nizatidine).
- Les inhibiteurs de la pompe à protons (oméprazole, lansoprazole et pantoprazole).

En France, l'oméprazole dispose d'une AMM pédiatrique pour le Mopral® chez l'enfant souffrant d'oesophagite et âgé de plus de un an, à la dose de 1mg.kg/jour, en deux prises.

Il n'y a pas d'AMM pédiatrique pour les anti-H₂. L'administration à des nourrissons implique l'utilisation d'une forme pharmaceutique appropriée c'est-à-dire une forme pharmaceutique liquide ou fluide tels que sirops, potions, microémulsions ou suspensions.

En outre, le chlorhydrate de ranitidine possède un goût désagréable, amer, métallique et persistant. L'administration d'une telle formulation s'avère délicate et peut conduire à une diminution de la compliance au traitement.

Notre objectif est de construire une formulation microémulsionnée et de rendre possible l'utilisation du chlorhydrate de ranitidine dans le traitement du reflux gastro-œsophagien de l'enfant et du nourrisson. Pour ce faire, nous avons préparé, à l'aide des diagrammes de phases, une microémulsion H/L, « en encapsulant » l'amertume de la substance active dans les gouttelettes aqueuses dispersées dans la phase huileuses. Afin de déterminer la teneur en substance active, nous avons validé la méthode de dosage du chlorhydrate de ranitidine et effectué des tests de stabilités.

PARTIE EXPERIMENTALE

Dans la seconde publication présentée dans ce chapitre, et reproduite ci-après : « Design and development of oral paediatric reverse water-in-oil microemulsions as carriers for ranitidine hydrochloride », sont présentés les protocoles expérimentaux précis pour la préparation de la microémulsion H/L (hydrophile/lipophile) contenant du chlorhydrate de ranitidine ainsi que les appareils et les techniques utilisées dans cette étude. Les étapes de la construction des diagrammes de phase sont également détaillées. Enfin les résultats de l'étude analytique et des caractéristiques physicochimiques sont discutés.

En introduction de ces résultats expérimentaux, le contexte de l'étude sera présenté, et notamment des notions sur la pharmacologie du chlorhydrate de ranitidine. Les principes généraux sur les formulations par microémulsions H/L, leur stabilité et leur étude par des diagrammes ternaires sont ensuite discutés. Enfin, la microémulsion que nous étudions sera présentée, et en particulier tous les excipients contenus en plus du chlorhydrate de ranitidine.

1. Contexte : le reflux gastro-intestinal et la pharmacologie du chlorhydrate de ranitidine

1.1. Le reflux gastro-oesophagien

Le reflux gastro-oesophagien se définit comme le passage intermittent du contenu gastrique dans l'oesophage, en dehors d'efforts de vomissements. Il s'agit d'un phénomène physiologique, de survenue fréquente chez le sujet normal, en particulier en période post-prandiale. La fréquence des symptômes du reflux gastro-oesophagien dans la population générale est élevée. Les symptômes du reflux gastro-oesophagien et les lésions d'oesophagite sont dus pour l'essentiel à l'agression de la muqueuse oesophagienne par la sécrétion gastrique acido-peptique.¹⁴

Les signes cliniques du reflux gastro-oesophagien peuvent se présenter sous des formes non spécifiques telles que des vomissements, des régurgitations, un refus

d'alimentation, de l'irritabilité, des hématemèses, un retard de croissance, une respiration bruyante et sifflante, des aspirations pulmonaires. Il peut être associé ou non à une oesophagite. L'administration se fait après un diagnostic par mesure du pH oesophagien pendant 24 heures.

1.2. Le chlorhydrate de ranitidine

C'est un principe actif anti-ulcéreux anti-sécrétoire. C'est un inhibiteur des récepteurs H₂ à l'histamine. Il inhibe ainsi fortement la sécrétion gastrique acide basale, les sécrétions acides nocturnes et stimulées par un repas.¹⁵

1.2. A. Structure chimique et activité des anti-H₂

L'existence des récepteurs H₂ à l'histamine contrôlant la sécrétion d'acide par la cellule pariétale gastrique a été mise en évidence par l'utilisation de plusieurs substances antagonistes telles que le burinamide et la métiamine. Par la suite, les recherches se sont tournées vers la cimétidine (Tagamet®), caractérisée par un noyau imidazole comme l'histamine. Ces recherches ont rapidement montré que ce noyau imidazole n'est pas indispensable pour qu'une substance antagonise les récepteurs H₂ de la muqueuse gastrique. Son remplacement par un noyau furane a conduit au développement de la ranitidine (Azantac®, Raniplex®), molécule mieux tolérée. Depuis la commercialisation des représentants de la classe des anti-H₂, de nouvelles modifications ont donné lieu à de nouveaux composés avec, par exemple, la substitution du noyau imidazole par le noyau thiazole. Ces substitutions ont conduit au développement de la famotidine (Pepdine®) et de la nizatidine (Nixazid®).¹⁶

Structure chimique de la ranitidine :

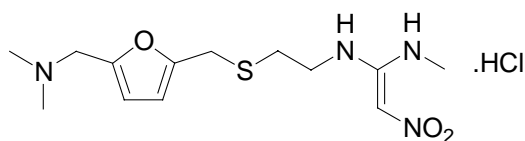


Schéma posologique :

Présentation destinée à l'enfant de 0 à 6 ans

Concentration en principe actif: 10 mg/ml

Prise de 10 mg/ kg/ jour

Mode d'administration: 2 prises quotidiennes

Durée d'administration prévisible : traitement de 4 à 6 semaines

Effets indésirables :

Les effets indésirables les plus fréquents sont : diarrhées, asthénie, bouche sèche, vertiges, rashes cutanés, fièvre. Plus rarement, on observe une élévation de la créatinine et des transaminases dans le sérum. Exceptionnellement, il est possible d'observer des leucopénies et des thrombopénies.

1.2. B. Pharmacologie

◆ Rappel sur la sécrétion d'acide gastrique

Au niveau de la cellule pariétale gastrique, la sécrétion acide est sous la dépendance de trois types de récepteurs situés sur la membrane basale:

- les récepteurs à l'histamine
- les récepteurs à l'acétylcholine
- les récepteurs à la gastrine

La stimulation de l'un de ces récepteurs active par une cascade d'événements faisant intervenir des messagers intracellulaires, la pompe à protons H^+/K^+ ATPase située au niveau du pôle apical de la cellule pariétale. Cette enzyme échange en présence d'ATP, un ion H^+ intracellulaire contre un ion K^+ extracellulaire. Les ions H^+ ainsi libérés s'unissent aux ions Cl^- pour former de l'acide chlorhydrique. Environ 2 litres d'acide chlorhydrique sont ainsi libérés par jour.¹⁷

◆ L'effet antisécrétoire et autres effets

Les anti-H2 provoquent une inhibition de la sécrétion basale d'acide chlorhydrique. Les sécrétions acides nocturnes et stimulées sont elles aussi fortement inhibées. Les anti-H2 diminuent le débit total de pepsine. Ils n'ont pas d'effet sur les sécrétions pancréatiques ou biliaires ni sur la motricité digestive. Aux doses utilisées en thérapeutique, les anti-H2 ne

modifient pas la gastrinémie basale, mais induisent une augmentation de la gastrinémie postprandiale.¹⁷

◆ *Devenir dans l'organisme et pharmacocinétique*

Après administration par voie orale, l'absorption du chlorhydrate de ranitidine est rapide. Le pic de concentration plasmatique est obtenu 1 à 3 heures après administration. La concentration plasmatique est proportionnelle à la dose ingérée et subit l'influence de variations interindividuelles.

La biodisponibilité est de 50% pour la forme comprimé, de 55% pour la forme effervescente. La ranitidine est soumise à l'effet de premier passage hépatique. L'absorption ne dépend pas de la prise concomitante d'aliments ou d'antiacides.

La fixation aux protéines est faible (15%). La ranitidine passe dans le lait, franchît la barrière foeto-placentaire mais ne passe que faiblement la barrière méningée.

La ranitidine est faiblement métabolisée en trois dérivés : S-oxyde, N-oxyde, desméthylranitidine. La demi-vie d'élimination est de 2 heures pour la forme orale. L'élimination est réalisée principalement par voie urinaire, sous forme inchangée.¹⁸

2. FORMULATION D'UNE MICROEMULSION H/L

2.1. Introduction

Dans le domaine de la formulation galénique de formes liquides pour un usage pédiatrique, différents facteurs sont à prendre en considération. Les formes liquides buvables recommandées pour cette population sont celles qui ont le plus tendance à poser des problèmes de goût. En effet, ce sont des formes pharmaceutiques pour lesquelles les composés manifestent une propension à se solubiliser dans la salive et d'interagir avec les récepteurs du goût.

Nous pouvons dégager des paragraphes précédents, quelques règles à adopter avant d'aborder la formulation proprement dite d'une spécialité buvable pédiatrique.

Notions à prendre en compte avant la formulation

L'importance du goût chez l'enfant n'est plus à démontrer compte tenu des descriptions faites dans les paragraphes précédents. Souvenons-nous simplement que pour qu'un médicament soit efficace, il doit être pris ! Sans en faire pour autant un aliment apprécié des enfants, ce qui pourrait être dangereux, il doit être ingéré sans trop de difficultés pour que les parents ne choisissent pas une autre spécialité. Le médicament doit être délivré, et les notions économiques sont à prendre en considération lors de l'élaboration d'une nouvelle spécialité pharmaceutique. En effet, il est illusoire de dépenser des budgets pour masquer le goût d'un principe actif sans aucune potentialité économique. Ainsi, une des premières étapes est de déterminer quels sont les moyens dont on peut se doter concernant le goût de la spécialité à formuler. Une solution scientifiquement séduisante peut se révéler être un échec économique !

L'étape suivante est évidente, il faut, dans la mesure du possible évaluer le goût du principe actif employé. Nous avons vu au cours de ce chapitre qu'il existe de nombreuses méthodes de masquage de goût. Mais si le simple ajout d'un édulcorant et d'un arôme permet d'obtenir une forme buvable de goût satisfaisant, il n'est pas nécessaire de chercher à réaliser une forme complexe, généralement plus onéreuse. Si un édulcorant et un arôme ne permettent pas l'obtention d'une spécialité de goût agréable, il va falloir envisager une formulation plus originale; et il faudra choisir quel type de méthode appliquer, et en général, il s'agira de savoir si l'interaction entre la molécule sapide et le récepteur gustatif est inhibée par action au niveau du principe actif ou au niveau de l'ensemble de la formule galénique. Cependant, il faut se rappeler que le goût n'est pas la seule caractéristique à étudier lors de la formulation d'un médicament. Ainsi, perdre la stabilité au profit des propriétés gustatives n'est pas concevable. De même, si la transposition de l'échelle de laboratoire à l'échelle industrielle n'est plus envisageable à cause de la complexité de la formule ou du procédé de fabrication, le masquage de goût devient secondaire. Ainsi, on va chercher à appliquer des procédés de masquage de goût pour lesquels on possède une expérience et dont on connaît les avantages et les inconvénients, aussi bien d'un point de vue scientifique qu'économique. On préférera utiliser une microémulsion dont les excipients sont connus, plutôt qu'une inclusion dans un complexe moléculaire prometteur mais dont la toxicité n'est que peu étudiée.

Enfin, si on est en possession d'une molécule « révolutionnaire » qui revêt un fort potentiel économique mais dont le goût est extrêmement déplaisant, on aura beaucoup plus de liberté quant au choix de la méthode à appliquer, quels qu'en soient le coût et la complexité.

2.2. Microémulsion de chlorhydrate de ranitidine

2.2. A. Introduction

La ranitidine administrée par voie orale aux nourrissons en milieu hospitalier est la forme commercialisée « injectable ». Celle-ci laisse un goût désagréable, amer, métallique et persistant.

La microémulsion hydrophile/lipophile mise au point pendant cette thèse présente l'avantage de masquer ce goût désagréable. Le principe actif hydrosoluble est incorporé dans la phase interne aqueuse du système émulsionné alors que la phase externe lipidique recouvre les récepteurs des papilles gustatives. De ce fait, le contact direct de la substance active dissoute dans l'eau avec les récepteurs est empêché.

Cette forme pharmaceutique liquide facilite l'administration, permet un meilleur ajustement posologique en fonction du poids du nourrisson, et améliore l'observance du traitement.

2.2. B. La microémulsion

Le terme émulsion désigne un système constitué par un liquide se trouvant dispersé sous la forme de fines gouttelettes dans un autre liquide, les deux liquides étant peu solubles voir insolubles l'un dans l'autre.

Par définition, une microémulsion homogène, fluide et stable est composée d'une phase aqueuse, d'une phase lipidique, d'au moins un agent tensioactif et d'au moins un agent co-tensioactif.

Une microémulsion se reconnaît à:

- sa transparence ou son opalescence ;
- sa bonne résistance à la centrifugation: 50 à 100 G

La distinction entre émulsion, solution micellaire et microémulsion se fait par la taille des gouttelettes dispersées. Pour les microémulsions, la taille des gouttelettes est comprise entre 10 et 100 nm. L'aspect des émulsions est dû à la réflexion des rayons lumineux qui les

traversent. Si les rayons lumineux ne sont pas réfléchis, l'aspect obtenu est transparent. Par contre, lorsque la taille des gouttelettes augmente les rayons lumineux sont réfléchis et l'aspect obtenu est laiteux.¹⁹

2.2. C. Paramètres influençant la formation et la stabilité des microémulsions

◆ **La température :**

La température influence la formation des microémulsions puisque la solubilité plus ou moins grande des agents émulsifiants en dépend.

◆ **La salinité :**

Les sels minéraux solubles interviennent essentiellement sur les interactions électrostatiques : *Diminution de la répulsion entre les gouttelettes d'eau ;
*Réduction de la rigidité de l'interface ;
*Amélioration des possibilités de solubilisation.

◆ **Le pH :**

Le pH influence la formation et l'existence des microémulsions, selon que l'on est présence ou non d'agents tensioactifs ou d'agents co-tensioactifs amphotères c'est-à-dire qui s'ionisent plus ou moins en fonction de leur point isoélectrique.

◆ **La force ionique :**

La stabilité de l'émulsion ou de la microémulsion est fonction des quantités des différents constituants en présence et de la concentration en sels de la phase aqueuse. Plus la phase aqueuse est chargée en cations, plus elle est stable.

2.2. D. Prédétermination de la zone de stabilité de la microémulsion par la méthode du diagramme de phase ternaire

Le diagramme de phase ternaire permet de trouver les proportions donnant la microémulsion la plus stable, et de définir la zone de formation des microémulsions les plus stables en fonction des proportions des phases et de l'agent émulsionnant.

La stabilité d'une microémulsion varie avec la concentration des différents constituants. Il convient donc d'établir un diagramme de phases d'un système comprenant à la fois tensioactif, co-tensioactif, émulsifiant et eau, à une température donnée. Auparavant, il est nécessaire, de définir les proportions relatives d'agents tensioactifs en agents co-tensioactifs qui vont être utilisés. Quelques essais préliminaires aident généralement à ce choix.

Le mélange agent tensioactif / agent co-tensioactif (=2, 33) une fois fixé reste invariable et est considéré comme l'émulsifiant.

Les produits obtenus sont intimement mélangés à l'aide d'un vortex et leur aspect est noté à température ambiante (= à 20° C) ou à une température définie préalablement dans le cas d'applications particulières.

2.2. E. Composition du produit fini

Le chlorhydrate de ranitidine est connu pour être un des principes actifs les plus amers en solution aqueuse. Le simple ajout d'édulcorants et d'arômes ne suffit pas à masquer son amertume. Pour cette raison, une nouvelle forme galénique qui va isoler le principe actif des récepteurs du goût a été élaborée. Le chlorhydrate de ranitidine est dissous dans une phase aqueuse tamponnée à un pH compris entre 6,5 et 7,5 qui est le point de stabilité optimal du chlorhydrate de ranitidine. Dans un second temps cette phase aqueuse est dispersée dans une phase lipophile. Ainsi, le principe actif ne se solubiliserait pas ou peu dans la salive et de ce fait, la saveur ne sera pas ou peu perçue. Le choix de la forme galénique s'est porté sur des systèmes émulsionnés et, pour des raisons de stabilité, vers la formulation de microémulsions. Une microémulsion est caractérisée par l'ajout d'un agent co-tensioactif en plus de l'agent tensioactif. Ceci permet de réaliser un système dispersé limpide et transparent, et d'obtenir une forme pharmaceutique ayant une stabilité nettement prolongée (sur plusieurs années) et meilleure, comparée à celle d'émulsions ordinaires.

Pour favoriser la prise du médicament, un édulcorant et un arôme ont été ajoutés. Une huile essentielle de citron va dissimuler la saveur et l'odeur huileuse. L'édulcorant est constitué de cyclamate de sodium qui a l'avantage de ne pas être à l'origine de dégradations de la ranitidine et ne diminue pas la stabilité de la microémulsion.

En ce qui concerne l'agent co-tensioactif, le choix s'est porté sur du propylène glycol. Le tensioactif choisi est dumonooléate de sorbitanne (Montanox® 80) appartenant au groupe des sorbitans oléiques. On peut noter que tout un travail, concernant la détermination des zones d'émulsions a été réalisé, et ceci principalement à l'aide de diagrammes ternaires déterminant le type d'émulsion obtenu en fonction de la concentration des différents constituants et du rapport tensioactif sur co-tensioactif.

Nous avons donc réalisé une microémulsion de phase dispersée aqueuse à base de chlorhydrate de ranitidine, et de phase dispersante lipophile constituée de Labrafil® M 1944 CS (oléoyl-macrogol-6-glycéride) appartenant au groupe des macrogolglycérides oléiques. La composition de la microémulsion retenue est:

Formule unitaire en g pour 100 ml :

Chlorhydrate de ranitidine	1,000	Parahydroxybenzoate de propyle	0,010
Labrafil® M1944CS	40,00	Cyclamate de Sodium	0,400
Montanox® 80	40,00	Tampon Acide citrique / Citrate tri-sodique dihydraté	10,295
Propylène glycol	17,10		
Parahydroxybenzoate de méthyle	0,002	Huile essentielle de citron	3,20
Eau purifiée			qsp 100 ml

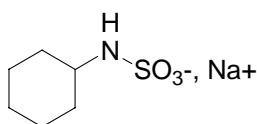
2.2. F. Détail et description des matières premières

◆ **Les excipients composant la solution tampon**

La solution aqueuse tampon doit permettre d'assurer la stabilité et la conservation du chlorhydrate de ranitidine. Le composé retenu dans la formulation finale est un tampon composé de citrate de sodium et d'acide citrique. Le pH de la solution obtenue avec un tampon composé d'acide citrique monohydraté et de citrate dihydraté est de 6,4.

Le cyclamate de sodium :

Le cyclamate de sodium est un agent édulcorant de synthèse utilisé à des doses très faibles et apprécié pour son aptitude à masquer des arrières goûts amers :



Ses propriétés générales sont:

- un profil sucré agréable et persistant
- un pouvoir sucrant 50 fois supérieur à celui du saccharose
- un masquage des amertumes persistantes
- un effet synergique avec les autres édulcorants
- une stabilité en solution aqueuse quel que soit le pH
- une stabilité aux traitements thermiques à hautes et basses températures
- non-cariogène

Il est autorisé par la Directive Européenne 94/35/EC sur les édulcorants destinés aux denrées alimentaires.

Les agents conservateurs :

Le parahydroxybenzoate de méthyle et le parahydroxybenzoate de propyle réduisent la prolifération bactérienne.

◆ *Les constituants de la phase lipophile*

On utilise des macroglycérides oléiques (Oléoylmacrogol-6-glycérides) commercialisés sous la dénomination LABRAFIL M 1944 CS par le groupe Gattefossé. Les macroglycérides oléiques sont des mélanges de monoesters, de diesters, et de triesters du glycérol et de monoesters et de diesters de macrogols.

Les macrogols sont des mélanges de polymères de formule générale H-(OCH₂-CH₂)_n-OH dont la masse moléculaire relative moyenne est comprise entre 300 et 400.

◆ *L'agent tensioactif*

Par définition, l'agent tensioactif est un composé chimique partiellement soluble dans la phase aqueuse et dans la phase lipidique, à caractère plus lipophile que l'agent co-

tensioactif dont le rôle est de provoquer la solubilisation mutuelle des phases aqueuses et huileuses de la microémulsion en se plaçant à l'interface des deux phases. Les polysorbates ont été retenus pour des raisons de goût.

◆ *L'agent co-tensioactif*

L'agent co-tensioactif est un composé chimique qui possède deux groupements, un polaire ou ionique et un lipophile contenant une chaîne aliphatique plus ou moins longue.

L'action synergique de l'agent tensioactif et de l'agent co-tensioactif est indispensable à l'obtention des microémulsions.

3. Reproduction de la seconde publication du chapitre 2

Ci-dessous est reproduite notre publication regroupant les descriptions des appareils et des méthodes utilisées ainsi que les protocoles expérimentaux et les résultats obtenus.

M. Smola, M. Zhao, Th.F. Vandamme, A. Sokolowski. « Design and development of oral paediatric reverse water-in-oil microemulsions as carriers for ranitidine hydrochloride », *Minerva Biotechnologica* **2007**, *19*, 7-16.

Design and development of oral paediatric reverse water-in-oil microemulsions as carriers for ranitidine hydrochloride

Malgorzata Smola¹, Minje Zhao¹, Thierry F. Vandamme^{1*} and Adam Sokolowski²

¹ Université Louis Pasteur, Faculté de Pharmacie, LC1 UMR 7175, Département de Chimie Bioorganique, 74 Route du Rhin – BP 60024, F-67401 Illkirch

*Corresponding author: Thierry.Vandamme@pharma.u-strasbg.fr

² Wrocław University of Technology, Faculty of Chemical Engineering, ul. Norwida 4/6, Budunek C-6, PL-50-373 Wrocław

Abstract

The main purpose of this study was to prepare an oral paediatric drug delivery system containing ranitidine hydrochloride. Due to the existence of several constraints (bitter taste of the drug, necessity to administer orally liquids to children, poor stability of the drug in aqueous solutions) to formulate oral appropriate paediatric formulations, reverse water-in-oil microemulsions have been evaluated as carriers. The optimum formulation of reverse water-in-oil (w/o) microemulsion containing ranitidine hydrochloride was obtained based on the study of pseudo ternary phase diagrams. The optimum w/o microemulsion consisted of 10% ranitidine hydrochloride, 30.4 % Labrafil® M 1944 CS, polysorbate 80 as the surfactant, propylene glycol as the co-surfactant with a surfactant/cosurfactant ratio of 2. The mean droplet size of the aqueous phase in the w/o microemulsion was 200 nm. The influence of other excipients, i.e. sweeteners on the physicochemical properties of the reverse microemulsions was also examined. In conclusion, the results of the present study will be helpful for the preparation of oral liquid dosage forms of ranitidine hydrochloride with an acceptable taste.

Keywords: ranitidine, microemulsion, taste masking, paediatric, oral drug delivery system.

**Design and development of oral paediatric reverse water-in-oil
microemulsions as carriers for ranitidine hydrochloride**

SMOLA, M; ZHAO, M; VANDAMME, TF; SOKOLOWSKI, A

Minerva Biotechnologica, 2007, Vol. 19, N° 1, Pages 7-16

Pages 138- :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'Université Louis Pasteur peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://www.ingentaconnect.com/content/docdel/art1073472693>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

References

1. Bunupuradah T, Wannachai S, Chuamchaitrakool A, Intasan J, Nuchapong T, Neiss W, Kramm K, Pancharoen C, Burger D, Ananworanich J. Use of taste-masking product, FLAVOR, to assist Thai children to ingest generic antiretrovirals. *AIDS Research and Therapy* 2006; 3 (1), art. n°30 1-5
2. Shou L, Chen L. Study on the methods of masking bitter taste of drugs. *Shangolong Tradit. Med. J.* 2002; 21, 302-304.
3. Zhang XB, Hou XP. Development of methods for masking unpleasant taste of drugs. *Chin. Hosp. Pharm. J* 2003; 23, 43-45.
4. Duchene P, Woessidjewe D, Ponchel C. Cyclodextrins and carrier systems. *J. Control. Release* 1999; 62, 263-268.
5. Loftsson T, Masson M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. *Int. J. Pharm* 2001; 225, 15-30.
6. Jaskari T, Vuorio M, Kontturi K, Manzanares JA, Hirvonen J. Ion-exchange fibers and drugs: an equilibrium study. *J. Control. Release* 2001; 70, 219-229.
7. Vuorio M, Kontturi K, Manzanares JA, Murtomaki L, Hirvonen J, Kankkunen T, Kontturi K. Ion-exchange fibers and drugs: a transient study. *J. Control. Release* 2003; 91, 439-448.
8. Gao Y, Cui F, Guan Y, Yang L, Wang Y, Zhang L. Preparation of roseithromycin-polymeric microspheres by the emulsion solvent diffusion method for taste masking. *Int. J. Pharma* 2006; 318. 62-69.
9. Gi S, Deutsch D, Graig DQM. An investigation into the interaction between taste masking fatty acid microspheres and alkaline buffer using thermal and spectroscopic analysis. *J. Pharm. Sci* 2006; 95 (5), 1022-1028.
10. Yajima T, Nagata A, Dmachi M, Umeke N, Itai S, Yunoki N, Nemoto M. Particle design for taste-masking using a spray-congealing technique. *Schem. Pharm. Bull* 1996 ; 44,187-191,
11. Jadhav K.R., Shaikh I.M. Ambade, K. W., Kadam, V. J. Applications of microemulsion based drug delivery system *Current Drug Delivery* 2006 ; 3 (3), July, pp. 267-273.
12. Ghosh PK., Majithiya RJ., Umrethia ML., Murthy RSR. Design and development of microemulsion dry delivery system acyclovir for improvement of oral bioavailability. *AAPS PharmSciTech* 2006; 7 (3) E₁-E₆.
13. Brogdon RN, Carmine AA, Heel RC, Speicht TM, Avery GS. Ranitidine. A review of its pharmacology and therapeutic use in peptic. Ulcer disease and other allied diseases. *Drugs* 1982; 24, 267-303.
14. Catterall W, Mackie K. Local anaesthetics. In J. G. Hardman and L. E. Limhind (Eds). *The pharmacological basis of therapeutics* (9 th ed.) Goodman and Gilman. Oxford: Pergamon Press.
15. Caporal-Gautier J, Nivet JM, Algranti P, Guilloteau M., Histe M., Lallier M., N'Guyen-Huu JJ, Russotto R. Guide to analytical validation. Report of an SFSTP commission. I. Methodology. *S.T.P. Pharma Pratiques* 1992a, 2 (4), 205-226.
16. Caporal-Gautier J, Nivet JM, Algranti P, Guilloteau M., Histe M., Lallier M., N'Guyen-Huu JJ, Russotto R. Guide to analytical validation. Report of an SFSTP commission. II. Examples of application. *S.T.P. Pharma Pratiques* 1992b, 2 (4), 227-239.
17. Caporal J, Capuzet E. Analytical validation: from protocol to report. *S.T.P. Pharma Pratiques* 1997, 7 (5), 360-363.
18. Chaminade P, Feraud S, Baillet A, Ferrier D. Validation of a chromatographic analysis method by HPLC. Ruggedness test and validation of the technique. *S.T.P. Pharma Pratiques* 1995, 5 (1), 17-35.
19. Miller JC, Miller JN. *Statistics for analytic chemistry*, 3rd ed., Ellis Horwood, Chichester, 1993.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans ce chapitre, et dans nos publications, nous avons exploré les fonctions gustatives et leurs implications dans la conception de formes médicamenteuses buvables. La perception des saveurs, au même titre que les autres sens, est complexe et n'est pas encore totalement comprise et élucidée.

Si l'enfant est physiologiquement plus sensible au goût, il l'est aussi psychologiquement. Ainsi, les problèmes de goût sont plus importants dans une formulation pédiatrique que dans une spécialité destinée aux adultes. De plus, l'enfant ne perçoit pas forcément l'utilité du médicament. Ainsi, diminuer les freins à la prise d'une forme buvable par un enfant est essentiel.

Une formulation buvable pédiatrique doit donc, en général, présenter une saveur agréable et de préférence sucrée. Même si dans de rares cas, il n'est pas nécessaire de rajouter d'agent édulcorant ou d'arôme, il est très fréquemment souhaitable, voire nécessaire, d'avoir recours à de tels excipients. Les édulcorants sont souvent d'origine synthétique et ont un fort pouvoir sucrant, comme la saccharine, le saccharinate de sodium ou le cyclamate de sodium. Les arômes sont présents dans la moitié des formes pharmaceutiques pédiatriques commercialisées actuellement, les arômes de fruits rouges sont les plus couramment utilisés, avec une nette préférence pour la fraise ou la framboise.

Cependant d'autres méthodes sont apparues récemment pour masquer le goût des substances actives désagréables aux papilles gustatives, comme l'absorption du composé dans un polymère ou une cyclodextrine. D'une manière générale, le choix de la méthode de masquage de goût dépendra de l'intensité de la saveur désagréable.

Dans le cas étudié ici, nous avons décidé de masquer le goût du chlorhydrate de ranitidine par l'usage d'une formulation galénique particulière à savoir une microémulsion hydrophile/lipophile. La formulation que nous avons obtenue est bien adaptée aux nouveau-nés et elle permet de masquer le goût amer du chlorhydrate de ranitidine de façon efficace.

Cette étude nous a conduit à mettre au point une méthode analytique simple et précise pour le dosage simultané de plusieurs composants contenus dans la microémulsion inverse.

Ainsi, nous proposons la première formule buvable du chlorhydrate de la ranitidine, dans le but de remplacer les formes injectables et solides commercialisées jusqu'à présent. Il est nécessaire de réaliser les études *in vivo* de son activité puis étudier sa biodisponibilité, quitte à faire évoluer la formule par l'ajout de nouveaux excipients comme des surfactants.

Une autre perspective de ce travail est d'utiliser les mêmes types de microémulsions mais dans des systèmes Lipophiles/Hydrophiles dans le but de masquer le goût de substances actives lipophiles, lesquelles représentent une large classe de médicaments.

Chapitre 3

Formulation d'une solution liquide à usage oral pédiatrique contenant de la vitamine D3 et du fluorure de sodium

INTRODUCTION

La formulation de molécules lipophiles est un enjeu crucial pour l'industrie pharmaceutique. La voie d'administration la plus fréquemment choisie est la voie orale. Elle présente, en effet les avantages suivants : bonne compliance, nombreuses formes pharmaceutiques disponibles... La biodisponibilité orale intrinsèque d'un principe actif est principalement définie par ses caractéristiques physico-chimiques (masse moléculaire, pKa...) qui vont déterminer sa solubilité,²⁰ et la perméabilité de l'intestin à la molécule.²¹ Ces dernières années, les formes pharmaceutiques à base de lipides destinées à l'administration par voie orale des principes actifs peu ou pas solubles dans l'eau ont connu un développement considérable.²² Une large gamme de systèmes lipidiques visant à améliorer l'absorption gastro-intestinale des principes actifs a été développée : émulsions, microémulsions, systèmes autoémulsifiables et systèmes micellaires.²³

La vitamine D₃ est souvent prescrite aux nouveau-nés afin de lutter contre le rachitisme. Le rachitisme est une pathologie qui altère la fabrication des os. Elle est provoquée par une exposition insuffisante à la lumière du soleil (ce sont en effet les UVB qui permettent à notre organisme de produire la vitamine D₃). Cette vitamine est indispensable à l'absorption du calcium par l'intestin et à sa fixation par les os. Un apport médicamenteux de vitamine D₃ peut être envisagé par le médecin si l'alimentation n'en apporte pas suffisamment. Elle, comme la majorité des vitamines, est hydrophobe ce qui rend difficile la formulation médicamenteuse. Le fluor est un élément important de la prévention des caries. Il est utilisé sous forme de sel, le fluorure de sodium, hydrophile et donc plus facile à formuler.

Dans cette partie du manuscrit, des formulations liquides pédiatriques destinées à solubiliser des molécules peu solubles en milieux aqueux seront étudiées. Ces solutions devront renfermer deux principes actifs, la vitamine D₃ (cholécalférol) et le fluorure de sodium. Afin d'éviter les problèmes d'allergies liés à l'utilisation d'agents antimicrobiens chez le nourrisson et le jeune enfant, nous avons décidé de ne pas utiliser des agents conservateurs antimicrobiens classiques comme les parabènes, et avons proposé un autre

système de protection, qui utilise le solvant 2-pyrrolidone commercialisé par la société BASF sous le nom de Soluphor[®] P. Son efficacité antibactérienne a été démontrée dans le premier chapitre.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les formulations colloïdales et la résorption gastro-intestinale

Les formulations à base de lipides naturels ou synthétiques représentent à l'heure actuelle une stratégie de formulation intéressante pour augmenter la biodisponibilité orale des principes actifs peu solubles en milieu aqueux.^{22, 24} L'effet bénéfique des lipides ingérés au cours d'un repas sur l'absorption des principes actifs peu solubles en milieu aqueux offre des perspectives intéressantes pour améliorer les formulations pharmaceutiques de ces derniers, bien que la forme et le volume des formulations lipidiques soient différents de ceux des lipides ingérés. Les formulations lipidiques améliorent la dissolution des substances actives faiblement hydrosolubles et facilitent la formation d'une phase solubilisée de principe actif à partir de laquelle l'absorption peut avoir lieu. Les lipides co-administrés sont à même d'augmenter la perméabilité membranaire et peuvent influencer la voie d'absorption du principe actif.

Les lipides offrent un large choix de formes galéniques : émulsions, microémulsions, systèmes autoémulsifiables et systèmes micellaires. Ces systèmes sont physiquement stables et peuvent être encapsulés dans des capsules dures ou molles.²⁵ Pouton a établi une classification des formulations lipidiques (tableau 3-1) qui prend en compte la composition en glycérides, surfactants et co-solvants du système, la taille des gouttelettes formées, ainsi que l'effet de la dilution aqueuse et de la lipolyse sur le système. Cette classification comprend trois types de formulations. Les formulations de type I sont constituées de triglycérides/ou d'un mélange de glycérides et ne contiennent pas de surfactants ; elles subissent la lipolyse et forment des vésicules grossières *in vivo*. Les formulations de type II sont des systèmes autoémulsifiables (SEDDS : Self Emulsifying Drug Delivery System) qui contiennent des surfactants de faible balance hydrophile-lipophile (HLB). Ces systèmes sont finement dispersés *in vivo* et améliorent la biodisponibilité indépendamment de la digestion des lipides. Les formulations de type III (SMEDDS : Self MicroEmulsifying Drug Delivery System) renferment des surfactants de haute HLB et/ou des co-solvants hydrosolubles. Elles forment *in vivo* des particules de taille inférieure à 100 nm et sont subdivisées en deux catégories : le type IIIA, qui se disperse en formant une microémulsion, et le type IIIB qui se disperse en une solution micellaire. Le choix du type de formulation est fonction de la capacité du système à

solubiliser le principe actif pour permettre la formulation d'une dose unité.²⁶ Les principes actifs qui présentent le plus de difficultés sont ceux qui ont une solubilité limitée dans l'eau et dans les lipides (ils possèdent typiquement des valeurs de log P voisines de 2).

Tableau 3-1: Propriétés des formulations lipidiques de type I, II, IIIA et IIIB

Composition typique (%)	Contenu d'hydrophilie croissante			
	Type I	Type II	Type IIIA	Type IIIB
Triglycérides ou mélange des glycérides	100	40-80	40-80	<20
Surfactants	-	20-60 (HLB<12)	20-40 (HLB>11)	20-50 (HLB>11)
Cosolvants hydrophiles	-	-	0-40	20-50
Taille de particules dispersées (nm)	Grossière	100-250	100-250	50-100
Importance de la dilution aqueuse	Importance limitée	Capacité de solvatation intacte	Perte de la capacité de solvatation	Changement de phase significatif et perte de la capacité de solvatation
Importance de la digestion sur la dispersion du système	Requise	Souhaitée	Peut être inhibée	Non requise

D'après C.W. Pouton, 1999.^{26, 27}

2. Microémulsions et systèmes autoémulsifiables

Les microémulsions sont des dispersions isotropes et thermodynamiquement stables constituées d'une phase aqueuse et d'une phase lipophile, stabilisées par un film interfacial de surfactants associés ou non à un co-surfactant. Les systèmes autoémulsifiables (SEDDS, SMEDDS) sont des pré-microémulsions constituées d'un mélange homogène d'huile et de surfactants non-ioniques. En présence d'eau, les SEDDS et les SMEDDS se dispersent respectivement sous la forme d'une émulsion et d'une microémulsion lipophile-hydrophile. Les SEDDS et les SMEDDS permettent d'augmenter avec efficacité la biodisponibilité orale des principes actifs lipophiles qui possèdent une solubilité dans l'huile ou dans les mélanges huile-surfactant suffisante.^{28, 29, 30} Khoo *et al.* ont ainsi montré une augmentation de la biodisponibilité absolue de l'Halofantrine, antimalarique peu soluble en milieu aqueux, formulé dans des SEDDS et des SMEDDS de triglycérides (TG) à chaînes moyennes.³¹ En

effet, une biodisponibilité absolue 6 à 8 fois supérieure à celle obtenue avec la forme solide commercialisée a été observée. L'augmentation de la biodisponibilité est principalement due à une augmentation de la solubilité du principe actif et à une amélioration de son profil de dissolution dans la lumière intestinale.³² La solubilité du principe actif dépend fortement de la nature des excipients lipidiques utilisés. En effet, la nature des glycérides (mono-, di- ou tri-glycérides) en terme de longueur de chaîne, d'insaturation, de la présence ou non de groupements polyéthylène glycol (PEG) va influencer le profil de dissolution du système. La libération du principe actif sera plus rapide avec des glycérides à chaînes moyennes (MCG) qu'avec des glycérides à chaînes longues (LCG). Les mécanismes par lesquels les systèmes lipidiques améliorent la résorption gastrointestinale ne se limitent pas à l'augmentation de la dissolution du principe actif dans le tractus gastrointestinal. Les surfactants non-ioniques, tels que les esters de sorbitanes (Polysorbate 80) et l'huile de ricin polyoxyéthyléné (Cremophor EL), permettent d'augmenter la perméabilité intrinsèque de la membrane intestinale et d'inhiber la métabolisation présystémique des substances actives. L'inhibition des CYP3A4 responsables de la métabolisation intestinale des principes actifs,^{33, 34} et de la P-gp responsable de l'efflux transmembranaire de certaines substances actives, favorise l'augmentation de la biodisponibilité orale des principes actifs.^{35, 36} L'absorption paracellulaire peut être favorisée par les MCG qui entraînent des changements structurels dans la membrane épithéliale, et augmentent la fluidité membranaire. Ces promoteurs d'absorption peuvent, à des concentrations élevées, induire une toxicité cellulaire qu'il convient d'évaluer.

Plusieurs exemples d'amélioration de la biodisponibilité orale au moyen de microémulsions et de systèmes autoémulsifiables (SEDDS, SMEDDS) ont été décrits dans la littérature ;^{22, 37} le plus connu étant celui de la cyclosporine A (NEORALTM). Il n'en reste pas moins que malgré ces exemples, peu de spécialités pharmaceutiques sous forme lipidique sont commercialisées. En effet, l'action des excipients lipidiques et des surfactants sur le métabolisme présystémique, la promotion de l'absorption et la libération du principe actif restent des domaines de connaissance à éclaircir.³⁸

3. Systèmes micellaires

Nous avons vu précédemment que la solubilisation micellaire joue un rôle important dans l'absorption des lipides.³⁹ Les sels biliaires forment des micelles mixtes avec les lipides

polaires insolubles, et favorisent leur absorption intestinale en augmentant leur solubilité et la perméabilité membranaire des entérocytes. Les systèmes micellaires ont donc été envisagés pour augmenter la biodisponibilité orale des principes actifs peu solubles en milieu aqueux.⁴⁰ Les micelles mixtes sont plus efficaces que les micelles simples, elles permettent d'obtenir une meilleure solubilisation du principe actif, ainsi qu'une meilleure perméabilité. Meaney et O'Driscoll ont démontré que la perméabilité de marqueurs hydrophiles (mannitol et polyéthylène glycol 4000) sur culture de cellules Caco-2 est augmentée de manière plus importante avec des micelles mixtes constituées de taurocholate de sodium : acide linoléique dans un rapport 20 : 1 mM, qu'avec des micelles simples de taurocholate de sodium (NaTC) 20 mM.⁴¹ Aucune toxicité cellulaire associée à l'augmentation de perméabilité vis à vis des marqueurs hydrophiles n'a été mise en évidence. Par contre, ils ont démontré que l'emploi de sels biliaires non conjugués, comme le cholate de sodium, entraîne une toxicité cellulaire sur Caco-2. Naylor *et al.* ont montré que la solubilisation des principes actifs est améliorée de manière plus importante avec des micelles mixtes qu'avec des micelles simples.⁴²

L'augmentation de la solubilité des principes actifs par les micelles mixtes est fonction de la concentration en sels biliaires.^{43, 44} Plus la concentration en sels biliaires est importante, plus la solubilisation est augmentée. On observe une augmentation significative de la solubilité des composés lipophiles pour des concentrations en sels biliaires supérieures ou égales à 15 mM, ce qui correspond aux concentrations retrouvées dans l'intestin après ingestion d'un repas. Selon Mithani *et al.*, la solubilisation des principes actifs par les sels biliaires augmente proportionnellement à leur coefficient de partage octanol / eau (Log P). Plusieurs exemples d'augmentation de la solubilité de substances actives peu solubles en milieu aqueux, ont été décrits dans la littérature. Dangi et al. ont augmenté la solubilité d'un antibiotique lipophile, l'amphotéricine-B, de 7 fois par rapport à un système non micellaire, à l'aide de micelles mixtes composées de desoxycholate de sodium et de monoléine.⁴⁵ Le degré d'amélioration de la solubilité varie avec le type d'acide gras utilisé. Les acides gras possédant une longue chaîne insaturée permettent d'obtenir une meilleure solubilisation. Le taux de dissolution de la griséofulvine a également été augmenté en présence de sels biliaires, et de micelles mixtes composées de phosphatidylcholine (PC) et de cholate de sodium (NaC).⁴⁶ Le taux de dissolution de la griséofulvine augmente de façon linéaire au-dessus de 20 mM de cholate de sodium pour des rapports molaires de PC : NaC constants (0,3 et 0,7).

PARTIE EXPERIMENTALE

Cette partie comporte les différentes étapes d'obtention de la solution buvable à l'usage pédiatrique : la solubilisation de la vitamine D₃, le choix d'excipients supplémentaires à utiliser (antioxydant, surfactant), la validation de la méthode de dosage de la vitamine D₃ et du fluorure de sodium, la formulation et les études de stabilité de la solution finale.

1. Matières premières

La vitamine D₃[®] (Fluka, France) et le fluorure de sodium (Fluka, France) ont été utilisés comme des substances actives. La Vitamine E TPGS[®] (Eastman, France) a été utilisée comme surfactant afin de faciliter la solubilisation d'agent antioxydant, le gallate de propyle (Aldrich, France) et l'acide sorbique (Fluka, France). L'arome fruits rouges 0% vanilline a été utilisé comme aromatisant et le saccharinate sodique et le maltitol liquide (Lycasin[®] 80/55-sirop), comme édulcorants (Roquette, France). Le Soluphor[®]P (BASF, France) a été utilisé comme un solubilisant. L'acétonitrile, l'eau, le méthanol ainsi que tous les autres réactifs utilisés sont de grade analytique.

2. Rappel sur l'activité antimicrobienne du Soluphor[®] P

Dans le premier chapitre de cette thèse nous avons démontré le pouvoir antibactérien du Soluphor[®]P, solvant destiné à solubiliser des molécules peu solubles en milieux aqueux. En marge de ses propriétés solubilisatrices, hors de l'utilisation de cet excipient, nous lui avons découvert, des propriétés antimicrobiennes. Ces propriétés antimicrobiennes ont été étudiées sur des bactéries (*staphylococcus aureus*, *pseudomonas aeruginosa*, *escherichia coli*), des champignons (*candida albicans* et *aspergillus niger*) et des spores de bacillus (*bacillus cereus*, *bacillus sphaericus* et *basillus subtilis*). Cette étude a permis de déterminer la concentration minimale inhibitrice et bactériostatique de cet excipient pour une application pédiatrique par voie orale. Cette nouvelle utilisation potentielle de la 2-pyrrolidone a été

validée en utilisant de la vitamine D₃ et du fluorure de sodium comme principes actifs (voir l'article annexé du chapitre 1).

3. Détermination de la solubilité de la vitamine D₃ dans du Soluphor®P

La méthode de détermination de la solubilité développée par Higuchi et Connors (1965) a été employée pour l'étude de la solubilité de la vitamine D₃ (cholécalférol). L'étude a été menée dans les solutions aqueuses de Soluphor®P et les solutions aqueuses de Soluphor®P et le surfactant, la Vitamine E TPGS®. L'ajout du surfactant pourrait aider à la solubilisation de la vitamine D₃. L'influence de ce surfactant sur la solubilisation sera donc testée.

Les échantillons ont été préparés par l'ajout en excès de la quantité de vitamine D₃ dans les fioles contenant dans un premier temps : 100 g de la solution aqueuse du Soluphor®P avec les différentes concentrations, à savoir 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 % (m/m) et dans un deuxième temps la solution aqueuse du Soluphor® P avec la concentration constante de 40 % (m/m) et avec la Vitamine E TPGS® à deux concentrations, à savoir 1,5 % et 3,0 % (m/m) (tableau 3-2).

Les valeurs de la vitamine D₃ solubilisée ont été déterminées en utilisant la chromatographie liquide.

Tableau 3-2 : Composition des échantillons pour l'étude de la solubilité de la vitamine D₃.

Échantillons	Composition % (m/m)		
	Soluphor® P	Vitamine E TPGS®	Eau
1	1	0	QSP 100g
2	5	0	
3	10	0	
4	20	0	
5	30	0	
6	40	0	
7	50	0	
8	40	1,5	
9	40	3,0	

3.1. Méthode de dosage de la vitamine D₃

3.1. A. Conditions chromatographiques

La vitamine D₃ est dosée par chromatographie liquide en phase inverse. Une colonne de type CC125/4 Lichrospher 100-5 RP-8 (dimensions : l = 0,125 m ; Φ = 4,0 mm, phase stationnaire : gel de silice octylsilylé pour chromatographie R (5 μ m), à particules sphériques, d'un diamètre de pores de 10 nm) a été utilisée (Macherey-Nagel, France). La phase mobile composée d'acétonitrile et de solution aqueuse d'acide phosphorique à 0.11 % (90 : 10 v/v) est pompée de manière isocratique à un débit de 1,4 ml/min. Un volume de 20 μ l est injecté dans la colonne à l'aide d'un injecteur automatique. La détection se fait à 268 nm, à l'aide d'un détecteur UV. Le détecteur est relié à un intégrateur. Le temps de rétention est d'environ 11 minutes. Le facteur de symétrie est de 0,8 à 1,5. Dans ces conditions, le cholécalférol a un temps de rétention de 11,3 minutes.

3.1. B. Préparation des échantillons

La solution témoin

Nous avons préparé la série de dilutions de la vitamine D₃ ($\geq 99.0\%$) dans le méthanol. La solution mère de la vitamine D₃ avait la concentration de 8,0 mg/100 mL. Les dilutions ont été faites avec le mélange méthanol/eau (70/30, v/v) afin d'obtenir des concentrations allant de 11,50 à 26, 83 μ g/mL.

Les solutions à examiner

Nous avons préparé une série de dilutions des solutions à examiner. Les dilutions ont été faites avec un mélange méthanol/eau (70/30, v/v). 5 ml de chaque solution ont été prélevés dans une fiole jaugée de 25 ml. La masse de ce 5 ml a été notée en g. Ensuite, la fiole a été complétée à 25,0 ml avec un mélange méthanol/eau (70/30, v/v).

3.2. Résultats obtenus

La solubilité de la vitamine D₃ dans les solutions aqueuses de 2-pyrrolidone à des différentes concentrations a été montrée à la figure 3-1. L'influence de l'ajout de la vitamine E TPGS[®] sur la solubilisation y est aussi montrée.

La vitamine D₃ présente une la solubilité de 0,01 µg/mL dans l’eau purifiée à 77 µg/mL en solution aqueuse constituée de 40 % (m/m) de 2-pyrrolidone et 79 µg/mL en solution aqueuse à 40 % (m/m) de 2-pyrrolidone et de 1,5 % (m/m) de Vitamine E TPGS[®]. Ces résultats montrent que le choix du mélange adéquat de co-solvant/surfactant peut augmenter la solubilité d’un principe actif peu soluble dans l’eau, comme la vitamine D₃. La figure 3-1 montre la faible influence de la Vitamine E TPGS[®] sur l’augmentation de la solubilité de la vitamine D₃. Malgré cela, l’utilisation de la Vitamine E TPGS[®] pour la suite de la formulation de notre solution buvable pourrait être utile pour l’augmentation de la solubilisation des autres excipients à utiliser par la suite (agent antioxydant par exemple).

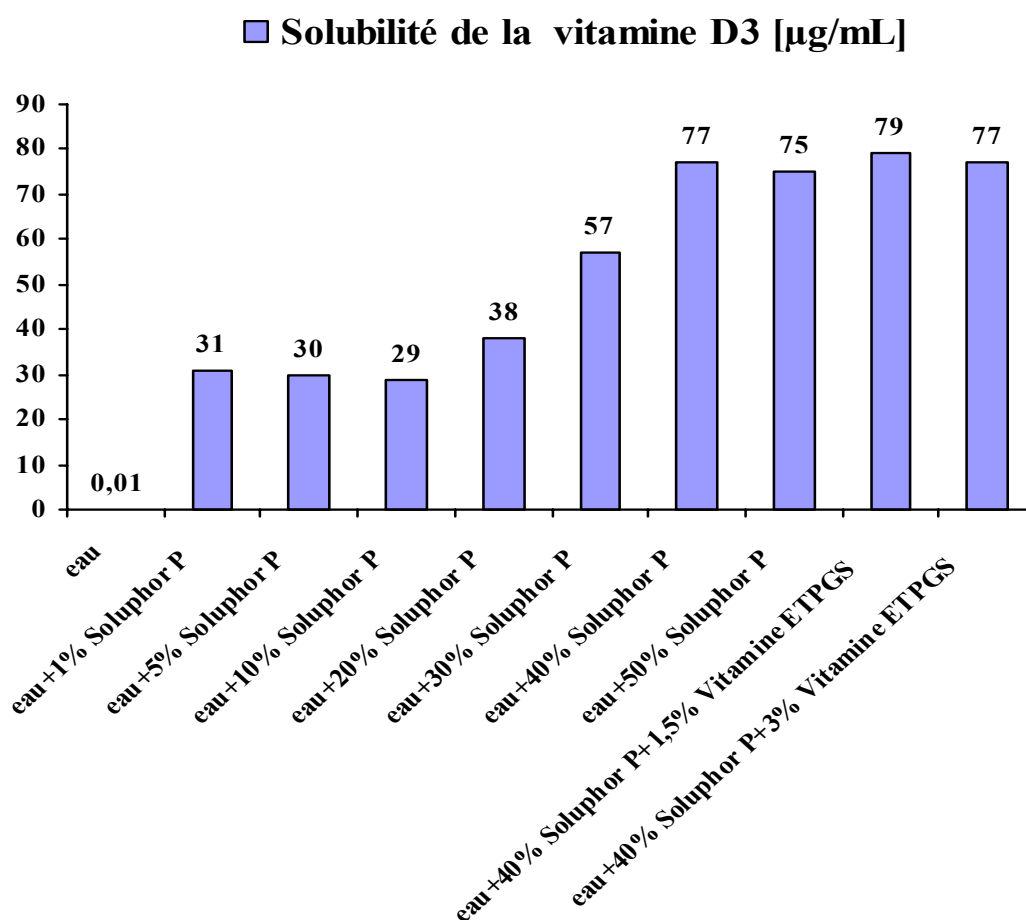


Figure 3-1 : Solubilité de la vitamine D₃ dans les solutions aqueuses de 2-pyrrolidone dans des différentes concentrations.

3.3. Discussion

Le Soluphor[®] P donne un aspect laiteux aux solutions aqueuses. Cette couleur s'accroît d'autant plus que la concentration en Soluphor[®] P est importante.

Les résultats de solubilisation obtenus pour la vitamine D₃ sont très satisfaisants en présence de Soluphor[®] P. Les solutions contenant du Soluphor[®] P ne nécessitent pas de chauffage pour améliorer la solubilisation, ce qui est une caractéristique importante, puisqu'elle facilite la réalisation pratique dans l'industrie pharmaceutique. Les expérimentations menées dans cette partie conduisent à la conclusion de solubiliser la vitamine D₃ par le Soluphor[®] P.

La concentration choisie en Soluphor[®] P nécessaire à la solubilisation de la vitamine D₃ pour la suite de la formulation de la solution buvable a été de 40 % (m/m). Nous allons également utiliser la Vitamine E TPGS[®] à deux concentrations, à savoir à 1,5 % et à 3,0 % (m/m). Cela nous permettra d'observer l'influence de la présence du surfactant sur la solubilité des autres excipients dans la solution aqueuse ainsi que sur la stabilité de la formulation.

4. Choix des autres excipients à utiliser

Dans cette partie, nous allons déterminer d'autres excipients à utiliser pour l'obtention de la solution buvable par voie orale à l'usage pédiatrique.

4.1. Ajout de l'antioxydant (gallate de propyle) et du surfactant (Vitamine E TPGS[®])

Le gallate de propyle présente une faible solubilité dans l'eau. Nous avons pu observer, avec le temps (1 mois), la formation d'un léger trouble dans la solution. Ce trouble correspond à une légère insolubilité, suivie de la précipitation du gallate de propyle en présence d'eau finale.

Pour remédier à ce problème, un agent tensioactif nonionique, la Vitamine E-TPGS, utilisée par voie orale,⁴⁷ a été ajoutée.

La quantité optimale de vitamine E-TPGS à utiliser est déterminée selon la manière décrite ci-dessous.

En se basant sur les données trouvées dans la littérature (30),⁴⁸ deux quantités la vitamine E-TPGS ont été testées : 1,500 et 3,000 g/100 ml. Les rapports des quantités entre la vitamine E-TPGS et le gallate de propyle qui ont été testées sont repris dans le tableau 3-3.

Tableau 3-3 : Rapport des quantités de vitamine E-TPGS et de gallate de propyle testées expérimentalement.

N° de la formule	Rapport de quantité pour 100 g de la nouvelle formule	
	Vitamine E-TPGS	Gallate de propyle
1	1x (1,500g)	1x (10,00 mg)
2	2x (3,000 g)	1x (10,00 mg)
3	1x (1,5000 g)	2x (20,00mg)
4	2x (3,000 g)	2x (20,00 mg)

4.2. Fluorure de sodium

Le fluorure de sodium présente une très bonne solubilité dans l'eau. Nous allons utiliser la concentration conseillée pour l'application pédiatrique (Ph.Eu.5.2) de 0.220 g/100 g de la solution finale.

4.3. Édulcoration- aromatisation

Afin d'améliorer le goût de la préparation pharmaceutique, deux agents édulcorants (saccharinate sodique et le maltitol) et un agent aromatisant (arome « fruits rouges » sans vanilline) ont été ajoutés dans les compositions de solutions reprises dans le tableau 3-4.

Tableau 3-4 : Composition des formulations liquides comportant le cholécalciférol et le fluorure de sodium.

Composant	Fonction	Quantité pour 100,0 ml
Cholécalciférol	Principe actif	0,008 g
Fluorure de sodium	Principe actif	0,220 g
Gallate de propyle	Antioxydant	0,010 g/ 0,020 g
Vitamine E TPGS	Solubilisant	1,500 g/ 3,000 g
Saccharine sodique	Édulcorant	0,500 g
Arôme fruits rouges 0% vanilline	Aromatisant	0,400 g
2-pyrrolidone (Soluphor® P)	Solubilisant	40,000 g
Maltitol liquide (Lycasin®)	Édulcorant	40,000 g
Eau purifiée	Solvant	QSP 100,0 ml

5. Formulation de la solution finale

5.1. Mode opératoire

La phase de formulation de la solution buvable a été divisée en trois étapes : préparation de la phase aqueuse, de la phase non-aqueuse et de la solution finale, comme décrit à la figure 3-2.

Préparation de la phase aqueuse : solution A : Dans une fiole jaugée de 100,0 ml, 0,220 g de fluorure de sodium et 0,62 g de saccharinate de sodium sont dissous dans 10 ml de l'eau purifiée. Ensuite 0,40 g d'arôme de fruits rouges sans vanilline et 40,0 g de maltitol liquide sont ajoutés. Homogénéiser afin d'obtenir une solution limpide.

Préparation de la phase non-aqueuse : solution B : Dans un bécher, 1,5 g (ou 3,0 g) de vitamine E-TPGS® sont dissous dans 40 g de 2-pyrrolidone à 40 °C puis laissés à refroidir.

Ajouter 8,0 mg de cholécalférol et 10,0 mg (ou 20 mg) de gallate de propyle. Homogénéiser jusqu'à l'obtention d'une solution limpide.

Préparation de la solution finale : Verser la Solution B dans une fiole jaugée de 100 ml contenant la solution A. Ajuster avec de l'eau jusqu'au trait de jauge. Homogénéiser jusqu'à l'obtention d'une solution limpide.

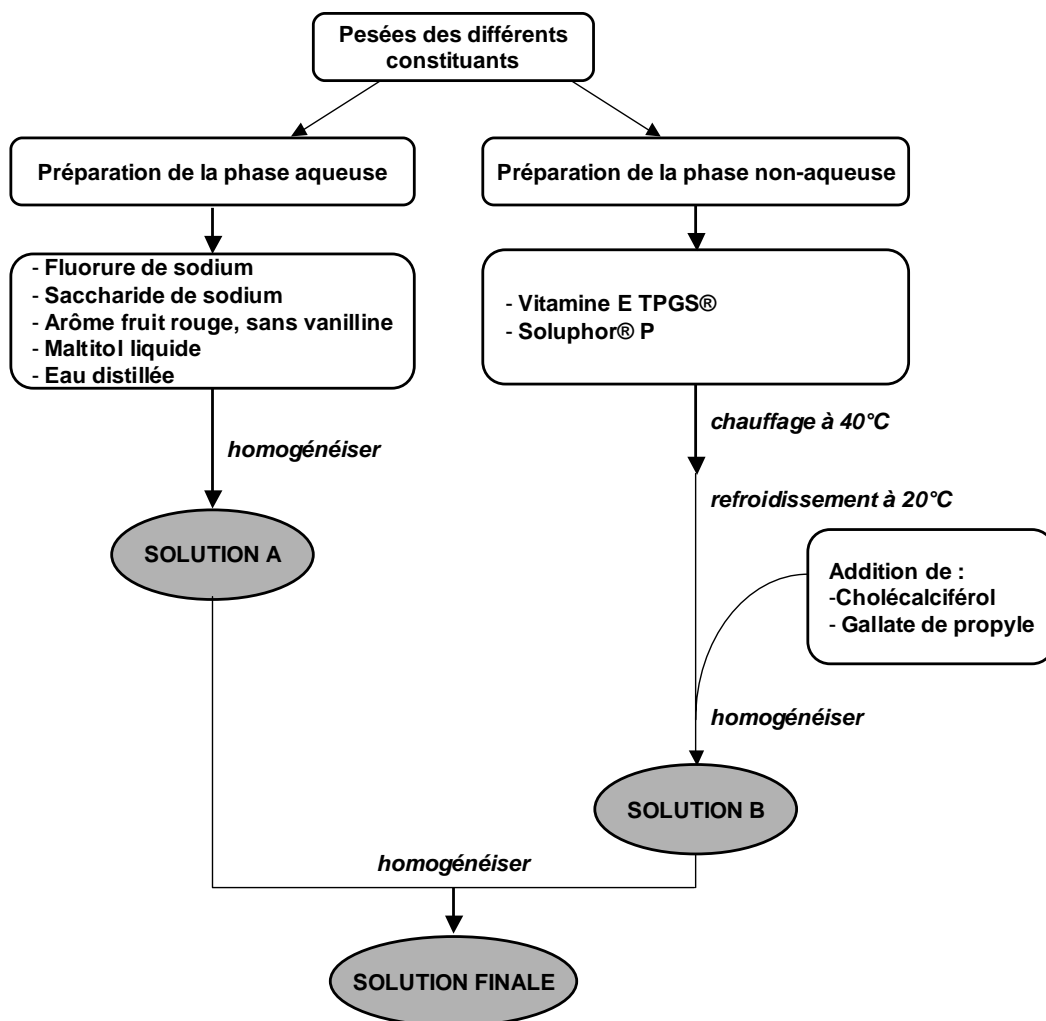


Figure 3-2 : Schéma de la formulation de la solution buvable contenant le cholécalférol et le fluorure de sodium.

6. Préparation des échantillons pour l'étude de stabilité

6.1. Préparation des solutions

Les 4 différentes formulations ont été préparées en quantité de 100 ml chacune (tableau 3-5). Chaque formulation a été répartie dans 3 flacons utilisés à l'heure actuelle pour le conditionnement des solutions liquides à usage pédiatrique (la caractérisation de sa composition est reprise ci-dessous). Le flacon 1 a été utilisé pour les essais à 20°C, le flacon 2 a été utilisé pour les essais à 30°C et le flacon 3 a été utilisé pour les essais à 40°C.

Les résultats de stabilité (dosage de la vitamine D₃ et du fluorure de sodium) ont été obtenus après 0, 7, 14, 21 et 27 jours.

Tableau 3-5 : Composition des quatre formulations préparées pour l'étude de stabilité.

COMPOSANT	FORMULE 1	FORMULE 2	FORMULE 3	FORMULE 4
Vitamine D3	0,008 g	0,008 g	0,008 g	0,008 g
Fluorure de sodium	0,220 g	0,220 g	0,220 g	0,220 g
Gallate de propyle	0,010 g	0,010 g	0,020 g	0,020 g
Vitamine ETPGS	1,500 g	3,000 g	1,500 g	3,000 g
Saccharine sodique	0,500 g	0,500 g	0,500 g	0,500 g
Arôme fruits rouges 0% vanilline	0,400 g	0,400 g	0,400 g	0,400 g
Solphor® P	40,000 g	40,000 g	40,000 g	40,000 g
Maltitol liquide	40,000 g	40,000 g	40,000 g	40,000 g
Eau purifiée	QSP 100,0 ml	QSP 100,0 ml	QSP 100,0 ml	QSP 100,0 ml

Les flacons utilisés sont de couleur blanche opaque. Ils sont en polyéthylène basse densité (PEBD) : LUPOLEN 1840 H blanc (dioxyde de titane sans autre additif).

Les bouchons sont constitués de 3 parties :

- Coque: polyéthylène de haute densité 7055 SANIC + blanc 71491 PBA - CI BA 000231

- Bague: LACQTENE 1070 MG 24 ATOFINA (LDPE) + blanc 71478 PG - CIBA 000227
- Obturateur: LACQTENE 1070 MG 24 ATOFINA (LDPE)

Dans les bouchons, seuls les obturateurs seront en contact avec la solution médicamenteuse.

6.2. Description de la méthode de dosage

6.2. A. Dosage du cholécalciférol

◆ Conditions chromatographiques

Le dosage du cholécalciférol a été effectué par chromatographie liquide à l'aide des conditions expérimentales suivantes :

- Colonne :
 - *dimensions* : $l = 0,125$ m ; $\Phi = 4,0$ mm,
 - *phase stationnaire* : gel de silice octylsilylé pour chromatographie R (5 μ m), à particules sphériques, d'un diamètre de pores de 10 nm,
 - *température* : 20 ± 2 °C.

Une colonne de type Macherey-Nagel, CC125/4 Lichrospher 100-5 RP-8 a été utilisée.

- Phase mobile :
 - *Phase mobile* : 250 volumes d'une solution aqueuse d'acide phosphorique R à 0,11% (v/v) sont mélangés avec 750 volumes d'acétonitrile R.
 - *Débit* : 2,0 ml/min
 - *Détection* : spectrophotomètre à 268 nm
 - *Injection* : 20 μ l

Conformité du système : solution témoin et solution du produit fini reconstitué.

- Temps de rétention est d'environ 11 minutes.
- Facteur de symétrie : 0,8 à 1,5

Dans ces conditions, le cholécalférol a un temps de rétention de 11,3 minutes.

La teneur (mg/100 ml de la solution buvable) en cholécalférol dans la formulation est calculée à l'aide de l'expression suivante :

$$T = \frac{S_2 m_1 d}{S_1 m_2} \times 1,25$$

S_1 = surface du pic du cholécalférol de la solution témoin,

S_2 = surface du pic du cholécalférol de la solution à examiner,

m_1 = prise d'essai en mg de la solution témoin,

m_2 = prise d'essai en g de la solution à examiner,

d = densité du produit fini

◆ Préparation des solutions

Solution à examiner : Prélever 5 ml de solution buvable, notez la masse exacte en g, et compléter à 25,0 ml avec un mélange *méthanol R/ eau R* (50/50, v/v).

Solution témoin : Dissoudre environ exactement 32,0 mg de cholécalférol dans 100,0 ml de *méthanol R*. Prélevez 5,0 ml de cette solution et compléter à 100,0 ml avec du *méthanol R*.

6.2. B. Dosage du fluorure de sodium

◆ Conditions expérimentales :

Le dosage du fluorure de sodium est effectué par détermination potentiométrique de la concentration en ion fluorure à l'aide d'électrodes à membrane sélective. Les conditions expérimentales ont été les suivantes :

- Appareil : CyberScan ion 510, Bioblock, qui permet de donner directement la lecture de la mesure ionique en ppm.

- Électrode spécifique pour fluorures, Bioblock, réf : N41936
- Électrode de référence, Bioblock, réf : N41948
- Température 20°C ± 0,5.

Le potentiomètre est étalonné à l'aide de trois solutions de fluorure de sodium qui ont les concentrations suivantes: 1,0 ; 10,0 et 100,0 ppm. Ces solutions sont préparées à partir de la solution ISE (Etalon ISE fluorures, 1000,0 ppm, Bioblock, réf. 30840), et du réactif tampon (solution ISAB, Bioblock, réf N30859). Chaque solution finale doit contenir 4 % de la solution ISAB (v/v).

Les concentrations en fluorure sont mesurées en ppm dans la solution témoin et dans la solution à examiner.

La teneur (mg/100 ml de la solution buvable) en fluorure de sodium est calculée à l'aide de l'expression suivante :

$$T = \frac{L_2}{L_1} \times \frac{m_1}{m_2} \times d$$

L_1 = lecture en ppm de la solution témoin,

L_2 = lecture en ppm de la solution à examiner,

m_1 = prise d'essai en mg de la solution témoin,

m_2 = prise d'essai en g de la solution à examiner,

d = densité du produit fini

◆ Préparation des solutions

Solution à examiner : Dans une fiole jaugée de 50,0 ml, 1 ml de la solution buvable est pesé et la valeur exacte est notée en grammes (m_2). Deux ml du réactif tampon (solution ISAB) sont ajoutés et le volume final est complété avec de l'eau R.

Solution témoin : Exactement 220,0 mg (m_1) de fluorure de sodium sont pesées dans 100,0 ml d'eau R. Un ml de cette solution est introduit dans une fiole jaugée de 50,0 ml. Enfin 2 ml de la solution ISAB sont ajoutés et le volume est complété avec de l'eau R.

7. Résultats d'études de stabilités de 4 nouvelles formules de la solution buvable

Les résultats de l'étude préliminaire de stabilité du cholécalciférol dans les quatre nouvelles formulations proposées sont repris ci-dessous. Ces essais de stabilité ont été réalisés pendant 27 jours à température ambiante, 30°C et 40 °C. Les résultats sont représentés dans les figures ci-après.

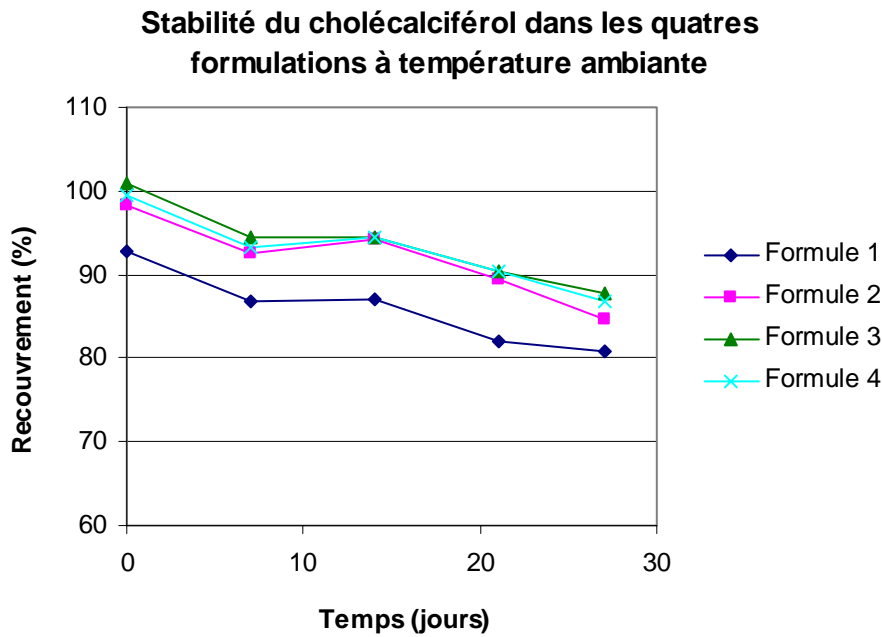


Figure 3-3 : Résultats de l'étude de stabilité de la vitamine D₃ dans les quatre formules proposées à la température ambiante.

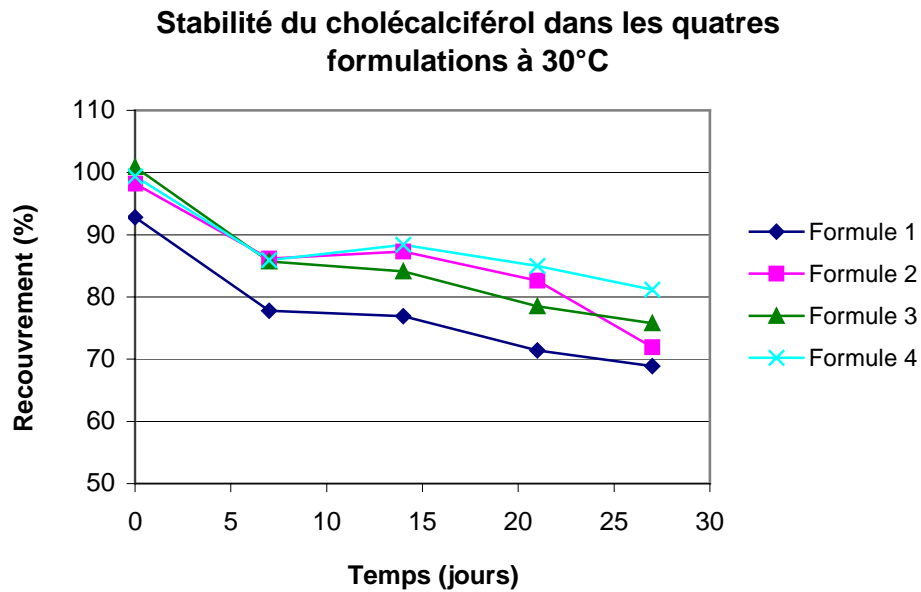


Figure 3-4 : Résultats de l'étude de stabilité de la vitamine D₃ dans les quatre formules proposées à la température 30 °C.

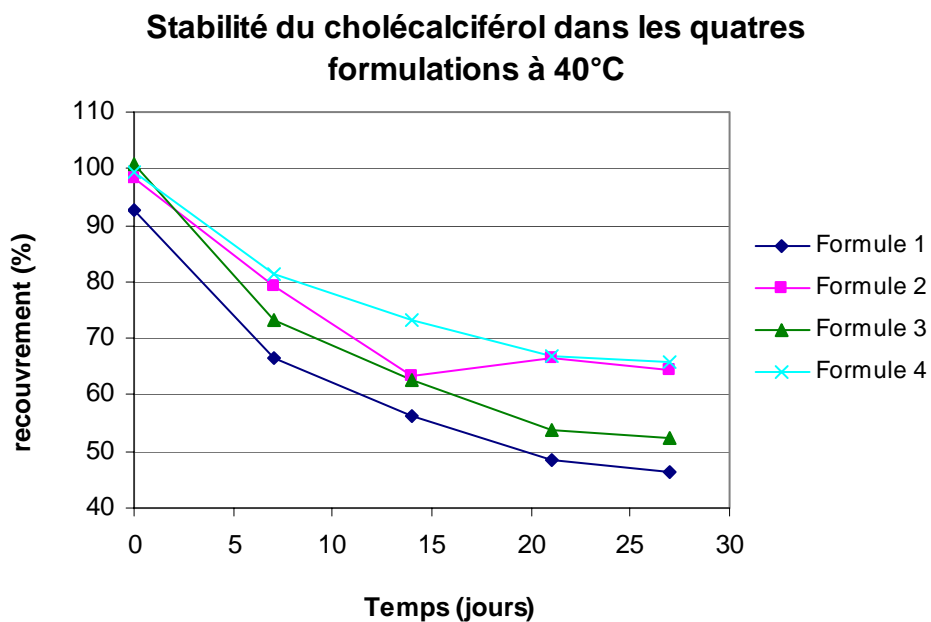


Figure 3-5 : Résultats de l'étude de stabilité de la vitamine D₃ dans les quatre formules proposées à la température 40 °C.

Nous avons constaté que dans les conditions de formulations décrites ci-dessus, le cholécalciférol n'est pas stable même à la température ambiante. Il ne reste que 80-86 % après 27 jours de conservation à température ambiante selon la formulation envisagée. Il fut observé également que cette teneur était d'autant plus faible que la température est élevée. Elle est de 67%-81% à 30 °C et de 46-66% à 40 °C selon la formule. Par conséquent la stabilité de ces formulations dépend de la température.

Les résultats d'études de stabilité pour le fluorure de sodium pour les quatre formulations de la solution buvable à toutes les températures ont été très semblables toujours restant sans changement, autour de 100 % sans aucune dégradation.

Les dosages du fluorure de sodium dans les quatre formulations testées aux différentes températures de mise en stabilité ont conduit à la conclusion d'aucune dégradation.

8. Choix de la formule finale

Les résultats des études de stabilité effectuées nous ont conduit à choisir la formule 3 comme notre formulation finale. La composition de la formule finale de la solution buvable comportant la vitamine D₃ et le fluorure de sodium est présenté dans le tableau 3-6 ci-dessous.

Tableau 3-6 : Composition de la formule finale.

Composant	Fonction	Quantité pour 100,0 ml
Cholécalciférol	Principe actif	0,008 g
Fluorure de sodium	Principe actif	0,220 g
Gallate de propyle	Antioxydant	0,022 g
Vitamine E TPGS	Solubilisant	1,500 g
Saccharine sodique	Edulcorant	0,500 g
Arôme fruits rouges 0% vanilline	Aromatisant	0,400 g
2-pyrrolidone (Soluphor® P)	Solubilisant	40,000 g
Maltitol liquide (Lycasin®)	Edulcorant	40,000 g
Eau purifiée	Solvant	QSP 100,0 ml

9. Résultats des études de stabilités de la formulation finale choisie pour la solution buvable

La formulation finale choisie a été soumise à des tests de stabilité d'une durée de 4 mois.

Les résultats de l'étude de stabilité du cholécalciférol dans la formulation proposée sont représentés à la figure 3-7 ci-dessous.

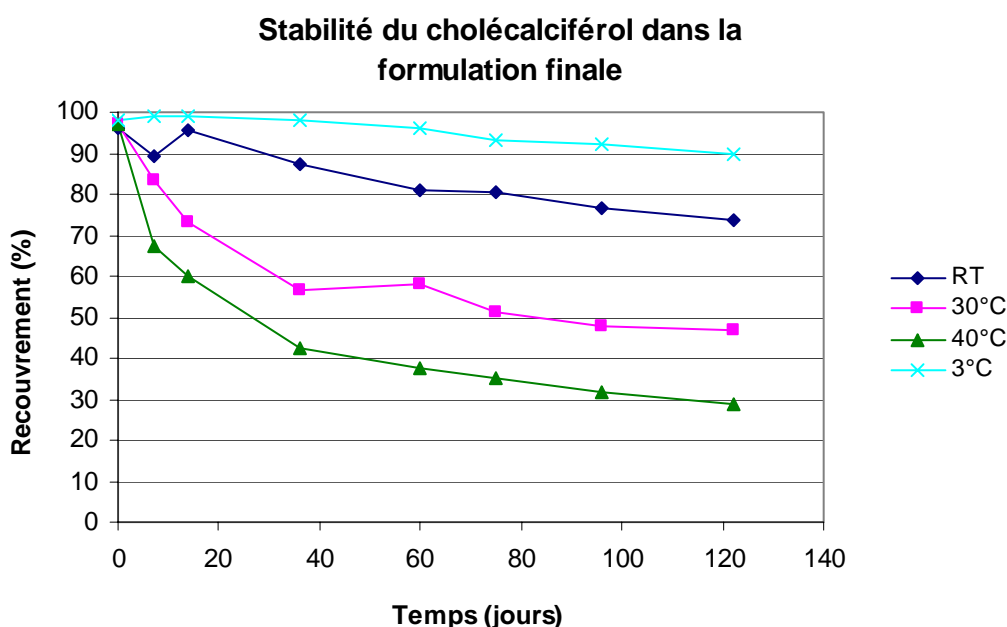


Figure 3-7 : Résultats de l'étude de stabilité de la vitamine D₃ dans la formule finale aux différentes températures.

Nous pouvons constater que le cholécalciférol n'est pas stable même à température ambiante. Il ne reste que 73,8% après 4 mois de conservation à la température ambiante (voir figure 3-7). Cette teneur est d'autant plus faible que la température est élevée. Elle est de 47% à 30 °C et de 28,8% à 40 °C. A 3 °C, le cholécalciférol est très stable. Après 80 jours de conservation, la teneur trouvée est de 93%.

Les résultats des études de stabilité pour le fluorure de sodium à toutes les températures ont été très semblables et restent sans changement autour de 100 %, ainsi aucune dégradation n'est observée quelle que soit la température.

10. Problèmes rencontrés et perspectives

Lors d'études antérieures, il a été observé que la formulation finale de solution buvable donnait lieu avec le temps au développement d'une coloration brunâtre, résultant très probablement d'interactions entre des excipients. Dans un premiers temps nous nous sommes attachés à identifier l'interaction entre excipients responsables de ce changement de couleur. Ensuite des solutions à ce problème ont été recherchées.

10.1. Interaction entre l'agent antioxydant (gallate de propyle) et le solvant (Soluphor® P)

L'interaction entre les excipients avait été observée visuellement (changement de couleur de la solution). Les fioles contenant la solution de la nouvelle formulation buvable, changeaient de couleur de la façon suivante :

- $t=0$: transparent
- $t=2$ jours : couleur rose claire
- $t=7$ jours : couleur violet foncé
- $t=14$ jours : couleur brun clair (figure 3-6)















Figure 3-6 : Nouvelle formulation après 14 jours.

Des interactions entre le gallate de propyle et le Soluphor[®] P ou la vitamine E[®] TPGS étaient soupçonnées. Quatre solutions binaires aqueuses de ces excipients ont donc été préparées et conservées pendant 14 jours, pour conduire aux observations rassemblées dans le tableau 3-7.

Il est apparu que seules les solutions dans les fioles 3 et 4 développaient des colorations avec le temps. Par conséquent, ce sont très probablement les interactions entre le gallate de propyle et le Soluphor[®] P qui sont responsables des changements de couleurs de la nouvelle formulation mis au point dans le paragraphe précédent.

Tableau 3-7: Colorations avec le temps de solutions aqueuses de gallate de propyle, Soluphor[®] P et vitamine E[®] TPGS.

		Fiole 1	Fiole 2	Fiole 3	Fiole 4
Composition pour un volume total de 20mL, complété avec de l'eau purifiée.	Gallate de propyle	0,022 g	0,220	0,022 g	0,220 g
	Vitamine E [®] TPGS	1,500 g	1,500 g	-	-
	Soluphor [®] P	-	-	40 g	40 g
t = 0		Transparent	Transparent	Transparent	Transparent
t = 1 jour		 Transparent	 Transparent	 Rose claire	 Rose pale
t = 7 jours		 Transparent	 Transparent	 Rose intense	 Rose léger
t = 14 jours		 Jaune très clair	 Transparent	 Orange foncé	 Brun clair

10.2. Résolution du problème existant

Nous avons proposé les solutions suivantes :

- 1) Augmenter la quantité d'agent antioxydant (gallate de propyle)
- 2) Remplacer le gallate de propyle par de l'acide sorbique

10.2. A. Augmentation de la quantité de gallate de propyle d'un facteur 10

La formulation proposée dans la partie précédente de ce chapitre reste la même hormis l'augmentation de la quantité de gallate de propyle. La composition de la formule modifiée est présentée dans le tableau 3-8 ci-dessous.

Tableau 3-8 : Composition de la formule après la modification de la quantité du gallate de propyle.

Composant	Fonction	Quantité pour 100,0 ml
Cholécalciférol	Principe actif	0,008 g
Fluorure de sodium	Principe actif	0,220 g
Gallate de propyle	Antioxydant	0,220 g (au lieu de 0,022 g)
Vitamine E TPGS	Solubilisant	1,500 g
Saccharine sodique	Edulcorant	0,500 g
Arôme fruits rouges 0% vanilline	Aromatisant	0,400 g
2-pyrrolidone (Soluphor® P)	Solubilisant	40,000 g
Maltitol liquide (Lycasin®)	Edulcorant	40,000 g
Eau purifiée	Solvant	QSP 100,0 ml

Le procédé de fabrication de la formulation reprise ci-dessus a été identique à celui mis en œuvre pour préparer la solution buvable finale précédente.

La stabilité du cholécalciférol a été vérifiée à la température de 25°C. Les résultats sont exposés dans le tableau 3-9.

Tableau 3-9 : Résultats d'étude de stabilité de la vitamine D3 dans la formule modifiée (quantité du gallate de propyle) à 25 °C.

Temps (jours)	Recouvrement de cholécalciférol par rapport à la valeur théorique (%)
0	87,3
14	73,8
28	70

10.2.B. Remplacement du gallate de propyle par de l'acide sorbique

Pour savoir si l'acide sorbique n'interagit pas avec le Soluphor[®] P, la solution suivante a été préparée : acide sorbique (0,177 g), Soluphor[®] P, eau (volume total de 20 mL).

La solution aqueuse obtenue ne se colore pratiquement pas, après 2 mois une légère couleur jaune est apparue (Figure 3-7).

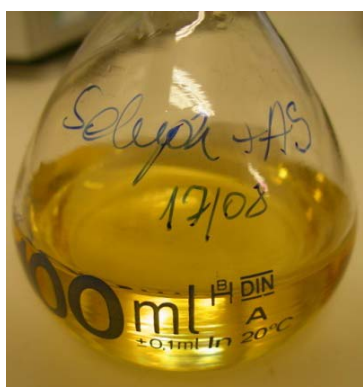


Figure 3-7 : Solution aqueuse d'acide sorbique et de Soluphor[®] P après 2 mois.

Ainsi, une nouvelle formulation a été fabriquée à partir de la composition de la formulation précédente, en substituant au gallate de propyle l'acide sorbique (tableau 3-10).

Tableau 3-10 : Composition de la formule après la modification de la quantité du gallate de propyle.

Composant	Fonction	Quantité pour 100,0 ml
Cholécalciférol	Principe actif	0,008 g
Fluorure de sodium	Principe actif	0,220 g
Acide sorbique	Antioxydant	0,177 g
Vitamine E TPGS	Solubilisant	1,500 g
Saccharine sodique	Edulcorant	0,500 g
Arôme fruits rouges 0% vanilline	Aromatisant	0,400 g
2-pyrrolidone (Soluphor® P)	Solubilisant	40,000 g
Maltitol liquide (Lycasin®)	Edulcorant	40,000 g
Eau purifiée	Solvant	QSP 100,0 ml

La nouvelle solution buvable contenant l'acide sorbique ne se colore pas après 2 mois (figure 3-8) :

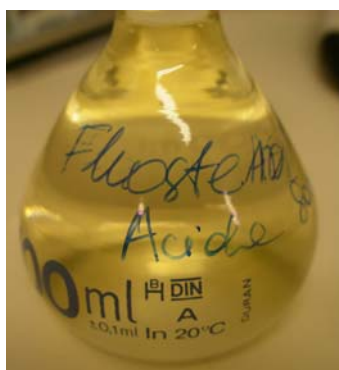


Figure 3-8 : Solution buvable contenant de l'acide sorbique après 2 mois.

Enfin, la stabilité de la vitamine D₃ a été étudiée à la température de 25 °C dans cette nouvelle formulation. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 3-11 ci-après.

Tableau 3-11 : Résultats d'étude de stabilité de la vitamine D₃ dans la formule modifiée (présence de l'acide sorbique) à 25 °C. :

Temps (jours)	Recouvrement de cholécalciférol par rapport à la valeur théorique (%)
0	88,3
14	83,8
28	80

10.3. Perspectives

Pour vérifier la conformité de ces formulations, il est nécessaire d'effectuer les tests de stabilité à différentes températures (2-8 ; 25 ; 30 et 40 °C) de la vitamine D₃ ainsi que ceux du gallate de propyle et ceux de l'acide sorbique, pour les deux nouvelles formules de la solution buvable comportant :

- 1) dix fois plus de gallate de propyle
- 2) l'acide sorbique

Cela permettra de trouver la composition idéale de la solution finale choisie.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Grâce aux différents essais de formulations effectués dans ce chapitre, nous avons pu obtenir une solution buvable pédiatrique comportant de la vitamine D₃ et du fluorure de sodium. Le choix de l'agent solubilisant a été une étape cruciale. Les études microbiologiques nous ont montré que le meilleur solvant à utiliser était le Soluphor[®] P qui est administré par voie parentérale jusqu'à présent. Les études précédentes menées dans le premier chapitre de cette thèse nous ont prouvé que ce solvant a un pouvoir antimicrobien efficace et suffisant pour éviter l'utilisation d'agents conservateurs de la famille de parabènes qui sont déconseillés pour l'application pédiatrique. Le choix de la composition finale est basé sur des études de stabilité (27 jours) de quatre formulations proposées. Enfin, la formulation finale a été soumise à une étude de stabilité plus poussée, d'une durée de 4 mois afin d'observer un risque éventuel de dégradation de la vitamine D₃. Les résultats ont été satisfaisants et la formulation est d'ors et déjà appliquée industriellement. Cette solution finale à l'application pédiatrique pourrait être appliquée à l'aide du dispositif proposé dans le chapitre suivant de cette thèse (IV).

Chapitre 4

Définition et mise au point d'un nouveau système d'administration de médicaments liquides destinés à la voie orale chez les nourrissons

INTRODUCTION

Longtemps, en ce qui concerne les médicaments, l'enfant a été considéré comme un « petit adulte ». Cette vision des choses est complètement erronée sur de nombreux aspects (physiologiques, essais cliniques, raisons économiques et réglementaires).

Physiologiquement, les enfants au-dessous de 6 ans ne peuvent avaler des comprimés ou des gélules. Il faut donc privilégier les formes liquides ou les solides de très petite taille.

Avant d'obtenir une autorisation de mise sur le marché, les médicaments pédiatriques formulés doivent être soumis à des essais supplémentaires (clinique, compliance.). Il est de plus difficile de vérifier l'effet sur l'organisme des enfants sans leur participation, ce qui soulève des problèmes éthiques. Ces essais spécifiques entraînent des coûts supplémentaires pour les laboratoires ce qui ne les incite pas à produire ces spécialités pédiatriques.

Cependant, aussi bien aux Etats-Unis qu'en Europe, de nouvelles réglementations et incitations ont été mises en place. La loi américaine (Pediatric Rule) oblige depuis 1998 les laboratoires pour la mise sur le marché des médicaments pédiatriques, à donner des indications précises sur les substances actives utilisées en distinguant adultes et enfants. En compensation des recherches et des obligations particulières concernant les médicaments pédiatriques, la FDA (Food and Drug Administration) a mis en place un dispositif de récompense et de soutien administratif.

En Europe, en 2007, le Parlement Européen a créé un comité pédiatrique pour évaluer les besoins spécifiques en médicaments pédiatriques. D'autre part, les missions de l'EMEA ont été étendues, en plus de ses compétences actuelles. En effet, parmi celles-ci, lui a été confiée la constitution d'une base de données d'essais cliniques déjà effectués pour éviter la répétition d'essais inutiles.

Des incitations financières ont également été prévues en contrepartie des efforts de recherche qui seront entrepris par les laboratoires, de même qu'un dispositif de coordination et de développement de l'accès à l'information a été mis en place pour limiter les évaluations au strict nécessaire.

En France, ces nouvelles réglementations seront reprises par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (Afssaps) dont la fonction est déjà de superviser et de surveiller la mise sur le marché des médicaments.

Dans ce cadre l'Afssaps a d'ailleurs relevé à la fin de l'année 2006 plusieurs cas graves de malaises chez des nourrissons dus à la mauvaise administration de médicaments. Lors de la prise de ces produits, un risque de malaise vagal (apnée du nourrisson pouvant entraîner une cyanose) a été mis en évidence chez des nouveau-nés et chez des nourrissons de moins de six mois alors qu'ils ne présentaient aucune pathologie apparente. L'hypothèse d'un mécanisme de type « fausse route » liée à une administration trop rapide du produit semble être la cause la plus probable. Certes, ce risque est très rare mais lorsqu'il se produit, il peut s'avérer mortel. Cet accident a permis à l'Afssaps de réévaluer les données de pharmacovigilance concernant les médicaments concernés (Uvestérol Vitaminé ADEC et Uvestérol D commercialisés par les laboratoires CRINEX) et de rappeler l'importance du respect des protocoles d'administration de ce type de produits. Dans ses recommandations, l'Afssaps insiste sur la nécessité de respecter scrupuleusement les protocoles d'administration des 2 produits Uvestérol. Pour une administration idéale, le nourrisson doit être installé la tête en légère flexion, reposée sur l'avant-bras, dans la position dite « semi-assise ». Le produit doit être administré lentement pour laisser le temps à l'enfant de l'avalier naturellement. Il peut être administré pur ou dilué (eau ou lait mais pas de jus de fruit). En cas de reflux, il ne doit pas être administré pur. Ces précautions (position semi- assise et administration lente) doivent être systématiquement appliquées lors de la prise d'un médicament sous forme liquide chez un nourrisson.

La bonne position d'un nouveau né dans les bras d'une mère lors de l'administration est nécessaire afin de maintenir l'enfant en position « semi-assise » dans le creux de son bras et permet également de mesurer la dose exacte de médicament à administrer en réglant le piston de la seringue. De manière idéale, l'embout de la seringue doit être glissé dans le coin de la bouche du bébé et le piston doit être appuyé lentement pour libérer progressivement la dose de médicament.

Fort de ces recommandations et indications nous avons défini et mis au point, pour les produits liquides qui ont fait l'objet des chapitres II et III de nouveaux types de seringues

permettant une administration plus adéquate.

Après avoir évoqué en introduction les raisons générales de la spécificité du médicament pédiatrique et notamment une synthèse de l'évolution réglementaire le concernant, ce CHAPITRE IV de notre thèse comprendra 2 grandes parties.

Une **première partie bibliographique** concernant l'aspect physiologique du phénomène de déglutition et de « fausse route ».

Une **seconde partie expérimentale** où nous évoquerons, en introduction, les différentes techniques et innovations (seringues, tétines, bouchons inviolables...) existantes. Puis nous proposerons et décrirons plusieurs modèles de seringue permettant, d'une part, de résoudre les risques de « fausse route » évoqués ci-dessus et, d'autre part d'améliorer considérablement le dosage d'un médicament liquide qui reste un problème en pédiatrie.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

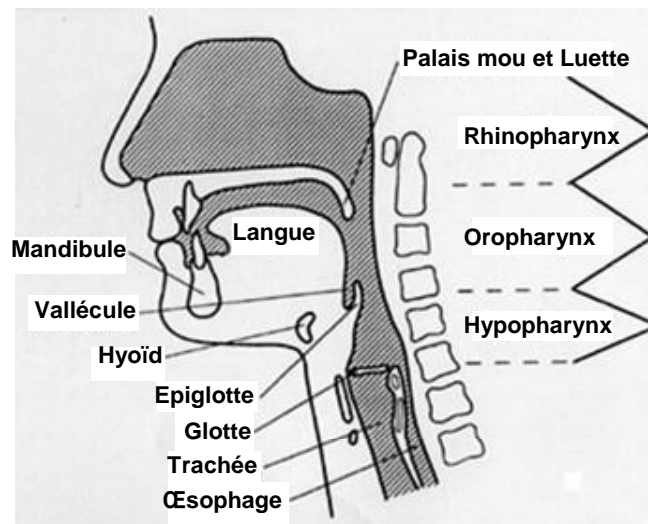
1. Physiologie de la déglutition

1.1. Les temps de la déglutition

La déglutition est l'ensemble des mécanismes permettant le transport des aliments de la cavité buccale vers l'estomac. Ce phénomène moteur et en grande partie réflexe et très rapide. Il est quasiment imperceptible chez le sujet sain.⁴⁹

Les mécanismes de la déglutition sont relativement difficiles à analyser du fait du nombre important de muscles mis en oeuvre dans une période très courte: en environ 1 seconde, 31 muscles sont actionnés de façon coordonnée.^{50, 51, 52, 53, 54, 55, 56}

L'anatomie de la gorge est décrite dans la figure 4-1, il y sera fait référence pour décrire la physiologie de la déglutition ci-dessous.^{57, 58, 59}



*Figure 4-1 : Anatomie de la gorge chez l'adulte.*⁵⁷

La déglutition se déroule en trois temps, que nous décrirons successivement : le temps préparatoire buccal, le temps bucco-pharyngé et le temps oesophagien.

1.1. A. Temps préparatoire buccal

Formation du bol alimentaire :

Ce temps est de durée variable. Il dépend de la consistance et de l'état d'hydratation de l'aliment. Les mouvements praxiques exécutés à ces moments nécessitent un apprentissage dans la petite enfance. Leur réalisation devient peu à peu automatique mais restera toujours soumis à un contrôle volontaire. La mastication et la salivation sollicitent les récepteurs gustatifs et olfactifs : c'est au cours de ce temps que réside essentiellement le plaisir de l'acte de nutrition.⁵⁶

1.1. B. Temps bucco-pharyngé

Propulsion du bol alimentaire de la cavité buccale au sphincter supérieur de l'œsophage :

Le temps buccal : dans cette phase, la langue propulse vers le pharynx le bol alimentaire en trois phases successives, phase linguale antérieure, puis médiane et ensuite postérieure. A ce moment, la bouche se ferme et un arrêt de la respiration accompagne le mouvement de la langue: apnée et déglutition sont deux fonctions qui s'excluent.

Le temps pharyngé : c'est le temps de franchissement du carrefour aérodigestif. Il est essentiel dans le déroulement de la déglutition: l'action des différents muscles doit donc être parfaitement coordonnée.

Quatre phases étroitement imbriquées et interdépendantes se déroulent dans ce **temps pharyngé**:

I) l'occlusion du sphincter vélopharyngé qui a pour but d'isoler l'oropharynx du rhinopharynx et ainsi d'éviter le reflux nasal des aliments. L'azygos de la luette parfait l'étanchéité. Par ailleurs un deuxième mécanisme assure l'occlusion de ce sphincter: c'est le rapprochement des parois pharyngées latérales vers la ligne médiane dû à la contraction des muscles constricteurs supérieurs ; il s'oppose ainsi au reflux des aliments du pharynx vers la cavité buccale.

II) l'occlusion du sphincter laryngé est réalisée, environ 1/100ième de seconde, avant l'ouverture du sphincter supérieur de l'œsophage. La fermeture de trois systèmes de valves s'effectue de bas en haut : le plan cordal est fermé grâce aux muscles adducteurs. Les bandes ventriculaires se ferment par la contraction de fibres supérieures et externes du thyro-

aryténoïdien. Les aryténoïdes basculent en avant, grâce à la contraction des muscles thyro-aryténoïdiens contre l'épiglotte qui se rabat en arrière. Le larynx se raccourcit "en accordéon " avec un effacement des ventricules. *L'épiglotte bascule en arrière sur le plan glottique.* L'élévation du pharyngolarynx, grâce à la contraction des muscles sus-hyoïdiens est également un facteur de protection essentiel des voies aériennes.

III) la propulsion du bol à travers le pharynx qui se fait grâce à 3 actions :

La base de la langue recule entraînant un véritable « coup de piston lingual ».

Le péristaltisme pharyngé, où les constricteurs supérieurs moyens et inférieurs se contractent de façon séquentielle, déplaçant ainsi le bol alimentaire vers le bas. Cette onde péristaltique se propage très rapidement de 12 à 25 cm par seconde environ.

Les muscles constricteurs agissent et créent une aspiration du bol alimentaire par un mécanisme de dépression dans l'hypopharynx, dû au mouvement antérosupérieur du pharyngolarynx. Plusieurs groupes de muscles entrent en action : les muscles sus-hyoïdiens, thyrohyoïdien, sterno-thyroïdien et sterno-cléido-hyoïdien. Le mouvement antérosupérieur du pharyngolarynx provoque ainsi une dépression dans la lumière pharyngée jouant un rôle de pompe aspirante « du bol alimentaire ».

IV) l'ouverture du sphincter supérieur de l'œsophage (SSO)

Le SSO correspond à la zone de jonction pharyngo-œsophagienne. En dehors de la déglutition, il reste fermé afin d'éviter l'entrée de l'air dans l'œsophage pendant l'inspiration ; il s'oppose également au reflux œsogastrique. Pendant la phase pharyngée, son ouverture se fait en 2 temps :

1- l'inhibition du tonus vagal (durée environ 500 ms) s'exerce sur le muscle cricopharyngien ce qui entraîne la relaxation du sphincter. Elle est contemporaine du début de l'élévation laryngée et de l'onde péristaltique pharyngée. La relaxation du sphincter précède son ouverture d'environ 150 ms.

2- l'ouverture proprement dite se fait par la contraction des muscles sus-hyoïdiens relayés par le thyro-hyoïdien. Ces muscles élèvent le cartilage cricoïde vers le haut et vers l'avant le dégageant du plan vertébral. L'élévation du larynx participe donc à l'ouverture de la bouche œsophagienne. La durée d'ouverture du sphincter est très brève, d'environ 0,5 seconde.

La fin du temps pharyngé est marquée par la descente du pharyngolarynx, la réouverture

du sphincter laryngé et le redressement de l'épiglotte. Ce mouvement de l'épiglotte protège de l'inhalation d'éventuels résidus alimentaires dans les vallécules.^{60, 61, 62, 63, 64, 65}

L'ensemble de la phase bucco-pharyngée dure environ 1 seconde.

1.1. C. Temps oesophagien

Transport du bol alimentaire au sphincter inférieur de l'œsophage :

Il assure le transfert des aliments du SSO jusqu'au cardia grâce à une onde péristaltique qui parcourt l'œsophage de haut en bas (péristaltisme primaire). La musculature œsophagienne est répartie en deux couches, longitudinales externes et circulaires internes. Elle est constituée, dans les premiers centimètres de l'œsophage, par des fibres striées qui peu à peu sont remplacées complètement par des fibres lisses au niveau de la moitié inférieure de l'œsophage.^{59, 62}

L'onde péristaltique fait intervenir les deux couches musculaires. La contraction des fibres longitudinales attire la portion distale d'un segment œsophagien à la rencontre du bol alimentaire. Les fibres circulaires se relâchent en aval du bol et se contractent en amont. Le péristaltisme œsophagien est plus lent que le péristaltisme pharyngé: la vitesse de l'onde œsophagienne est de 3 cm/s dans l'œsophage proximal et jusqu'à 5 cm/s dans le tiers inférieur. Le péristaltisme œsophagien peut être déclenché indépendamment du péristaltisme pharyngé: la distension des parois œsophagiennes provoque un péristaltisme dit secondaire, en dehors de la déglutition.⁶⁶

Contrairement au temps pharyngé, la pesanteur joue un rôle dans le transfert du bol alimentaire dans l'œsophage. Les liquides peuvent atteindre le cardia plusieurs secondes avant l'onde péristaltique. Les contractions œsophagiennes sont plus amples chez le sujet couché que chez le sujet debout. Outre la pesanteur, un deuxième facteur concourt à la propulsion des aliments dans l'œsophage thoracique. Lors de l'inspiration, il se crée une dépression intraluminale qui attire le bol alimentaire vers le bas.^{60, 62, 63, 64}

La durée du temps œsophagien est bien supérieure aux deux précédentes: 2 secondes pour les liquides, 7 à 9 secondes pour les solides.

1.2. La déglutition chez le nourrisson

L'anatomie de la gorge du nourrisson diffère sensiblement de celle de l'adulte (Figure 4-2).

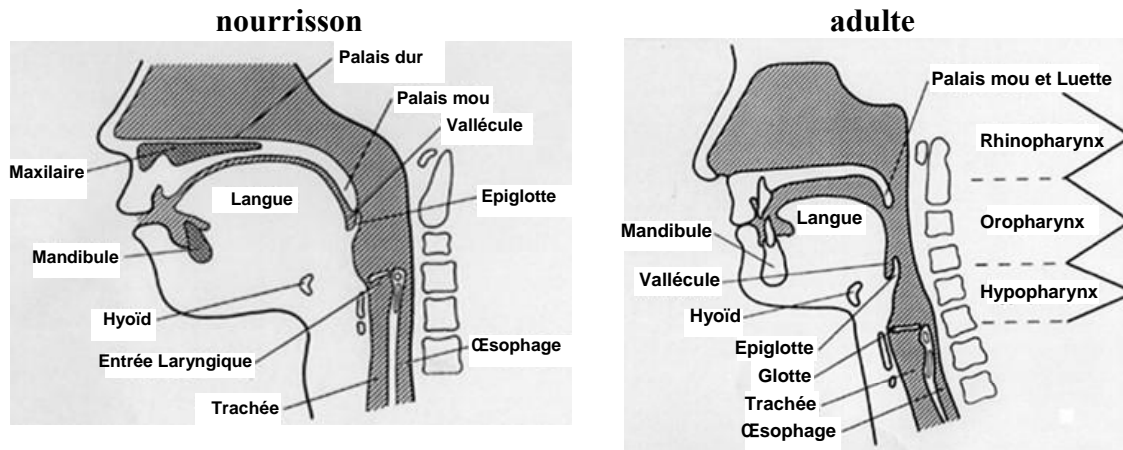


Figure 4-2 : Anatomie comparée de la gorge du nourrisson et de l'adulte.57 58

1.2. A. Les principales différences anatomiques

Ces différences se situent au niveau de la bouche, du pharynx et du larynx (Figure 4-2).

Au niveau de la cavité buccale, la langue, plus volumineuse occupe pratiquement toute la cavité et au niveau de la voûte palatine, plus concave, le voile est en contact avec l'épiglotte. Au niveau du pharynx, celui-ci est plus court mais avec un angle des parois postérieures plus ouvert. Pour le larynx enfin il est important de noter que le plan glottique et l'os hyoïde sont en position plus haute et plus antérieure, la membrane thyro-hyoïdienne est plus courte, l'épiglotte est plus tubulaire, les aryténoïdes sont plus volumineux et les cartilages cunéiformes sont plus saillants. Le chaton cricoïdien est également plus épais assurant ainsi, une meilleure protection des voies respiratoires.^{62, 67}

1.2. B. Les différents moments de déglutitions

Tout d'abord, le temps buccal et le temps pharyngé sont plus intriqués chez le nourrisson que chez l'adulte. Son comportement nutritionnel de "suction-déglutition" est un acte réflexe dont le centre de commande est bulbaire et présent dès la dixième semaine de vie in utero.

Le temps buccal du nourrisson est caractérisé par la création d'un vide intrabuccal (la succion) obtenu par la mise en œuvre de plusieurs mécanismes: contraction forte de l'orbiculaire des lèvres et des muscles de la houppe du menton créant l'étanchéité au niveau des lèvres ; fermeture de l'isthme buccopharyngé par le resserrement du voile sur le dos de la langue qui alterne des mouvements de protraction et de rétropulsion. Le vide ainsi créé aspire le liquide canalisé par la langue qui s'est creusée en forme de gouttière. Le liquide accumulé par plusieurs mouvements de succion remplit un "réservoir" postérieur formé par le voile apposé sur la langue ou sur l'épiglotte.⁶⁸

Comme l'adulte pendant la phase préparatoire buccale, le nourrisson peut continuer à respirer pendant les mouvements de succion.

Le temps pharyngé du nourrisson succède en moyenne à deux ou trois mouvements de succion. Il est déclenché par la stimulation des zones réflexes par le bol lacté. Le temps pharyngé est pratiquement le même que chez l'adulte. Cependant, la déglutition, contrairement à l'adulte, se déroule avec les arcades séparées (interposition linguale) et l'os hyoïde ainsi que le larynx n'ont pas besoin d'être stabilisés par la contraction des muscles masticateurs. D'autre part, l'orbiculaire des lèvres reste fortement contracté pendant le temps pharyngé. Enfin, l'onde péristaltique pharyngée est plus marquée.^{67, 68}

Le temps œsophagien du nourrisson ne semble pas fondamentalement différent de celui de l'adulte. Cependant, les déglutitions ont un rythme supérieur mais ne déclenchent pas à tout coup une contraction œsophagienne. Après une série de déglutitions pharyngées, la contraction déclenche une onde péristaltique qui vide l'œsophage de son contenu.⁶⁹

1.2. C. De la succion-déglutition à la déglutition de l'adulte

Cette évolution débute vers l'âge de 6 mois et se poursuit jusqu'à l'âge de 36 mois. La maturation du système nerveux central permet de développer le contrôle volontaire de la phase buccale. Parallèlement, des modifications anatomiques se produisent: l'éruption des dents, l'agrandissement de la taille de la cavité buccale et du pharynx permettent de diversifier les aliments. La déglutition se "posteriorise" avec une absence de contraction des muscles péri-buccaux et la participation plus importante des muscles rétracteurs et élévateurs de la

langue dans la propulsion du bol alimentaire de la cavité buccale vers le pharynx. La contraction des masticateurs permet l'apparition d'une déglutition avec les arcades dentaires au contact l'une de l'autre.^{70, 71}

2. Le phénomène de « fausse route »

Le croisement des voies aériennes et digestives au niveau de l'hypopharynx impose une coordination étroite des mécanismes de fermeture des voies aériennes et de propulsion du bol alimentaire vers l'œsophage. Le défaut de ce mécanisme entraîne un phénomène de « fausse route » c'est-à-dire la pénétration de particules alimentaires, liquides ou solides, dans la trachée se traduisant généralement par des épisodes de toux durant la prise alimentaire.⁷²

Ce chapitre de la thèse est consacré à l'administration de médicaments pédiatriques liquides. Nous ne traiterons donc ici que des applications à des patients non atteints de pathologies particulières de la déglutition. En effet, ces cas de pathologie liés à une maladie, à des troubles post-opératoires ou à des causes neurologiques relèvent de traitements plus particuliers supposant des techniques d'administration spécifiques. Pour ce qui nous concerne, à savoir, les cas de « fausses routes » se produisant occasionnellement chez des sujets sans pathologie de la déglutition, l'incident provient généralement d'erreurs l'administration du médicament : mauvaise pratique ou matériel mal adapté.

2.1. Mauvaise pratique

Nous avons souligné en introduction l'importance que l'AFSSAPS accordait à la position de l'enfant dans les bras de la personne administrant le produit. Ainsi le nourrisson doit être installé la tête en légère flexion, reposant sur l'avant-bras, dans la position dite « semi-assise ». De façon plus générale, une déglutition normale doit se faire « tête droite ». Dans cette position, les muscles sous le larynx (muscles sous-hyoïdiens) ne sont pas tendus, et permettent, par leur étirement passif, le déplacement du larynx vers le haut et vers l'avant. La zone du sphincter supérieur de l'œsophage (SSO) se trouve donc dégagée et laisse passer le

bol vers l'œsophage.⁷³

Ces principes généraux de positionnement du patient sont nécessaires pour éviter les désagréments de « fausse route » mais ne sont pas toujours suffisants. Il faut également se préoccuper de la nature du produit ingéré et de son procédé d'administration.

2.2. Matériel mal adapté

S'agissant donc de liquide, il faut préciser certains points qui influent directement sur les réflexes de déglutition et qui peuvent éventuellement les contrarier et entraîner des « fausses routes ».

La vitesse d'écoulement des liquides est plus élevée que celle des autres formes de médicaments et nécessite normalement un déclenchement plus rapide des réflexes de déglutition. Certains liquides, en particulier ceux contenant des agents mouillants (alcool notamment) s'écoulent extrêmement rapidement, ils tapissent la muqueuse et s'infiltrant dans le moindre interstice. Ils entraînent des risques de fausses routes même sans erreurs flagrantes d'administration.

Le volume ingéré influe également considérablement sur les réflexes pharyngés : en effet l'apnée correspondant au temps buccopharyngé varie significativement quand le bol alimentaire se situe par exemple entre 20 et 100 ml.

Enfin la température peut aussi agir sur les réflexes mais l'administration se faisant le plus souvent à température ambiante, les risques sont minimes.

Ces constats mettent en évidence l'importance qu'il faut apporter aux instruments d'administration pour limiter les risques de « fausse route ».

OBJECTIFS DE L'ETUDE

Dans les chapitres 2 et 3 du manuscrit nous avons présenté des innovations concernant des médicaments pédiatriques sous formes liquides qui supposent une prise orale. C'est donc tout naturellement que nous nous sommes préoccupés de les administrer de la meilleure façon aux jeunes enfants et aux nouveaux nés. Le dispositif idéal doit délivrer une dose précise de façon sûre, en corrélation avec le poids et l'âge de l'enfant. La populaire cuillère à thé ne garantit évidemment pas ce dosage. Plusieurs dispositifs calibrés comme la cuillère médicinale ou les pipettes sont assez précises mais ne délivrent pas parfaitement les liquides visqueux et ont tendance à faire déborder les médicaments.

Les seringues orales calibrées dosent précisément la prise, délivre la quantité complète et ne débordent pas. Si le marquage est bien lisible, elles évitent les erreurs de dosage mais seulement à condition que les parents reçoivent une formation adéquate. Elles sont donc considérées comme le standard pour l'administration de médicaments liquides par voie orale. Dans le domaine des seringues et doseurs de nombreuses innovations sont apparues.

Enfin, de nombreux laboratoires ont développés des applicateurs spécifiques à certains de leurs produits. Il existe par exemples des tétines doseuses,^{74, 75, 76} des bouteilles avec tétines,⁷⁷ ou avec seringues incorporées,⁷⁸ des valves réglant le débit en fonction de la succion du bébé,⁷⁹ des seringues avec embout en forme de cuillère,⁸⁰ ou avec une tétine incorporée.⁸¹

Cependant, pour les médicaments sous forme de microémulsion ou de solutions micellaires que nous proposons dans cette thèse, les seringues orales dosables nous ont semblé être les mieux adaptées. Pourtant, elles nécessitaient quelques aménagements car les seringues d'administrations orales classiques qui sont actuellement commercialisées ne nous ont pas paru suffisamment performantes. C'est pourquoi nous proposons dans notre PARTIE EXPERIMENTALE ci-dessous des prototypes nouveaux de seringues prenant en compte le souci de maîtrise des 2 facteurs agissant sur les reflexes de déglutition à savoir le volume et la pression du liquide dans la bouche du patient. Ces différents prototypes ont récemment fait l'objet d'une demande de brevet.⁸²

PARTIE EXPERIMENTALE

Nous rappellerons tout d'abord, dans un premier temps, comment se présentent les seringues classiques généralement fournies avec les médicaments liquides. Dans les 2 paragraphes suivants nous développerons les modifications proposées pour agir sur la direction du flux et sur le volume du liquide délivré.

1. Seringue « traditionnelle » commercialisée

Les seringues actuellement commercialisées et destinées à l'administration orale des liquides en pédiatrie se présentent généralement selon le schéma repris ci-dessous :

- a) un corps de seringue avec une ouverture unique en bout de cylindre par lequel le liquide propulsé par le piston se déverse dans la bouche du patient
- b) un piston coulissant dans le corps de la seringue qui pousse le liquide vers l'orifice de sortie quand le praticien l'actionne.

Lors de l'actionnement du piston un jet direct de la substance est dirigé vers le fond de la gorge de l'enfant. Si le geste n'est pas fait avec une extrême délicatesse, le flux liquide va entrer directement en contact avec la zone pharyngée évitant (au moins partiellement) le temps de déglutition ordinaire. Ceci présente le risque de déclencher les réflexes de déglutition prématurément et d'entraîner un phénomène de « fausse route ».

2. Modifications de la vitesse de diffusion et de la direction

Le principal changement proposé consiste à éliminer l'ouverture du milieu du cylindre à l'extrémité de la seringue (Figure 4-3) et de placer plusieurs ouvertures sur la bordure de la seringue comme le montrent les dessins ci-dessous (Figure 4-4).

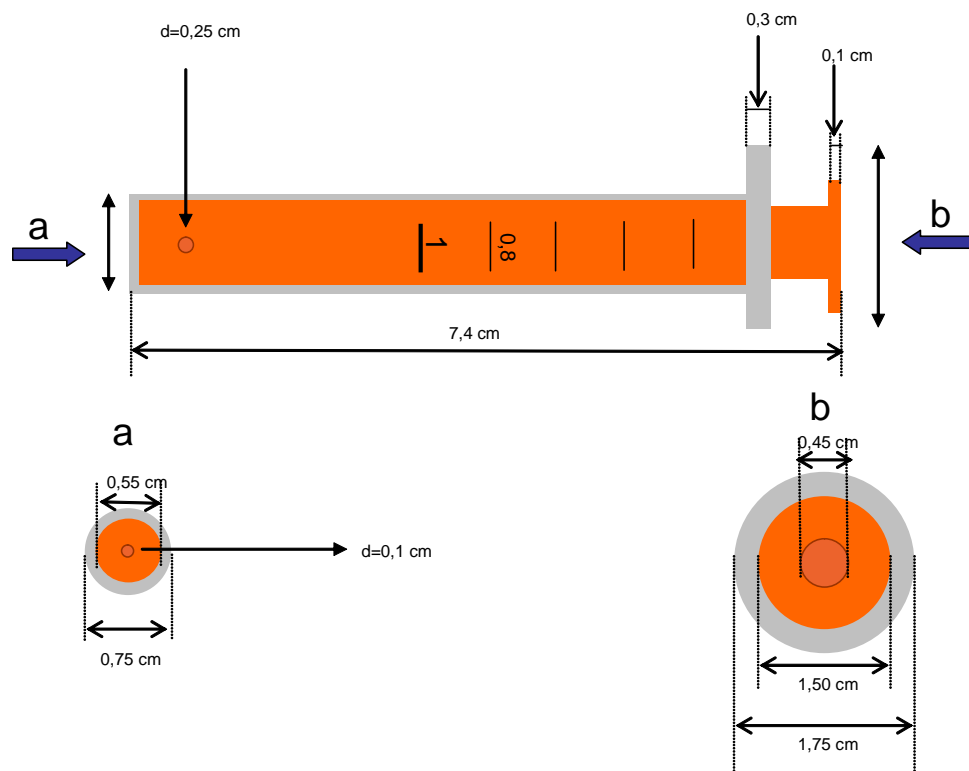


Figure 4-3 : *Seringue pour l'administration orale chez le nourrisson, coupe longitudinale et sections au niveau des deux extrémités.*

La disposition et le nombre d'orifices auront pour effets de projeter le liquide dans la bouche et non vers la gorge et de moduler le débit de l'administration. Ceci permettra au liquide de séjourner dans la bouche avant d'être dégluti, donnant ainsi à l'enfant la possibilité de passer par un « temps buccal » et au nourrisson de produire son mouvement de succion, pour préparer ainsi normalement et sans risque le « temps pharyngé » de la déglutition.

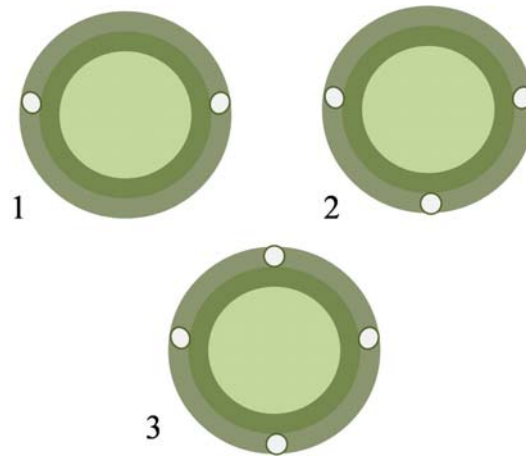


Figure 4-4 : Dispositions des orifices à l'extrémité de la seringue (vues en section de la seringue).

3. Modifications permettant de mieux maîtriser le volume du jet

Nous avons vu ci-dessus l'incidence du volume du bol alimentaire sur les réflexes pharyngés (§1.2. Le phénomène de « fausse route »). La maîtrise de la dose administrée dans la bouche présente également de l'importance (outre, bien sûr, celle, essentielle, du dosage du principe actif).

Pour la maîtriser, nous avons proposé quelques améliorations du piston. Un système de crantage permet d'arrêter le piston quand le volume de médicament à prélever est atteint. Plusieurs possibilités sont envisageables ; nous présentons ci-dessous les schémas de quelques-unes de nos propositions :

1) crantage à une dose avec piston concave :

Dans le modèle de la figure 4-5, le piston a une forme concave et un crantage dans le corps de la seringue permet de contrôler le volume prélevé ou expulsé. A nouveau, la disposition des orifices peut varier selon le débit et l'orientation d'expulsion souhaitée.

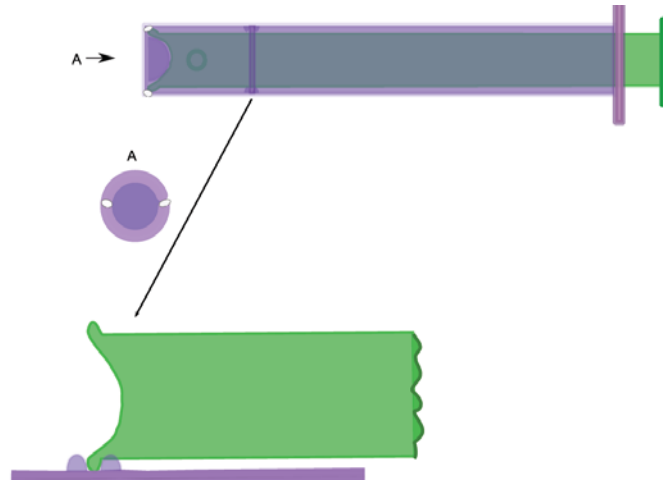


Figure 4-5 : Modèle à piston concave (vue en coupe et section).

2) crantage à doses multiples avec piston plat à double cannelure :

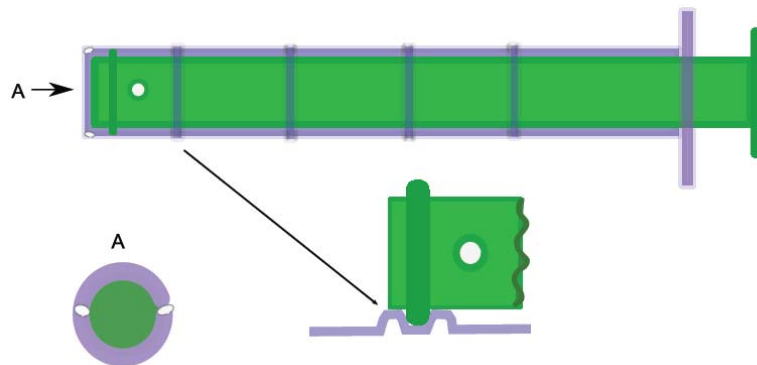


Figure 4-6 : Modèle à piston droit (vue en coupe et section).

Dans ce modèle (Figure 4-6), le piston est droit, ce qui permet plus facilement de l'équiper d'un joint qui se bloque sur un système de double cannelure. Les cannelures sont disposées à plusieurs niveaux sur le corps de la seringue pour permettre l'administration de différentes doses, selon le poids du nourrisson par exemple.

3) crantage à dose multiple à piston convexe et avec un arrêt de sécurité à double cannelure :

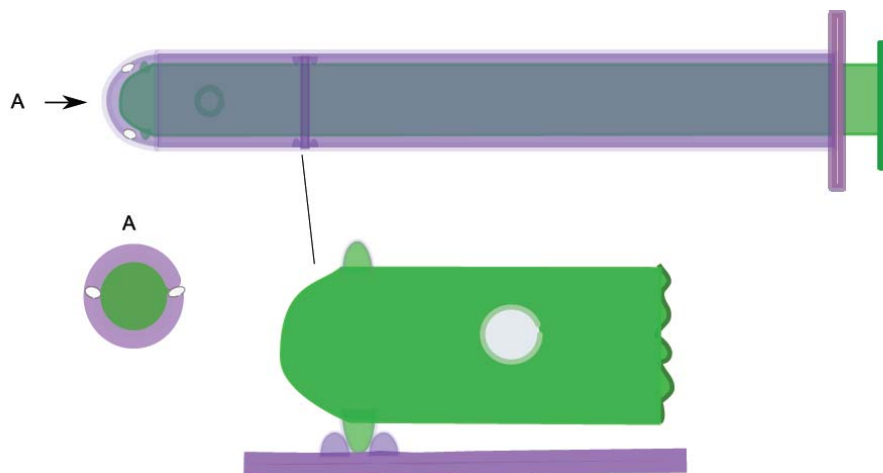


Figure 4-7 : Modèle à piston convexe (vue en coupe et section).

Dans ce dernier modèle (Figure 4-7), le piston a une forme convexe. On retrouve le crantage du premier modèle. La préférence d'un piston concave ou convexe pourra dépendre de la viscosité de la formule. L'avantage du piston convexe est l'expulsion totale du liquide du corps de la seringue.

4. Adaptation du dispositif d'administration à la formulation

Dans les deux paragraphes précédents ont été proposés plusieurs dispositifs qui devraient permettre de mieux contrôler l'administration de formulations liquides chez le nourrisson. Le choix précis de la disposition, du nombre et du diamètre des orifices au bout de la seringue (paragraphe 2) ainsi que le choix de la forme du piston (paragraphe 3.) devraient être le résultat d'une étude pour chaque formulation envisagée.

Le paramètre essentiel sera la viscosité de la formule. Effectivement à la fois le diamètre des orifices et la forme du piston devront être sélectionnés pour permettre l'aspiration optimale du médicament (éviter les bulles d'air est essentiel pour contrôler la dose administrée) et son éjection régulière.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les améliorations proposées concernant la direction du jet du médicament et la précision de son dosage ne sont certes pas des révolutions technologiques. Elles permettent néanmoins une meilleure adéquation de la seringue pour l'administration d'un médicament liquide aux enfants et aux nouveaux-nés et complètent très utilement les recommandations de l'Afssaps. Ces petits progrès techniques devraient ainsi permettre d'éviter certains accidents graves.

Ces améliorations de matériel montrent à quel point il est indispensable de penser le problème de l'administration de médicament, globalement. La définition d'un principe actif pertinent pour un symptôme donné ne suffit pas, il faut se préoccuper de sa bio-disponibilité en définissant l'excipient le plus adapté et prévoir le moyen de l'administrer convenant le mieux au patient concerné (nourrisson, enfant, adulte, personne âgée).

Les évolutions récentes de la législation au niveau européen (EMA) ou français (Afssaps) vont largement dans ce sens et il est fort à penser que cette approche globale du médicament destiné à chaque catégorie de patient en particulier sera l'axe principal des réglementations et des recherches futures. Ceci ouvre de belles perspectives à la recherche en pharmacie pédiatrique.

Après avoir proposé ces nouveaux modèles de seringues, nous avons réalisé au laboratoire des prototypes très simplifiés à partir de seringues classiques. Ceux-ci ont été étudiés pour démontrer le bon écoulement de formulations simples. Ces résultats ne sont pas présentés ci-dessus, puisqu'ils sont très préliminaires. Notre objectif est maintenant de réaliser des prototypes de bonne qualité pour décrire de façon précise leurs propriétés d'aspiration et d'éjection des fluides en fonction de la viscosité.

Suite à la demande de brevet déposée par le Laboratoire pour la conception de ces nouvelles seringues, nous souhaitons également valoriser notre invention auprès de partenaires industriels. Ceux-ci seront tout aussi bien des entreprises pharmaceutiques que leurs manufacturiers pour les dispositifs d'administration. Nous avons déjà pu estimer auprès de

fabricants, que toutes améliorations des seringues que nous proposons peuvent être réalisées avec un surcoût faible par rapport aux seringues classiques. Cet argument pourrait, nous l'espérons, encourager les entreprises pharmaceutiques à utiliser notre invention, dans un but de réduire les risques associés aux traitements par voie orale des nourrissons.

Chapitre 5

Administration pulmonaire de poudres autoémulsionnables

INTRODUCTION

Il existe de nombreuses maladies pulmonaires ayant pour origine un encombrement bronchique. Les plus graves de ces maladies telles que la broncho-pneumopathie obstructive, la détresse respiratoire du nouveau-né ou l'asthme sont des pathologies lourdes pouvant entraîner des gênes importantes dans la vie quotidienne voire la mort. C'est pourquoi le développement de nouveaux médicaments notamment pour le traitement étiologique est important. Ils permettent d'améliorer la qualité de vie des patients.

La voie inhalée constitue le mode d'administration optimal dans le traitement de nombreuses affections respiratoires. Elle suscite beaucoup d'intérêt pour la délivrance systémique de médicaments. Cependant, le poumon est un organe complexe doté de mécanismes de défense efficaces qui limitent la déposition des particules inhalées et les éliminent très rapidement. Le nombre d'excipients dont l'innocuité a été démontrée en inhalation (sous forme de poudre sèche) reste extrêmement limité à l'heure actuelle.

Contenant une ou plusieurs substances actives qui peuvent être dissoutes ou dispersées dans un excipient approprié, les préparations pour inhalation sont des préparations liquides ou solides destinées à être administrées dans les poumons sous forme de vapeurs ou d'aérosols en vue d'une action locale ou systémique. Les excipients utilisés dans la conception de ces préparations pharmaceutiques (gaz propulseurs, co-solvants, diluants, conservateurs antimicrobiens, solubilisants, stabilisants) ne doivent exercer aucun effet notable sur les fonctions de la muqueuse du tractus respiratoire et de ses cils. A côté des préparations liquides pour inhalation (destinées à être converties en vapeurs, dispensées au moyen de nébuliseurs ou d'inhalateurs pressurisés à valve doseuse), les poudres pour inhalation conditionnées en récipients multidoses ou unidoses ont fait l'objet de recherches importantes ces dernières années. Les inhalateurs à poudres présentent les avantages de n'utiliser aucun gaz propulseur pour leurs conceptions, d'offrir une meilleure stabilité des formules ainsi que d'être un recours aisé pour des préparations qui ne peuvent être formulées sous forme liquide. Bien que la technologie particulière ait permis de concevoir et de mettre sur le marché des inhalateurs à poudres, ces derniers, pour des raisons évidentes de biodisponibilité, ne renferment à l'heure

actuelle que des principes actifs hydrosolubles et qui ne présentent pas de problèmes de perméabilité membranaire. L'administration par voie pulmonaire de principes actifs faiblement hydrosolubles et/ou qui sont peu perméables vis-à-vis de la membrane pulmonaire constitue encore à l'heure actuelle un véritable défi de formulation.

Ce dernier chapitre de thèse est consacré à l'étude de la formulation de médicaments destinés à une administration par voie pulmonaire. Pour ce faire, des poudres fines destinées à être utilisées pour le traitement de l'asthme ont été produites par nébulisation.

Deux substances actives ont été utilisées pour étudier les paramètres de nébulisation : le salbutamol base (sympathomimétique β_2 sélectif de propriétés physicochimiques hydrophiles) et un corticoïde qui a des propriétés lipophiles, le budésonide.

Dans un premier temps, ont été étudiés et définis les rapports optimaux d'excipients (surfactants, lactose) à utiliser. Ensuite le travail a consisté à mettre au point les conditions opératoires de fabrication (température et débit de l'air d'entrée et de sortie de l'atomiseur, débit de pulvérisation, pression et température de l'air de pulvérisation, etc.) ainsi que les paramètres de formulation (proportions de surfactants, de lactose et de principe actif -PA-) afin d'obtenir de manière reproductible des microparticules présentant les caractéristiques appropriées pour une délivrance par voie pulmonaire. Les particules préparées correspondent à des formulations de type émulsions ou microémulsions contenant le principe actif solubilisé par des agents tensioactifs et le lactose dans la phase aqueuse. Les formulations particulières ont été préparées à partir des zones de microémulsions déterminées par les diagrammes de phases. Une fois que les compositions ont été choisies, différentes formulations déshydratées par nébulisation ont été préparées, et conditionnées dans des gélules. Enfin des expériences d'inhalation ont été réalisées à l'aide de dispositifs DPI (Dry Powder Inhalers). Ces particules, lorsqu'elles seront délivrées au niveau pulmonaire, devraient pouvoir donner lieu à la formation d'émulsions/microémulsions lorsqu'elles se déposeront sur la muqueuse bronchique ou alvéolaire après avoir été aérosolisées.

Les caractéristiques physico-chimiques des poudres obtenues ont été également évaluées. Les distributions de taille (analyse granulométrique par diffraction laser) et les performances d'aérosolisation (cascade d'Andersen) ont été mesurées. La finesse des

particules obtenues devrait permettre un parcours aisé dans les voies bronchiques, notamment jusqu'aux alvéoles pulmonaires où se trouve la membrane alvéolaire propice à l'absorption de principes actifs. Enfin, des expériences sur une Balance de Langmuir ont été effectuées pour étudier l'éventuelle recristallisation des poudres obtenues au niveau de l'interface alvéolaire.

Ce chapitre est suivi d'un article publié dans *International Journal of Nanomedicine* intitulé: « *Nanocarriers as pulmonary drug delivery systems to treat and to diagnose respiratory and non respiratory diseases* ». Cet article traite de l'utilisation de systèmes nanométriques utilisés pour le traitement et le diagnostic des problèmes respiratoires entre autre. Nous y expliquons l'anatomie et la physiologie du tractus respiratoire humain, les mécanismes de dépôts et le devenir de particules inhalées, les différents types de formulations développées pour la voie pulmonaire (micelles, liposomes, microémulsions, micro et nanoparticules, cyclodextrines) et leur optimisation.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Dans cette partie, nous allons compléter l'article annexé à la fin de ce chapitre (physiologie du tractus respiratoire humain, présentation des différents types de formulations pour la voie pulmonaire). Ci-dessous, les caractéristiques physico-chimiques des poudres dédiées à l'inhalation seront discutées (granulométrie, évaluation des propriétés aérodynamiques). Puis les principales substances actives administrées par voie pulmonaire seront présentées, les dispositifs d'inhalation commercialisés actuellement seront exposés, ainsi que les techniques de micronisation.

1. Granulométrie des particules et évaluation des propriétés aérodynamiques

1.1. Impact de la granulométrie sur l'administration pulmonaire

La taille des particules décide de l'efficacité de leur migration le long du tractus respiratoire. Selon leur taille, elles pourront atteindre :

- les parois nasales, pharyngées et laryngées pour des particules de taille supérieure à 30 μm ,
- la trachée, pour des particules de 20-30 μm ,
- les bronches, pour des particules de 10-20 μm ,
- les bronchioles, pour des particules de 10-3 μm .⁸³

Des particules d'une taille proches de 5 μm atteindront les canaux alvéolaires et les alvéoles pulmonaires (sacs polyédriques ultimes où s'effectuent les échanges gazeux avec le sang à travers une fine cloison tapissée d'une couche continue de cellules épithéliales plates).⁸⁴

Des particules d'une taille inférieure à 5 microns atteindront l'épithélium alvéolaire, mais s'y fixeront moins efficacement : soumises au mouvement brownien, les particules extrêmement fines restent en suspension dans l'air inspiré et sont rejetées lors de l'expiration. En pratique, dans ce cas, il est recommandé au patient de faire une pause respiratoire en fin

d'inspiration pour augmenter le temps de contact particules–tractus et faciliter ainsi le dépôt de particules.^{85, 86}

Le dépôt de particules inhalées dans le tractus respiratoire peut être influencé par différents paramètres comme la granulométrie, la densité des particules de l'aérosol, les paramètres de ventilation et la morphologie de l'appareil respiratoire.^{87, 88, 89}

Ainsi, parmi ces facteurs, c'est la taille des particules inhalées qui est le plus important. Elle est, le plus souvent, exprimée en termes de diamètre aérodynamique (d_{ae}) afin de tenir compte à la fois du diamètre géométrique, de la forme et de la densité des particules. Le d_{ae} est défini comme le diamètre d'une particule sphérique de densité unitaire ayant la même vitesse de dépôt que la particule mesurée.

En conclusion, il est généralement considéré que les particules qui atteignent efficacement le poumon présentent un d_{ae} compris entre 0,5 et 5 μm . Les particules dont le d_{ae} est supérieur à 5 μm se déposent essentiellement par impaction inertielle au niveau des voies aériennes supérieures, tandis que la grande majorité des particules de taille inférieure à 0,5 μm , animées du mouvement Brownien, est susceptible d'être éliminée durant l'expiration.^{90, 91, 92, 93}

1.2. Évaluation aérodynamique des poudres

Pour pouvoir évaluer le comportement aérodynamique des aérosols, la Pharmacopée Européenne impose des méthodes se basant sur le fractionnement et la collecte des particules sur impacteurs.⁹⁴ Ces méthodes vont tenter de modéliser le tractus respiratoire pour évaluer *in vitro* les formulations dédiées à l'administration par voie pulmonaire.

Le principe de fonctionnement des impacteurs implique le passage du flux d'air véhiculant le nuage de particules à travers des orifices de plus en plus étroits séparés par des plateaux dits « plateaux d'impaction ». Ces dispositifs sont sensibles au diamètre et à la densité des particules. Celles dont l'inertie est forte vont suivre une trajectoire rectiligne et donc s'impacter sur les plateaux, les autres resteront en suspension dans l'air et continueront leur chemin vers les plateaux suivant. En pénétrant plus profondément dans le dispositif, le flux d'air devient de plus en plus rapide, et force les particules les plus petites à s'impacter au niveau des étages inférieurs.

Quatre types d'impacteurs sont décrits et recommandés par la Pharmacopée Européenne 5^{ème} édition pour l'évaluation aérodynamique des particules fines :

- L'impacteur en verre à deux étages (Glass Impinger)
- L'impacteur à cascade multi-étages (Andersen Cascade Impactor)
- L'impacteur liquide multi-étages (Multi-stage Liquid Impinger)
- L'impacteur de « nouvelle génération » (Next Generation Impactor)

Pour nos formulations, nous avons utilisé l'impacteur à cascade multi-étages (Andersen Cascade Impactor). Il est composé de huit plateaux, numérotés de 0 à 7, et d'un filtre terminal (Figure 5-1). Le diamètre de coupure (d_{ce}) de chaque étage, correspondant à une efficacité de rétention de 50 % des particules ($D(50)$), est dépendant du flux d'air sélectionné.

C'est un impacteur qui, de par ses nombreux plateaux, donne des indications précises sur la répartition granulométrique des particules.

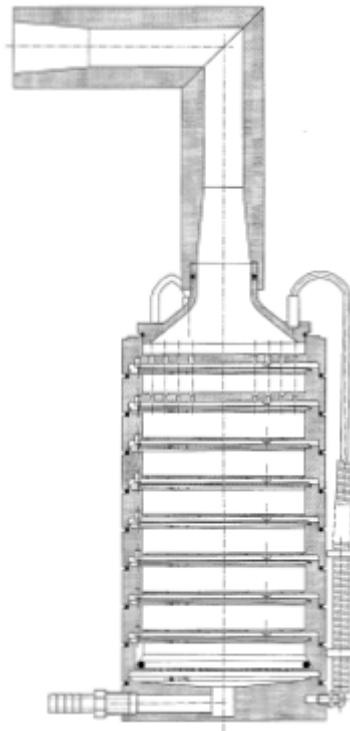


Figure 5-1 : Impacteur à cascade de type Andersen.

2. Formulations médicamenteuses administrées par inhalation

Depuis des siècles, la thérapie par les aérosols est utilisée. Déjà Galien recommandait à ses malades d'aller inhaler les vapeurs sulfureuses qui émanaient du Vésuve en vue de soigner leur bronchite chronique. Plus tard, la fumée de cigarettes de Belladone et de Datura a été utilisée pour traiter les crises d'asthme.⁹⁵

Grâce à des avancées technologiques remarquables et au développement de la recherche médicale, l'inhalation de médicaments est devenue le mode d'administration optimal pour le traitement de nombreuses affections des voies respiratoires. La délivrance du principe actif in situ procure alors un effet rapide et efficace à dose faible, et provoque par la même occasion nettement moins d'effets secondaires comparativement aux autres voies d'administration. De plus, le tractus respiratoire, de par ses caractéristiques spécifiques, est considéré comme une porte d'entrée non invasive potentielle vers la circulation systémique.

Le nombre important d'alvéoles (200 à 600 millions) confère aux poumons une surface d'échange particulièrement grande, de l'ordre de 140 m², au niveau de laquelle le passage des substances est régulé par la présence d'une très fine barrière alvéolo-capillaire (0,1 à 0,2 µm d'épaisseur). En tant que voie d'administration de médicaments, l'inhalation permet d'éviter l'effet de premier passage hépatique ; de plus, le poumon présente une métabolisation enzymatique réduite (l'arsenal enzymatique est certes complexe mais largement moins actif que celui du tractus gastro-intestinal). L'ensemble de ces caractéristiques couplé à un flux sanguin élevé (5 L/min) permet généralement d'obtenir une absorption rapide des substances inhalées avec une distribution directe dans la circulation générale.⁹⁶

Les médicaments administrés par la voie inhalée, pour traiter les affections respiratoires, peuvent être divisés en différentes catégories comme décrit dans le tableau 5-1.

Tableau 5-1 : Classement des médicaments administrés par la voie inhalée, pour traiter les affections respiratoires.

Substances actives		Action/ Caractéristiques
BRONCHO-DILATATEURS	Agonistes β_2-adrénergiques	Action relaxante directe sur les muscles lisses des voies respiratoires. A courte durée d'action (salbutamol, fénotérol, etc.) sont administrés par inhalation en cas de crise, et à titre préventif et thérapeutique dans l'asthme d'effort. ⁹⁷ Outre l'asthme, aussi pour soulager les symptômes de la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) et contribue à éviter les complications qui en découlent.
	Anti-cholinergiques	Action relaxante directe sur les muscles lisses des voies respiratoires Réduisent les effets indésirables gênants qui se manifestent lors de leur usage par voie systémique (sécheresse de la bouche, troubles de l'accommodation et de la miction). On distingue ceux à courte durée d'action (ipratropium) et ceux à longue durée d'action (tiotropium). Ils sont surtout utilisés dans le traitement de la BPCO. En cas d'asthme, ils constituent une alternative en cas de contre-indication aux β_2 -mimétiques. Tant dans la BPCO que dans l'asthme, ils exercent un effet additif lorsqu'ils sont associés à des β_2 -mimétiques.
ANTI-INFLAMMATOIRES DE TYPE CORTICOSTEROÏDES		L'inhalation de corticostéroïdes (par ex. budésonide, fluticasone) permet d'obtenir un effet favorable tout en donnant lieu à beaucoup moins d'effets indésirables que l'administration systémique, et constitue la base du traitement de l'asthme à long terme. Dans le traitement de la BPCO, la place des corticostéroïdes à inhaler n'est pas tout à fait claire. Il ressort des études réalisées que leur effet est plus limité que dans l'asthme et dépend de la gravité de la maladie; plus faible est le volume expiratoire maximal pendant la première seconde (VEMS), et plus grand sera l'effet sur les exacerbations. Les différentes recommandations préconisent un corticostéroïde à inhaler chez les patients atteints de BPCO sévère à très sévère (VEMS < 50%) avec des exacerbations fréquentes. ^{98, 99}
INHIBITEURS DE LA LIBERATION DE MEDIATEURS		Ces substances agissent vraisemblablement par un effet stabilisant au niveau de la membrane des mastocytes. Le cromoglycate sodique peut être administré en aigu (\pm 20 minutes avant le stimulus) pour prévenir l'asthme d'effort, une bronchoconstriction induite par un allergène ou provoquée par de l'air froid. ¹⁰⁰
MUCOLYTIQUES		Les produits tels que la N-Acétylcystéine servent à liquéfier le mucus. Ils sont indiqués dans le traitement des maladies respiratoires chroniques accompagnées l'hypersécrétion telles que la mucoviscidose et la BPCO.
ANTI-INFECTIEUX		On retrouve des antibiotiques tels que la tobramycine, administrés dans le traitement des infections respiratoires dues à <i>Pseudomonas aeruginosa</i> chez les patients atteints de mucoviscidose, ¹⁰¹ ou encore des anti-protazoaires tels que la pentamidine, utilisées dans le traitement de la pneumonie à <i>Pneumocystis carinii</i> chez les patients atteints du SIDA. ¹⁰²

3. Dispositifs d'inhalation

Trois systèmes d'administration de médicaments par la voie pulmonaire sont présentés ci-dessous : les nébuliseurs, les aérosols doseurs (AD ou MDI pour *Metered Dose Inhalers*) et les inhalateurs à poudre sèche (IPS ou DPI pour *Dry Powder Inhalers*).

Les critères requis pour tous ces dispositifs sont la reproductibilité de la dose délivrée en principe actif, la stabilité physique et chimique du médicament préservée et la facilité d'utilisation par le patient.

En plus de ces critères primordiaux, des critères secondaires prennent une importance croissante, comme le coût de production, le design ou encore d'autres paramètres améliorant la compliance du patient (inhalateur multidose, indicateur de doses, etc.).^{103, 104, 105}

3.1. Les nébuliseurs

Les nébuliseurs ont été inventés au début du XIX^{ème} siècle pour le traitement des affections respiratoires.

Ces systèmes requièrent un courant de gaz comprimé (nébuliseur pneumatique), qui génère de fines gouttelettes d'aérosol à partir d'une solution ou d'une suspension contenant le principe actif. L'aspiration de la partie superficielle du liquide est induite par la création d'une zone de dépression, (le passage forcé du gaz comprimé à travers un tube de faible diamètre) qui se vaporise sous forme de fines gouttelettes au contact du courant gazeux circulant à très haute vitesse.

Les liquides pour nébulisation sont composés de principes actifs hydrophiles (solution ou suspension dans des liquides aqueux) et des adjuvants pour assurer la stabilité physico-chimique du produit. Le grand avantage des nébuliseurs réside dans la génération de fines gouttelettes indépendamment des mouvements respiratoires. Cela permet d'utiliser ces appareils chez les jeunes enfants, les patients âgés ou inconscients, incapables de coordonner leurs mouvements respiratoires avec la génération de l'aérosol.^{106, 107}

Le principal défaut des nébuliseurs est leur taille : ils sont généralement très encombrants, nécessitent un nettoyage régulier et présentent des rendements de nébulisation très faibles. D'autre part, le « volume mort » important qui piège une grande quantité de liquide, des distributions de taille particulière assez large ainsi que la libération en continu de l'aérosol (aussi bien pendant la phase inspiratoire qu'expiratoire du patient) font que la fraction pulmonaire dépasse rarement 10 % de la dose nominale.^{108, 109}

Afin de surpasser ces défauts majeurs et pour améliorer la compliance du patient, les nébuliseurs sont soumis à des développements permanents. Récemment l'utilisation de récepteurs/capteurs électroniques qui permettent de générer l'aérosol uniquement pendant l'inspiration du patient a été proposé, ainsi que la miniaturisation des dispositifs ou encore le développement de systèmes reposant sur l'atomisation, à travers de micro-orifices, d'un liquide à très haute pression et formant des gouttelettes plus fines.^{110, 111}

3.2. Les aérosols doseurs (AD)

Ce sont les systèmes de délivrance d'aérosol les plus fréquemment rencontrés depuis les années 1950. Les aérosols doseurs sont composés de trois parties principales:

- Un réservoir avec la substance active (solution ou suspension dans le gaz propulseur liquéfié ou « propellant »).
- Une valve doseuse (pour délivrance reproductible d'une dose précise de médicament)
- Un système d'activation.

Le gaz liquéfié est en équilibre avec sa tension de vapeur. Quand la valve doseuse est activée, la quantité souhaitée de médicament est éjectée sous la pression du liquide propulseur en ébullition. Le mélange liquide- vapeur en expansion génère des gouttelettes (le processus de formation est identique à celui décrit pour la nébulisation). L'évaporation quasi-instantanée du liquide propulseur permet d'obtenir des particules avec des distributions de taille plus uniformes que celles des particules obtenues par nébulisation.

Les gaz les plus souvent utilisés consistaient en des chlorofluorocarbones (CFC), tels que le CFC-11 (trichlorofluorométhane), le CFC-12 (dichlorodifluorométhane) et le CFC-114 (dichlorotétrafluoroéthane). Ils étaient généralement combinés dans les formulations de manière à atteindre des valeurs de tension de vapeur, de densité du liquide et de solubilité

adéquates. Les CFC sont intéressants car ils présentent une grande tolérance et une faible toxicité pulmonaire. De plus, leur pureté et leur stabilité chimiques sont élevées. Ils ne sont pas inflammables et sont compatibles avec la plupart des matériaux utilisés.

Malheureusement, les aérosols doseur ne permettent généralement pas de délivrer au niveau des voies respiratoires profondes plus de 20% de la dose expulsée par le dispositif.

Toutefois, le plus grand inconvénient de ces dispositifs est l'impact nocif sur l'environnement des gaz propulseurs utilisés. Les CFC sont responsables de la destruction de la couche d'ozone et sont progressivement remplacés par les hydrofluoroalcanes (HFA); les plus connus étant le HFA134a (tétrafluoroéthane) et le HFA227 (heptafluoropropane). Toutefois, le passage aux dérivés HFA continue de nécessiter d'importantes optimisations galéniques ainsi que la mise en oeuvre de nombreux essais de toxicité.

3.3. Les inhalateurs à poudre sèche (IPS)

C'est la signature et la mise en place du protocole de MONTREAL, prévoyant et imposant la suppression des chlorofluorocarbures (CFC) qui a conduit aux développements de poudres pour inhalation.

Les IPS utilisent l'énergie fournie par le patient (au moment de l'aspiration) pour disperser la poudre contenant la substance active. Ils ne contiennent donc pas de CFC et ne nécessitent aucune synchronisation entre l'inhalation et l'activation.

De nombreuses études de dépôt aussi bien *in vitro* que *in vivo*, prouvent que la déposition pulmonaire pour un principe actif donné est plus importante lors de l'administration via IPS que via d'autres dispositifs d'inhalation.¹¹²

Il existe deux types d'IPS :

- **dispositifs unidoses** : équipés d'un réservoir ayant une dose unitaire. La poudre est préconditionnée dans des gélules emballées dans des blisters pour les préserver de l'humidité (Rothaler®, Spinhaler®, Cyclohaler® etc.).

- **dispositifs multidoses** : équipés d'un réservoir multidoses. La quantité de poudre souhaitée est prélevée à l'aide d'une valve doseuse (Turbohaler®) ou bien elle est préconditionnée dans des blisters (système multidoses : Diskhaler®, Diskus®, etc.).

Tous les IPS ont un mécanisme d'aérosolisation et de désagrégation des amas de poudres ainsi qu'un adaptateur pour diriger l'aérosol dans la bouche du patient.

Dans le Spinhaler®, le mécanisme de fonctionnement est très simple : la gélule est percée avec deux fines aiguilles puis une petite hélice est activée lors de l'inhalation permettant de disperser les particules dans le flux d'air. Dans le Turbohaler®, un système à roulette située à la base de l'appareil libère la dose requise de poudre. Le flux d'air créé pendant l'inhalation, passant à travers des canaux spiralés, devient turbulent et permet la dispersion des amas de particules de poudres à inhaler.

Les innovations récentes pour fournir des énergies d'expulsion supérieures, devraient rendre la désagglomération et la dispersion des poudres indépendantes du flux inspiratoire du patient (micromoteurs à hélice, compresseur à air, composants piézo-électriques).^{110, 111}

4. Techniques de micronisation

Comme nous l'avons évoqué précédemment, la taille des particules inhalées est l'un des paramètres clés qui influencent le profil de dépôt pulmonaire et par conséquent l'activité pharmacologique d'un aérosol. Généralement, seules les particules possédant un diamètre aérodynamique compris entre 0,5 et 5 µm atteignent le poumon. Les particules de taille plus grande se déposent essentiellement au niveau des voies aériennes supérieures, tandis que les particules submicroniques sont susceptibles d'être exhalées sans s'être déposées.^{88, 93}

Ainsi, la micronisation des particules actives est une étape cruciale dans la formulation d'aérosols. Les procédés classiques qui permettent d'atteindre des tailles particulières convenables sont le broyage, l'utilisation de fluides supercritiques et l'atomisation. Notons que ces techniques peuvent également s'appliquer aux excipients (cas

du lactose micronisé « compétiteur », utilisé dans le but d'atténuer les forces d'adhésion PA-excipient porteur, et des microparticules lipidiques, voir la partie expérimentale).

Les différentes techniques de micronisation sont décrites dans le tableau 5-2.

Dans la partie expérimentale de ce chapitre, nous utiliserons pour nos formulations autoémulsionnables la méthode d'atomisation par « spray-drying ». Cette technique d'atomisation faisant intervenir la chaleur est un procédé continu, qui permet la transformation d'une solution ou d'une suspension en une poudre sèche en une unique étape. La méthode consiste à pulvériser le liquide sous la forme de gouttelettes qui entrent en contact avec un gaz inerte préchauffé. La surface de contact importante assure une évaporation rapide des gouttelettes et leur transformation en particules solides. Ces dernières sont séparées du gaz par filtration, précipitation électrostatique ou bien par séparation centrifuge.^{118, 119}

La pulvérisation peut se faire selon différentes méthodes qui influencent considérablement la taille des gouttelettes formées : pulvérisations centrifuge, pneumatique, à haute pression ou ultrasonique.

L'atomisation se fait soit dans une configuration dite « ouverte », soit dans une configuration « fermée ». Dans le premier cas, le gaz inerte, habituellement de l'air, n'est pas recyclé et est déchargé dans l'environnement externe après une dernière filtration qui retient les particules solides les plus fines. La configuration fermée, nécessite l'utilisation de solvants organiques et une atmosphère exempte d'oxygène ; l'azote est le gaz le plus couramment employé à cet égard, pour contenir la teneur en O₂ strictement inférieure à 5 %.

Plusieurs paramètres peuvent être ajustés en vue d'une atomisation optimale comme : le débit, l'humidité, les températures d'entrée et de sortie du gaz dans l'instrument, ainsi que le mode de pulvérisation (débit et pression de pulvérisation).

Tableau 5-2 : Différentes techniques de micronisation de particules solides.

Techniques de micronisation		Méthode	Granulométrie
Broyage mécanique		Broyeurs mécaniques permettant de réduire la taille des poudres pour atteindre des granulométrie grossière (broyeur à marteaux, granulateur oscillant, broyeur à billes et broyeur à jet ou à flux d'air). ¹¹³ L'air comprimé circule à une vitesse supersonique entraînant, par un effet venturi, les particules à microniser dans la chambre de broyage. Les collisions interparticulaires qui en découlent provoquent le fractionnement de la poudre. ^{114, 115}	de 1 à 20 µm
L'utilisation de fluides supercritiques (FSC)	Atomisation supercritique (RESS, pour Rapid Expansion of Supercritical Solutions)	Le principe repose sur l'utilisation des propriétés de solvation des FSCs pour les solides. Lorsque le mélange CO ₂ -soluté sous pression est détendu à travers un orifice de faible diamètre, la dépressurisation brutale conduit à une diminution considérable de la densité, et il s'ensuit une sursaturation importante et une cristallisation du soluté. Comme la nucléation et la croissance ont lieu pendant une durée très courte de l'ordre de 10 ms, les particules obtenues sont très petites, souvent submicroniques. ^{113, 114, 116}	Submicroniques
	Procédé antisolvant (SAS, pour Supercritical Anti Solvent)	Quand le soluté est insuffisamment soluble dans le FSC, celui-ci peut être utilisé comme anti-solvant. Ce principe d'utilisation est particulièrement adapté pour des molécules telles que les sucres et les protéines connues pour leur très faible solubilité dans le CO ₂ supercritique. Outre le composé à microniser et le FSC, un troisième composé intervient. Il s'agit d'un solvant organique. Lors de la mise en contact de la solution avec l'anti-solvant supercritique, celui-ci va se dissoudre dans la phase organique diminuant sa densité, son pouvoir solvant et donc la solubilité du soluté. Simultanément, le solvant va s'évaporer dans la phase supercritique, augmentant la concentration du soluté. C'est ce transfert de masse bidirectionnel qui explique la rapide sursaturation du soluté conduisant à sa nucléation. ¹¹⁷	
Atomisation par « spray-drying »		Pulvérisation du liquide sous forme de gouttelettes qui entrent en contact avec un gaz inerte préchauffé. La surface de contact importante assure une évaporation rapide des gouttelettes et leur transformation en particules solides. Ces dernières sont séparées du gaz par filtration, précipitation électrostatique ou bien par séparation centrifuge. ^{118, 119}	de 1 à 500 µm

La flexibilité de la technique d'atomisation par « spray-drying » en fait un procédé largement répandu au niveau industriel. Ainsi, en plus des applications qui nous intéressent, d'autres applications pharmaceutico-biochimique incluent la production de produits d'hémisynthèse et de synthèse (par exemple des antibiotiques tels que la pénicilline et la tétracycline), des excipients (lactose, gomme arabique), des protéines (des enzymes comme l'amylase, la glucose oxydase, etc.) ainsi que des vitamines (vitamines A, B, D, etc.).¹²⁰

Concernant l'administration par inhalation, l'atomisation est particulièrement intéressante pour la production de poudres sèches délivrées via des IPS (voir paragraphe précédent).^{121, 122, 123} Son principal avantage est la possibilité, en faisant varier les paramètres opératoires mentionnés plus haut, de contrôler de manière rigoureuse les caractéristiques essentielles des particules comme la forme, la densité, la taille et la distribution granulométrique, ainsi que les propriétés d'écoulement et l'aptitude à la désagglomération. De plus, cette technique convient parfaitement à la manipulation de substances thermosensibles puisque l'effet « rafraîchissant » produit par l'évaporation quasi-instantanée des gouttelettes, d'une part, et le temps de résidence relativement court dans la chambre d'atomisation (allant de 100 millisecondes à quelques secondes) d'autre part, protègent ces molécules vis-à-vis de la chaleur ambiante.^{113, 118} En outre, l'atomisation, dans sa configuration fermée en utilisant des solvants organiques, est facilement applicable aux substances peu solubles dans l'eau, évitant ainsi l'emploi de surfactants ou d'autres agents solubilisants susceptibles d'irriter le tractus respiratoire. Il faut, toutefois, veiller à réduire au minimum le taux de solvant résiduel.^{118, 119}

En présence de substances et excipients présentant une température de transition (T_c) et/ou une température de fusion basses (c'est-à-dire une température qui n'excède pas de plus de 20°C la température de sortie de l'appareil) l'atomisation par spray-drying conduit à la formation d'un agrégat de particules ramollies. Pour pallier à cet inconvénient, ces produits (corps gras par exemple) sont généralement atomisés par « spray congealing ». A la différence de la technique précédente, le produit est tout d'abord fondu puis pulvérisé et les particules solides sont obtenues par solidification instantanée au contact d'un courant d'air froid.

PARTIE EXPERIMENTALE

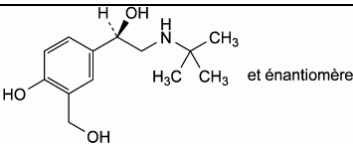
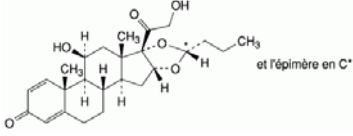
Dans cette partie, nous décrirons les étapes successives nécessaires au choix des conditions de formulations de microémulsions, l'optimisation des conditions de nébulisation et la caractérisation des poudres produites : dosage des substances actives, étude granulométrique, étude des propriétés aérodynamiques et analyse à l'aide d'une balance de Langmuir des propriétés de fluidification des monocouches de DPPC.

1. Matériel et méthodes

1.1. Matières premières

Les Montane® (Seppic, France) ont été utilisés en tant qu'huiles (surfactants de HLB bas) et les Montanox® (Seppic, France) ainsi que la Vitamine E TPGS® (Eastman, France) ont été utilisés comme surfactants hydrophiles aux HLB élevées. Les deux substances actives utilisées sont : le budésonide (Chemos GmbH, Allemagne) et le salbutamol base (Aldrich, France) (tableau 5-3). Le lactose (Aldrich, France) a été utilisé en tant que vecteur pour l'obtention des poudres à usage par voie pulmonaire. L'acétonitrile, l'eau, le méthanol ainsi que tous les autres réactifs utilisés sont de grade analytique.

Tableau 5-3 : Caractéristiques de substances actives: Salbutamol base et Budésonide.

Salbutamol base				
Structure	Aspect	Solubilité	Point de Fusion	Activité
 <p>$C_{13}H_{21}NO_3$ M_r 239,3</p> <p>et énantiomère</p>	Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche	Assez soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 %	Environ 155 °C, avec décomposition	Sympatomimétique β_2 sélectif, il provoque une bronchodilatation par son action sur les récepteurs β_2 adrénergiques des muscles lisses bronchiques
Budésonide				
 <p>$C_{25}H_{34}O_6$ M_r 430,5</p> <p>et l'épimère en C'</p>	Poudre cristalline blanche à sensiblement blanche.	Pratiquement insoluble dans l'eau, facilement soluble dans le chlorure de méthylène, assez soluble dans l'alcool	Environ 221-232°C, avec décomposition	Corticostéroïde, il inhibe la phospholipase A2 et le chimiotactisme pour les éosinophiles et les neutrophiles

1.2. Sélection de surfactants. Critères de choix.

Nous allons utiliser deux substances actives : le salbutamol base, assez soluble dans l'eau et le budésonide, pratiquement insoluble dans l'eau. Afin de solubiliser la substance active en solution aqueuse, il est fait recours à des modes opératoires précis et bien appropriés qui utilisent soit des solubilisants, soit des agents tensioactifs, soit des cosolvants. De très nombreux tensioactifs ont été utilisés pour réaliser des solubilisations, cependant pour limiter les risques de toxicité, nous nous sommes limités aux tensioactifs nonioniques.

L'objectif de ce travail étant d'obtenir des poudres sèches pour l'inhalation par le procédé de nébulisation, nous avons pensé utiliser comme vecteur, le lactose cristallin qui serait « enrobé » par le mélange de deux surfactants et la substance active. Dans ce but des microémulsions ont été produites, composées de la substance active, de deux surfactants et du lactose, puis « séchées » par l'atomiseur.

Nous avons sélectionné des surfactants qui, à température ambiante, ont des aspects semi-solides ou solides (pâtes visqueuses ou écailles) caractérisés par des températures de transition de phase relativement élevées (49-54°C) pour permettre, en présence de la substance active, la formation de microparticules solides. Ainsi, les dérivés du sorbitan, les Montanes® (esters lipophiles de sorbitan) et les Montanox® (esters hydrophiles de sorbitan polyéthoxylés) (tableau 5-4) ont été choisis. Ces composés ont d'autre part les avantages d'être biodégradables, non toxiques, et de conduire *in vivo* à des métabolites assimilables et également non toxiques (acide ou alcool gras et sucre).¹²⁴ La Vitamine E TPGS® (dérivé hydrophile de la vitamine E), soluble dans l'eau, sera aussi utilisée comme surfactant pour émulsifier les principes actifs lipophiles.

Tableau 5-4 : Caractéristiques des surfactants non-ioniques utilisés

Nom	Aspect	Point de Fusion	HLB
Montane® 40 Monopalmitate de sorbitane	à 25°C : écailles	49°C	6,7
Montane® 60 Monostéarate de sorbitane	à 25°C : écailles	55°C	4,7
Montane® 65 Tristéarate de sorbitane	à 25°C : écailles	54°C	2,1
Montanox® 40 Monopalmitate de sorbitane éthoxylé	à 25°C : liquide à gel	-	15,6
Montanox® 60 Monostéarate de sorbitane éthoxylé	à 25°C : liquide à gel	-	14,9
Montanox® 65 Tristéarate de sorbitane éthoxylé	à 25°C : liquide à gel	-	10,5
Vitamine E TPGS® Polyéthylène glycol 1000 succinate de d- α -tocopheryl	à 25°C : solide visqueux	39-42°C	13-15

Des couples de surfactants seront mis en œuvre, constitués d'un surfactant avec une HLB basse (Montane®, plus forte affinité pour la phase huileuse) et d'un surfactant avec une HLB élevée (Montanox® ou Vitamine E TPGS®, plus forte affinité pour la phase aqueuse). Ces couples devraient permettre de former des micelles et aider à solubiliser les principes actifs utilisés qui ne sont, quant à eux, peu ou pas solubles dans l'eau.

Les surfactants choisis pourraient s'associer rapidement avec les phospholipides alvéolaires lorsqu'ils sont administrés par la voie pulmonaire.^{125, 126} De plus, nous pensons qu'ils pourront former une microémulsion aux niveau des sites d'action, c'est à dire dans les bronches ou dans les alvéoles pulmonaires. La microémulsion formée *in situ* augmenterait alors la biodisponibilité de la substance active lipophile et ce, particulièrement avec la Vitamine E TPGS®.

La HLB des mélanges de surfactants considérés a été calculée (tableau 5-5). Deux rapports de surfactants Montane®/Montanox® (ou Vitamine E TPGS®) on été considérés, à savoir 1/3 et 1/5.

Tableau 5-5 : Les mélanges de surfactants utilisés et leurs HLB.

Rapport de Montane® sur Montanox® (ou Vitamine E TPGS®)	Montane® 40				Montane® 60				Montane® 65			
	Montanox® 40	Montanox® 60	Montanox® 65	Vitamine E TPGS®	Montanox® 40	Montanox® 60	Montanox® 65	VITAMINE E TPGS®	Montanox® 40	Montanox® 60	Montanox® 65	Vitamine E TPGS®
1/3	13,4	12,85	7,65	12,9	12,9	12,35	9,0	12,4	12,2	11,7	8,4	11,8
1/5	14,2	13,5	7,34	13,6	13,7	13,2	9,5	13,2	13,3	12,7	9,0	12,8

Comme attendu les mélanges de surfactants qui possèdent la HLB la plus forte sont ceux incluant les Montanox® 40 et 60 ou la Vitamine E TPGS®.

2. Solubilité des principes actifs dans les mélanges de surfactants

La solubilité de deux principes actifs utilisés dans les différents mélanges de surfactants a été déterminée par partie selon le protocole suivant (figure 5-2) :

Une partie de principe actif (PA, 10 mg) est exactement pesée dans un becher. L'excipient est ajouté par partie de 10 mg. Le mélange est placé dans un bain marie à 70°C sous agitation pendant 15 minutes (plaque chauffante et agitateur, Heidolph MR 3001K muni d'une sonde de température EKT3001). Une goutte du mélange est prélevée et déposée sur une lame de verre pour être observée au microscope optique (grossissement x 20). L'absence de cristaux de PA en suspension dans le mélange nous permet de conclure à la solubilité totale du principe actif. L'absence de recristallisation du PA à température ambiante est également vérifiée au cours du temps (sur 1 semaine). Le PA solubilisé est exprimé en mg/g d'excipients.

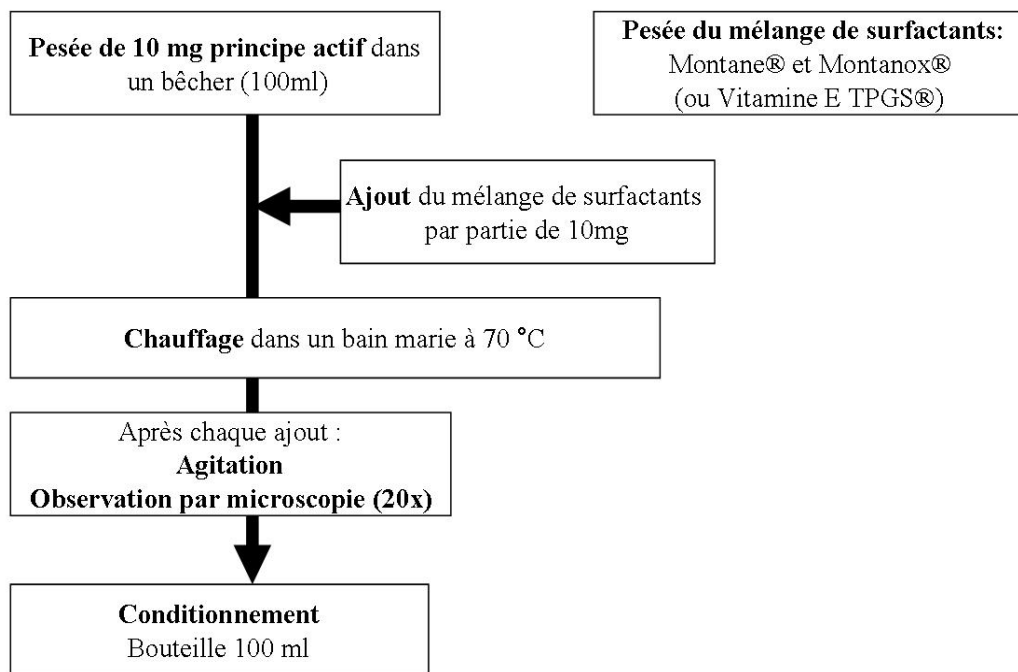


Figure 5-2 : Schéma général des modes opératoires mis en œuvre pour l'étude de solubilité de principes actifs utilisés.

Les solubilités mesurées du salbutamol base et du budésonide dans les différents mélanges de surfactants sont rassemblées dans les tableaux 5-6 et 5-7.

Les différents surfactants sont totalement miscibles entre eux et forment des liquides très visqueux après leur fusion. Après chauffage à 70°C et refroidissement, aucune recristallisation des principes actifs n'a été observée à température ambiante, aux concentrations notées dans les tableaux 5-6 et 5-7.

Tableau 5-6 : Solubilité du salbutamol base dans les surfactants chauffés à 70°C.

Mélange de surfactants Rapport 1/3		Solubilité de salbutamol base (mg/g)
Montane®40	Montanox® 40	100
	Montanox® 60	80
	Montanox® 65	50
	Vitamine E TPGS®	90
Montane®60	Montanox® 40	40
	Montanox® 60	50
	Montanox® 65	20
	Vitamine E TPGS®	40
Montane®65	Montanox® 40	20
	Montanox® 60	20
	Montanox® 65	10
	Vitamine E TPGS®	30
Mélange de surfactants Rapport 1/5		Solubilité de salbutamol base (mg/g)
Montane®40	Montanox® 40	100
	Montanox® 60	70
	Montanox® 65	40
	Vitamine E TPGS®	80
Montane®60	Montanox® 40	30
	Montanox® 60	40
	Montanox® 65	30
	Vitamine E TPGS®	40
Montane®65	Montanox® 40	30
	Montanox® 60	10
	Montanox® 65	10
	Vitamine E TPGS®	20

Les mélanges de surfactants de HLB élevée (incluant le Montanox® 40 ou la Vitamine E TPGS®, tableau 5-5), solubilisent deux fois plus de principe actif que les surfactants qui présentent une faible HLB (incluant le Montanox® 65). Nous n'avons pas observé de différences importantes entre les solubilisations des deux principes actifs. D'autre part les différents rapports de surfactants utilisés 1/3 et 1/5 influencent peu les solubilisations. Pour les prochaines étapes de la formulation de systèmes microémulsionnés, nous allons utiliser tous ces mélanges de surfactants seront utilisés afin de pouvoir observer leur « comportement » en milieu aqueux (apparence ou absence de la précipitation de l'un de deux).

Tableau 5-7 : Solubilité de budésonide dans les surfactants chauffés à 70°C.

Mélange de surfactants Rapport 1/3		Solubilité de budésonide (mg/g)
Montane®40	Montanox® 40	70
	Montanox® 60	60
	Montanox® 65	30
	Vitamine E TPGS®	90
Montane®60	Montanox® 40	40
	Montanox® 60	50
	Montanox® 65	20
	Vitamine E TPGS®	40
Montane®65	Montanox® 40	20
	Montanox® 60	20
	Montanox® 65	10
	Vitamine E TPGS®	30
Mélange de surfactants Rapport 1/5		Solubilité de budésonide (mg/g)
Montane®40	Montanox® 40	80
	Montanox® 60	60
	Montanox® 65	20
	Vitamine E TPGS®	60
Montane®60	Montanox® 40	40
	Montanox® 60	10
	Montanox® 65	20
	Vitamine E TPGS®	40
Montane®65	Montanox® 40	20
	Montanox® 60	10
	Montanox® 65	10
	Vitamine E TPGS®	30

3. Formulation des systèmes microémulsionnés

L'obtention des systèmes microémulsionnés, nécessite des étapes préliminaires pour sélectionner les mélanges de surfactants parmi tous ceux présentés précédemment.

Nous avons déterminé trois étapes principales :

Étape 1 : Etude de la miscibilité des mélanges de surfactants dans l'eau (à quelques concentrations), dans l'objectif de sélectionner les mélanges de surfactants pour l'établissement des diagrammes de phases

Étape 2 : Établissement des diagrammes de phases en présence de la substance active avec les mélanges de surfactants sélectionnés. Nous observerons ici l'homogénéité des solutions et la précipitation éventuelle des substances actives (salbutamol base ou budésonide).

Etape 3 : Préparation des microémulsions en se basant sur les diagrammes de phases. Les microémulsions comprendront une substance active, de l'eau, un mélange de surfactant et du lactose. Le choix de la concentration de lactose se fera pour atteindre la microémulsion la plus stable pour la nébulisation

3.1. Etape 1. Miscibilité des mélanges de surfactants avec l'eau

Le protocole simplifié utilisé pour cette étude est décrit dans la figure 5-3.

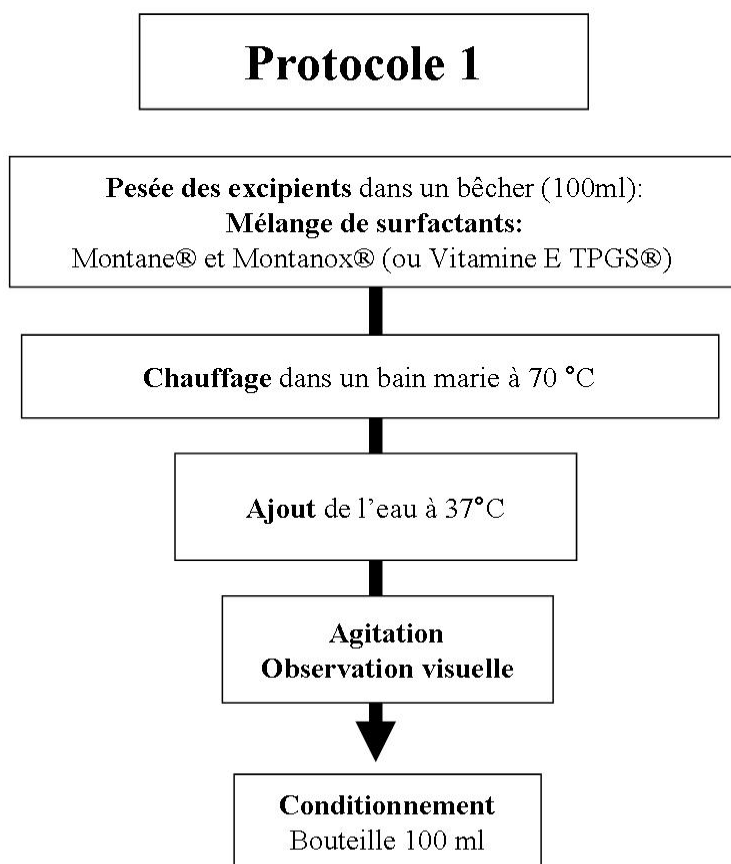


Figure 5-3 : Schéma général des modes opératoires mis en œuvre pour le protocole 1.

Nous avons étudié l'aspect des solutions aqueuses des différents mélanges de surfactants (tableau 5-5) : Montane®/Montanox® et Montane®/ Vitamine E TPGS® dans des rapports 1/3 et 1/5.

Ces couples de surfactants ont été mélangés à l'eau à des teneurs de 0,5% ; 1% ; 2% en poids. Les expériences ont été réalisées à 37°C.

3.1. A. Etape 1. Résultats, aspect des solutions

Les solutions obtenues ont été classées en fonction de leurs aspects :

- **opaque** : solution blanche laiteuse qui ne laisse pas passer la lumière
- **opalescente foncée** : solution moins blanche, laiteuse qui laisse très peu passer la lumière
- **opalescent** : solution blanche assez claire qui laisse passer la lumière
- **opalescent clair** : solution blanchâtre très claire qui laisse très bien passer la lumière
- **limpide** : solution non colorée que la lumière traverse normalement

Les solutions ont été également classées selon le précipité obtenu :

Nombre de particules dans 5 ml de solution :

- **peu de particules** : quelques dizaines de particules
- **particules** : quelques centaines de particules
- **beaucoup de particules** : quelques milliers de particules

Taille des particules :

- **particules fines** : de tailles d'environ 1 µm
- **particules tailles moyennes** : de tailles d'environ 3 µm
- **grosses particules** : de taille d'environ 5 µm

Les tableaux 5-8 à 5-11, ci-dessous donnent l'aspect de chaque solution aqueuse contenant les mélanges de surfactants étudiés (parmi toutes les combinaisons possibles, quelques unes ont été abandonnées car vouées à l'échec au vu des résultats intermédiaires obtenus). Les meilleurs résultats, qui correspondent aux mélanges sélectionnés pour l'établissement des diagrammes de phase ont été surlignés en orange.

Tableau 5-8 : Aspect des solutions aqueuses : Montane®40 /Montanox® 40, 60, 65.

ASPECT OBSERVE		Concentration de surfactant [p/p] / poids du mélange de surfactant		
		0,5% / 1g	1% / 2g	2% / 4g
Montane® 40 / Montanox® 40 (Rapport)	1/3	Opalescent clair	Opalescent	Opalescent
	1/5	Opalescent très clair	Opalescent très clair	Opalescent
Montane® 40 / Montanox® 60 (Rapport)	1/3	Opalescent	Opalescent	Opalescent
	1/5	Opalescent très clair	Opalescent clair	Opalescent
Montane® 40 / Montanox® 65 (Rapport)	1/3	Opalescent	Opaque	Opaque
	1/5	Opalescent	Opalescent	Opaque

Tableau 5-9 : Aspect des solutions aqueuses : Montane®60 /Montanox® 40, 60, 65.

ASPECT OBSERVE		Concentration de surfactant [p/p] / poids du mélange de surfactant	
		0,5% / 1g	1% / 2g
Montane® 60 / Montanox® 40 (Rapport)	1/3	Opalescent clair, peu de particules, très fines	Opalescent clair, peu de particules, très fines
	1/5	Opalescent clair, peu de particules, très fines	Opalescent clair, peu de particules, très fines
Montane® 60 / Montanox® 60 (Rapport)	1/3	Opalescent clair, peu de particules, très fines	Opalescent clair, peu de particules, très fines
	1/5	Opalescent très clair, peu de particules, très fines	Opalescent, peu de particules, très fines
Montane® 60 / Montanox® 65 (Rapport)	1/3	Opalescent, beaucoup de particules, grosses	Opaque, beaucoup de particules, grosses

Tableau 5-10 : Aspect des solutions aqueuses : Montane®65 /Montanox® 40, 60, 65.

ASPECT OBSERVE		Concentration de surfactant [p/p] / poids du mélange de surfactant	
		0,5% / 1g	1% / 2g
Montane® 65 / Montanox® 40 (Rapport)	1/3	Opaque, beaucoup de particules	Opaque, beaucoup de particules
Montane® 65 / Montanox® 60 (Rapport)	1/3	Opalescent, beaucoup de particules	Opaque, particules
Montane® 65 / Montanox® 65 (Rapport)	1/3	Opaque, beaucoup de particules	Opaque, particules

Tableau 5-11 : Aspect des solutions aqueuses : Montane® 40, 60, 65/ Vitamine E TPGS®.

ASPECT OBSERVE		Concentration de surfactant [p/p] / poids du mélange de surfactant	
		0,5% / 1g	1% / 2g
Montane® 40 / Vitamine E TPGS® (Rapport)	1/3	Opalescent clair, peu de particules, fines	Opalescent clair
	1/5	Opalescent clair, particules fines	Opalescent clair
Montane® 60 / Vitamine E TPGS® (Rapport)	1/3	Opalescent, beaucoup de particules	Opalescent, beaucoup de particules
	1/5	Opalescent clair, particules	Opalescent, beaucoup de particules
Montane® 65 / Vitamine E TPGS® (Rapport)	1/3	Opalescent, beaucoup de particules, très fines	Opaque, beaucoup de particules
	1/5	Opalescent, particules, très fines	Opalescent, beaucoup de particules

3.1. B. Etape 1. Discussion

Les solutions réalisées avec les mélanges de surfactants ayant une valeur de HLB élevée (tableau 5-5) sont généralement très claires voire limpides alors que les mélanges de surfactants à HLB basse conduisent à des solutions aqueuses opaques qui précipitent fréquemment.

Les mélanges de surfactants de HLB éloignées ont souvent eu tendance à précipiter : Montane® 40 ou 60 en mélange avec le Montanox® 40 ou la Vitamine E TPGS®.

La Vitamine E TPGS® se dissout aisément dans l'eau. Toutefois, les solutions obtenues opalescentes dans un premier temps ont eu tendance à précipiter après 24h (0,5 % et 1 % avec le Montane® 40 et 0,5 % avec le Montane® 60). Ce fait est peu important car les solutions seront séchées par la suite par nébulisation.

Pour l'Etape 2, qui concernent l'établissement de diagrammes de phases avec ces mélanges de surfactants et les substances actives, nous avons choisi des compositions donnant des solutions aqueuses limpides et stables aux quelques rapports et concentrations testées (0,5% et 1 %):

- Montane® 40 / Montanox® 40.
- Montane® 40 / Vitamine E TPGS®.

3.2. Etape 2. Diagrammes de phases des mélanges de surfactants en présence des substances actives

3.2. A. Principe des diagrammes de phase

Pour réaliser un diagramme de phase, il est nécessaire de définir le rôle de chaque excipient. Cette attribution suit des règles bien précises. Ici, nous avons deux surfactants et l'eau distillée. Dans un premier temps, l'excipient qui possède la HLB la plus faible est considéré comme la phase lipophile. L'excipient dont la HLB est la plus élevée est considéré comme le surfactant. Les diagrammes de phases des couples de surfactants sélectionnés ont été réalisés afin de mettre en évidence les zones de microémulsion.

Le protocole expérimental simplifié est présenté à la figure 5-4.

10 mélanges primaires de phase lipophile (Montane®) et de surfactant (Montanox® ou Vitamine E TPGS®) ont été préparés (tableau 5-12).

Après avoir ajouté lentement et progressivement des petits volumes d'eau distillée (0,5-1 ml) à 40 °C, les mélanges sont agités et observés visuellement. Si le mélange reste transparent, la solution est considérée être dans une zone de « microémulsion ». Après un certain volume d'eau ajoutée, dès que la solution devient trouble, la fin de la zone de microémulsion est notée. Sur les diagrammes de phases sont reportées les zones de microémulsions. L'apparition des gels n'est pas mentionnée.

Tableau 5-12 : Variation des quantités de surfactants pour les diagrammes de phase.

Montane® (g)	Montanox® ou Vitamine E TPGS® (g)
0	1
0,05	0,95
0,10	0,90
0,15	0,85
0,20	0,80
0,25	0,75
0,30	0,70
0,40	0,60
0,50	0,50
0,60	0,40
0,70	0,30
0,80	0,20
0,90	0,10
1,0	0

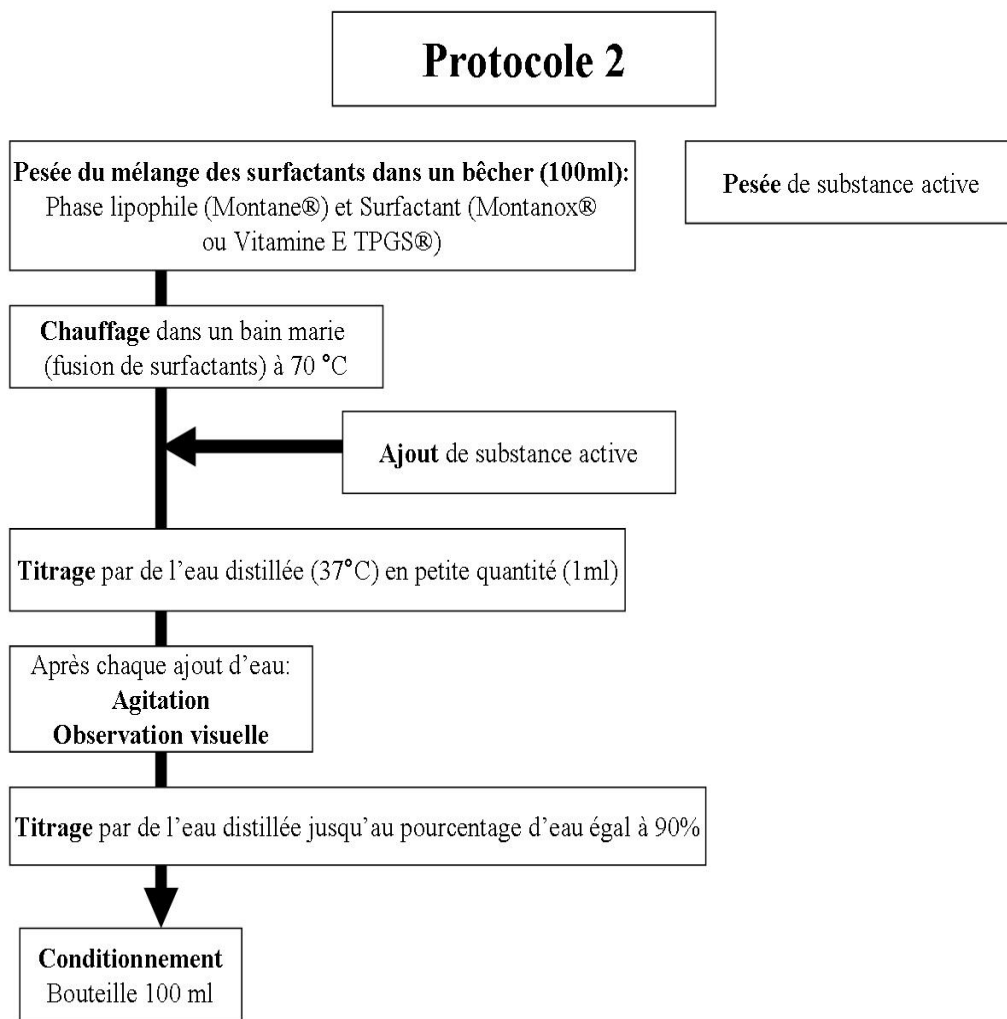


Figure 5-4 : Schéma général des modes opératoires mis en œuvre pour l'étape 2.

3.2. B. Etape 2. Résultats, diagrammes de phase

Nous avons utilisé les mélanges surfactants sélectionnés dans l'étape 1 : Montane® 40/Montanox® 40 et Montane® 40/Vitamine E TPGS®.

En se basant sur les résultats d'étude de solubilités du salbutamol base et du budésonide dans les différents mélanges de surfactants, nous avons choisi les concentrations suivantes :

- salbutamol base de 100 mg/g pour le mélange Montane® 40/Montanox® 40
- salbutamol base de 90 mg/g pour le mélange Montane® 40/Vitamine E TPGS®
- budésonide de 70 mg/g pour le mélange Montane® 40/Montanox® 40

- budésonide de 80 mg/g pour le mélange Montane®40/Vitamine E TPGS®

Sur tout le diagramme de phases, la concentration en substance active est constante. Les quantités d'eau ajoutée et de surfactants ont été converties en pourcentages afin de construire les diagrammes de phases. La masse totale des surfactants et de l'eau contenue dans la bouteille représente 100 %.

Les diagrammes de phases obtenus avec le salbutamol base sont représentés aux figures 5-5 et 5-6 ; par une coloration bleue sur le diagramme, les zones d'opalescence bleutée ou de microémulsion sont indiquées.

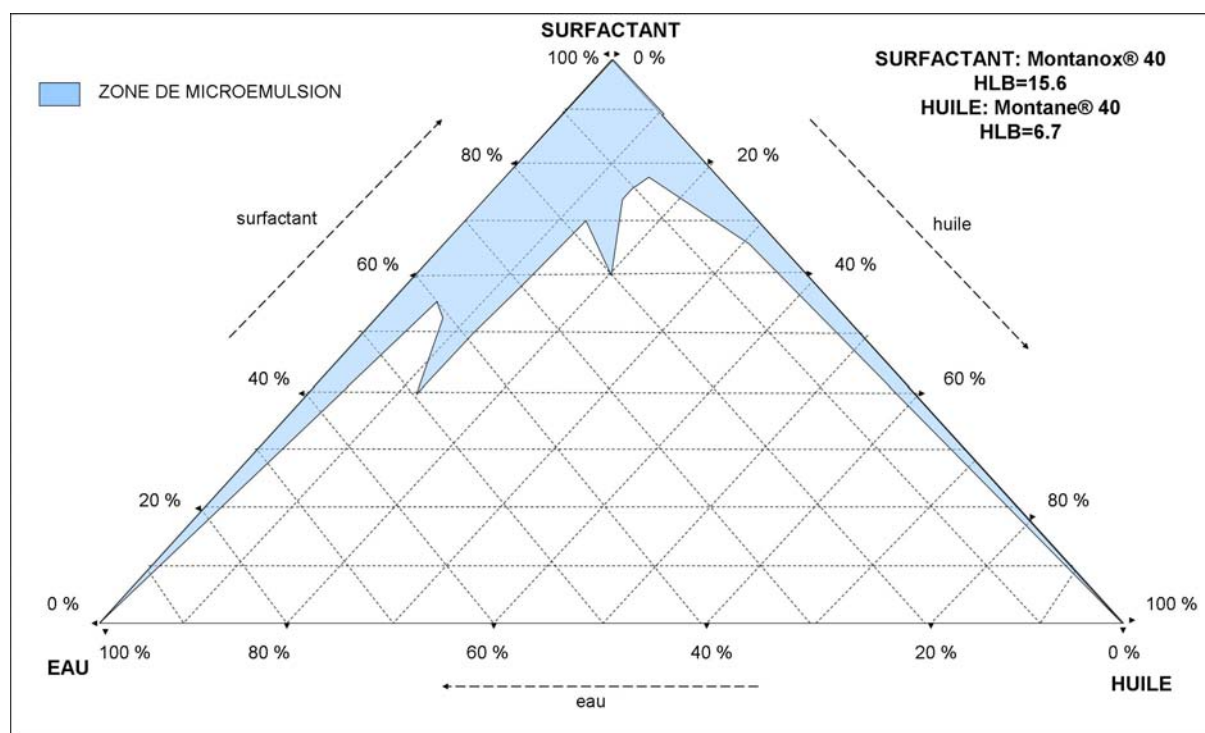


Figure 5-5 : Diagramme de phases du couple Montane® 40 - Montanox® 40 avec le salbutamol base.

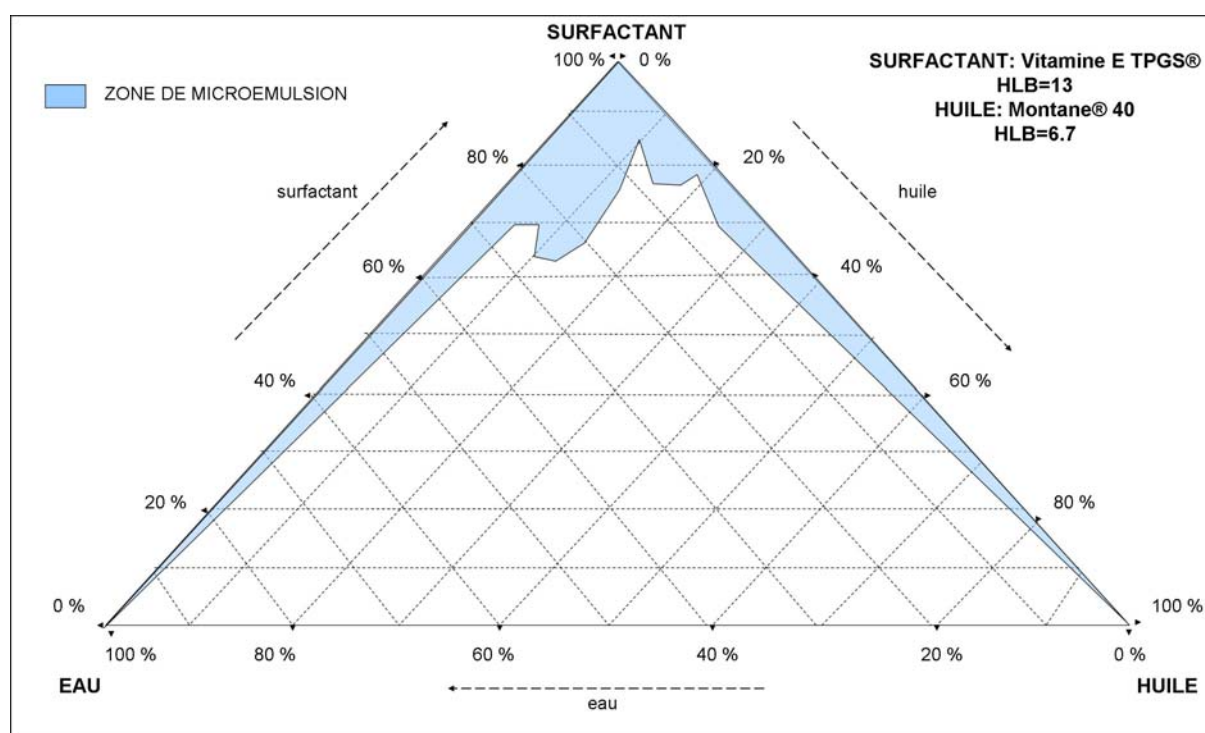


Figure 5-6 : Diagramme de phases du couple Montane® 40 - Vitamine E TPGS® avec le salbutamol base.

Les diagrammes de phases obtenus avec le budésonide se sont révélés identiques. Ceci s’explique par le fait que la présence de la substance active ne modifie pas les zones de microémulsions déterminées uniquement par la nature, le rapport et la concentration en surfactants.

Les échantillons de concentrations correspondant aux zones opalescentes et non gélifiées sont des microémulsions. Ces zones pourront être utilisées pour le choix de composition de microémulsions dans la suite des expérimentations

3.3. Etape 3. Préparation des microémulsions pour la nébulisation

Dans l’étape 3 (Figure 5-7) des microémulsions sont préparées en se basant sur les diagrammes de phases obtenus dans l’Etape 2, en présence de la substance active et de lactose.

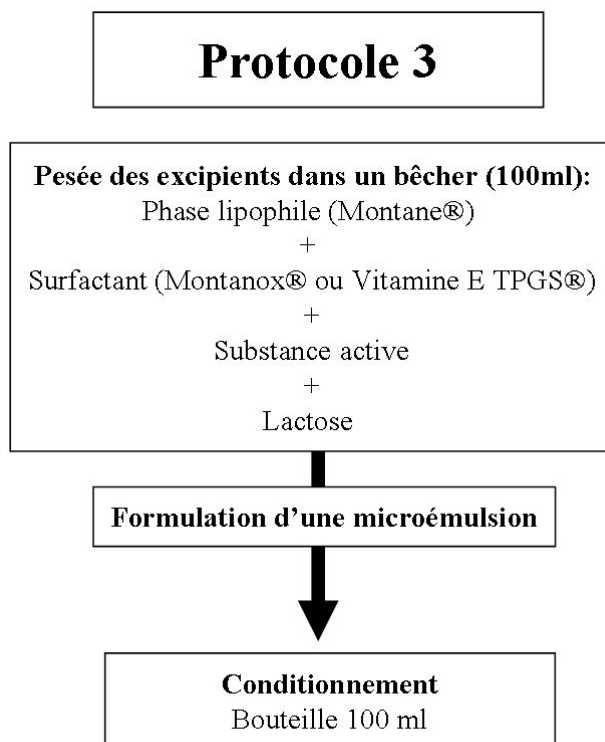


Figure 5-7 : Schéma général du protocole expérimental de l'Etape 3.

Dans les expériences suivantes, les couples de surfactants Montane® 40/Montanox® 40 et Montane® 40/Vitamine E TPGS® ont été maintenus. Le rapport 1/5 a été utilisé dans ces mélanges ainsi qu'une teneur finale de 0,5% en masse dans les formulations finales. Ces conditions permettent de se situer largement dans la zone de microémulsion déterminée par les diagrammes de phase.

Tous les mélanges contiennent des teneuses fixes en substances actives par rapport au mélange de surfactant : pour le salbutamol base 100 mg/g et pour le budésonide 10 mg/g.

Le lactose a été ajouté dans les préparations, pour faciliter l'obtention de particules solides lors de la nébulisation. La quantité de lactose est le dernier paramètre à optimiser pour atteindre une nébulisation efficace, et des poudres fines.

Dans les préparations contenant le mélange de surfactant Montane® 40/Montanox® 40, trois concentrations différentes de lactose ont été considérées : 5, 10 et 15 % (p/p) dans le mélange final (tableaux 5-13 et 5-14).

Dans les préparations contenant le mélange de surfactant Montane®40/Vitamine E TPGS®, uniquement la concentration de lactose à 15 % (p/p) dans le mélange final a été étudiée (tableaux 5-15 et 5-16). Le but de ces échantillons est d'étudier l'influence de la nature du surfactant hydrophile (Montanox® 40 ou Vitamine E TPGS®) sur la qualité des poudres obtenues.

Ainsi huit microémulsions (E1-E8) ont été préparées avec succès et seront celles qui seront retenues dans la suite du travail pour l'étape de nébulisation.

Tableau 5-13 : Compositions des microémulsions de salbutamol base avec le mélange de surfactant Montane®40/Montanox®40 (pour un total de 200 g de solution).

Microémulsion	Concentration de lactose % (p/p) dans la préparation	Poids de lactose (g)	Poids de l'eau (g)	Poids de substance active (g)	Poids de surfactants (g)	
					Montane®40	Montanox®40
E1	5	10	188,9	0,1	Montane®40	0.17
					Montanox®40	0.83
E2	10	20	179,9	0,1	Montane®40	0.17
					Montanox®40	0.83
E3	15	30	169,9	0,1	Montane®40	0.17
					Montanox®40	0.83

Tableau 5-14 : Compositions de microémulsions de budésonide avec le mélange de surfactant Montane®40/Montanox®40 (pour un total de 200 g de solution).

Microémulsion	Concentration de lactose %	Poids de lactose (g)	Poids de l'eau (g)	Poids de substance active (g)	Poids de surfactants (g)	
					Montane®40	Montanox®40
E4	5	10	188,9	0,01	Montane®40	0.17
					Montanox®40	0.83
E5	10	20	179,9	0,01	Montane®40	0.17
					Montanox®40	0.83
E6	15	30	169,9	0,01	Montane®40	0.17
					Montanox®40	0.83

Tableau 5-15 : Compositions de microémulsions de salbutamol base avec le mélange de surfactant Montane®40/Vitamine E TPGS® (pour un total de 200 g de solution).

Microémulsion	Concentration de lactose %	Poids de lactose (g)	Poids de l'eau (g)	Poids de substance active (g)	Poids de surfactants (g)	
					Montane®40	Vitamine E TPGS®
E7	15	30	169,9	0,1	0.17	0.83

Tableau 5-16 : Compositions de microémulsions de budésonide avec le mélange de surfactant Montane®40/Vitamine ETPGS® (pour un total de 200 g de solution).

Microémulsion	Concentration de lactose %	Poids de lactose (g)	Poids de l'eau (g)	Poids de substance active (g)	Poids de surfactants (g)	
					Montane® 40	Vitamine E TPGS®
E8	15	30	169,9	0,01	0.17	0.83

4. Nébulation des microémulsions, production de microparticules solides

4.1. Principe de la nébulisation

La technique de nébulisation, ou atomisation, comporte deux opérations, la dispersion et le séchage. La solution ou suspension est dispersée en fines gouttelettes par un atomiseur installé à l'intérieur d'une chambre à séchage parcourue par un courant d'air très chaud. Le courant d'air chaud soumet les gouttelettes dispersées à un mouvement cyclonique qui permet d'obtenir une surface de séchage très importante. L'énergie nécessaire à l'évaporation du solvant (ici l'eau) est apportée par l'air chaud et la dessiccation s'effectue immédiatement.

Le résidu sec, ou nébulisat, obtenu se présente sous la forme d'une poudre fine dont la granulométrie dépend des différents paramètres d'atomisation (température de séchage, vitesse de la dispersion...).

4.2. Équipement de nébulisation

L'équipement destiné à l'obtention des particules lipidiques est un atomiseur de laboratoire de type Büchi Mini Spray Dryer B-290 (Büchi Laboratory-Techniques, France).

Il se compose des éléments suivants :^{127, 128}

- Une pompe d'alimentation péristaltique.
- Un système d'atomisation pneumatique.

Ce mode de pulvérisation consiste à faire passer le liquide dans une buse au niveau de laquelle le contact avec un flux d'air provoque la pulvérisation sous forme de fines gouttelettes.

- Une chambre de séchage (cyclone) (Figure 5-8).

La solution à disperser est introduite au centre de la buse en mouvement à l'aide d'une pompe péristaltique. Le liquide parvient à la périphérie où il est désintégré en gouttelettes qui constituent un véritable brouillard. Le fluide nébulisé est mis en contact avec le milieu gazeux préchauffé dans une chambre dite de séchage ou d'évaporation. La température d'entrée du gaz y est régulée par l'appareil.

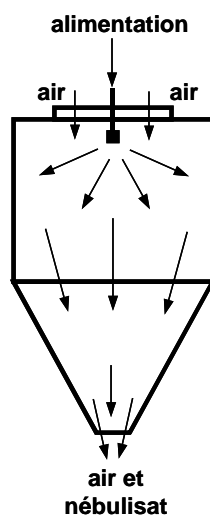


Figure 5-8 : Dispersion de la solution dans le cyclone de l'atomiseur.

- Un système de collecte des particules (Figure 5-9).

La chambre de séchage est de forme cylindro-conique. Elle est conçue afin que les gouttelettes y fassent le plus long trajet possible pour être parfaitement sèches avant d'arriver au contact des parois. L'air chaud est soufflé au niveau de la turbine puis circule vers le bas

emportant la poudre qui passe ensuite par le système de séparation avec récupération du nébulisat à la sortie.

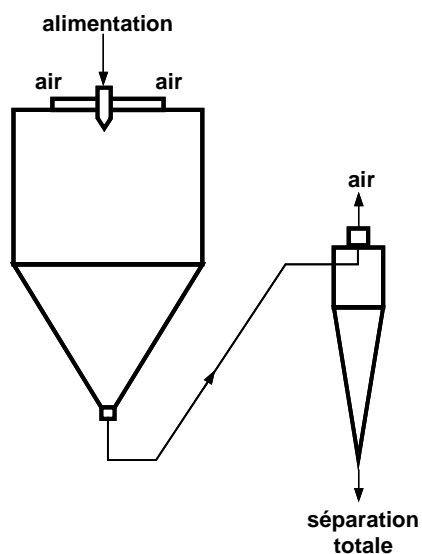


Figure 5-9 : Séparation du nébulisat.

L'atomisation nécessite l'adoption, d'une part, d'une température d'entrée élevée de façon à évaporer rapidement la totalité du solvant, et d'autre part, d'une température de sortie suffisamment basse pour éviter la fusion ou le ramollissement des matières grasses séchées (les surfactants).

A partir des huit microémulsions E1-E8 préparées au paragraphe 3.3 (tableaux 5-13 à 5-16), des expériences de nébulisation ont été réalisées.

Le mode opératoire décrit dans la figure 5-10 a été mis en œuvre.

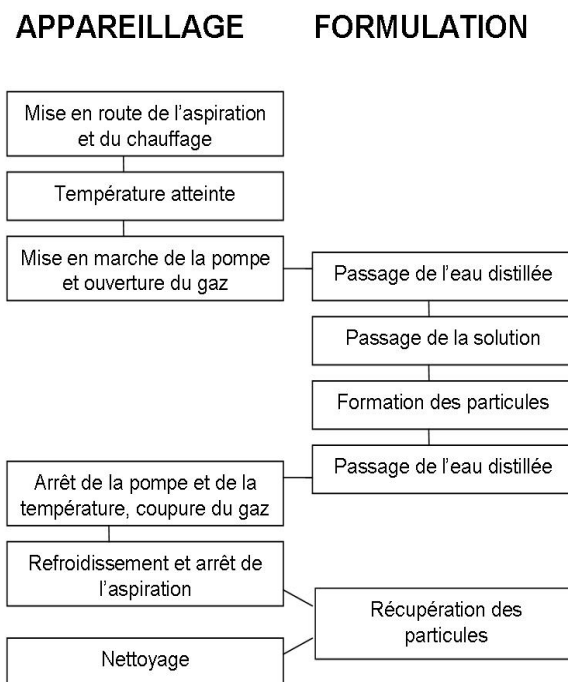


Figure 5-10 : Schéma des différentes opérations pour l'obtention de particules à partir d'un nébulisateur de type Büchi Mini Spray Dryer B-290.

Le nébulisateur a été mis en route avec une aspiration maximale (100%), et à une température précise (différentes températures ont été testées dans notre cas). Une fois la température atteinte, la valve du gaz au niveau de l'appareillage et de la bouteille de gaz (azote) a été ouverte, puis la pompe a été allumée.

Dans un premier temps, seule de l'eau distillée est aspirée. Dans un deuxième temps, la solution est aspirée et donne lieu à la formation de particules dans le cyclone qui sont finalement récupérées dans le récipient de collecte.

Lors de la nébulisation, les propriétés physicochimiques de la solution d'une part et les nombreux paramètres mécaniques de l'appareillage d'autre part influencent l'aspect, le caractère, la taille, la forme et la densité des particules formées. Ces paramètres doivent être optimisés pour permettre l'obtention d'une poudre qui rencontre les caractéristiques les plus proches possibles de celles souhaitées.

Les paramètres de l'appareil sont les suivants :

La pression de gaz :

Le débit d'azote est réglé à l'aide d'un rotamètre fixé à la bombonne de gaz et au niveau de l'appareillage. Plus le débit augmente, plus la pompe injectera rapidement la solution.

La pompe péristaltique :

Elle permet d'injecter la solution. En pratique, sa puissance varie de 0 à 50%. Quand on augmente le pourcentage, on augmente le volume de solution pulvérisé et par conséquent la taille des particules.

L'aspirateur :

L'aspiration permet d'aspirer l'air qui traverse le nébulisateur. En pratique, sa puissance varie de 50 à 100% et son débit maximum est de 35 m³/h. Quand le volume d'air aspiré augmente, la taille des particules diminue car elles restent moins longtemps dans le cyclone. Pendant nos expériences, l'aspiration a été maintenue à 100% sachant que l'obtention de particules de très petites tailles est requise.

La température d'entrée de la solution :

C'est la température à laquelle va être soumis le faible volume de solution contenu dans la buse et qui permettra la nébulisation par évaporation du solvant, l'eau dans le cas présent. La température a été adaptée en fonction des points de fusion des composés de la solution : elle doit être suffisamment élevée pour permettre l'évaporation du solvant sans pour autant détruire les autres substances en l'occurrence les principes actifs, les surfactants et le lactose.

4.3. Expériences de nébulisation

4.3. A. Sélection des conditions de nébulisation

Pour déterminer les conditions optimales d'atomisation nous avons fait varier les températures d'entrée du gaz ($T_{\text{entrée}}$) et le débit de la pompe péristaltique (tableau 5-17). La puissance d'aspiration maximale et une pression de 6 bars d'azote ont été utilisées pour toutes les expériences.

Le lactose devient anhydre à 120°C et a une température de fusion de 201-202°C. Les différents surfactants fondent entre 40 et 50°C, le salbutamol base et le budésonide ont une température de fusion respectivement de 155°C et à 230°C. D'une façon générale, notre

choix a été d’augmenter la température $T_{\text{entrée}}$ avec la teneur en lactose dans la microémulsion. D’autre part, la présence de budésonide permet d’envisager des températures plus élevées qu’avec le salbutamol base.

En ce qui concerne la pompe, le meilleur débit (en pourcentage) est proche de 15%. En effet, si la pompe a un débit trop élevé, le volume qui sort est plus important et comme l’aspiration a été fixée à 100%, les particules sont alors trop mouillées et adhèrent aux différentes parties de du nébulisateur.

Le détail des compositions des microémulsions E1-E8 est repris dans les tableaux 5-13 à 5-16 du paragraphe 3.3.

Tableau 5-17 : Variation des paramètres de l’appareillage pour les différents échantillons.

Echantillon	% de lactose de la solution	T d’entrée (°C)	% de la pompe	Pression d’azote (en bar)	% aspiration
E1	5%	140	30	6	100
E2	10%	150	20	6	100
E3	15%	160	15	6	100
E4	5%	150	20	6	100
E5	10%	130	20	6	100
E6	15%	180	15	6	100
E7	15%	160	15	6	100
E8	15%	180	15	6	100

4.3. B. Poudres obtenues

Au cours de la nébulisation, des pertes de matériel sont dues au dépôt des particules sur l’appareillage. Ces pertes ont été constatées quels que soient les échantillons et la quantité de poudre finale obtenue et influencent par conséquent le rendement. En effet, plus la quantité de poudre produite est faible, plus les pertes sont proportionnellement importantes et plus le rendement est affecté.

Au cours des expériences, nos observations nous ont conduits à la conclusion suivant laquelle la production de poudres avec un rendement convenable et une taille adéquate pour

une administration pulmonaire nécessite un contrôle rigoureux de la température de sortie (T_{sortie}) de l'air de séchage. En effet, une T_{sortie} trop basse conduit à l'adhésion des particules sur les parois du cyclone par suite d'une évaporation incomplète du solvant. De même, une T_{sortie} trop élevée entraîne certes une évaporation totale du liquide pulvérisé, mais le rendement obtenu est diminué à cause du ramollissement et/ou de la fusion des corps gras (surfactants) utilisés.

La température de sortie est donc un des paramètres opératoires les plus critiques à ajuster lors d'une atomisation. Malheureusement, nous n'avons pas eu la possibilité de reprendre une étude d'optimisation de la température T_{sortie} .

Les poudres issues de chaque expérience sont étudiées dans les paragraphes suivants pour déterminer le teneur en principe actif, les tailles des particules et leurs propriétés aérodynamiques.

5. Détermination de tailles de particules par analyse granulométrique

5.1. Principe de la diffraction laser

L'analyse granulométrique des particules a été réalisée à l'aide d'un granulomètre laser LA-950 permettant des déterminations de tailles de 0,01 à 3000 μm .

La taille d'une particule est un paramètre relativement complexe à exprimer de façon universelle. Dans le cadre de ce travail, la taille et la distribution granulométrique des échantillons a été appréciée en les mesurant par diffraction laser. Le principe de cette technique repose sur la diffraction, dans toutes les directions, d'un faisceau lumineux par les particules à analyser. L'intensité de cette diffraction dépend de la taille des particules. Des particules de grande taille correspondent à une intensité importante avec un angle de diffraction faible. Une diminution graduelle de l'intensité du flux lumineux, lorsque l'on va vers des angles plus larges, caractérise des particules de petite taille.^{129, 130}

D'une manière générale, un échantillon représentatif, dispersé à une concentration adéquate soit dans un liquide soit dans un gaz approprié, traverse un faisceau de lumière monochromatique, habituellement produit par une source laser. La lumière diffusée par les

particules sous différents angles est détectée au moyen d'un multidétecteur et le signal reçu est converti en données numériques. Ces dernières sont transformées, au moyen d'un modèle optique et d'un algorithme mathématique appropriés, en une distribution granulométrique en volume.

5.2. Granulométrie des poudres obtenues par nébulisation

Le procédé d'obtention de particules par atomisation a permis d'obtenir des poudres fines dont les distributions de taille s'étendent de 8 à 400 μm , avec dans le meilleur des cas plus de 85 % des particules ayant un diamètre d'environ 8 μm , ce qui correspond à la taille requise pour atteindre les alvéoles pulmonaires. Les résultats sont mentionnés dans le tableau 5-18 et les graphiques sont repris à l'annexe 5-1.

Tableau 5-18 : Mesure des tailles des particules par diffraction laser.

Échantillon	Sonication pendant la mesure	Nombre de populations	Caractéristiques des populations
E1	NON	1	Diamètre moyen : 400 μm ; écart type : 361 μm
	OUI	1	Diamètre moyen : 62 μm ; écart type : 45 μm
E2	NON	2	Population 1 : 400 μm – maximum 88 % d'intensité Population 2 : 20 μm – maximum 11 % d'intensité
	OUI	2	Population 1 : 80 μm – maximum 74 % d'intensité Population 2 : 20 μm – maximum 36 % d'intensité
E3	NON	2	Population 1 : 400 μm – maximum 62 % d'intensité Population 2 : 50 μm – maximum 32 % d'intensité
	OUI	2	Population 1 : 60 μm – maximum 32 % d'intensité Population 2 : 11 μm – maximum 82 % d'intensité
E4	NON	2	Population 1 : 400 μm – maximum 82 % d'intensité Population 2 : 13 μm – maximum 7 % d'intensité
	OUI	2	Population 1 : 90 μm – maximum 72 % d'intensité Population 2 : 13 μm – maximum 25 % d'intensité
E5	NON	1	Diamètre moyen : 457 μm ; écart type : 343 μm
	OUI	2	Population 1 : 200 μm – maximum 78 % d'intensité Population 2 : 11 μm – maximum 12 % d'intensité
E6	NON	2	Population 1 : 60 μm – maximum 22 % d'intensité Population 2 : 11 μm – maximum 83 % d'intensité
	OUI	1	Diamètre moyen : 8 μm ; écart type : 5 μm
E7	NON	3	Population 1 : 200 μm – maximum 30 % d'intensité Population 2 : 50 μm – maximum 52 % d'intensité Population 3 : 16 μm – maximum 42 % d'intensité
	OUI	2	Population 1 : 50 μm – maximum 44 % d'intensité Population 2 : 11 μm – maximum 68 % d'intensité
E8	NON	2	Population 1 : 400 μm – maximum 40 % d'intensité Population 2 : 45 μm – maximum 53 % d'intensité
	OUI	1	Diamètre moyen : 8 μm ; écart type : 4 μm

Chacun des échantillons a été mis en suspension dans l'éthanol pour réaliser les mesures de diffraction laser. L'appareil utilisé permet d'appliquer des ultrasons pendant le temps de l'expérience de diffraction (6 minutes). Chaque suspension a été analysée deux fois avec et sans ultrasons. Dans chaque cas, les tailles des particules mesurées en l'absence d'ultrasons sont plus importantes (tableau 5-18). Il est probable que les ultrasons permettent de séparer les particules plus efficacement au sein des suspensions. Les mesures réalisées dans ces cas-ci seraient donc plus précises pour caractériser la taille des particules des échantillons E1-E8.

Nous ne discuterons que les expériences de diffraction laser réalisées en présence d'ultrasons.

Selon les échantillons étudiés, les graphiques de diffractions présentent une ou plusieurs populations de particules, centrées sur des diamètres moyens (voir les graphiques de diffractions reproduits en annexe 5-1). Le nombre de populations observées sur chaque graphique est indiqué dans le tableau 5-18. Dans les cas où une seule population est observée, celle-ci est décrite par un diamètre moyen et l'écart type associé à la distribution « en cloche ». Si plusieurs populations sont observées, chacune d'entre-elles est décrite par un diamètre moyen et une valeur d'intensité exprimée en % selon une unité arbitraire qui correspond au maximum des distributions (voir les graphiques de diffraction en annexe).

Les analyses des quatre échantillons de salbutamol base E1-E4 montre la présence de deux populations, la première au-delà de 60 μm et la seconde autour de 10 μm . A l'exception des autres poudres, E1 qui comprend une unique population centrée sur 62 μm . Puisque nous recherchons des tailles de particules faibles, le meilleur résultat est obtenu avec E3 pour lequel la population centrée autour de 11 μm est très majoritaire. E3 est l'échantillon qui comprend la quantité maximale de lactose (15 %) et a été produit à la température d'atomisation la plus forte (160°C). La substitution du Montanox® 40 par la Vitamine E TPGS® n'est pas souhaitable, comme l'indique le résultat obtenu avec E4, malgré une forte quantité de lactose dans l'échantillon.

Les résultats obtenus avec les poudres contenant le budésonide sont meilleurs puisque tous les échantillons sauf E5 renferment très majoritairement des particules dont la taille est centrée aux alentours de 10 μm . E5, qui contient des particules très grosses (autour de 200 μm) a été produit à une température d'atomisation particulièrement faible, de 130°C. Les deux meilleurs résultats obtenus avec E6 et E8 correspondent à des mesures de populations uniques

centrées autour de $8\mu\text{m}$. Ces deux échantillons contiennent des surfactants différents, des proportions de lactose différentes mais ont tous deux été produits à des températures d'atomisation particulièrement élevées (180°C). Ce dernier paramètre apparaît donc primordial pour obtenir des poudres fines. Il est à noter que le budésonide peut supporter des températures importantes au contraire du salbutamol base.

Enfin, les résultats obtenus avec deux échantillons produits dans des conditions similaires (même mélange de surfactants, même proportion de lactose, même température d'atomisation) mais à partir de substances actives différentes, E7-budésonide et E3-salbutamol base, donnent des résultats similaires en diffraction de lumière (2 populations autour de $50\mu\text{m}$ et $11\mu\text{m}$, dans les mêmes proportions). Cette observation prouve la bonne reproductibilité de la préparation des poudres malgré la variation des substances actives.

Pour conclure, selon les résultats obtenus par diffraction laser, les conditions favorables pour l'obtention de poudres fines sont une forte quantité de lactose (15%) et une température d'atomisation élevée (180°C). Les deux mélanges de surfactants Montane® 40/Montanox® 40 et Montane® 40/Vitamine E TPGS® n'ont pas montré de différences ici.

6. Dosage des principes actifs dans les poudres obtenues par nébulisation

6.1. Instrumentation pour la chromatographie liquide haute performance (CLHP)

Le salbutamol base est dosé par chromatographie liquide en phase inverse. Une colonne de type CC125/4 Lichrospher 100-5 RP-8 (longueur = 0,125 m ; diamètre = 4,0 mm, phase stationnaire : gel de silice octylsilylé $-5\mu\text{m}$ -, à particules sphériques, d'un diamètre de pores de 10 nm) a été utilisée (Macherey-Nagel, France). La phase mobile est un mélange d'acétonitrile : eau (70:30 v/v), ajusté à $\text{pH} = 3,5$ avec de l'acide phosphorique R à 0,11% (v/v). Elle est pompée de manière isocratique à un débit de 1 ml/min. Un volume de $20\mu\text{l}$ est injecté dans la colonne à l'aide d'un injecteur automatique. La détection se fait à 280 nm, à

l'aide d'un détecteur UV. Le détecteur est relié à un intégrateur.

Le budésonide est dosé par chromatographie liquide en phase inverse avec les mêmes conditions expérimentales. La phase mobile est composée d'acétonitrile : eau (50:50 v/v) ajustée à pH= 3,5 avec de d'acide phosphorique R à 0,11% (v/v). Le débit de la pompe est de 1,5 ml/min.

6.2. Droites d'étalonnage pour le dosage des principes actifs

Pour le salbutamol base, une gamme de dilution a été réalisée à l'aide d'échantillons étalons afin de déterminer les quantités de substance active dans chaque solution analysée. Le temps de rétention du salbutamol base est de 2,4 minutes dans les conditions expérimentales détaillées ci-dessus.

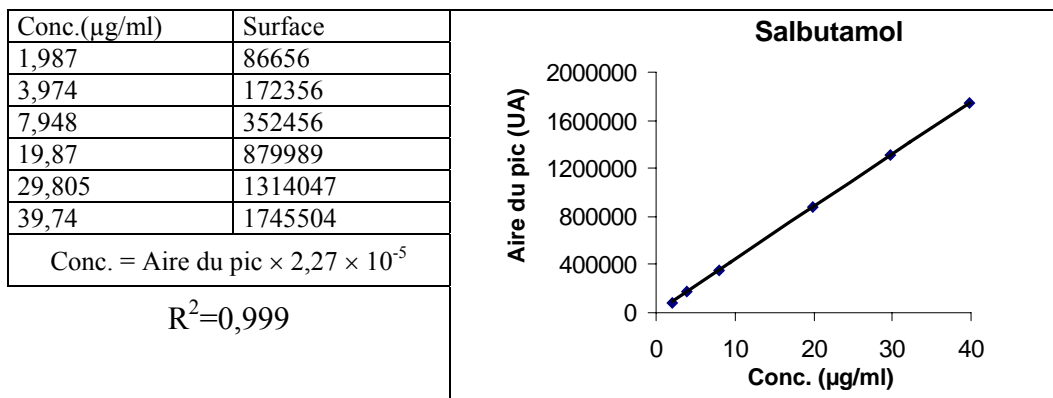


Figure 5-11 : Droite d'étalonnage pour le salbutamol base.

Également pour le budésonide, une gamme de dilution a été réalisée à l'aide d'échantillons étalons afin de déterminer les quantités de substance active dans chaque poudre. Le temps de rétention du budésonide est de 2,6 minutes dans les conditions expérimentales détaillées ci-dessus.

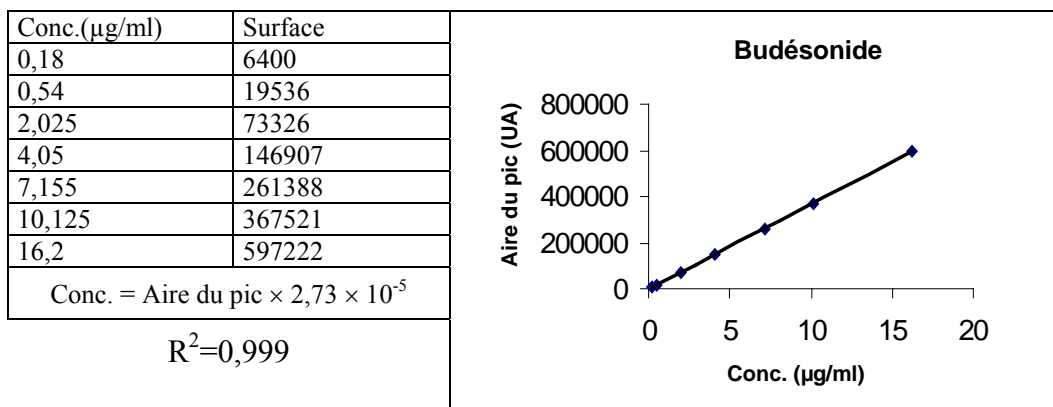


Figure 5-12 : Droite d'étalonnage pour le salbutamol base.

6.3. Dosage des principes actifs dans les poudres

6.3. A. Préparation des solutions

Préparation des échantillons de salbutamol base E1, E2, E3:

La poudre pesée est introduite dans une fiole jaugée de 5,0 ml. Elle est dissoute dans 1,0 ml d'eau. Un mélange méthanol/eau : 50/50 est ensuite ajouté jusqu'au trait de jauge. Enfin 0,5 ml de cette solution est prélevé et mélangé à 0,5 ml du mélange méthanol/eau : 50/50 (dilution globale de la poudre pesée dans 10 mL de solution).

Préparation d'échantillon de salbutamol base E7

La poudre pesée est introduite dans une fiole jaugée de 5,0 ml. Elle est dissoute dans 1,0 ml d'eau. Un mélange acétonitrile/eau : 50/50 est ensuite ajouté jusqu'au trait de jauge. Enfin 0,5 ml de cette solution est prélevé et mélangé à 0,5 ml du mélange acétonitrile/eau : 50/50 (dilution globale de la poudre pesée dans 10 mL de solution).

Préparation des échantillons de budésonide E4, E5, E6, E8

La poudre pesée est dissoute dans 5,0 ml d'acétonitrile. La solution est ensuite soumise aux ultrasons pendant 10 minutes pour extraire le budésonide et centrifugée 5 minutes à 3000 tours/ min. 1,0 ml du surnageant a été prélevé et dilué par 300 µl d'eau avant d'être injecté (dilution globale de la poudre pesée dans 6,5 mL de solution).

6.3. B. Résultats des dosages

Chacun des échantillons liquides préparés à partir des poudres obtenues par nébulisation des microémulsions E1-E8 a été en CLHP en duplicat. A partir des aires mesurées sur les chromatogrammes les concentrations en substances actives ont été calculées dans les échantillons liquides. Ces valeurs ont été converties en teneur massique des substances actives dans les poudres nébulisées issues de E1 à E8 (tableaux 5-19 et 5-20).

Les teneurs massiques en salbutamol base et en budésonide mesurées dans les poudres ont été comparées aux teneurs massiques théoriques (calculées à partir de la composition

initiale des microémulsions E1 à E8 - tableau 5-13 à 5-16 -en considérant une évaporation totale de l'eau lors de la nébulisation).

Tableau 5-19 : Résultats de l'analyse par CLHP pour les poudres contenant du salbutamol base.

Échantillon	Masse de poudre analysée (mg)	Aire mesurée pour deux injections (UA)	Aire moyenne (UA)	Concentration moyenne en salbutamol base (µg/ml)	Masse de salbutamol base dans la poudre pesée (µg)	Teneur en salbutamol base dans la poudre (µg/mg)	Teneur en salbutamol base théorique dans la poudre (µg/mg)	Fraction de salbutamol base retrouvée
E1	116,89	4214458 4224172	4219315	95,79	957,9	8,19	9,00	91 %
E2	219,02	4598726 4463777	4531251,5	102,85	1028,5	4,69	4,73	99 %
E3	351,13	5068229 4959649	5013939	113,82	1138,2	3,24	3,21	100 %
E7	344,18	5239274 5023315	5131294,5	116,48	1164,8	3,38	3,21	100 %

Tableau 5-20 : Résultats de l'analyse par CLHP pour les poudres contenant du budésonide.

Échantillon	Masse de poudre analysée (mg)	Aire mesurée pour deux injections (UA)	Aire moyenne (UA)	Concentration moyenne en budésonide (µg/ml)	Masse de budésonide dans la poudre pesée (µg)	Teneur en budésonide dans la poudre (µg/mg)	Teneur en budésonide théorique dans la poudre (µg/mg)	Fraction de budésonide retrouvée
E4	259,52	685701 681172	683436,5	18,65	121,22	0,47	0,91	51 %
E5	560,6	1078205 1078116	1078160,5	29,43	191,29	0,34	0,47	73 %
E6	710	885192 900120	892656	24,36	158,34	0,22	0,32	67 %
E8	730,28	966045 963188	964616,5	26,33	171,14	0,23	0,32	72 %

Ces résultats indiquent que la teneur massique en salbutamol base correspond à la teneur théorique attendue dans tous les échantillons (E1-E3 et E7), démontrant la bonne formation de la microémulsion.

Les analyses pas CLHP des échantillons contenant le budésonide indiquent un moins bon recouvrement de la substance active par rapport au taux massique théorique. Ceci pourrait être dû au manque d'efficacité du procédé d'extraction du budésonide à partir des poudres

(voir le paragraphe 6.3.A.). Dans ce cas, les valeurs de la fraction de budésonide retrouvée (tableau 5-20) seraient sous-estimées par rapport aux pourcentages réels.

Pour poursuivre notre étude (conditionnement, évaluation aérodynamique) nous avons retenus les poudres issues de E3 et E7 qui renferment le salbutamol base et les poudres issues de E6 et E8 qui renferment du budésonide.

7. Etude des comportements aérodynamiques par la cascade d'Andersen

7.1. Principe de la cascade d'Andersen

Nous avons utilisé l'impacteur à cascade multi-étages (Cascade d'Andersen) représenté sur la figure 5-13.

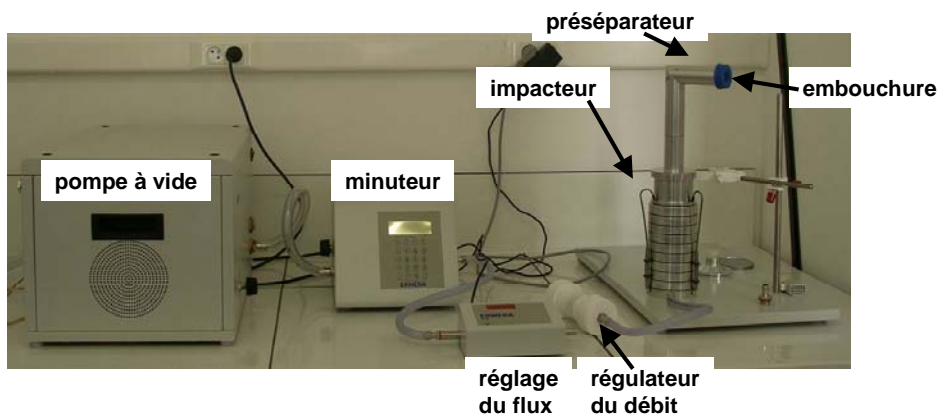


Figure 5-13 : Impacteur à cascade multi-étages (Cascade d'Andersen).

Cet appareil permet l'évaluation aérodynamique des particules fines en caractérisant le dépôt des particules en fonction de leurs tailles dans des tamis mimant les voies pulmonaires.

Un dispositif pour inhalation (IPS) est adapté à l'une des extrémités du récupérateur de poudre, tandis que la pompe est connectée à l'autre extrémité. Une fois l'IPS chargé, la pompe est mise en marche et le débit est réglé au moyen du régulateur de façon à appliquer à travers l'inhalateur une pression différentielle (lue sur le manomètre différentiel) de 4,0 kPa (40,8 cm H₂O).

Une gélule contenant la poudre à analyser est placée dans une encoche de forme adéquate, et est percée aux deux extrémités au moyen de quatre fines aiguilles. Lors de « l'inhalation », elle passe dans la chambre de rotation et se met à tourner grâce aux turbulences induites par l'aspiration. Ce mouvement de rotation provoque la sortie de la poudre due à la force centrifuge, et la grille, placée au-dessus de la chambre de rotation, contribue fortement à l'éclatement et à la redispersion des agglomérats sous forme de particules individualisées.

Lorsque l'aspiration est terminée, l'appareillage est démonté et le contenu en principe actif est récupéré lors d'une étape de rinçage (méthode décrite ci-dessous). L'opération a été répétée dix fois pour chaque formulation.

La Pharmacopée Européenne 5-2 (2.9.18) recommande pour la détermination de l'uniformité de la dose délivrée, tout comme pour la détermination de la fraction respirable, de mesurer précisément le flux d'inhalation qui devra être utilisé pour les études *in vitro* de chaque dispositif à poudre sèche étudié. Pour effectuer cette mesure, on applique une pression constante de 4 kPa au moyen d'une pompe à vide à travers l'embout de l'IPS ; une fois cette valeur atteinte, le manomètre est retiré et remplacé par un débitmètre. Le flux indiqué est alors le flux applicable pour les tests *in vitro*.

Le débit est réglé à 28,3 l/min d'après la Pharmacopée Européenne et la durée de l'essai a été de 8,4 secondes pour correspondre au volume d'inspiration recommandé (4 litres).

Le protocole utilisé comprend les étapes suivantes :

- Le dispositif est connecté. La gélule contenant la poudre à étudier est percée et 3 à 4 aspirations sont effectuées pour vider la gélule complètement.
- Une fois l'appareillage arrêté, l'embouchure, le pré-séparateur et les différents tamis sont rincés avec des solvants appropriés de façon à récupérer la poudre qui sera dosée par CLHP afin de déterminer la concentration en substance active qui est arrivée sur les différents tamis mimant l'arbre bronchique.
- Les dimensions des différents tamis de T0 à T7 sont reprises dans le tableau 5-21.

Tableau 5-21 : Description des différents tamis de T0 à T7.

Tamis	Description	Numéro	Dimension (mm)
T0	Etage 0 - diamètre de buse	96	2,55 ± 0,025
T1	Etage 1 - diamètre de buse	96	1,89 ± 0,025
T2	Etage 2 - diamètre de buse	400	0,914 ± 0,0127
T3	Etage 3 - diamètre de buse	400	0,711 ± 0,0127
T4	Etage 4 - diamètre de buse	400	0,533 ± 0,0127
T5	Etage 5 - diamètre de buse	400	0,343 ± 0,0127
T6	Etage 6 - diamètre de buse	400	0,254 ± 0,0127
T7	Etage 7 - diamètre de buse	201	0,254 ± 0,0127

Dans toutes nos expériences, les paramètres de pression de la pompe ont été les suivants :

P1= 4.91 kPa, P2= 87 kPa et P3= 34 kPa

D’après la Pharmacopée Européenne 5-2, il faut que $P3/P2 \leq 0,5$ pour que le débit critique soit atteint et donc que la pompe soit assez puissante.

7.2. Conditionnement des poudres pour l’inhalation

7.2. A. Dispositifs d’administration

Les dispositifs d’administration repris sur la figure 5-14 ont été utilisés pour les essais de délivrance. L’appareil 1 est utilisé avec des gélules de taille 3 qu’il perfore aux deux extrémités avec 4 pics. L’appareil 2 est quant à lui avec des gélules de taille 2 qu’il perfore aux deux extrémités avec 1 pic.



Appareil 1 : Cyclohaler® / Pharmachemie ; Foradil® / Novartis

Appareil 2 : Ingelheim & Handihaler® /Boehringer Ingelheim

Figure 5-14 : Dispositifs de délivrance.

7.2. B. Conditionnement des poudres dans des gélules

Les poudres issues de la nébulisation des microémulsions E1-E8 ont été conditionnées dans des gélules adaptées aux dispositifs d'administrations.

Les gélules ont été obtenues auprès des laboratoires Qualicaps. Elles sont nommées **Quali-V®-I capsules** (Figures 5-15), sont en hypromellose d'origine végétale et ont différents volumes (tableau 5-22).

Ces gélules sont mieux adaptées aux poudres pour l'inhalation unidose que des gélules en gélatine car elles contiennent moins d'humidité, produisent moins d'électricité statique et ont une bonne aptitude à la perforation. De plus, elles sont transparentes, ce qui laisse voir le contenu et permet de contrôler si l'inhalation a bien permis de vider la gélule ou si il faut reproduire l'inhalation comme expliqué dans la notice.



Figure 5-15 : Quali-V®-I capsules, de taille 2 à gauche et de taille 3 à droite.

Les gélules de taille 2 (contenance 0,4 ml) proviennent du lot E0403578 et sont transparentes et les gélules de tailles 3 (contenance 0,3 ml) proviennent du lot E0604819 et sont aussi transparentes.

Les gélules ont été conditionnées une à une. La poudre a été pesée individuellement pour chacune des gélules.

Tableau 5-22 : Volume maximal contenu dans les différentes tailles de gélules Quali-V®-I capsules.

Taille	2	3	4	5
Volume (en ml)	0,4	0,3	0,22	0,15

Pour les échantillons E3, E7, E6 et E8, nous avons déterminé la masse de poudre contenant environ approximativement une dose de principe actif de 200 µg ainsi que le volume occupé par cette poudre (tableaux 5-23) déterminé dans une éprouvette graduée.

Tableau 5-23 : Volume équivalent à une dose de 200 µg de principe actif.

Échantillon	Masse pesée pour atteindre une dose de substance active de 200 µg (en mg)	Volume de poudre pour une dose de 200 µg de principe actif (en ml)
E3	59,5	0,17
E7	62,3	0,20
E6	529,0	1,3
E8	625,0	1,5

Les poudres ne sont pas tassées et les gélules ont été conditionnées une à une. Les échantillons E3 et E7 qui contiennent du salbutamol base ont été conditionnés en gélules de taille 3 et les échantillons E6 et E8 qui contiennent du budésonide ont été conditionnés dans plusieurs gélules de taille 2.

Dans le tableau 5-24, le nombre de gélules fabriquées à partir de chaque poudre est détaillé, ainsi que leur masse.

Tableau 5-24 : Paramètres de conditionnement des gélules.

Échantillon	Taille de gélule	Poids de poudre max par gélule (en mg)	Nombre de gélule	Poids moyen de poudre par gélule (en mg)	Poids total de poudre (en mg)
E3	3	60	10	60,8	608,2
E7	3	27	5	26,72	133,6
E6	2	100	15	103,54	1553,1
E8	2	80	30	79,7	2393,1

7.3. Etude des poudres par la cascade d'Andersen

7.3. A. Récupération des poudres sur les tamis par le solvant.

L'embout (E), le pré-séparateur (PS) et chaque tamis (T0 à T7) de l'impacteur à cascade ont été rincés avec un solvant ou un mélange de solvants adapté au-dessus de deux entonnoirs de taille dégressive (Figure 5-16). La solution finale a été récupérée dans un ballon jaugé de volume adapté.

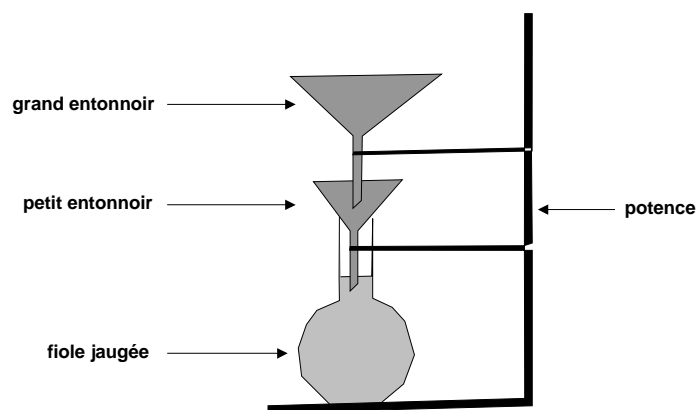


Figure 5-16 : Montage pour la récupération de la poudre par le solvant.

7.3.A. Echantillons produits par l'analyse des poudres issues des microémulsions

Etudes de la poudre issue de la microémulsion E3

Nous avons utilisé des gélules de taille 3 et le dispositif Cyclohaler®. Dix gélules correspondant à une dose approximative de 200 µg de principe actif ont été utilisées. Les tamis de la cascade d'Andersen ont été nettoyés avec au maximum 5 ml de solution dans un premier temps, et ensuite avec de l'eau distillée puis avec un mélange éthanol/eau : 50/50.

Etudes de la poudre issue de la microémulsion E7

Nous avons utilisé des gélules de taille 3 et le dispositif Cyclohaler®. Cinq gélules contenant une dose de poudre correspondant à 600 µg de principe actif chacune ont été utilisées. La poudre sur les tamis a été récupérée avec de l'acétonitrile dans un premier temps puis par un mélange acétonitrile/eau : 50/50.

Etudes de la poudre issue de la microémulsion E6

Nous avons utilisé des gélules de taille 2 et le dispositif Ingelheim®. Quinze gélules contenant une dose de poudre correspondant à 50 µg de principe actif chacune ont été utilisées. La poudre sur les tamis a été récupérée avec de l'acétonitrile.

Études de la poudre issue de la microémulsion E8

Nous avons utilisé des gélules de taille 2 et le dispositif Ingelheim®. Trente gélules contenant une dose de poudre correspondant à 50 µg de principe actif chacune ont été utilisées. La poudre sur les tamis a été récupérée avec de l'acétonitrile. Nous avons obtenu 10 solutions à doser par CLHP.

7.3. C. Dosage par CLHP des substances actives sur les différents tamis de la cascade d'Andersen

Les conditions de dosage par CLHP du salbutamol base et du budésonide sont identiques à celles détaillées précédemment (paragraphe 6). Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux de 5-24 à 5-27.

Tableau 5-24 : Études de la poudre issue de la microémulsion E3.

Solution dosée par CLHP	Aire du pic	Concentration en salbutamol base (µg/ml)	Quantité de salbutamol base récupérée (µg)	Pourcentage de la fraction de salbutamol base récupérée
T0	417175	9,463	47,315	4,0
T1	337393	7,65	38,25	3,2
T2	552189	12,532	62,66	5,3
T3	222472	5,038	25,19	2,1
T4	415172	9,418	47,09	4,0
T5	479128	10,871	54,355	4,6
T6	394896	8,957	44,785	3,8
T7	114365	2,581	12,905	1,1
E	155398	3,513	70,26	5,9
PS	853339	19,376	775,04	65,8
Quantité totale de salbutamol base dosé (mg)			1177,9	100%
Quantité de salbutamol base récupérée sur les tamis (mg)			332,6	28,26%

Tableau 5-25 : Études de la poudre issue de la microémulsion E7.

Solution dosée par CLHP	Aire du pic	Concentration en salbutamol base (µg/ml)	Quantité de salbutamol base récupérée (µg)	Pourcentage de la fraction de salbutamol base récupérée
T0	300464	6,81	34,05	2,4
T1	218792	4,954	24,77	1,8
T2	177822	4,023	20,115	1,5
T3	117846	2,66	13,3	0,97
T4	134079	3,029	15,145	1,1
T5	61507	1,38	6,9	0,5
T6	35792	0,795	3,975	0,28
T7	28578	0,631	3,155	0,22
E	12634	0,269	5,38	0,39
PS	548777	12,454	1245,4	90,75
Quantité totale de salbutamol base dosé (mg)			1372,2	100%
Quantité de salbutamol base récupérée sur les tamis (mg)			121,4	8,8%

Tableau 5-26 : Études de la poudre issue de la microémulsion E6.

Solution dosée par CLHP	Aire du pic	Concentration en budésonide base (µg/ml)	Quantité de budésonide récupérée (µg)	Pourcentage de la fraction de budésonide récupérée
T0	46924	1,312	10,23	4,6
T1	29390	0,835	6,51	2,98
T2	29564	0,84	6,55	3,0
T3	12484	0,375	2,93	1,34
T4	9391	0,291	2,27	1,04
T5	14481	0,43	3,35	1,53
T6	23198	0,667	5,20	2,38
T7	6919	0,224	1,75	0,8
E	14298	0,425	3,32	1,52
PS	104877	2,887	18,77	8,6
Quantité totale de budésonide dosé (mg)			218,24	100%
Quantité de budésonide récupérée sur les tamis (mg)			38,80	17,7%

Tableau 5-27 : Études de la poudre issue de la microémulsion E8.

Solution dosée par CLHP	Aire du pic	Concentration en budésonide base ($\mu\text{g/ml}$)	Quantité de budésonide récupérée (μg)	Pourcentage de la fraction de budésonide récupérée
T0	190129	5,204	33,83	3,9
T1	171475	4,697	30,53	3,6
T2	163444	4,479	29,11	3,4
T3	110882	3,05	19,83	2,3
T4	62788	1,743	11,33	1,3
T5	105994	2,917	18,96	2,2
T6	122502	3,366	21,88	2,5
T7	26690	0,762	4,95	0,58
E	25802	0,737	4,79	0,56
PS	285575	7,799	101,39	11,98
Quantité totale de budésonide dosé (mg)			846,19	100%
Quantité de budésonide récupérée sur les tamis (mg)			170,42	20,14%

7.3. D. Discussion

Lors de ces expériences, nous avons observé des pertes importantes de poudre à plusieurs niveaux. Des pertes se produisent lors de la perforation des gélules par le dispositif d'administration, ainsi qu'au niveau de l'embout du fait d'un défaut d'étanchéité. Ces pertes n'ont pas pu être chiffrées avec précision. Comparer la quantité totale de substance active retrouvée dans les tamis, l'embout et le pré-séparateur par rapport aux quantités engagées n'est donc pas fiable.

En revanche, en considérant la fraction de poudre qui a bien été introduite dans l'appareil, nous pouvons analyser la répartition de la substance active à tous les niveaux analysés dans la cascade d'Andersen.

Pour le salbutamol base :

Pour E3, nous avons retrouvé 28,26% de substance active sur les différents tamis alors que pour E7 seulement 8,8% ont été retrouvés. De plus, le pourcentage de poudre sur chaque tamis est relativement constant pour E3 alors qu'il était décroissant de T0 à T7 pour E7. La

poudre de l'échantillon E3 est donc probablement plus fine, elle passe ainsi plus facilement d'un tamis à l'autre. Ceci peut être imputé à la vitamine E TPGS® qui est un surfactant plus collant que le Montane® 40 et lors de la nébulisation, les particules s'agglomèrent d'avantage dans ce cas.

Pour le budésonide :

Pour E6, 20,14% de substance active ont été retrouvés sur les différents tamis et 17,7% pour E8. De même, pour les deux poudres, les quantités de substances actives sur chaque tamis ont été très légèrement dégressives de T0 à T7. Les deux poudres ont donc une granulométrie proche et une faculté identique de passage d'un tamis au tamis suivant.

Comparaison du budésonide et du salbutamol base :

Dans le cas du budésonide, à la différence du salbutamol, les deux échantillons se sont révélés identiques. Ceci est probablement dû à la plus grande lipophilie du budésonide ainsi qu'à sa plus grande résistance à la chaleur qui nous a permis d'utiliser sans risque une température de nébulisation nettement plus élevée, ce qui a assuré la finesse des particules produites (voir les conditions de nébulisation au tableau 5-17).

La différence entre les deux principes actifs est également liée aux deux dispositifs d'administration utilisés. Il semble que le dispositif Cyclohaler® plus récent que le dispositif Ingelheim® donne de meilleurs résultats.

8. Analyse des poudres sur une balance de Langmuir

8.1. Notions sur les monocouches

Dans les liquides, les molécules sont en interaction entre elles (forces de Van der Waals). Au sein du liquide, la résultante des forces appliquées à une molécule est nulle.

Au voisinage de la surface, par contre, apparaît une dissymétrie : la résultante des forces appliquées à une molécule n'est plus nulle et s'exerce vers l'intérieur. La tendance de la surface du liquide est donc de se restreindre.

Pour étirer la surface du liquide, il faut donc appliquer une force et donc fournir du travail.

On appelle tension superficielle γ , le travail dW qu'il faut fournir par unité de surface dS pour étirer celle-ci ou la force par unité de longueur pour étirer celle-ci.

$$\gamma = dW/dS = dF/dx$$

γ s'exprime en $J.m^{-2}$ ou en N/m

L'ajout d'un produit tensioactif diminue considérablement la tension superficielle de l'eau par la disposition que les molécules prennent dans le liquide (figure 5-17).

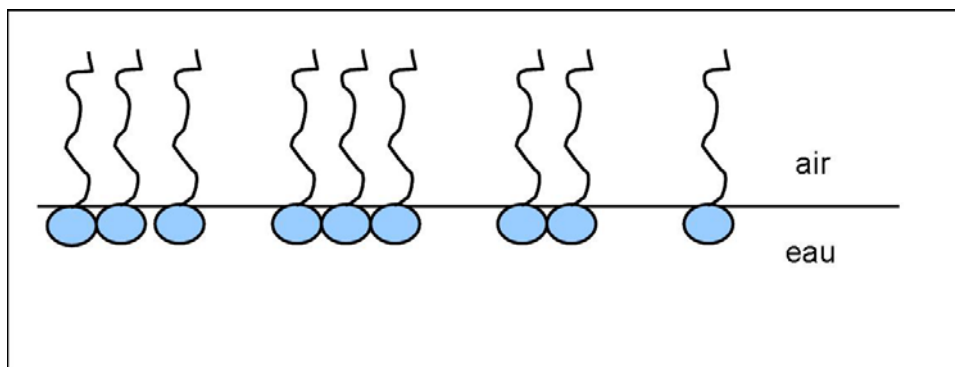


Figure 5-17 : Orientation de molécules de surfactant à l'interface air/eau.

C'est cette disposition qui est à la base des pouvoirs mouillants, moussants et émulsionnants.

Toutefois à partir d'une certaine concentration en agent tensioactif, appelée concentration micellaire critique (CMC), la surface du liquide étant saturée de molécules

tensioactives, celles-ci se regroupent entre elles dans le liquide en formant des micelles (Figures 5-18).

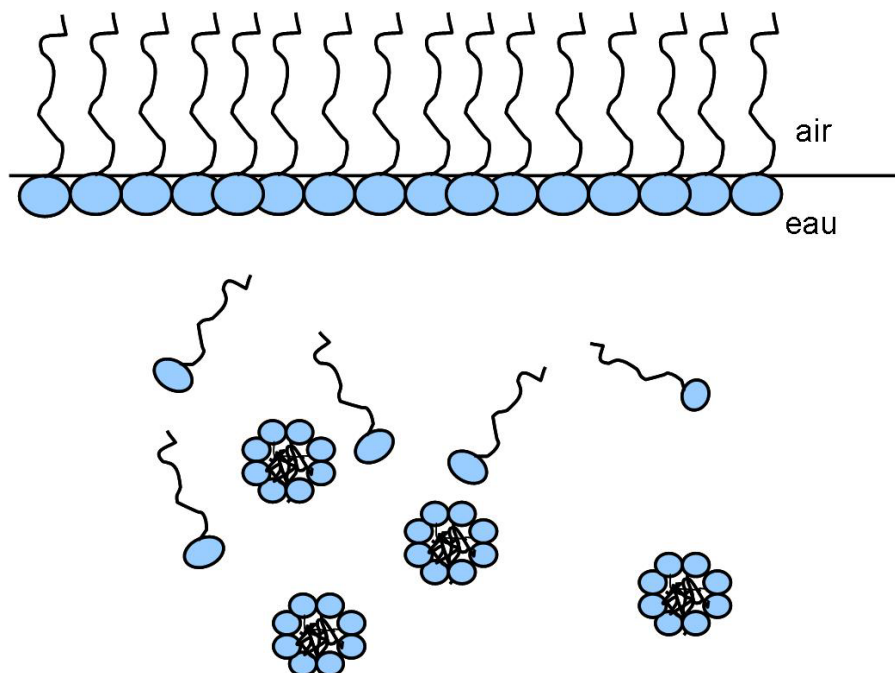


Figure 5-18 : Saturation de 'interface air/eau. Film monomoléculaire

La formulation d'un film monomoléculaire (monocouche) est en compétition avec la formulation de micelles. Tant que la concentration est très faible, la formation du film monomoléculaire est majoritaire.

La longueur de la chaîne hydrophobe est un critère qui décide pour la formation de monocouches. Il est admis que cette chaîne doit avoir une longueur supérieure à 12 atomes de carbones. Si la chaîne est plus courte, même si le produit est insoluble dans l'eau, il aura tendance à former des micelles. Ces micelles sont solubles dans l'eau et empêchent la formation de la monocouche. A l'opposé, si la chaîne est trop longue, le produit a tendance à cristalliser à la surface de l'eau et ne forme pas de monocouche. Il n'y a malheureusement pas de longueur de chaîne idéale pour former efficacement une monocouche, car la tête polaire hydrophile intervient également dans sa formation.

8.3. Principe de la balance de Langmuir. Méthode utilisé

Nous avons utilisé l'appareil KSV 3000 System (KSV Instruments, Helsinki, Finlande). L'appareil est composé d'une cuve en téflon remplie d'eau distillée, de deux barrières mobiles et d'une lame de Wilhelmy permettant la mesure de la pression de surface.

Les poudres obtenues par atomisation sont dissoutes dans un solvant non miscible à l'eau, le chloroforme. Les gouttes de la solution à tester sont placées à la surface de l'eau (volume totale de la solution à tester 40 μ L). Les gouttes de la solution de DPPC (1 mg/mL) sont déposées ensuite sur la même surface d'eau. Elles s'étalent rapidement et recouvrent l'ensemble de l'aire disponible.

Après évaporation du chloroforme, un film monomoléculaire de surfactants est formé, également appelée film de Langmuir (figure 5-18). Lorsque la distance entre les molécules de surfactants est grande, leurs interactions sont faibles ; cet état est assimilé à un gaz à deux dimensions. Dans ces conditions, le film monomoléculaire a relativement peu d'effets sur la tension de surface de l'eau. Lorsque l'aire disponible est réduite (par un système de barrières de l'appareil, contrôlé automatiquement), les molécules sont comprimées et exercent des effets répulsifs entre elles. Ce phénomène est appelé pression de surface, notée π . Pour une surface plane à l'équilibre, π représente la différence entre la tension de surface en présence d'une monocouche, γ , et la tension de surface de l'eau seule, γ_0 :

$$\pi = \gamma - \gamma_0$$

La balance de Langmuir permet de modifier l'aire d'une surface sur laquelle a été disposé le film monomoléculaire de surfactant, grâce à deux barrières en téflon. La cuve, aussi en téflon, est remplie d'eau et la pression de surface est mesurée de manière continue lors de la compression. La pression de surface est mesurée par la méthode de la lame de Wilhelmy, en déterminant la force de tension de surface d'une lame en tungstène partiellement immergée dans une phase liquide, ici l'eau. Cette mesure est comparée à la mesure absolue de la surface propre.

Les propriétés d'un film monomoléculaire sont représentées par la courbe de pression de surface π en fonction de l'aire à la surface de l'eau disponible pour chaque molécule ou aire moléculaire A . Cette courbe est appelée isotherme de compression et permet de

déterminer les différentes phases de la monocouche (figure 5-19). Le comportement d'un produit amphiphile et ses différentes phases sont déterminées par différents facteurs comme les propriétés physico-chimiques du produit ou la température.

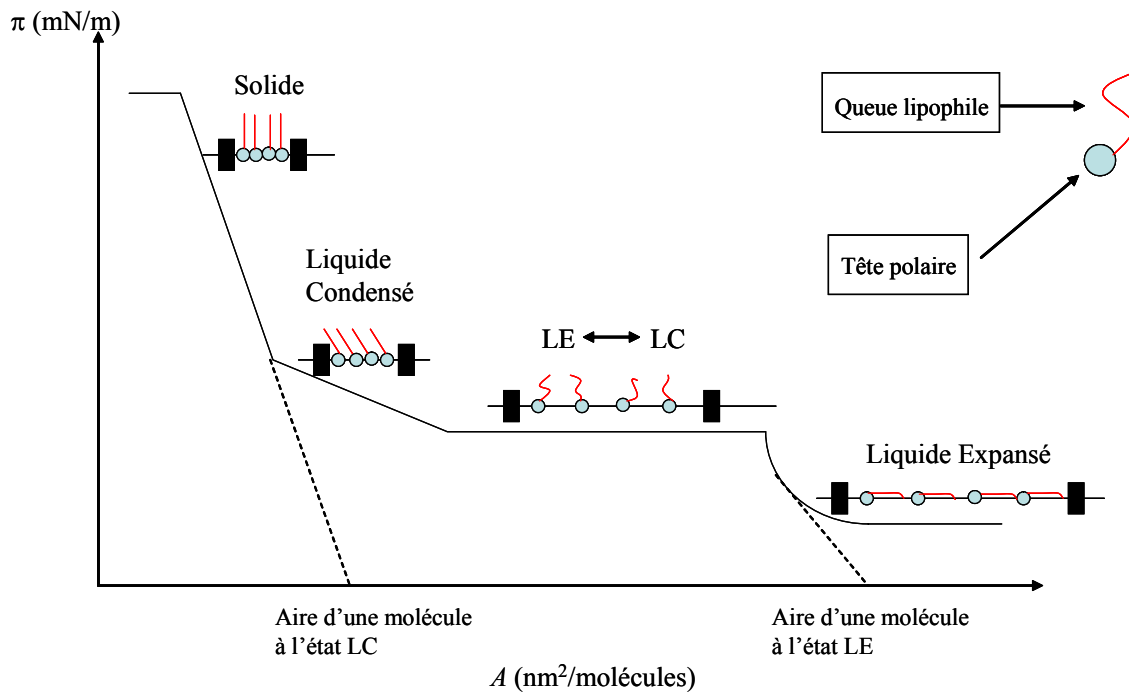


Figure 5-19 : Isotherme de compression.

Le film monomoléculaire se trouve dans un état liquide expansé (LE) à l'état initial (barrières complètement ouvertes). Lors de la compression, les molécules se rapprochent, les chaînes peuvent encore bouger librement et des interactions entre les têtes hydrophiles peuvent exister. La pression de surface correspondant à cette région est très faible.

Un plateau est marqué par la transition de la phase liquide expansée vers la phase liquide condensé (LC). Dans cette région, les chaînes hydrophobes, qui étaient distribuées à proximité de la surface de l'eau, commencent à se relever. Il y a coexistence de phases, la proportion de la phase LC augmente lorsque la surface disponible diminue.

En phase LC, l'isotherme continue par une transition abrupte, jusqu'à une région linéaire à forte pente. Les molécules sont inclinées et se redressent au fur et à mesure vers la verticale au cours de la compression.

Dans certains cas, un changement de phase est observé lors de la compression de la monocouche en phase LC : les molécules s'assemblent dans une phase ordonnée quasiment

solide (S). Cette phase est analogue à une phase cristalline bidimensionnelle, les chaînes des molécules s'organisent perpendiculairement à la surface et occupent ainsi une surface minimale.

Aux plus faibles aires de surface, un phénomène dit de collapsus intervient ; la monocouche peut alors déborder de la cuve, former des multicouches ou se dissoudre dans l'eau. Le résultat est une perte de produit formant la monocouche.

La dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) est un surfactant pulmonaire (figure 5-20). A l'interface air/eau, le DPPC forme une monocouche qui est à l'état LC à faible aire moléculaire. Cette molécule peut être considérée comme un modèle de membrane lipidique.

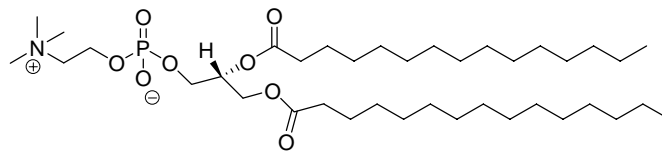


Figure 5-20: Structure DPPC

Nous avons voulu étudier l'influence des poudres obtenues sur une monocouche de DPPC. Pour cela, nous avons mélangé au DPPC nos poudres obtenues, dans le but de comprendre les interactions pouvant exister entre ces deux produits ainsi qu'observer si aucune recristallisation n'apparaît (à l'interface alvéolaire cela pourrait bloquer les alvéoles).

Le DPPC ne peut pas être considéré comme un modèle pour l'absorption pulmonaire, car le milieu pulmonaire est beaucoup plus complexe. Cependant, le DPPC peut servir de modèle pour cette étude préliminaire.

8.3. Etude de la solution de référence de DPPC

Une solution à 1 mg/mL de DPPC dans le chloroforme a été préparée et 40 μ L de cette solution ont été déposés à la surface de la cuve de Langmuir. Après évaporation du solvant, le système a été comprimé (par « fermeture automatique » des barrières), à 30°C (la température joue ici un rôle primordial). L'isotherme de compression obtenue est le suivant:

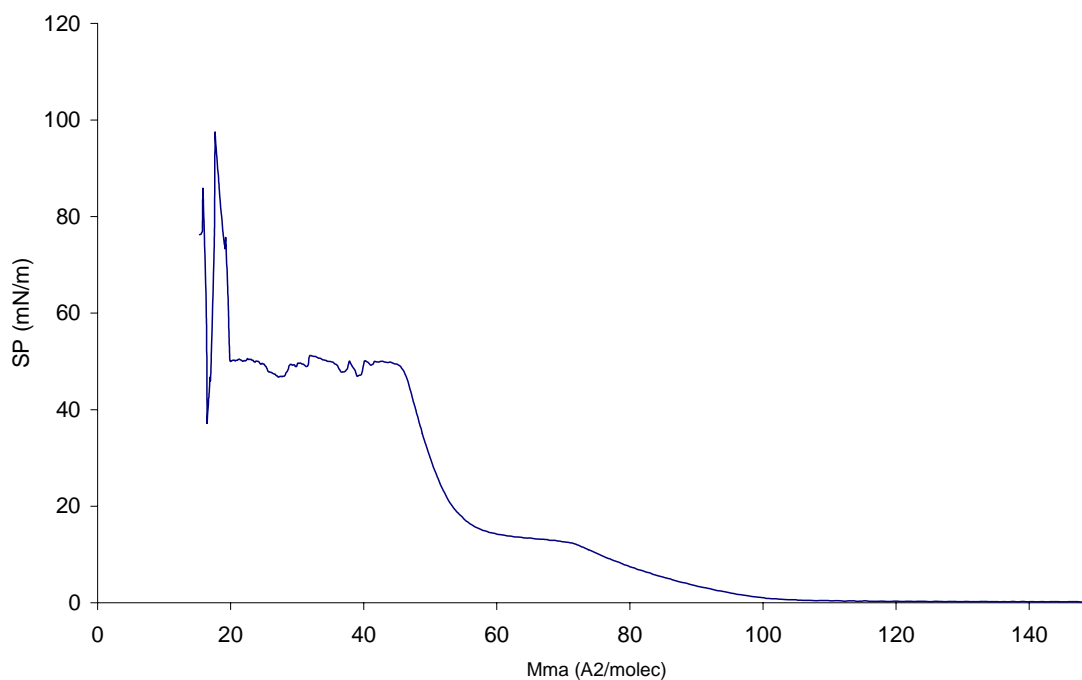


Figure 5-21 : Isotherme de compression du DPPC.

Comme décrit dans la littérature, nous pouvons observer la présence de la phase LE, de la transition LE/LC et de la phase LC.¹³¹

8.4. Analyse des poudres obtenues

Les poudres obtenues renfermant le salbutamol base (E3 et E7) et celles renfermant le budésonide (E6 et E8) ont été testées et leur influence sur cette monocouche de DPPC étudiée.

8.4. A. Salbutamol base, échantillons E3 et E7.

Nous avons préparé les solutions de 1 mg/mL de chaque poudre. Les gouttes de la solution à tester ont été déposées sur la surface d'eau à l'aide de la seringue d'un volume de

40 μL . Ensuite le même volume de gouttes de la solution de DPPC (1 mg/mL) a été placé sur la surface comportant déjà notre solution à tester. Les barrières ont été fermées et les graphiques de condensation ont été enregistrés. Nous avons obtenu les résultats suivants pour l'échantillon E3 (Figure 5-22) et pour l'échantillon E7 (Figure 5-23).

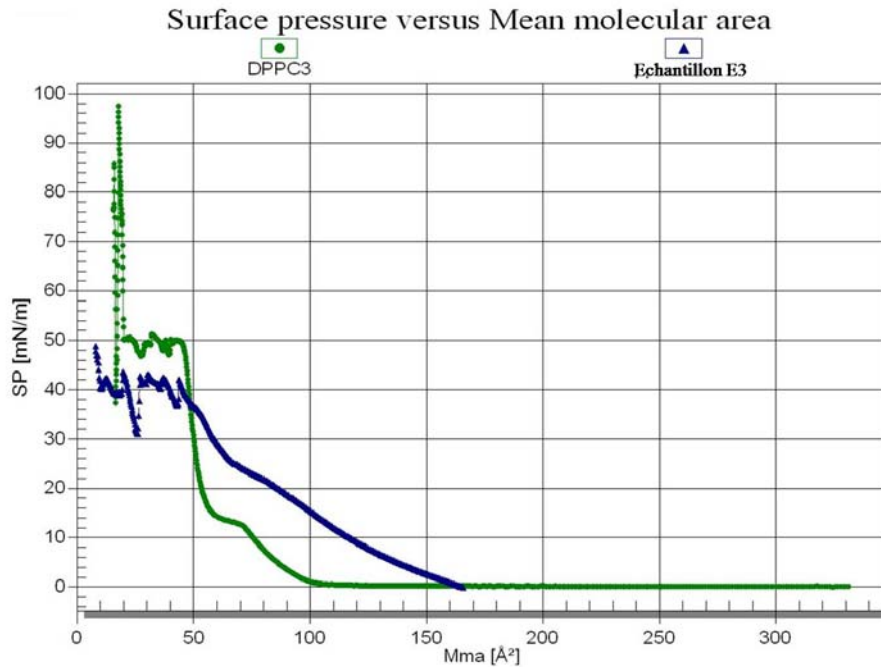


Figure 5-22 : Isotherme de compression de l'échantillon E3.

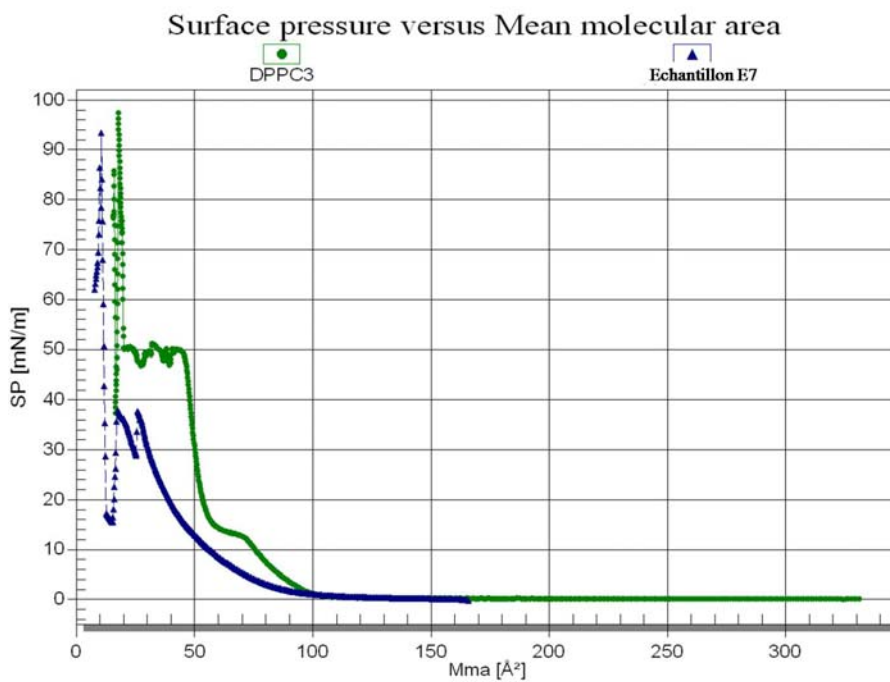


Figure 5-23 : Isotherme de compression de l'échantillon E7.

Les deux échantillons E3 et E7 ont des comportements différents. Cependant les deux poudres conduisent à la disparition du plateau de transition LE/LC de la monocouche de DPPC, ce qui indiquerait l'insertion des surfactants de E3 et E7 dans la monocouche.

Dans le cas d'E3, l'isotherme de compression est déplacée vers la droite, c'est-à-dire vers des aires par molécules supérieures (Figure 5-22). Ce phénomène pourrait correspondre à une fluidification par rapport à la monocouche de DPPC seul.

En revanche en présence d'E7, l'isotherme de compression a été déplacée vers les petites aires (vers la gauche, Figure 5-23). Il est possible que dans ce cas les chaînes de DPPC se trouvent plus organisées, il pourrait y avoir dans ce cas un risque de création de domaines condensés ou cristallisés.

8.4. B. Budésonide, échantillons E6 et E8.

La préparation des échantillons a été la même que pour le salbutamol base. Nous avons obtenu les résultats suivant pour l'échantillon E3 (Figure 5-24) et pour l'échantillon E7 (Figure 5-25).

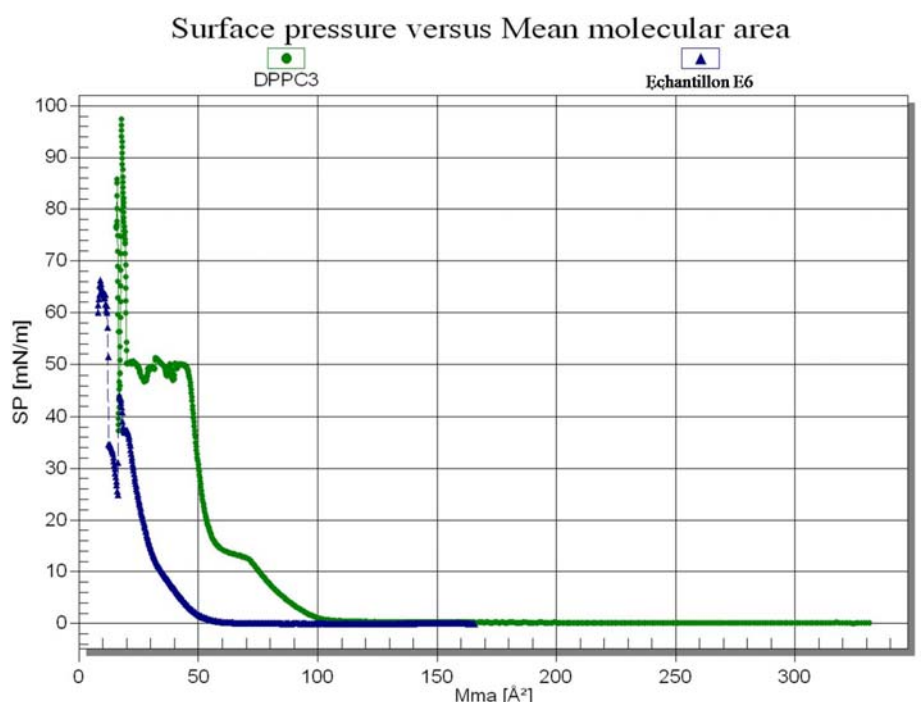


Figure 5-24 : Isotherme de compression de l'échantillon E6.

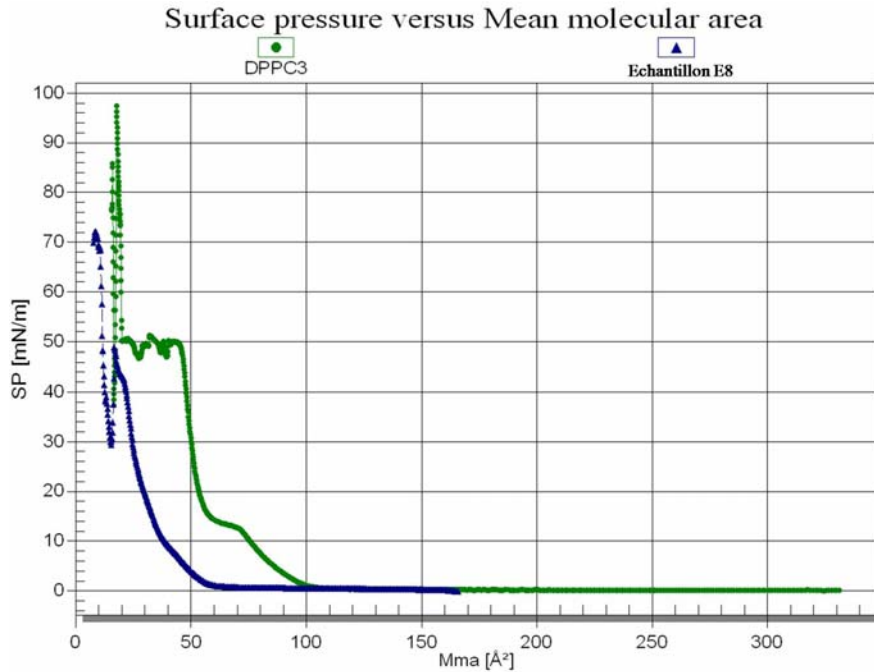


Figure 5-25 : Isotherme de compression de l'échantillon E8.

Les deux échantillons E6 et E8 contenant le budésonide se comportent de la même façon. Comme dans les cas précédents, le plateau de transition LE/LC de la couche de DPPC disparaît. La monocouche de DPPC est donc modifiée, prouvant l'insertion des surfactants d'E6 et E8.

Toutefois, nous avons pu observer dans les deux cas un déplacement des courbes vers la gauche, c'est-à-dire vers les petites aires (Figures 5-24 et 5-25). Comme précédemment, cela pourrait correspondre à une plus forte organisation des chaînes de DPPC, et donc à la formation de domaines plus condensés ou cristallisés.

8.4. C. Conclusion

Bien que la couche de DPPC ne soit qu'un modèle simpliste des membranes alvéolaires, ces résultats préliminaires nous ont permis de réaliser quelques observations intéressantes.

Dans l'application souhaitée de nos échantillons, il est nécessaire que les surfactants compris des les poudres puissent s'insérer dans les monocouches de DPPC, sans provoquer leur solidification. A ce titre, il nous a semblé que l'échantillon E3 donnait les résultats les

plus favorables, puisqu'il semble au contraire permettre la fluidification de la monocouche. Les résultats obtenus avec les échantillons E7, E6 et E8 sont moins favorables, puisqu'il n'existe un risque de cristallisation de la monocouche. Toutefois, il serait nécessaire de réaliser des expériences complémentaires pour s'en assurer, et par exemple étudier la structure des monocouches par microscopie.

La nature de surfactants s'est relevée très importante quant à l'effet des poudres sur les monocouches de DPPC. Ainsi E3 et E7 diffèrent uniquement par la nature d'un co-surfactant, le Montanox®40 pour E3 et la Vitamine E TPGS® pour E7 et ont des effets très différents.

De la même façon, la nature de la substance active a un effet indiscutable : E3 et E6 ont la même composition, excepté qu'E3 contient du salbutamol base et E6 du budésonide. Il est possible que la structure de corticostéroïde du budésonide lui permette de s'insérer dans la monocouche de DPPC, et ainsi d'être responsable de la solidification observée avec E6.

Enfin, nous n'avons étudié qu'un unique rapport DPPC/poudre dans les monocouches (environ 50 /50). Il serait intéressant d'étudier d'autres rapports, en considérant une plus faible proportion de poudre, pour confirmer nos observations.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le procédé d'atomisation a permis d'obtenir des poudres fines sèches de particules de taille comprise entre 8 et 11 microns. La solubilisation des substances actives dans l'eau et les mélanges de surfactants a donné naissance à des particules matricielles homogènes. Au terme de ce travail, de nouveaux excipients et mélanges d'excipients ont été proposés pour la formulation de poudres sèches pour inhalation. Ils sont susceptibles d'agir en tant que transporteur dans le but d'améliorer le profil des dépôts au niveau pulmonaire.

Grâce à l'étude des diagrammes de phases, nous avons généré plusieurs microémulsions stables originales contenant un mélange de surfactants (à HLB forte et faible) et du lactose, le vecteur de poudres pulmonaires. Les dosages des principes actifs, salbutamol base et budésonide, dans les poudres issues de ces microémulsions a confirmé la bonne formation de celles-ci.

Le procédé retenu pour la préparation des particules est la nébulisation. Il s'agit d'une technique très efficace et rapide, facilement transposable à l'échelle industrielle. Un de ses principaux avantages est la possibilité de faire varier et de contrôler de manière rigoureuse les caractéristiques essentielles des poudres obtenues, comme la granulométrie. Nous avons contrôlé un certain nombre de paramètres critiques comme la température d'entrée ou la puissance de la pompe. Toutefois au cours de nos expériences, la température de séchage (ou de sortie) de l'appareil est apparue comme un paramètre supplémentaire qui doit être optimisé améliorer le rendement en poudre produites.

La meilleure préparation de poudre réalisée, en terme de granulométrie et de propriétés aérodynamique est celle issue de la microémulsion E3, contenant un mélange de surfactant Montane® 40/Montanox ® 40 (1/5, 0,5% dans E3) et du lactose (15 % dans E3), et nébulisée à une température élevée (160 °C). L'échantillon de poudre E3 a également révélé avoir les propriétés les plus intéressantes lors de l'analyse de monocouches de DPPC sur une balance de Langmuir.

Les premiers résultats obtenus dans la partie expérimentale de notre thèse sur les poudres autoémulsionnables ouvrent des perspectives très prometteuses qu'il sera intéressant

d'approfondir. Ainsi par exemple les futures optimisations de procédé final devront concerner l'étude de la température de sortie du nébuliseur et la réduction des pertes de poudre au niveau de l'appareil de cascade d'Andersen.

De même en prolongement des premières expériences sur la balance de Langmuir, il serait intéressant d'étudier des modèles de monocouche plus élaborés se rapprochant des membranes alvéolaires. Enfin, des études *in vitro* plus précises seraient intéressantes pour démontrer que les poudres produites permettent de créer des microémulsions lorsqu'elles se déposent sur la muqueuse bronchique ou alvéolaire après avoir été aérosolisées, grâce aux mélanges de surfactants qu'elles renferment: Montane®/Montanox® ou Montane®/Vitamine E TPGS®.

Reproduction de la publication du chapitre 5

Ci-dessous est reproduite notre publication regroupant les descriptions de l'utilisation de systèmes nanométriques utilisés pour le traitement et le diagnostic des problèmes respiratoires entre autre. Nous y expliquons l'anatomie et la physiologie du tractus respiratoire humain, les mécanismes de dépôts et le devenir de particules inhalées, les différents types de formulations développées pour la voie pulmonaire (micelles, liposomes, microémulsions, micro et nanoparticules, cyclodextrines) et leur optimisation.

M.Smola, Th.F.Vandamme, A.Sokolowski, *“Nanotechnology and its potential in the treatment and diagnosis of respiratory and systemic diseases.”* Int. J. Nanomedicine, 2008 :3 (1) 1-19.

Nanocarriers as pulmonary drug delivery systems to treat and to diagnose respiratory and non respiratory diseases

Malgorzata SMOLA, Thierry VANDAMME, Adam SOKOLOWSKI

International Journal of Nanomedicine, 2008, Vol. 3, N° 1, Pages 1-19

Pages 281-299 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

http://dovepress.com/articles.php?article_id=742

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

Conclusion Générale

Ce manuscrit, dans son ensemble, a été consacré au développement de nouvelles techniques pour l'administration de substances actives pédiatriques. Dans les différentes parties d'introduction et de présentation bibliographique, nous avons pu souligner le manque important de solutions aux problèmes soulevés par le cas très précis de l'administration de médicaments aux nourrissons et aux enfants. Les enjeux sont nombreux : ils vont de la découverte de nouveaux excipients plus efficaces et mieux tolérés (allergies de l'enfant), à l'élaboration de nouvelles formulations liquides pour la voie orale, au masquage de goût des substances actives jusqu'à la conception de nouveaux dispositifs d'administrations qui prennent en compte la physiologie de déglutition infantile.

Dans la première partie, un nouvel excipient conservateur antimicrobien a été étudié. La 2-pyrrolidone, ou Soluphor[®]P, était jusqu'alors utilisé comme agent solubilisant dans des formulations injectables. Nous avons démontré que ce composé remplit les critères fixés par la Pharmacopée Européenne, Vème édition, pour être utilisé comme agent conservateur dans des formulations pédiatriques pour la voie orale. Le Soluphor[®]P pourrait devenir un substitut aux produits de la famille des parabènes que l'on souhaite éliminer de nombreuses formulations pédiatriques du fait des risques allergiques et de soupçon d'effets cancérigènes et reprotoxiques.

Les parties 2 et 3 ont été consacrées au développement de nouvelles formulations galéniques pédiatriques pour la voie orale. Tout d'abord un système de type microémulsion hydrophile/lipophile a été développé pour permettre le masquage de goût d'une substance active très amère, le chlorhydrate de ranitidine. Le goût est un critère essentiel dès lors que le médicament sera administré à des enfants qui y sont physiologiquement et psychologiquement plus sensibles que les adultes. La formule développée représente la première forme buvable du chlorhydrate de la ranitidine, et pourrait remplacer les formes injectables et solides commercialisées jusqu'à présent. Dans la partie 3 une formulation aqueuse/organique micellaire a été conçue en utilisant le Soluphor[®] P comme solvant organique. L'utilisation de cet excipient multifonctionnel solubilisant/conservateur antimicrobien a permis l'élaboration d'une formulation simple et stable contenant

simultanément deux substances actives : la vitamine D3 très hydrophobe et le fluorure de sodium soluble dans l'eau. Grâce à ce cas pratique les propriétés du Soluphor® P ont été confirmées. Ce solvant organique, pourrait se placer de façon avantageuse parmi les excipients solubilisant utilisés jusqu'à présent : la N-méthyl-2-pyrrolidone (NMP), le propylène glycol, l'éthanol ou les polyéthylènes glycols.

La problématique de l'administration par voie orale de liquides à des nourrissons a aussi été abordée dans le manuscrit. Alors que seules les formes liquides sont tolérées par voie orale par les très jeunes enfants, elles sont responsables d'accidents graves dus à des événements de « fausse route ». Dans le chapitre 4, des nouvelles seringues sont proposées pour permettre de rendre l'administration de formules liquides aux enfants plus sûre et plus précise. Depuis la réalisation des prototypes simplifiés avec les moyens du laboratoire, des prototypes exacts ont été produits industriellement pour étudier en détail leurs propriétés d'aspiration et d'éjection des fluides en fonction de la viscosité.

Dans une dernière partie, les formulations de deux substances actives pour le traitement de l'asthme ont été étudiées. Le salbutamol base et le budésonide sont des composés qui doivent être administrés par voie pulmonaire. Les formulations sont conçues avec des mélanges de surfactants et du lactose, pour permettre aux poudres générées de donner lieu à la formation d'émulsions/microémulsions lorsqu'elles se déposeront sur la muqueuse bronchique ou alvéolaire après avoir été aérosolisées.

L'ensemble de ce travail nous a conduit à explorer divers domaines d'études, mais tous encadrés par une même thématique : les traitements pédiatriques. Nous avons abordé des concepts très variés et fait appel à de nombreuses techniques expérimentales pour étudier les formulations pédiatriques à tous les niveaux : l'excipient, le système de formulation et le dispositif d'administration. De ce fait, parfois seulement des pistes de recherches ont pu être proposées, plutôt que des solutions abouties. Mais nous avons bon espoir que certaines de ces pistes puissent avoir des applications industrielles au vu des résultats très prometteurs que nous avons pu obtenir.

Annexes

ANNEXE 1-1

Technical Information

ME 139 e
June 1994 (JWF)
Supersedes edition of October 1991

File 7

Soluphor® P

2-Pyrrolidone as solvent for the pharmaceutical industry

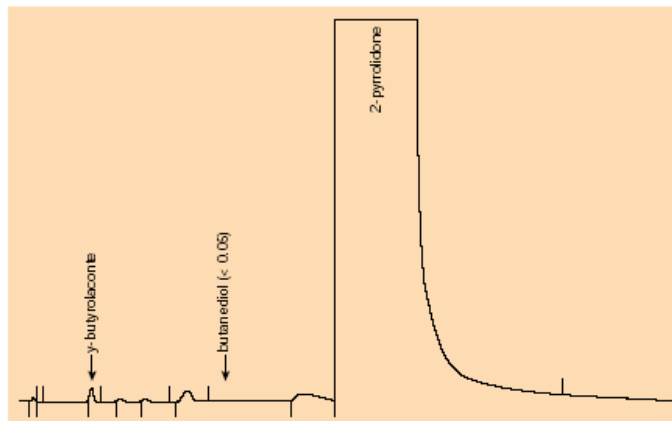
Nature	2-Pyrrolidone, dist. C ₄ H ₇ NO; molar mass 85.1
Properties	Solphor P is a colourless or slightly coloured liquid that solidifies at room temperature and has a characteristic odour. It is soluble in water and a number of organic solvents, e.g. ethanol, isopropyl alcohol, and aromatic hydrocarbons.

Specifications	<table> <tr> <td>Identity</td> <td>IR spectrum (see below)</td> </tr> <tr> <td>Assay (2-Pyrrolidone)</td> <td>≥ 99,0 % (Gas chromatography, see below)</td> </tr> <tr> <td>Water</td> <td>≤ 0.5 % (by K. Fischer, Ph. Eur. Method V.3.5.6)</td> </tr> <tr> <td>Solidification point</td> <td>25 – 26 °C (Ph. Eur. Method V.6.12)</td> </tr> <tr> <td>Hazen colour (APHA)</td> <td>≤ 50 Pt-Co units (ISO 6271)</td> </tr> <tr> <td>pH, 10% in water</td> <td>8,2 – 10,8</td> </tr> <tr> <td>Heavy metals</td> <td>≤ 20 ppm (Ph. Eur. Method V.3.2.8)</td> </tr> <tr> <td>Refractive index at 26 °C</td> <td>1,480 – 1,490</td> </tr> <tr> <td>Sulfate ash</td> <td>≤ 0,05 % (Ph. Eur. Method V.3.2.14)</td> </tr> <tr> <td>Iron</td> <td>≤ 10 ppm (atom absorption)</td> </tr> <tr> <td>Viscosity at 25 °C</td> <td>11 – 14 cSt (Ph. Eur. Method V.6.7.1)</td> </tr> <tr> <td>Gamma butyrolactone</td> <td>≤ 0,5 % (GC, see below)</td> </tr> <tr> <td>1,4-butanediol</td> <td>≤ 0,4 % (GC, see below)</td> </tr> <tr> <td>Pyrogens</td> <td>≤ 0,5 I.U. endotoxins/ 20 mg (LAL Test, Ph. Eur. Method V.2.1.9).</td> </tr> </table>	Identity	IR spectrum (see below)	Assay (2-Pyrrolidone)	≥ 99,0 % (Gas chromatography, see below)	Water	≤ 0.5 % (by K. Fischer, Ph. Eur. Method V.3.5.6)	Solidification point	25 – 26 °C (Ph. Eur. Method V.6.12)	Hazen colour (APHA)	≤ 50 Pt-Co units (ISO 6271)	pH, 10% in water	8,2 – 10,8	Heavy metals	≤ 20 ppm (Ph. Eur. Method V.3.2.8)	Refractive index at 26 °C	1,480 – 1,490	Sulfate ash	≤ 0,05 % (Ph. Eur. Method V.3.2.14)	Iron	≤ 10 ppm (atom absorption)	Viscosity at 25 °C	11 – 14 cSt (Ph. Eur. Method V.6.7.1)	Gamma butyrolactone	≤ 0,5 % (GC, see below)	1,4-butanediol	≤ 0,4 % (GC, see below)	Pyrogens	≤ 0,5 I.U. endotoxins/ 20 mg (LAL Test, Ph. Eur. Method V.2.1.9).
Identity	IR spectrum (see below)																												
Assay (2-Pyrrolidone)	≥ 99,0 % (Gas chromatography, see below)																												
Water	≤ 0.5 % (by K. Fischer, Ph. Eur. Method V.3.5.6)																												
Solidification point	25 – 26 °C (Ph. Eur. Method V.6.12)																												
Hazen colour (APHA)	≤ 50 Pt-Co units (ISO 6271)																												
pH, 10% in water	8,2 – 10,8																												
Heavy metals	≤ 20 ppm (Ph. Eur. Method V.3.2.8)																												
Refractive index at 26 °C	1,480 – 1,490																												
Sulfate ash	≤ 0,05 % (Ph. Eur. Method V.3.2.14)																												
Iron	≤ 10 ppm (atom absorption)																												
Viscosity at 25 °C	11 – 14 cSt (Ph. Eur. Method V.6.7.1)																												
Gamma butyrolactone	≤ 0,5 % (GC, see below)																												
1,4-butanediol	≤ 0,4 % (GC, see below)																												
Pyrogens	≤ 0,5 I.U. endotoxins/ 20 mg (LAL Test, Ph. Eur. Method V.2.1.9).																												

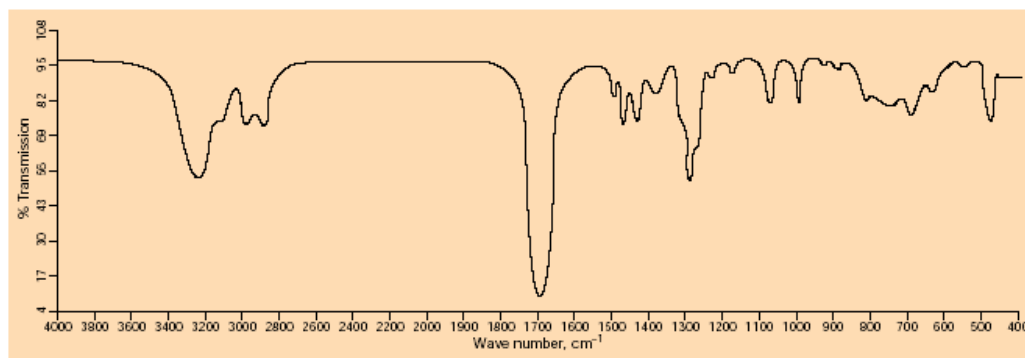
The assay and the gamma-butyrolactone and butanediol contents are determined by gas chromatography under the following conditions.

Column	Lutensol [®] AP 20 (nonylphenol-20-ethoxylate), 5% on Chromosorb [®] WAW-DCMS, with 3% KOH, 3,5 m length, 3 mm inner diameter
Temperatures	Sampler: ca. 220 °C Column heater: ca. 160 °C, isothermal. Detector: ca. 220 °C
Carrier gas	Helium, ca. 40 ml/min
Detector	FID
Sample	0,5 µl
Evaluation	Percentage area

The gas chromatogram for Soluphor P recorded under these conditions is a typical example for the quantitative determination of 2-pyrrolidone, gamma-butyrolactone, and 1,4-butanediol.



As a comparison, the infrared spectrum for the identity test can be derived from the following diagram.



Application

Before it is taken into use, Soluphor P must be melted and homogenized by careful heating, if necessary over a longer period.

The main application for Soluphor P is as a solvent in veterinary injection preparations, in which case it is used together with water and/or in combination with low-molecular-weight polyvinylpyrrolidone (Kollidon® 12 PF or Kollidon 17 PF). Another application is in solutions for oral application. The solubility of some active substances in Soluphor P and Soluphor P blends is listed in the following table.

Active substance	Soluphor P + Water (2+8)	Soluphor P + Water (4+6)	Soluphor P + Water (4+6) + 5% Kollidon 12 PF	Soluphor P
Propanidide	20 mg/ml	140 mg/ml	140 mg/ml	500 mg/ml
Dimetridazole	20 mg/ml	30 mg/ml	30 mg/ml	40 mg/ml
Sulfathiazole	< 10 mg/ml	30 mg/ml	40 mg/ml	200 mg/ml
Chloramphenicol	10 mg/ml	100 mg/ml	150 mg/ml	1300 mg/ml

The following example concerns an oxytetracycline ampoule and is quoted from a patent [1].

Oxytetracycline	22.65 g
Magnesium oxide	1.92 g
2-Pyrrolidone (e.g. Soluphor P)	40.00 g
Polyvinylpyrrolidone K 17 (e.g. Kollidon 17 PF)	5.00 g
Magnesium formaldehyde sulfoxylate	0.44 g
2-Aminoethanol	3.84 g
Water	q. s. ad 100.00 ml

Mix the water and the Soluphor P, and dissolve the Kollidon 17 PF in the mixture. Heat the solution to 75 °C. Add the magnesium formaldehyde sulfoxylate and stir until dissolved. After the magnesium oxide has been suspended, slowly stir in the oxytetracycline until a clear solution is obtained. After the solution has cooled, set to pH 8.5 with aminoethanol.

A combination of polyvinylpyrrolidone and Soluphor P allows a parenteral preparation with a lasting effect to be obtained [2, 3]. In this case, allowances must be made for the fact that dogs are hypersensitive to parenterally applied polyvinylpyrrolidone.

Another example of a veterinary injection is the following formulation of a trimethoprim-sulfonamide combination, which has been developed in the laboratory:

Trimethoprim	2.0 g
Sulfadoxine	10.0 g
Soluphor P	56.0 g
Water	29.0 g
Sodium hydroxide	q. s. (pH 8.5)

Dissolve the two active substances in Soluphor P, add the water, and set to pH 8.5 with sodium hydroxide.

Another potential application for Soluphor P is in topical preparations to accelerate the absorption of active substances. The penetration of active substances through the human skin is accelerated by Soluphor P to the same extent as by dimethylsulfoxide (DMSO) [4] or more than by dimethylformamide [7–10]. The effect can also be exploited in transdermal systems [5].

Soluphor P exerts a strong antimicrobial effect on gram-positive and gram-negative bacteria and fungi. As a consequence, there is no need for a further preservative in the formulation.

Stability

If the product is kept in unopened original containers at room temperature (20–23 °C), its shelf life is at least nine months.

Storage and packaging

Storage at temperatures below 20 °C is recommended in order to avoid discoloration. In view of the product's sensitivity towards traces of iron, it is supplied in removable polyethylene drums within sheet-metal containers of 200-kg capacity.

Safety Data Sheet

A Safety Data Sheet is available.

Product Number

01591/2-31

Physiological data

Acute toxicity:

LD ₅₀ oral:	≥ 5 g/kg rat
LD ₅₀ intravenous:	ca. 5 ml/kg dogs
LD ₅₀ intravenous:	ca. 1 ml/kg rabbits
LD ₅₀ subcutaneous:	ca. 4 g/kg mice
LD ₅₀ intraperitoneal:	ca. 3.8 g/kg mice

Solphor P does not irritate the skin and mucous membranes. Under the conditions selected for the Ames test, it was found to be nonmutagenic. In a *in vitro* cytogenetic study on human lymphocytes, it did not have any harmful effects on chromosomes.

No mutation of the foetuses occurred under the maternal toxic dose in the test for teratogenic potential on rats.

A detailed product review of 2-pyrrolidone with toxicological data has been compiled by CRCS for the TSCA Organization (USA) [6] and will be forwarded to interested parties on request.

Reference

- [1] US Patent 4, 018, 889 (1976), Pfizer
- [2] European Patent 0 021 847 (1980), Pfizer
- [3] A. J. Agar et al., J. Contr. Release **6**, 375 – 385 (1987)
- [4] B. W. Barry, J. Contr. Release **6**, 85 – 97 (1987)
- [5] B. Asmussen, Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. 13 No. 5, 343 – 351 (1991)
- [6] Information Review "2-Pyrrolidone"
IR-441 (July 15, 1985) prepared under EPA
Contract No. 68-02-6651 by CRCS, Inc., Rockville/USA.
- [7] S. Bennett, B. W. Barry, R. Woodford, J. Pharm. Pharmacol. **37**, 298 – 304 (1985)
- [8] D. Southwell, B. W. Barry, Int. J. Pharm. **22**, 291 – 298 (1984)
- [9] D. Southwell, B. W. Barry, J. Invest. Derm. **80**, 507 – 514 (1983)
- [10] B. W. Barry, D. Southwell, R. Woodford, J. Invest. Derm. **82**, 49 – 52 (1984)

Note

The data submitted in this publication are based on our current knowledge and experience. They do not constitute a guarantee in the legal sense of the term and, in view of the manifold factors that may affect processing and application, do not relieve processors from the responsibility of carrying out their own tests and experiments. Any relevant patent rights and existing legislation and regulations must be observed.

BASF Aktiengesellschaft
Unternehmensbereich Feinchemie
67056 Ludwigshafen/Germany

BASF

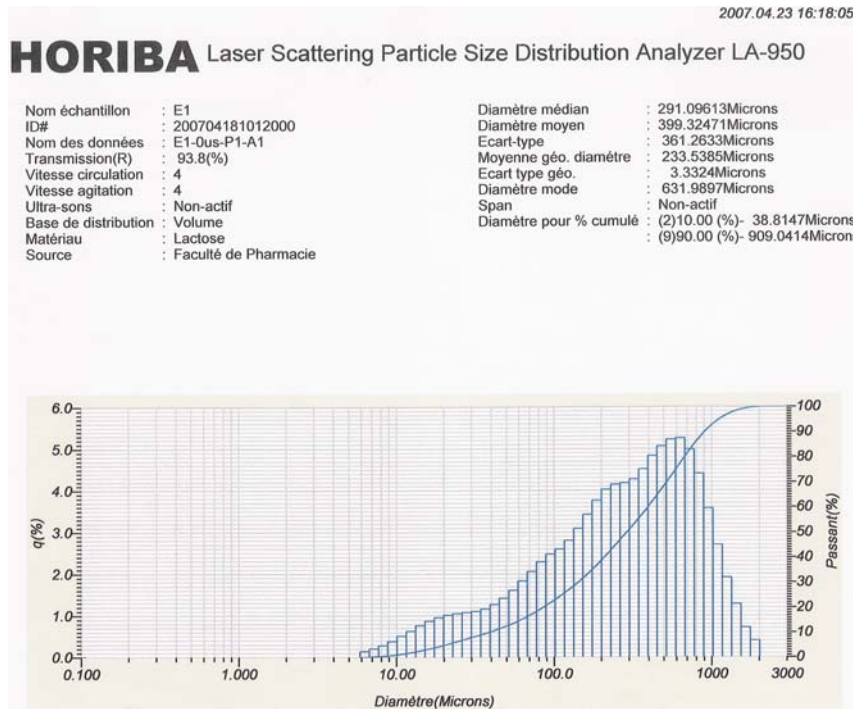
Printed in Germany

ANNEXE 5-1

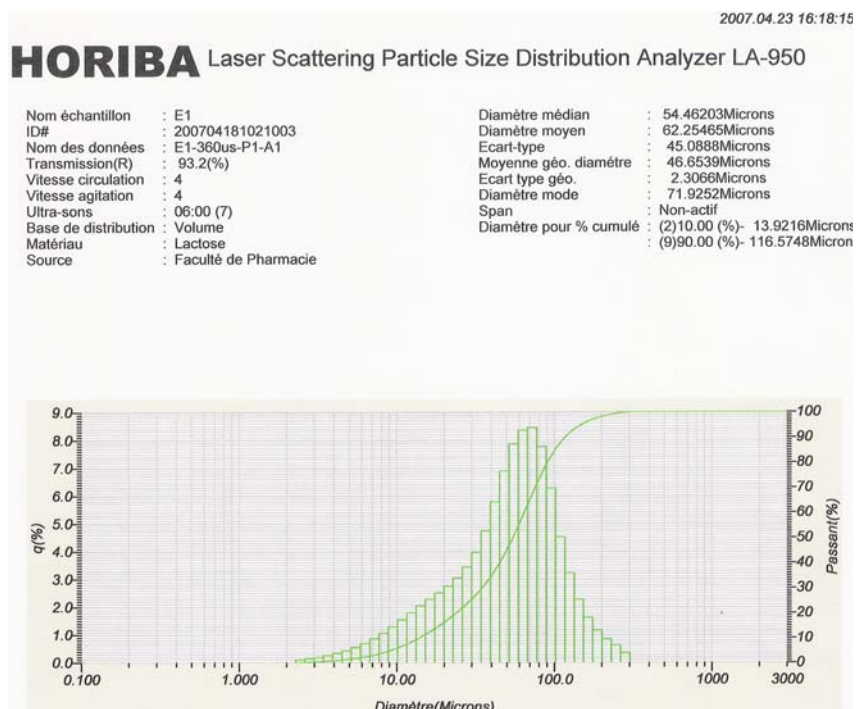
Mesure par diffraction laser des tailles des particules des échantillons E1-E8.

Chaque échantillon a été analysé 2 fois en présence ou en absence d'ultra-sons.

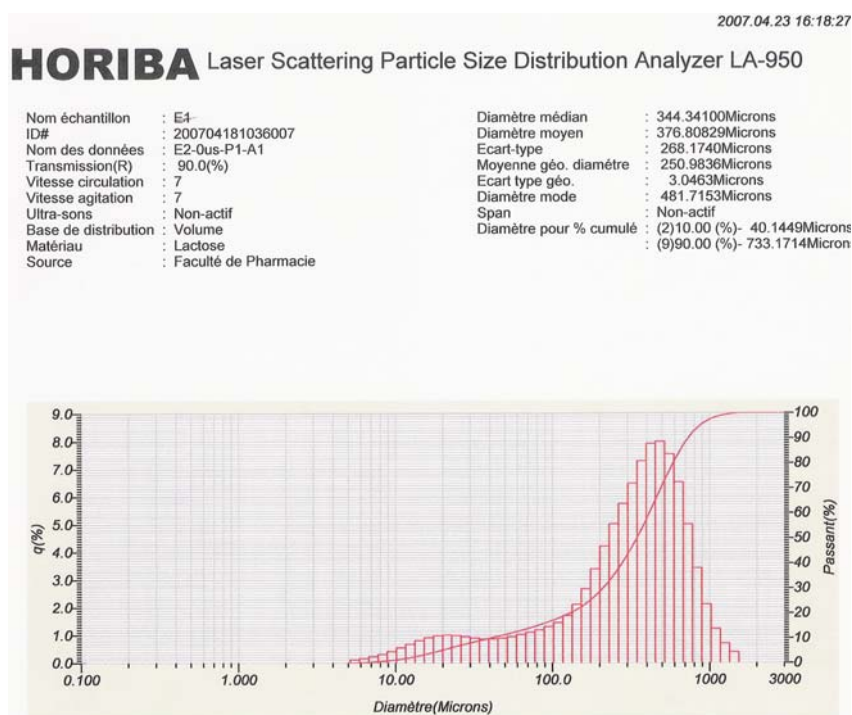
Echantillon : E1 – mesure sans ultra-son



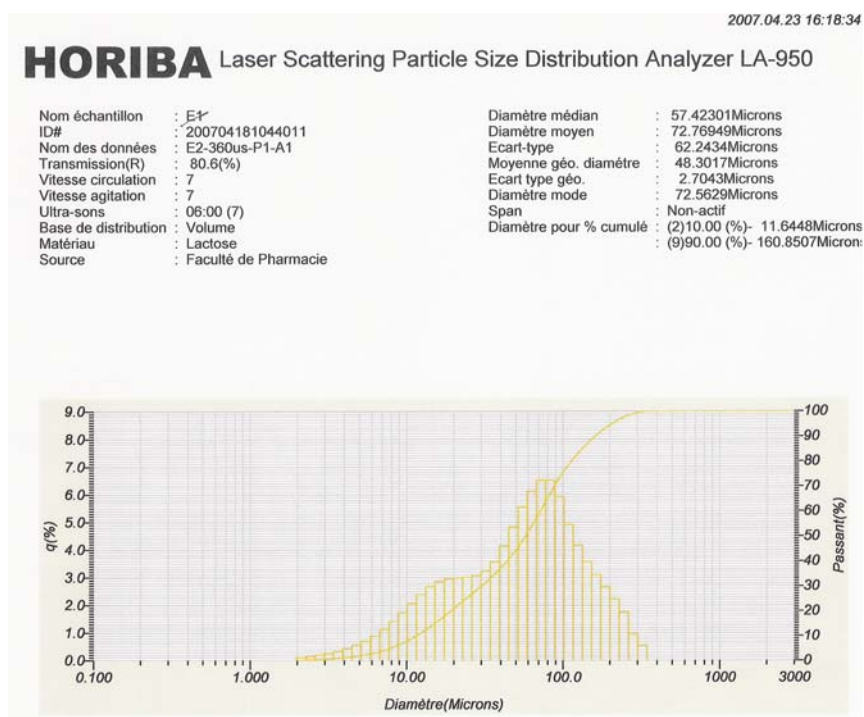
Echantillon : E1 – mesure avec ultra-son



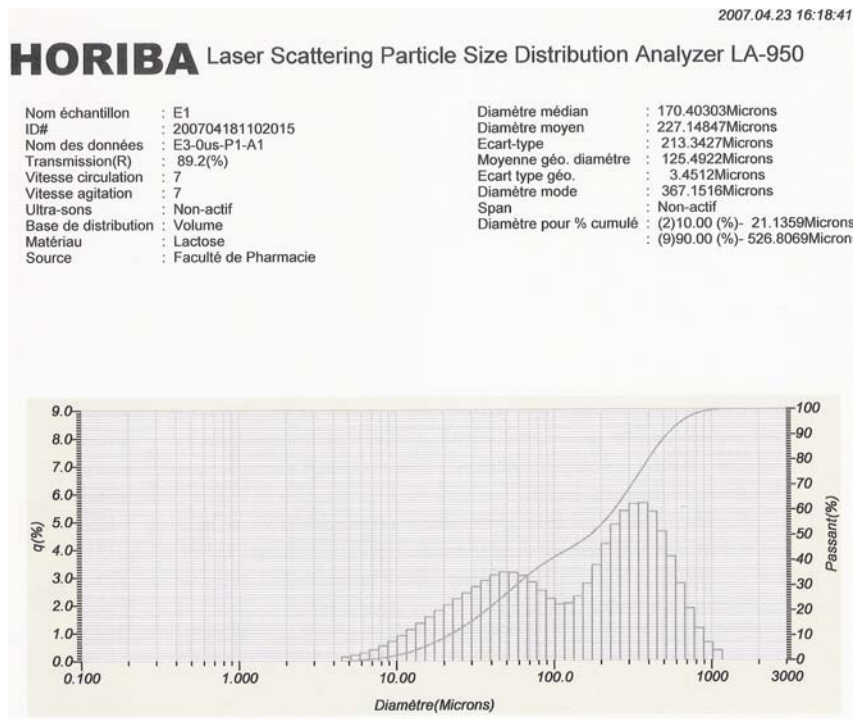
Echantillon : E2 – mesure sans ultra-son



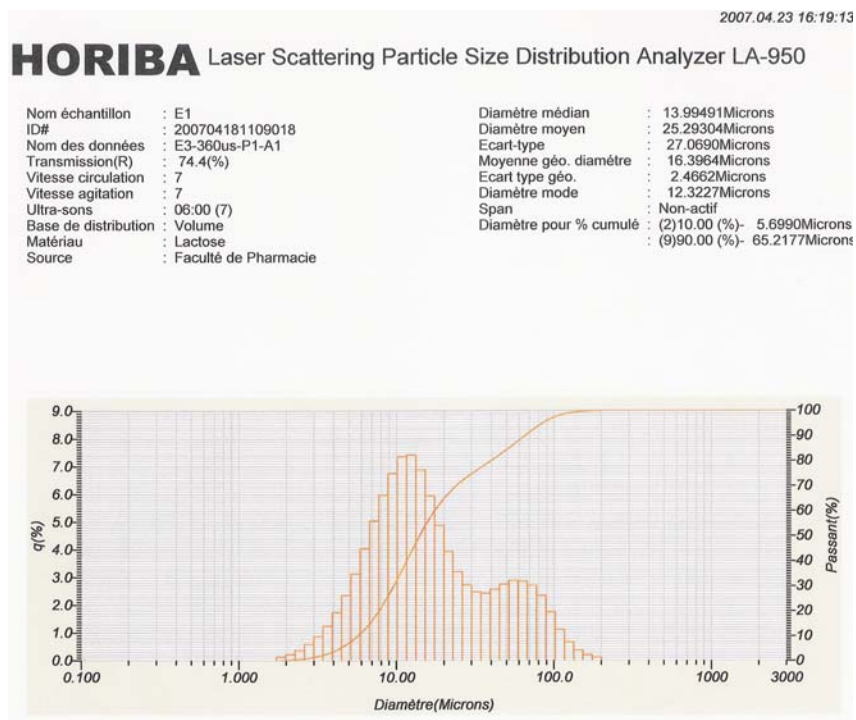
Echantillon : E2 – mesure avec ultra-son



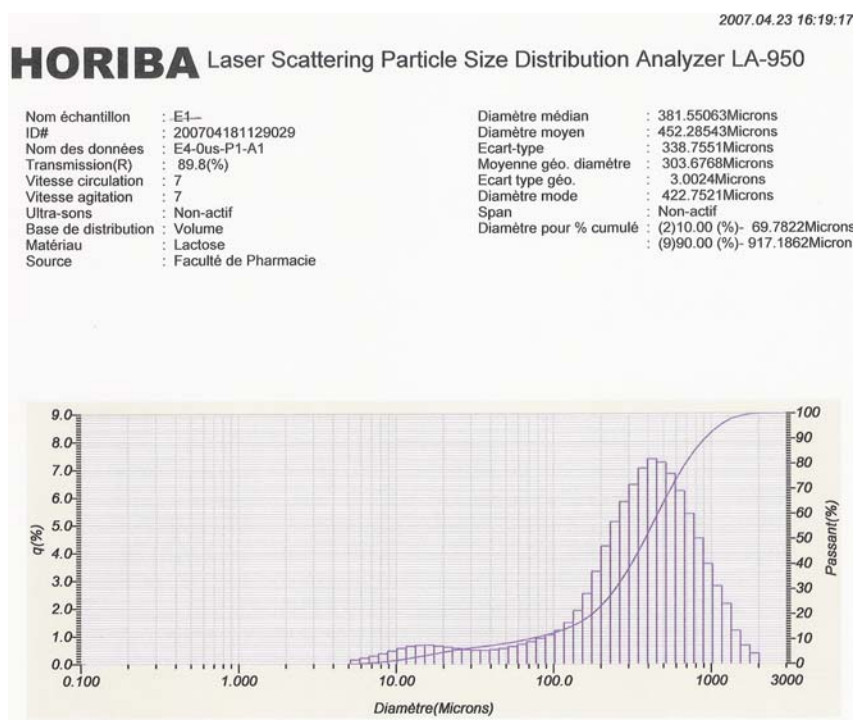
Echantillon : E3 – mesure sans ultra-son



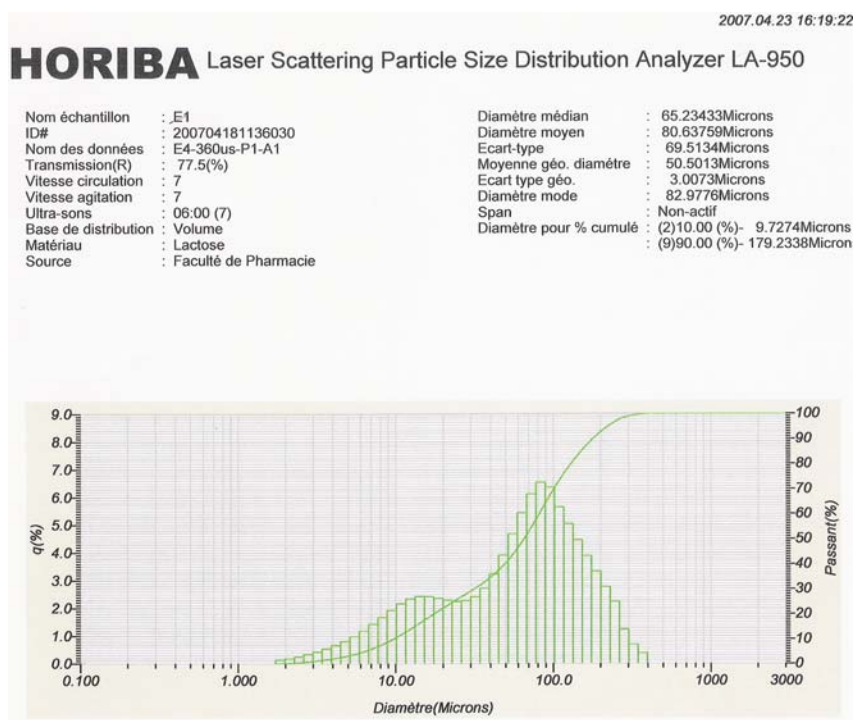
Echantillon : E3 – mesure avec ultra-son



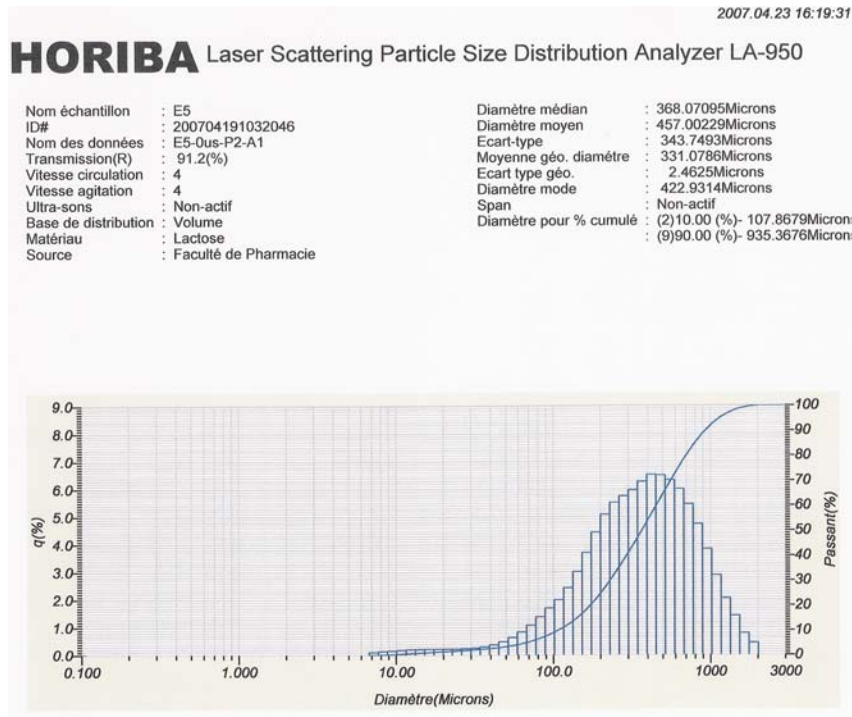
Echantillon : E4 – mesure sans ultra-son



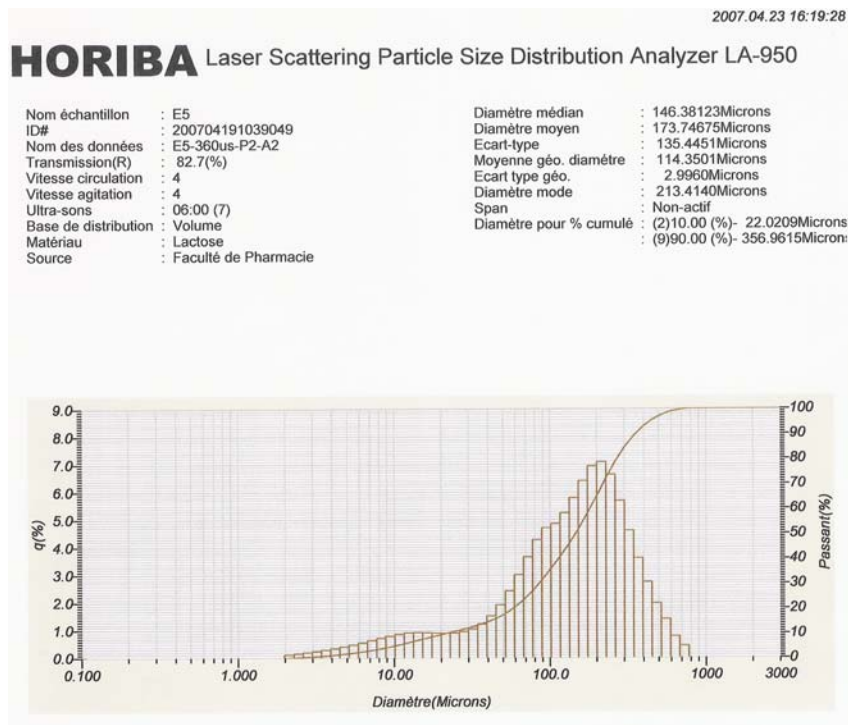
Echantillon : E4 – mesure avec ultra-son



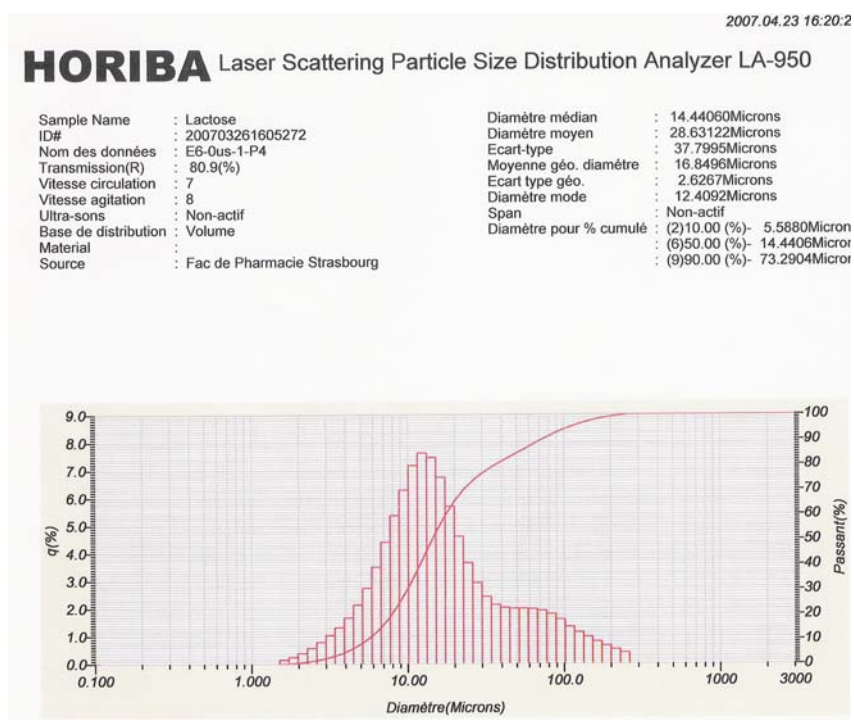
Echantillon : E5 – mesure sans ultra-son



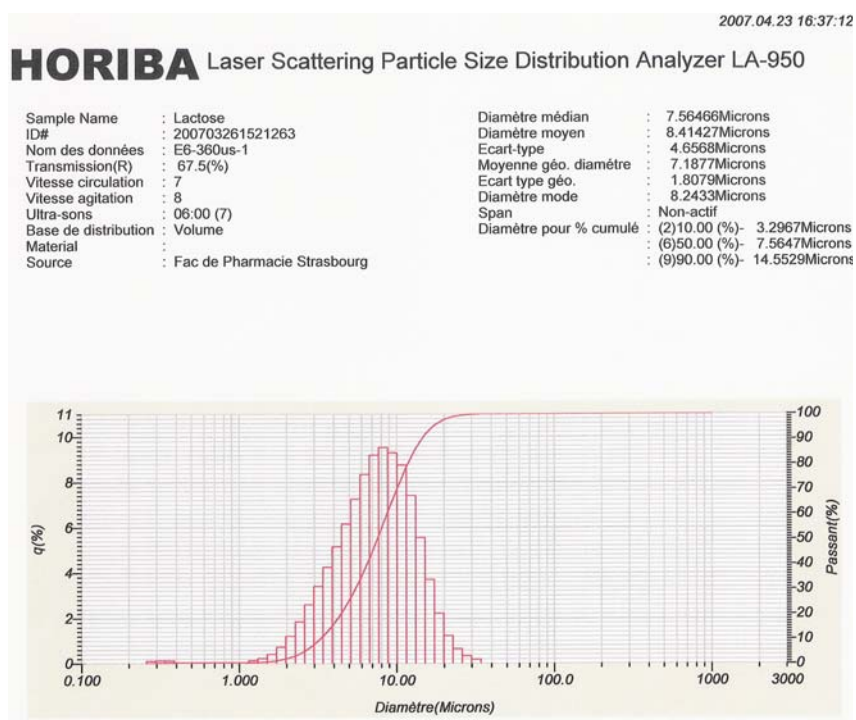
Echantillon : E5 – mesure avec ultra-son



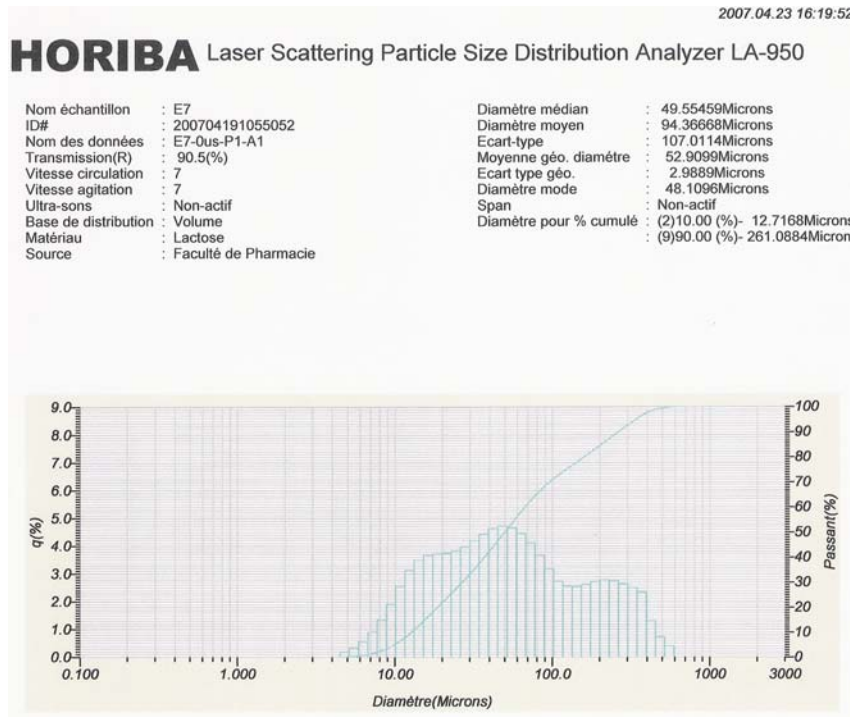
Echantillon : E6 – mesure sans ultra-son



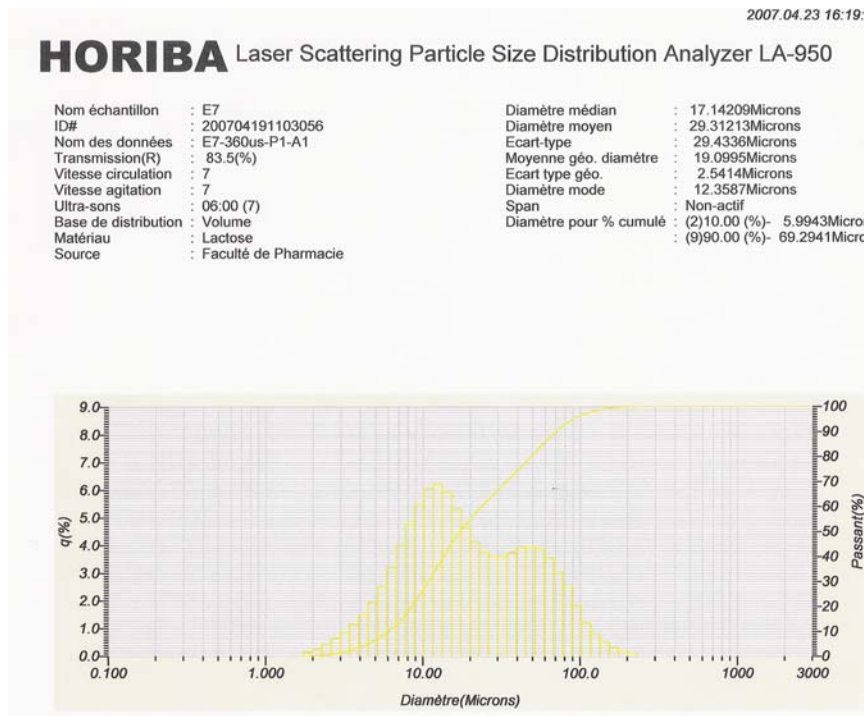
Echantillon : E6 – mesure avec ultra-son



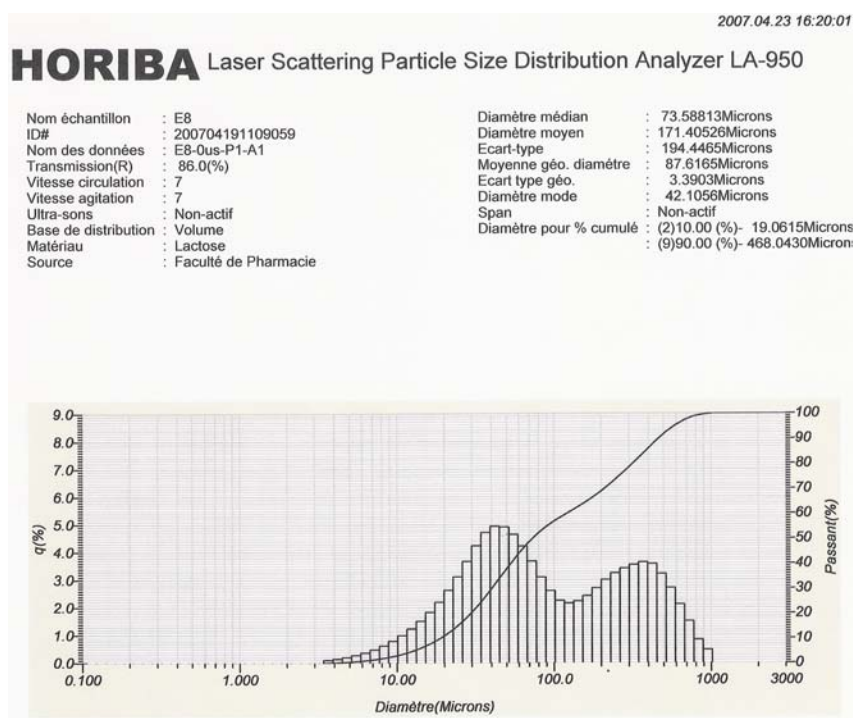
Echantillon : E7 – mesure sans ultra-son



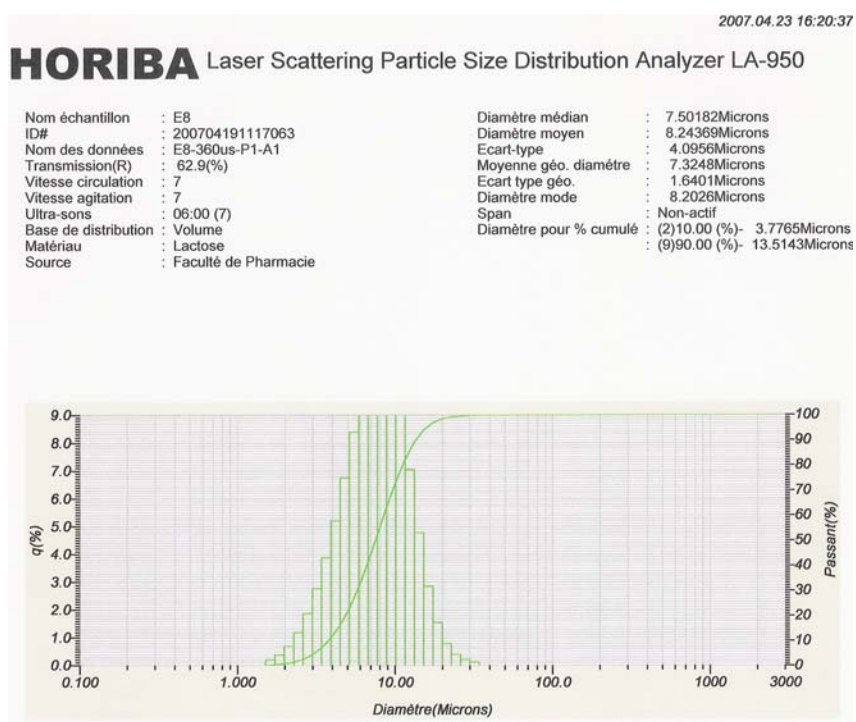
Echantillon : E7 – mesure avec ultra-son



Echantillon : E8 – mesure sans ultra-son



Echantillon : E8 – mesure avec ultra-son



Références Bibliographiques

-
- ¹ R. Rowe, P.J. Sheskey and P. J. Weller, Eds. « Handbook of Pharmaceutical Excipients » (Pharmaceutical Press and American Pharmaceutical Association, Chicago, II, **2003**).
- ² P.D. Darbre, « Underarm cosmetics and breast cancer », *J. Appl. Toxicol.* **2003**, 23/2, 89-95.
- ³ M.G. Soni, I.G. Carabin, G.A. Burdock. « Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabènes) ». *Food and Chemical Toxicology* **2005**, 43, 985-1015.
- ⁴ MC. Nahata, « Lack of pediatric formulation », *Pediatrics* **1999**, 104, 607-9.
- ⁵ D. Chang, R.K. Chang. « Review of Current Issues in pharmaceutical Excipients », *Pharmaceutical Technology*, **2007**.
- ⁶ R.G. Strickley. « Solubilizing excipients in oral and injectable formulations », *Pharm. Research* **2004**, 21, No.2.
- ⁷ C.W. Pouton. « Properties and uses of common formulation lipids, surfactants and cosolvents », AAPS Workshop **2007**.
- ⁸ P.S. Burton, J.T. Goodwin, T.J. Vidmar, B. M. Amore, « Predicting drug absorption: how nature made it a difficult problem », *J. Pharm. Exp. Ther.* **2002**, 303, No.3.
- ⁹ S. Ishii. « Compositions d'édulcorants à fort pouvoir sucrant, à pouvoir sucrant accru, correcteurs de goût et leur utilisation », Brevet P.C.T. WO 01/25262, 2001.
- ¹⁰ P. Buser, M. Imbert. « Psychophysiologie sensorielle II », Ed Hermann, 1982, 291-337.
- ¹¹ L. Perrin. « Le comportement de l'enfant face à la saveur sucrée », Thèse en chirurgie dentaire, Brest, n° 006, 1986.
- ¹² E.N. Marieb. « Anatomie et physiologie humaines », Ed De Boeck Université, 2ème édition, 498-501.
- ¹³ J.M. Charbonnel, C. Devys C, « Les anti-ulcéreux », *Lyon Pharmaceutique* **1995**, 46, 471487.
- ¹⁴ B.K. Sandhu, A. Sawcenko. « Gastroesophageal reflux in children », *Indian J Pediatr* **1999**, 66, 52-55.
- ¹⁵ S.M. Cano, J.B. Montoro, C. Pastor, L. Pou, P. Sabin. « Stability of ranitidine hydrochloride in total nutrient admixtures », *Am J Hosp Pharm* **1988**, 45, 1100-110.
- ¹⁶ « Raniplex 300MG Comprimés et granules », Avis de la commission de transparence, 21 mai 1997.
- ¹⁷ « Anti-ulcéreux », Fiche de transparence A.F.S.S.A.P.S, 10 octobre 1998.
- ¹⁸ M.F. Williams, L.J. Hak, G. Dukes. « In vitro evaluation of the stability of ranitidine hydrochloride in total parenteral nutrient mixtures », *Am J Hosp Pharm* **1990**, 47, 1574-1579.
- ¹⁹ M. J. Lawrence, G.D. Rees. « Microemulsion-based media as novel drug delivery systems », *Adv Drug Deliv Rev* **2000**, 45, 89-121.
- ²⁰ Hörter D., Dressman J.B., « Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract », *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, 46, p. 75-87.
- ²¹ Kramer S.D. « Absorption prediction from physicochemical parameters », *PSTT*, 1999, 2 (9), p. 373-380.
- ²² Humberstone A.J., Charman W.N., « Lipid-based vehicles for the oral delivery of poorly water soluble drugs », *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1997, 25, p. 103-128.
- ²³ Constantinides P.P., « Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption : physical and biopharmaceutical aspects », *Pharm. Res.*, 1995, 12 (11), p. 1561-1572.
- ²⁴ Charman W.N., « Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts », *J. Pharm. Sci.*, 2000, 89 (8), p. 967-978.
- ²⁵ Roman R., « So you want to use lipid-based formulations in development », *B. T. Gattefossé*, 1999, n°92, p. 51-58.
- ²⁶ Pouton C.W., « Lipid formulations for oral administration of drugs : non-emulsifying, self-emulsifying and self-microemulsifying' drug delivery systems », *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2000, 11 (2), p. 593-598.
- ²⁷ Pouton C.W., « Formation of self-emulsifying drug delivery systems », *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1997, 25, p. 47-58.
- ²⁸ Charman S.A., Charman W.N., Rogge M.C., « Self-emulsifying drug delivery systems : formulation and evaluation of an investigational lipophilic compound », *Pharm. Res.*, 1992, 9 (1), p. 87-93.
- ²⁹ Shah N.H., Carvajal M.T., Patel C.L, Infeld M.H., Malick A.W., « Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) with polyglycolized glycerides for improving *in vitro* dissolution and oral absorption of lipophilic drugs », *Int. J. Pharm.*, 1994, 106, p. 15-23.
- ³⁰ Kim J.Y., Ku Y.S., « Enhanced absorption of indomethacin after oral or rectal administration of a self-emulsifying system containing indomethacin to rats », *Int. J. Pharm.*, 2000, 194, p. 81-89.

- ³¹ Khoo S-M, Humberstone A.J., Porter C.J.H., "Formulation design and bioavailability assessment of lipidic self-emulsifying formulations of halofantrine", *Int. J. Pharm.*, 1998, 167, p. 155-164.
- ³² Kim H-J., Yoon K.A., Hahn M., Park E-S., Chi S-C., "Preparation and in vitro evaluation of self-emulsifying drug delivery systems containing idebenone", *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 2000, 26 (5), p. 523-529.
- ³³ Benet L.Z., Izumi T., Zhang Y., Silverman J.A., et Wacher V.J., "Intestinal drug transport proteins and P-450 enzymes as barriers to oral drug delivery", *J. Contr. Rel.*, 1999, 62, p. 25-31.
- ³⁴ Watkins P.B., "The barrier function of CYP3A4 and P-glycoprotein in the small bowel", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1997, 27, p. 161-170.
- ³⁵ Nerurkar M.M., Burton P.S., Borchardt R.T., "The use of surfactants to enhance the permeability of peptides through Caco-2 cells by inhibition of an apically polarised efflux system", *Pharm. Res.*, 1996, 13 (4), p. 528-534.
- ³⁶ Charman W.N., "Lipids and oral bioavailability : are there yet-to-be realised opportunities ? ", B. T. *Gattefossé*, 1998, n°91, p. 55-63.
- ³⁷ Gershanik T., Benita S., "self-dispersing lipid formulations for improving oral absorption of lipophilic drugs", *Eur.J. Pharm.Biopharm.*, 2000, 50, p. 179-188.
- ³⁸ Wasan K.M., "Formulation and physiological and biopharmaceutical issues in the development of oral lipid-based drug delivery systems", *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 2001, 27 (4), p. 267-276.
- ³⁹ Simmonds W.J., "The role of micellar solubilization in lipid absorption", *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.*, 1972, 50, p. 403-421.
- ⁴⁰ O'Driscoll C.M., "Micellar solubilization/self-emulsifying systems for improved absorption of drugs", In : Minutes of european symposium, Paris : *Edition de santé*, 1997, p. 126-139.
- ⁴¹ Meaney C.M., O'Driscoll C.M., "A comparison of the permeation enhancement potential of simple bile salt and mixed bile salt : fatty acid micellar systems using the Caco-2 cell culture model", *Int. J. Pharm.*, 2000, 207, p. 21-30.
- ⁴² Naylor L.J., Bakatselou V., Dressman J.B., "Comparison of the mechanism of dissolution of hydrocortisone in simple and mixed micelle systems", *Pharm. Res.*, 1993, 10 (6), p. 865-870.
- ⁴³ Bakatselou V., Oppenheim R.C., Dressman J.B., "Solubilization and wetting effects of bile salts on the dissolution of steroids", *Pharm. Res.*, 1991, 8 (12), p. 1461-1469.
- ⁴⁴ Mithani S.D., Bakatselou V., TenHoor C.N., Dressman J.B., "Estimation of the increase in solubility of drugs as a function of bile salt concentration", *Pharm. Res.*, 1996, 13 (1), p. 163-167.
- ⁴⁵ Dangi J.S., Vyvas S.P., Dixit V.K., "The role of mixed micelles in drug delivery. I. Solubilisation", *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 1998, 24 (7), p. 681-684.
- ⁴⁶ De Smidt J.H., Grit M., Crommelin D.J.A., "Dissolution kinetics of griseofulvin in mixed micellar solutions", 1994, *J. Pharm. Sci.*, 83 (9), p. 1209-1212.
- ⁴⁷ Wen-Thing K., Shyr-Yi L., Hsiu-O H., Ming-Thau S., "Physical characterizations of microemulsion systems using tocoperyl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS^o) as a surfactant for the oral delivery of protein drugs", *Journal of controlled release*, 2005 (102), p. 489-507.
- ⁴⁸ Y.V. Rama Prasad, "Enhanced intestinal absorption of vancomycin with Labrasol and d- α -tocopherol PEG 1000 succinate in rats", *Int. Journ. of Pharm*, 250 (2003) 181-190.
- ⁴⁹ D. Robert, A. Giovanni, M. Zanaret. « Physiologie de la déglutition », *Encycl Méd Chir, Oto-rhino-laryngologie*, 1996.
- ⁵⁰ M. Guatterie, V. Lozano. « La déglutition et les dysphagies », Novartis Ed.
- ⁵¹ A. Car. « La commande corticale du centre cortical bulbaire ». *J Physiol* 1970, 62, 361-386.
- ⁵² C. Dubreuil, A. Morgon, C. Martin. « La commande corticale de la déglutition. Point d'impact bulbaire de la voie corticiluge déglutitrice ». *J Physiol* 1973, 66, 553-576.
- ⁵³ « Physiologie de la region orofaciale. Physiologie des voies aërodigestives supérieures », Paris: Masson, 1983, 83-98.
- ⁵⁴ M. Guatterie, V. Lozano, M. Barat. « Troubles de la déglutition après accident vasculaire cérébral : évaluation et prise en charge », *Journal de Réadaptation Médicale* 1999.
- ⁵⁵ V. Lozano, M. Guatterie. « Troubles de la déglutition chez les personnes âgées et adaptations palliatives », *Information Diététique* 1997.
- ⁵⁶ M. Savary. « Physiologie de l'œsophage. Physiologie des voies aériennes supérieures », Paris: Masson, 1984, 187-199.
- ⁵⁷ Chevallier, Bonfils. « Anatomie, ORL v 3 », Flammarion.
- ⁵⁸ « Atlas d'anatomie humaine normale », Sinelnikov, Moscou.
- ⁵⁹ E.M. Bish, J.A. Logemann, A.W. Rademaker, P.J. Kamilas, C.L. Lazarus. « Pharyngeal effects of bolus volume, viscosity, and temperature in patients with dysphagia resulting from neurologic impairment and in normal subjects », *J Speech Hear Res* 1994, 37, 1041-1049.

- ⁶⁰ G. Ciampini, A. Jean. « Rôle des afférences glossopharyngiennes et trigéminales dans le déclenchement et le déroulement de la déglutition », *J Physiol* **1980**, *76*, 49-66.
- ⁶¹ R.O. Dantas, M.K. Kern, B.T. Massey, W.J. Dodds, P.J. Kahrilas, G.J. Bresseur. « Effect of swallowed bolus variables on oral and pharyngeal phases of swallowing », *Am J Physiol* **1990**, *258*, G675-G681.
- ⁶² W.J. Dodds, K.V. Man, I.J. Cook, P.J. Kahrilas, E.T. Stewart, M.K. Kern. « Influence of bolus volume on swallow-induced hyoid movement in normal subjects », *Am J Roentgenol* **1988**, *150*, 1307-1309.
- ⁶³ W.J. Dodds, E.T. Stewart, J.A. Logemann. « Physiology and radiology of the normal and pharyngeal phases of swallowing », *Am J Roentgenol* **1990**, *154*, 953-963.
- ⁶⁴ D Cerenko, M.S. Mc Connel, R. Jackson R. « Quantitative assessment of pharyngeal bolus driving forces », *Otolaryngol Head Neck Surg* **1989**, *100*, 57-63.
- ⁶⁵ J.P. Deffez, L. Deffez-Jozon, A. Lelievre, C. Marchai, I. Van Peteghem. « Temps buccal de la déglutition salivaire. Physiopathologie et principes de rééducation », *Encycl Med Chir* (Elsevier, Paris). Stomatologie et Odontologie **1991**, 22-008-A-20.
- ⁶⁶ E.T. Cunningham, M.W. Donner, B. Jones, S.M. Point. « Anatomical and physiological overview », *Normal and abnormal swallowing*. Jones B, Donner MW editions. New-York: Springer Verlag, **1991**, 7-32.
- ⁶⁷ S.S. Kramer. « Special swallowing problems in children », *Gastrointest Radiol* **1985**, *10*, 241-250.
- ⁶⁸ S.S. Kramer. « Swallowing in children », *Normal and abnormal swallowing*. Jones B, Donner MW editions. New York: Springer Verlag, **1991**, 173-188.
- ⁶⁹ M.J. Casas, K.A. Mc Pherson, D. Kenny. « Durational aspects of oral swallow in neurologically normal children with cerebral palsy: an ultrasound investigation », *Dysphagia* **1995**, *10*, 155-159.
- ⁷⁰ J.E. Aviv, J.H. Martin, M.E. Jones, T.A. Wee, B. Diamond, M.S. Keen MS. « Age-related changes in pharyngeal and supraglottic sensation », *Ann Otol Rhinol Laryngol* **1994**, *103*, 749-752.
- ⁷¹ R. Shaker, L. Lang. « Effect of aging on the deglutitive oral, pharyngeal, and esophageal motor function », *Dysphagia* **1994**, *9*, 221-228.
- ⁷² B.J. Martin, J.A. Logemann, R. Shaker, W.J. Dodds. « Coordination between respiration and swallowing : respiratory phase relationships and temporal integration », *J Appl Physiol* **1994**, *76*, 714-723.
- ⁷³ J.A. Caste II, D.O. Castell, A.R. Shultz, S. Georgeson. « Effects of head position on the dynamics of the upper esophageal sphincter opening during swallowing », *Dysphagia* **1993**, *8*, 1-6.
- ⁷⁴ Berry, Sr., Brevet, **2006**, US 7,001,357 B2.
- ⁷⁵ Berry, Sr., Brevet, **2003**, US 6,524,272 B1.
- ⁷⁶ Crowe, *et al.*, Brevet, **1998**, US 5,772,685.
- ⁷⁷ Botts, Brevet, **1993**, US 5,244,122.
- ⁷⁸ Valenti, Brevet, **1997**, US 5,620,462.
- ⁷⁹ Brevet, US 7,097,632.
- ⁸⁰ Isaacs, Brevet, **1995**, US 5,377,879.
- ⁸¹ Fu-Hsiang, Brevet, **1996**, US 5,554,116.
- ⁸² Demande de brevet français déposée 6 juin 2006 à INPI à Paris.
- ⁸³ E.R. Weibel. « Morphometry of the human lung », Berlin, Springer-Verlag, 1963.
- ⁸⁴ K. Horsfield, G. Cummings. « Morphology of the bronchial tree in man », *J. Appl. Physiol.* **1968**, *24*, 373-391.
- ⁸⁵ H. Yeh, G.M. Schum. « Models of human lung airways and their application to inhaled particle deposition », *Bull. Math. Biol.* **1980**, *42*, 461-480.
- ⁸⁶ P. Gehr, M. Bachofen, E.R. Weibel. « The normal human lung: ultrastructure and morphometric estimation of diffusion capacity », *Resp. Physiol.* **1978**, *32*, 121140.
- ⁸⁷ T. Martonen, Y. Yang. « Deposition mechanics of pharmaceutical particles in human airways », Hickey A.J. (Ed), *Inhalation aerosols, Physical and biological basis for therapy*, vol. 94, Marcel Dekker, New York, NY, 1996, pp 3-27.
- ⁸⁸ H. Schulz. « Mechanisms and factors affecting intrapulmonary particle deposition: implications for efficient inhalation therapies », *PSTTI.* **1998**, *8*, 336-344.
- ⁸⁹ P. Zanen, L.T. Go, J.W. Lammers. « The optimal particle size for parasympatholytic aerosols in mild asthmatics », *Int. J. Pharm.* **1995**, *114*, 115.
- ⁹⁰ C.J. Mussante, J.D. Schroeter, J.A. Rosati, T.M. Crowder, A.J. Hickey, T.B. Martonen. « Factors affecting the deposition of inhaled porous drug particles », *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91*, 1590-1600.
- ⁹¹ J. Heyder, J. Gebhart, G. Scheuch. « Influence of human lung morphology on particle deposition », *J. Aerosol Med.* **1988**, *1*, 81-88.
- ⁹² W. Hofmann, B. Asgharian, R. Wiukler-Heil. « Modeling intersubject variability of particle deposition in human lungs », *J. Aerosol Sci.* **2002**, *33*, 219-235.

- ⁹³ H.M. Courrier, N. Butz, Th.F. Vandamme. « Pulmonary drug delivery systems: recent developments and prospects », *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* **2002**, *19*, 425-498.
- ⁹⁴ A. Rawle. « The importance of particle size analysis in the pharmaceutical industry », Malvern Instruments Ltd. (1997) 11-18.
- ⁹⁵ J.M. Aiache. « Aperçu sur les aérosols médicamenteux de leurs origines à nos jours », *Rev. Histoire de la Pharmacie* **1979**, *26*, 241-298.
- ⁹⁶ A.L. Adjei, Y. Ciu, P.K. Gupta. « Bioavailability and pharmacokinetics of inhaled drugs », Hickey A.J. (Ed), *Inhalation aerosols, Physical and biological basis for therapy*, vol. 94, Marcel Dekker, New York, NY, 1996, 197-231.
- ⁹⁷ Répertoire commenté des médicaments, Centre belge d'information pharmacothérapeutique, 18^{ème} édition, 2004.
- ⁹⁸ B.R. Celli, W. MacNee. « Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper », *Eur. Respir. J.* **2004**, *23*, 947-953.
- ⁹⁹ L. Nannini, C.J. Cates, T.J. Lasserson, P. Poole. « Combined corticostéroïdes and Long acting beta-agonist in one inhaler for chronic obstructive pulmonary disease », *Cochrane Database Syst. Rev.* **2004**, *3*, CD003794.
- ¹⁰⁰ Répertoire commenté des médicaments, Centre belge d'information pharmacothérapeutique, 18^{ème} édition, 2004.
- ¹⁰¹ S.P. Conway. « Evidence for using nebulised antibiotics in cystic fibrosis », *Arch. Dis. Child.* **1999**, *80*, 307-309.
- ¹⁰² C.C. Wei, L.L. Pack, C.K. Chan. « Effects of long-term aerosol pentamidine for *Pneumocystis carinii* prophylaxis on pulmonary function », *Chest.* **1998**, *114* 742-747.
- ¹⁰³ R.N. Dalby, S.L. Tiano, A.J. Hickey. « Medical devices for the delivery of therapeutic aerosols to the lungs », Hickey A.J. (Ed), *Inhalation aerosols, physical and biological basis for therapy*, vol. 94, Marcel Dekker, New York, NY, 1996, pp 441-473.
- ¹⁰⁴ D. Ganderton. « Targeted delivery of inhaled drugs: current challenges and futures goals », *J. Aerosol Med.* **1999**, *12*(Suppl.), S3-S8.
- ¹⁰⁵ J. Grossman. « The evolution of inhaler technology », *J. Asthma.* **1994**, *31*, 55-64.
- ¹⁰⁶ C.E. Johnson. « Principles of nebulizer-delivered drug therapy for asthma », *Am. J. Hosp. Pharm.* **1998**, *46*, 1845-1855.
- ¹⁰⁷ M.M. Clay, S.W. Clarke. « Wastage of drug from nebulisers: a review », *J. R. Soc. Med.* **1987**, *80*, 38-39.
- ¹⁰⁸ S.H. Thomas, M.J. O'Doherty, H.M. Fidler, C.J. Page, D.F. Treacher, T.O. Nunan. « Pulmonary deposition of a nebulised aerosol during mechanical ventilation », *Thorax* **1993**, *48*, 154-159.
- ¹⁰⁹ C. O'Callaghan, P.W. Barry. « The science of nebulised drug delivery » *Thorax* **1997**, *52*(Suppl.), 31-44.
- ¹¹⁰ L.J. Smith. « Developments in inhalation technology », *Drug Deliv. Syst. Sci.* **2002**, *2*, 63-66.
- ¹¹¹ R. Dalby, J. Suman. « Inhalation therapy: technological milestones in asthma treatment », *Adv. Drug Del. Rev.* **2003**, *55*, 779-791.
- ¹¹² R. Pauwels, S. Newman, L. Borgström. « Airway deposition and airway effects of antiasthma drugs delivered from metered-dose inhalers », *Eur. Respir. J.* **1997**, *10*, 2127-2138.
- ¹¹³ R.H. Notter. « Functional composition and component biophysics of endogeneous lung surfactant », C. Lenfant (Ed.), *Lung surfactants: Basic science and clinical applications*, vol. 149, Marcel Dekker, Nex York, NY, 2000, 171-206.
- ¹¹⁴ C. Dunbar. « Dry powder formulation for inhalation », *Drug Deliv. Syst. Sci.* **2002**, *2*, 78-80.
- ¹¹⁵ A.L. Adjei, P.K. Gupta. « Dry powder inhalation aerosols ». A.L. Adjei, P.K. Gupta (Eds.), *Inhalation delivery of therapeutic peptides and proteins*, vol. 107, Marcel Dekker, New York, NY, 1997, pp 625-665.
- ¹¹⁶ R.J. Malcolmson, J.K. Embleton. « Dry powder formulations for pulmonary delivery » *Pharm. Sci. Technol. Today.* **1998**, *1*, 394-398.
- ¹¹⁷ J. Fages, H. Lochar, E. Rodier, J.J. Letourneau, M. Sauceau. « La génération de solides divisés par fluides supercritiques », *Can. J. Chem. Eng.* **2003**, *81*, 161-175.
- ¹¹⁸ M. Sacehetti, M.M. Van Oort. « Spray drying and supercritical fluid particle generation techniques », Hickey A.J. (Ed), *Inhalation aerosols, Physical and biological basis for therapy*, vol. 94, Marcel Dekker, New York, NY, 1996, 337-384.
- ¹¹⁹ J. Broadhead, S.K.E. Rouan, C.T. Rhodes. « The spray drying of pharmaceuticals », *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1992**, *18*, 1169-1206.
- ¹²⁰ K. Masters. « Spray Drying Handbook, 5th ed. », Longman Scientific & Technical, New York, 1991, pp 309-351.
- ¹²¹ M.T. Vidgren, P.A. Vidgren, T.P. Paronen. « Comparison of the physical and inhalation properties of spray dried and mechanically micronised disodium cromoglycate », *Int. J. Pharm.* **1987**, *35*, 139-144.

- ¹²² A. Chawla, K.M.G. Taylor, J.M. Newton, M.C.R. Jolmson. « Production of spray dried salbutamol sulphate for use in dry powder aerosol formulation », *Int. J. Pharm.* **1994**, *108*, 233-240.
- ¹²³ M.T. Carvajal M.T., P. Gasior, E.M. Phillips, A. Weinreib, R. Tarantino, A.W. Malick. « Spray-drying optimization to produce powder for inhalation », *Pharm. Res.* **1994**, *11*, 5140.
- ¹²⁴ « Montane® et Montanox®, esters de sorbitant polysorbates », fascicule de données techniques SEPPIC, **1990**.
- ¹²⁵ R.H. Notter. « Discovery of endogenous lung surfactant and overview of its metabolism and action », C. Lenfant (Ed.), *Lung surfactants: Basic science and clinical applications*, vol. 149, Marcel Dekker, Nex York, NY, 2000, 119-149.
- ¹²⁶ D. Meisner. « Liposomes as a pulmonary drug delivery system », Rolland A. (Ed.), *Pharmaceuticals particulate carriers: therapeutic applications*, vol. 41, Marcel Dekker, New York, NY, 1993, 31-61.
- ¹²⁷ Büchi Mini Spray Dryers, Büchi, Switzerland, [hTc://www.buchi.com/Spray-Drying.69.0.html](http://www.buchi.com/Spray-Drying.69.0.html) - consulté en octobre 2005.
- ¹²⁸ Büchi B-190 spray-dryer, [hTc://www.sprayresearch.com/capabilities/buchi_b190.htm](http://www.sprayresearch.com/capabilities/buchi_b190.htm) - consulté en octobre 2005.
- ¹²⁹ P. Kippax. « Issues in the appraisal of laser diffraction particle sizing techniques », *Pharm. Technol. Eur.* **2005**, 32-39.
- ¹³⁰ Particle size analysis by light diffraction, European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM), European Pharmacopoeia Commission. (2004) E1-E7.
- ¹³¹ O. Albrecht, H. Gruler, E. Sackmann, E. *J. Phys.* **1978**, *39*, 301-303

Nom : SMOLA

Prénom : Malgorzata

Titre : Contribution à l'étude de la formulation et de l'analyse physicochimique de formulations pédiatriques microémulsionnées.

Résumé

Actuellement, de nombreux médicaments destinés aux adultes ne peuvent être prescrits pour un usage pédiatrique, n'étant pas adaptés pour cette indication. En effet, la législation pharmaceutique contraint les laboratoires à mettre sur le marché, pour la voie orale chez les nourrissons et les enfants, des formes liquides (solutions, émulsions, suspensions). Pour ce faire, il existe un réel intérêt à formuler ou à reformuler sous forme liquide des molécules destinées en première intention aux adultes (en adaptant les dosages) ou bien d'autres substances actives, destinées spécifiquement aux enfants.

Le choix de la forme pharmaceutique est important pour permettre d'une part une administration aisée et d'autre part pour masquer le goût désagréable de principes actifs amers. Le choix des excipients utilisés est également important pour éviter toute intolérance ou effets indésirables, tout en maintenant une bonne stabilité, une pharmacocinétique et une biodisponibilité adaptée. Pour ce faire, l'administration de médicaments pédiatriques sous formes colloïdales (microémulsions, nanoémulsions, micro et nanoparticules) permet de répondre aux objectifs particuliers de l'administration de médicaments destinés à cette classe d'âge.

Le manuscrit comprend cinq chapitres dont les objectifs sont les suivants :

1. Étude de l'activité antimicrobienne de solutions multidoses originales formulées en l'absence d'agents conservateurs antimicrobiens classiques.
2. Diminution de l'amertume de principes actifs administrés aux nourrissons et aux enfants de bas âge sous forme liquide à l'aide de systèmes colloïdaux organisés et stables.
3. Formulation d'une solution liquide à usage oral pédiatrique contenant de la vitamine D3 et du fluorure de sodium.
4. Définition d'un dispositif original d'administration de solutions orales chez les nourrissons et les enfants en bas âge.
5. Formulations de particules microémulsionnables pédiatriques destinées à la voie pulmonaire.

Mots clés : Microémulsion, Pédiatrie, Formulation, Poudre pulmonaire, Agent antimicrobien, Administration oral, Solution micellaire