

UNIVERSITE DE STRASBOURG
ECOLE DOCTORALE SCIENCES CHIMIQUES
2009/2010

THESE

Présenté pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

Par

Mustafa BEESH

**Mise au point de nouvelles formulations
pharmaceutiques orales à délivrance ciblée de
principes actifs au niveau du côlon**

Discipline : Chimie

Spécialité : Sciences Pharmaceutique

Soutenance publique le 29 Juin 2010

Dr. Gérard LIZARD (DR, INSERM, Dijon)

Dr. Marc POIROT (DR, INSERM, Toulouse)

Dr. Saïd ENNAHAR (MC, HDR, Strasbourg)

Pr. Thierry VANDAMME (Strasbourg)

Rapporteur externe

Rapporteur externe

Examineur interne

Directeur de thèse

« Puisqu'on ne peut être universel en sachant tout ce qui peut se savoir sur tout, il faut savoir un peu de tout, car il est bien plus beau de savoir quelque chose de tout que de tout savoir d'une chose. Cette universalité est la plus belle. Si on pouvait avoir les deux encore mieux mais s'il faut choisir, il faut choisir celle là. »

Pascal

« La bougie ne perd rien de sa lumière en la communiquant à une autre bougie. »

Anonyme

Remerciements

Tout d'abord parce que cela me permet de remercier les personnes sans qui ces années n'auraient pas été aussi belles. Mais aussi parce que ces quelques lignes viennent du cœur et ne suivent pas de logique scientifique...

*La première personne que j'aimerais remercier et dédier cette thèse est mon épouse **Zilal** (mon ange gardien) sans lequel cette thèse n'aurait jamais vu le jour. Ton amour, ta compréhension, ta patience, tes encouragements et ta tendresse m'ont permis d'en arriver là, merci pour ta présence à mes côtés, merci pour ton soutien à chaque instant pendant les bons moments comme pendant les autres. Mon âme tu es toute ma vie. **Ame ELZILLE**, tu resteras mon amour éternel.*

A mon petit ange Joud, Joud, rien que ton sourire me remplit de joie, me donne l'esprit et me fait oublier les problèmes, merci pour ton innocence.

*Je voudrais exprimer ma profonde reconnaissance à mon directeur de thèse, Monsieur le professeur **VANDAMME Thierry** qui m'a accompagné tout au long de ma thèse. Merci pour ton encadrement scientifique et technique, comme pour les discussions scientifiques, pour la confiance que tu m'as accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral.*

*J'exprime ma profonde gratitude à Monsieur Dr. **LIZARD Gérard** et à Monsieur Dr. **POIROT Marc** qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger mon travail de thèse et d'assumer la tâche de rapporteur.*

*J'aimerais exprimer ma reconnaissance à Monsieur Dr. **ENNAHAR Saïd** qui a accepté d'être partie du jury et examiner ce travail, et également pour ton soutien et tes conseils indispensables.*

*Je remercie **MAJEWSKA Paulina** qui a travaillé sur ce sujet en y apportant tout son savoir-faire et un dévouement sans faille au laboratoire. Je tiens à elle exprimer ma plus profonde reconnaissance pour m'avoir aidé pendant la première année de thèse. Je garderai un très bon souvenir des*

discussions interminables que nous avons eu tant du point de vue scientifique que totalement imbécile.

*Je tiens également à remercier Monsieur Dr. **LABU Luc** pour son aide bénéfique et pour nos discussions scientifiques.*

*Mes reconnaissants remerciements à mes amis du master (**Master ingénierie pharmaceutique, 2005/2006**) notamment, à **ALALAWY Yassir** et à **LAWSON Germain** pour leurs aides, leurs soutiens et également pour les bons moments que nous avons passés ensemble.*

*Un grand grand grand merci du fond de cœur à toutes mes amie de thèse notamment à **SAE HOUER Pierre** et à **GBSSI komenan-gildas**, pour leurs amitiés, leurs soutiens, mais aussi pour les bons moments que nous avons passés ensemble durant ces années ainsi que, pour leurs coup de main indispensable pendant la phase de rédaction de mon mémoire de thèse.*

*Aussi que, Je voulais remercier du fond de cœur à Madame Dr. **BIETH Helene** pour son aide et son soutienne spontané.*

*J'adresse mes plus vifs remerciements à Monsieur le professeure **PABST Jean-Yves** et à son équipe pour sa gentillesse et son soutien (merci Jean-Yves pour votre bonne humeur et votre extrême gentillesse).*

*Mes reconnaissants remerciements à Monsieur le professeur **MARCHIONI Eric** et à toute son équipe pour leurs aides et leurs soutiens.*

*Mes remerciements vont aussi à ma **mère**, à tous mes frères et sœurs et également à mes familles et mes amis en Syrie.*

Mes remerciements vont aussi à toutes et à tous qui sont pensés à moi durant mes études en France et je sais qu'ils sont nombreux. Merci pour votre amour et vos encouragements.

A mon père Abd Elillah

Table des matières

Remerciements	5
Table des matières	9
Liste des abréviations	15
Liste des figures	17
Liste des tableaux	21
Introduction générale et objectif	25
Chapitre 1	29
Etude bibliographique	29
1. Appareil digestif	31
2. Anatomie du côlon	36
3. Fonctions du côlon	39
3.1. Absorption de l'eau et du sel	39
3.3. L'activité bactérienne	42
3.4. Matières fécales et défécation	42
4. Le côlon, site de libération spécifique de principes actifs	42
5. Les facteurs influant sur la performance de la libération ciblée des médicaments au niveau du côlon	46
5.1. Le pH gastro-intestinal	46
5.2. La vidange gastrique	47
5.3. Le temps de transit gastro-intestinal	49
5.4.2. Absorption des peptides et des protéines	56
6. Le microbiote gastro-intestinal	58
6.1. Introduction générale	58
6.2. Distribution du microbiote dans le tractus gastro-intestinal	60
6.3. Les facteurs majeurs influençant le microbiote gastro-intestinal	62

6.4.	Les importances physiologiques du microbiote intestinal	63
6.4.1.	Rôle du microbiote intestinal dans le métabolisme intra-luminal du côlon.....	64
6.4.2.	Métabolisme des résidus alimentaires dans le côlon.....	65
6.4.3.	Métabolisme des médicaments dans le côlon	67
7.	Polysaccharides dans les systèmes spécifiques pour la délivrance colique de médicaments.....	68
7.1.	Introduction.....	68
8.	Le dextran	71
8.1.	Historique, structure et origine.....	71
8.2.	Propriétés physico-chimiques	72
8.3.	Aspects pharmacologiques et dégradation enzymatique.....	73
8.4.	Application dans le domaine biomédical	73
9.	Méthodes de délivrance spécifique des médicaments au niveau du côlon	74
9.1.	Formes rectales	74
9.2.	La formation de liaisons covalentes entre principe actif et transporteur : formulation d'une prodrogue.....	75
9.3.	Les systèmes basés sur les variations de pH.....	78
9.4.	Les systèmes basés sur les durées du transit.....	83
9.5.	Les systèmes basés sur l'utilisation des polysaccharides	85
9.6.	Autres systèmes	87
	Partie expérimentale.....	91
	Chapitre 2.....	93
	Synthèses, caractérisation et dégradation enzymatique des différents esters de dextran.....	93
1.	Objectifs et stratégie de synthèse.....	95
2.	Estérification de polysaccharides.....	95
2.1.	Généralités sur les esters organiques de polysaccharides	95
2.2.	Conditions hétérogènes.....	96

2.3.	Conditions homogènes.....	98
2.3.1.	Le milieu aqueux.....	98
2.3.2.	Solvants organiques.....	99
2.4.	Degré de substitution	100
3.	Matériels et méthodes	102
3.1.	Matériels	102
3.2.	Synthèse des esters de dextran.....	102
3.3.	Caractérisation des esters de dextran	104
3.4.	Etude de la dégradation enzymatique in vitro des différents esters de dextran ...	105
3.5.	Préparation de films isolés	106
3.6.	Etude de perméabilité d'un principe actif modèle à travers les films isolés.....	106
3.7.	Statistiques	108
4.	Résultats et discussion	108
4.1.	Synthèse et caractérisation de différents esters de dextran.....	108
4.2.	Caractérisation par spectroscopies	110
4.2.1.	Les spectres IRTF.....	110
4.2.2.	Les spectroscopies RMN ¹ H et ¹³ C	111
4.3.	Etude de la dégradation enzymatique in vitro des esters de dextran	114
4.4.	Etude de la perméabilité.....	116
5.	Conclusion	119
	Chapitre 3.....	121
	Synthèse, caractérisation et dégradation enzymatique de di, tri, et tétra blocs copolymères à base de dextran.....	121
1.	Objectifs et stratégie de synthèse.....	123
2.	Généralités sur les copolymères.....	123
2.1.	Les copolymères à blocs	123
2.2.	Polymère greffé.....	124

2.3.	Les copolymères amphiphiles.....	124
3.	La Polymérisation Radicalaire.....	125
3.1.	Polymérisation en milieu hétérogène.....	125
3.1.1.	Généralités.....	125
3.1.2.	Les différents procédés.....	126
3.2.	Polymérisation en milieu homogène.....	127
3.2.1.	Polymérisation en masse.....	127
3.2.2.	Polymérisation en solution.....	127
4.	Polymérisation radicalaire en émulsion par voie redox.....	128
5.	Matériels et méthodes.....	130
5.1.	Matériels.....	130
5.2.	Synthèses de copolymères à tétra blocs de type Dex-A-B-C.....	131
5.3.	Purification des copolymères à blocs.....	132
5.4.	Caractérisation des copolymères à blocs.....	134
5.5.	Paramètres de la copolymérisation.....	134
5.5.1.	Pourcentage d'efficacité de greffage GE%.....	134
5.5.2.	Pourcentage de greffage G%.....	134
5.5.3.	Pourcentage de conversion total TC%.....	135
5.5.4.	Pourcentage des homopolymères libres FP%.....	135
5.5.5.	Pourcentage du dextran libre FD%.....	135
5.6.	Etude de la dégradation enzymatique in vitro des différents copolymères à blocs à base de dextrans par la dextranase.....	135
5.7.	Préparation de films isolés.....	135
5.8.	Etude de perméabilité du principe actif à travers le film isolé.....	136
6.	Résultats et discussions.....	136
6.1.	Synthèse et caractérisation des nouveaux copolymères à blocs à base de dextrans.....	136
6.2.	Etudes spectroscopiques.....	139

6.2.1.	Caractérisation par spectroscopie IRFT	139
6.2.2.	Caractérisation par spectroscopies RMN ¹ H et ¹³ C.....	141
6.3.	Etude in vitro de la dégradation enzymatique des copolymères à blocs à base de dextrans	146
6.4.	Etude In vitro de la perméabilité de la théophylline à travers des films isolés....	148
7.	Conclusion	150
Chapitre 4.....		151
Etudes de la libération in vitro d'un traceur à partir de comprimés enrobés avec différents types des copolymères à blocs à base de dextrans.....		151
1.	Objectifs et stratégie de synthèse	153
2.	Introduction.....	153
3.	Fabrication de comprimés.....	153
3.1.	Propriétés d'une poudre avant compression	154
3.1.1.	Propriétés d'écoulement.....	155
3.1.2.	Comprimabilité	155
3.2.	Modification des propriétés d'une poudre avant compression : granulation.....	155
3.2.1.	Granulation à sec.....	156
3.2.2.	Granulation par voie humide	157
3.3.	Compression	159
4.	Généralités sur l'enrobage par film (Pelliculage)	159
4.1.	Formation du film à partir d'une dispersion aqueuse	161
5.	Matériels et méthodes	162
5.1.	Matériels	162
5.2.	Préparation et évaluation des comprimés nus de théophylline	163
5.3.	Préparation des dispersions utilisées pour l'enrobage	164
5.4.	Enrobage des comprimés	166
5.5.	Etude de la libération in vitro de la théophylline à partir de comprimés enrobés	167
6.	Résultats et discussions.....	168

6.1.	Préparation et enrobages des comprimés.....	168
6.2.	Etude de la libération in vitro de la théophylline à partir de comprimés enrobés	169
6.2.1.	Etude de l'influence de la composition des blocs polyacrylique sur la libération de la théophylline	170
6.2.2.	Etude de l'influence du poids moléculaire du bloc de dextran sur la libération de la théophylline	172
6.2.3.	Etude de l'influence du pourcentage d'enrobage sur la libération de la théophylline à partir de comprimés enrobés.....	174
6.2.4.	Etude de l'influence du pH sur la libération de la théophylline	175
6.2.5.	Etude de l'influence de la dextranase sur la vitesse de la libération de la théophylline à partir de comprimés enrobés avec 10% du Dex70(1).....	176
7.	Conclusion	177
	Chapitre 5.....	179
	Conclusion générale et perspectives	181
	Chapitre 6.....	185
	Références	185
	Chapitre 7.....	209
	ANNEX (Brevet et article).....	209
	Brevet	
	Forme galénique orale, procédé de fabrication du polymère et utilisation.....	211
	Article	
	Synthesis and characterization of dextran esters as coating or matrix systems for oral delivery of drugs targeted to the colon	213

Liste des abréviations

AGCC	Acides gras à chaîne courte
Å	Angström
AcOEt	Acétate d'éthyle
BCS	Système de classification biopharmaceutique
CC	Cancer du côlon
CPG	Chromatographique en phase gazeuse
DCM	Dichlorométhane
Dex (1)	Dextran-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (65 :25 :10)
Dex (2)	Dextran-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (1 :1 :1)
Dex (3)	Dextran-b-P(MA-b-MAA) (70 : 30)
Dex (4)	Dextran-b-P(MA-b-MAA) (90 : 10)
Dex (5)	Dextran-b-P(MA-b-MMA) (50 : 50)
DexAce	Acétate de dextran
Dex-b-P(A-b-B-b-C)	Dextran copolymère à blocs A, B et C
DexBut	Butyrates de dextran
DexPro	Propionates de dextran
DMAP	4,4-Diméthylaminopyridine
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DS	Degré de substitution
ERS 30	Eudragit® RS 30 D
EFS 30	Eudragit® RS 30 D
Et2O	Ether
H	Heure
H	Epaisseur du compact (mm)
Hz	Hertz
ICARR	Indice de Carr (%)
IHAUSNER	Indice d'Hausner
IRTF	Infrarouge à Transformée de Fourier
kDa	kilodalton
MAA	Acide méthacrylique

MA	Acrylate de méthyle
MeOH	Méthanol
μm	Micromètre
m/m	Rapport masse/masse
m/v	Rapport masse/ volume
mL	Millilitre
MMA	Méthacrylate de méthyle
Mm	Millimètre
Mn	masse molaire moyenne en nombre
Mw	masse molaire moyenne en masse
N	Newton / Normal
P	Perméabilité
PA	Principe actif
Poly(A-co-B)	Copolymère statistique A-B
Poly(A-g-B)	Copolymère greffé B greffé sur A
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SIDA	Syndrome de l'ImmunoDéficiency Acquisée
T	Température (°C)
TEC	Citrate de triéthyle
TGI	Tractus gastro-intestinal
THF	Tétrahydrofurane
UFC	Unité formant colonies
UV	Ultra-violet
v/v	Volume/volume

Liste des figures

Figure 1: Evolution du nombre de publications couvrant la thématique de délivrance de médicaments dans le côlon (www.scopus.com/search/form.url, 2010).....	25
Figure 2: Anatomie du tractus gastro-intestinal de l'homme (Aggett <i>et al.</i> , 2003).	33
Figure 3: Anatomie du gros intestin (Ganong and Jobin, 2005b).	36
Figure 4: Représentations schématiques de la paroi intestinale (Bernier <i>et al.</i> , 1988a).	38
Figure 5: Représentation schématique de l'évolution des principaux ions dans le côlon (Bernier <i>et al.</i> , 1988d).....	41
Figure 6: Temps de séjour gastrique d'un comprimé non désintégré (taille 11x 6 mm, densité 1,4 g/mL) avec différents régimes alimentaires (Washington <i>et al.</i> , 2001b).....	49
Figure 7: Elimination dans les selles des déchets provenant d'un repas déterminé. (TA= temps d'apparition, T _{max} . = temps où le selles contiennent le plus de déchets) (Bernier <i>et al.</i> , 1988b).	51
Figure 8: Classification biopharmaceutique des substances actives (BCS) (Amidon <i>et al.</i> , 1995).	54
Figure 9: Voies de passage des médicaments à travers l'épithélium intestinal : la voie paracellulaire emprunte des pores sur les jonctions serrées, la voie transcellulaire utilise ; (1) l'interaction morphologique avec la membrane, (2) la diffusion passive à travers des pores, (3) la diffusion passive avec solubilisation dans la membrane, (4) la diffusion facilitée et (5) un transporteur actif (Meunier <i>et al.</i> , 1988).....	55
Figure 10: Différentes étapes de la colonisation intestinale (De Bodman, 2008).....	59
Figure 11: Les différentes fonctions physiologiques du microbiote intestinal (Burcelin <i>et al.</i> , 2009).	64
Figure 12: Schéma de l'hydrolyse et de la fermentation de différents glucides dans le côlon (Bernier <i>et al.</i> , 1988c).	66
Figure 13: Structure du dextran issu de la souche <i>Leuconostoc Mesenteroïdes</i>	71
Figure 14: Transformation du saccharose en dextran.	72
Figure 15: Conception générale de la synthèse de prodrogues.	75
Figure 16: La structure chimique de la salazopyrine (SASP), de la balsalazide, de l'ipsalazide et de l'olsalazide (OSZ). La réduction de ces prodrogues azoïques par les bactéries du côlon conduit à la libération du 5-ASA (Chourasia and Jain, 2003).	76
Figure 17: Structure chimique de l'Eudragit® (Vandamme <i>et al.</i> , 2002).....	80

Figure 18: Schéma représentatif du trajet du CODES™ dans le tractus gastro-intestinal (Yang et al., 2002).	82
Figure 19: Coupe transversale du système osmotique OROS-CT (Chourasia and Jain, 2003).	89
Figure 20: Schéma général d'une réaction d'estérification.	96
Figure 21: Synthèse d'esters à partir de dérivés d'acide.	96
Figure 22: Mécanisme des réactions d'estérification avec l'anhydride acétique catalysées par le DMAP (Heinze <i>et al.</i> , 2006).	97
Figure 23: Synthèse de l'amidon 2-aminobenzoate en milieu aqueux (Heinze <i>et al.</i> , 2006)..	98
Figure 24: Structures de liquides ioniques (Heinze <i>et al.</i> , 2006).	100
Figure 25: Mécanisme d'estérification du dextran avec l'anhydride d'acides catalysé par le DMAP (a), schéma général de la synthèse d'ester de dextran (b).	104
Figure 26: Représentation schématique des cellules de diffusion pour les études de perméabilité (Stringer and Peppas, 1996; www.permegear.com/sbs.htm , 2010).	107
Figure 27: Spectres IRTF du dextran 70 (d) et des butyrates de dextran avec différents degrés de substitution, DS.3 (a), DS.2 (b) et DS.1(c).	110
Figure 28: Spectres RMN 13C(a) et RMN 1H (b) du dextran dans DMSO-d6.	112
Figure 29: Dégradation enzymatique de différents esters de dextran avec la dextranase à la concentration de 0,5 U/mL (a), de 5 U/mL (b) et de 10 U/mL (c).	115
Figure 30: Libération de la théophylline à travers des films dans différents milieux gastro-intestinaux LGS (a), LIS (b) et LCS (c).	117
Figure 31: Exemples d'architectures de copolymères (Kumar <i>et al.</i> , 2001).	124
Figure 32: Mécanisme général d'une polymérisation radicalaire en émulsion par oxydoréduction de cérium (IV). Ainsi, S représente un substrat polysaccharidique et M représente un monomère (Casinos, 1992; Mr <i>et al.</i> , 2000).	129
Figure 33: Mécanisme de la polymérisation redox des alkylcyanoacrylates (ACAs) sur le dextran pour former le dextran-b-PACA (Chauvierre <i>et al.</i> , 2003b).	130
Figure 34: Schéma général représentent le (a) mécanisme de polymérisation radicalaire par voie redox, (b) la synthèse du dextran-b-P (MA-b-MMA-b-MAA).	133
Figure 35: Spectres IRFT du dextran et des différents copolymères à blocs à base de dextrans et d'acides acryliques.	140
Figure 36: Spectre RMN 1H des différents types des copolymères à blocs à base de dextran 70 dans DMSO-d6.	141
Figure 37: Spectres RMN 13C (a) et RMN 1H (b) du dextran dans du DMSO-d6.	142

Figure 38: Spectre RMN 1H du dex10 (2) dans du DMSOd6.	142
Figure 39: Spectres RMN 1H du dex70 –b-P(MA-b-MMA-b-MAA) de type 2 avant (A) et après (b) hydrolyse acide.	143
Figure 40: Spectre RMN 13C (J-mode) du dex70-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) dans le DMSO-d6 (CH du PMA située à 41 ppm, C (quartenaire) du PMMA et PMAA située à 44 ppm, CH3 du PMMA et PMAA situé à 15-18 ppm, CH2 du PMA, PMMA et PMAA est situé à 34 ppm, O-CH3 du PMA et PMMA est situé à 52 ppm, C=O de PMAA, PMMA et PMA sont respectivement situés à 180, 176 et 178 ppm et ceux du dex70 sont situés entre 66 et 98 ppm).	146
Figure 41: Dégradation enzymatique in vitro des différents types des copolymères à blocs à base de dex70 (A), de dex70 (B), de dex70 (C) et de dex70 (D).....	147
Figure 42: Dégradation enzymatique in vitro des différents copolymères à blocs à base de dex70.....	148
Figure 43: Schéma représentant les étapes de la compression directe, de la granulation par voie sèche et de la granulation par voie humide (Summers and Aulton, 2002).	156
Figure 44: Schéma des quatre stades représentant les interactions macroscopiques observées entre un liquide et une poudre (Goldszal and Bousquet, 2001).....	158
Figure 45: Schéma de principe de la compression sur presse rotative (Levacher, 2006).	159
Figure 46: Processus de formation d'un film à partir d'une dispersion aqueuse de polymères insolubles (Yang, 2009).	161
Figure 47: Processus de la coalescence des particules pendant la phase d'évaporation des particules pendant la phase d'évaporation (Carlin <i>et al.</i> , 2008).	162
Figure 48: Influence de l'enchaînement des copolymères polyacryliques sur la libération de la théophylline. Dex70(1) : Dex70-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (70: 23: 6); Dex70(2) : Dex70-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (48: 28: 24) ; Dex70(3) : Dex70-b-P(MA-b-MAA) (83: 17) ; Dex70(4) : Dex70-b-P(MA-b-MAA) (94: 6) ; et Dex70(5) : Dex70-b-P(MA-b-MMA) (59 : 41).	170
Figure 49: Schéma des différents mécanismes de libération des substances actives à partir des comprimés enrobés par de polymères insolubles : (1) solubilisation / diffusion à travers la phase homogène formée par les polymères plastifiés ; (2) solubilisation / diffusion à travers des pores constitués par le plastifiant ; (3) diffusion à travers des pores aqueux ; (4) libération sous impulsion d'un gradient des pressions osmotiques (Ozturk <i>et al.</i> , 1990).	172

Figure 50: Influence des poids moléculaire de blocs dextrans sur la cinétique de libération de la théophylline.....	173
Figure 51: Influence du pourcentage d'enrobage sur la libération de la théophylline à partir des comprimés enrobés avec Dex70(1).	174
Figure 52: Influence du pH sur la vitesse de libération de la théophylline à partir de comprimés enrobés avec 10% m/m de Dex70 (1).	175
Figure 53: Influence de la dextranase sur la vitesse de la libération de la théophylline à partir de comprimés enrobés.....	176

Liste des tableaux

Tableau 1: Principaux paramètres physiologiques et caractéristiques du fluide du tractus gastro-intestinal (Vandamme et al., 2002; Rubinstein, 2007; McConnell et al., 2008a)..	34
Tableau 2: Le taux quotidien de renouvellement de l'eau (en mL) dans le tube digestif (Ganong and Jobin, 2005a).....	40
Tableau 3: Avantages et inconvénients de la délivrance ciblée d'un principe actif au niveau du côlon.....	43
Tableau 4: Importance du côlon dans l'absorption de médicaments (les maladies, les symptômes et les principes actifs) (Jain <i>et al.</i> , 2007; Patel <i>et al.</i> , 2007; McConnell <i>et al.</i> , 2009a).	45
Tableau 5: Facteurs influençant l'absorption gastro-intestinale (Kinget <i>et al.</i> , 1998; Lee and Mukherjee, 2007; Deferme <i>et al.</i> , 2008; Griffin and Driscoll, 2008).	53
Tableau 6: Les différentes classes des promoteurs d'absorption colique avec des exemples représentatifs (Kinget <i>et al.</i> , 1998; Lee and Mukherjee, 2007).	57
Tableau 7: Distribution qualitative et quantitative du microbiote du TGI (en UFC.mL ⁻¹) (Bernier <i>et al.</i> , 1988c; Vandamme <i>et al.</i> , 2002).....	61
Tableau 8: Les principaux facteurs influençant la composition et la fonction du microbiote intestinal (Holzapfel et al., 1998; Vandamme, et al. 2002).	63
Tableau 9: L'activité enzymatique des différents types de glycosidases sur les populations mixtes de bactéries fécales de l'homme après 24 h de croissance sur différents substrats polysaccharides (Jain <i>et al.</i> , 2007).....	65
Tableau 10: Les espèces bactériennes impliquées dans la dégradation des différents polysaccharides (Jain <i>et al.</i> , 2007; Kumar <i>et al.</i> , 2009).....	65
Tableau 11: Quelques exemples de réactions métaboliques initiées par le microbiote intestinal et leur substrat médicamenteux (Abu Shamat, 1993; Sousa <i>et al.</i> , 2008).	68
Tableau 12: Polysaccharides couramment utilisés dans la délivrance ciblée de médicaments au niveau du côlon (Chourasia and Jain, 2003; Sinha and Kumria, 2003b; Jain et al., 2007)	70
Tableau 13: Différentes prodrogues développées pour la délivrance spécifique de principe actif au niveau du côlon(Sinha and Kumria, 2003b).	77
Tableau 14: Structure chimique et caractéristiques de copolymères de méthacrylates solubles et insolubles (Kim, 2004; Skalsky and Petereit, 2008).....	81

Tableau 15: Conditions des réactions, degré de substitutions et rendement d'estérification du dextran.....	103
Tableau 16: Solubilité des esters de dextran dans l'eau et des différents solvants organiques.....	109
Tableau 17: Déplacements chimiques (ppm) du dextran dans le DMSO-d ₆	113
Tableau 18: Déplacements chimiques (ppm) des différents esters de dextran dans le CDC ¹³	113
Tableau 19: Perméabilité de la théophylline à travers de différents films en l'absence et en présence de dextranase.....	118
Tableau 20: Condition de synthèse des différents copolymères à blocs préparés.	132
Tableau 21: Différents paramètres caractéristiques des copolymères à blocs à base de dextrans et d'acides polyacryliques.....	138
Tableau 22: Déplacements chimiques (ppm) des différentes fonctions composants les différents types de copolymérisés à blocs à base de dextrans 70 avec des acryliques à blocs dans du DMSOd6.	144
Tableau 23: Perméabilité de la théophylline à travers des films isolés dans des milieux mimant les milieux gastro-intestinaux.....	149
Tableau 24: Exemples d'excipients (liste non exhaustive) utilisés pour préparer de comprimés, reliés à leurs fonctions précises (Allen, 1998; Lee, 2008).	154
Tableau 25: Avantages et inconvénients des deux types de solvants utilisés au cours du pelliculage (Levacher, 2006).	160
Tableau 26: Composition des comprimés de théophylline non enrobés.....	163
Tableau 27: Aptitude à l'écoulement des poudres (USP XXVIII, 2005).....	164
Tableau 28: Composition des dispersions d'enrobage de différentes formulations utilisées.	165
Tableau 29: Conditions opératoires mise en œuvre lors des enrobages des comprimés de théophylline anhydre.....	166
Tableau 30: Conditions opératoires mise en œuvre lors des études de la libération <i>in vitro</i>	167
Tableau 31: Caractéristiques des comprimés nus de théophylline.....	168

Introduction générale et objectifs

Introduction générale et objectif

La voie orale est sans conteste la voie d'administration privilégiée et la plus aisée pour administrer un médicament à un patient. 84% des cinquante médicaments les plus distribués pour les marchés américain et européen sont administrés par cette voie (Lennernas and Abrahamsson, 2005; McConnell *et al.*, 2008a). Afin d'optimiser l'absorption d'un principe actif par cette voie d'administration, depuis plusieurs années, un grand nombre de recherches ont été entreprises. Parmi celles-ci, l'application d'enrobages à dissolution pH-dépendante permet par exemple d'assurer une libération ciblée dans certaines parties du tube digestif (fenêtres d'absorption) et d'éviter une libération prématurée du principe actif.

Bien que beaucoup de progrès technologiques aient été réalisés pour améliorer les formes médicamenteuses destinées à être administrées par cette voie, un des enjeux majeurs qui reste à surmonter est celui de pouvoir assurer une libération ciblée et intacte de principes actifs au niveau du côlon (Langer, 2001; Rosen and Aribat, 2005). Les formes coliques ont fait l'objet d'intenses recherches. La Figure 1 représente le nombre des articles publiés relatifs à « la délivrance de médicaments au niveau du côlon » en fonction de l'année de publication, par une recherche dans la base de données *Scopus Web*.

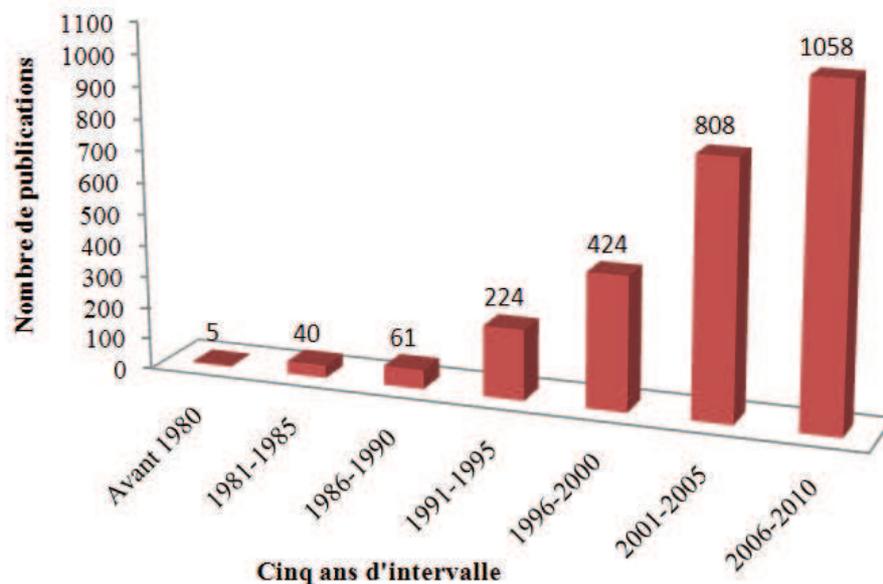


Figure 1: Evolution du nombre de publications couvrant la thématique de délivrance de médicaments dans le côlon (www.scopus.com/search/form.url, 2010).

Seules des formes pharmaceutiques innovantes pourront répondre à cette problématique puisque celles-ci devront parcourir l'estomac, l'intestin et par conséquent différentes zones de pH et résister à différentes enzymes sans dommage pour le principe actif

qui pourrait ainsi être libéré soit brutalement soit de manière prolongée lorsque ces dernières arrivent dans le côlon ascendant. De nombreuses molécules appartenant à des classes thérapeutiques différentes sont concernées par une délivrance ciblée dans le côlon : des anti-inflammatoires, des anticancéreux, des protéines, des peptides, des vermifuges, des agents de diagnostics, des antibiotiques, etc.

La forme pharmaceutique idéale à développer est une forme pharmaceutique solide (comprimé, gélule, minigranules, etc.) comprenant un enrobage qui se dégradera ou se solubiliserait spécifiquement dans le côlon et qui restera intact jusqu'à ce qu'il arrive à ce niveau du tube digestif. De plus, cet enrobage ne doit pas présenter de toxicité, d'irritabilité ou d'effets indésirables chez le patient auquel cette forme pharmaceutique est administrée. Pour répondre à cette problématique, nous proposons de modifier chimiquement des polysaccharides dégradables spécifiquement par les enzymes et les bactéries présentes naturellement dans le côlon.

L'objectif de ce travail de thèse était donc de concevoir de nouveaux excipients à base de polysaccharides, plus précisément à base de dextran, et de les adapter aux conditions physiologiques du tractus gastro-intestinal et plus particulièrement au côlon. Ces nouveaux excipients doivent être dégradables par le microbiote colique et doivent idéalement se dissoudre au pH rencontré dans le côlon.

Deux approches totalement différentes de modifications chimiques destinées à modifier l'hydrosolubilité du dextran, sans pour autant empêcher leur dégradation par le microbiote et les enzymes coliques dans différentes conditions, ont été réalisées.

Une première approche a consisté à modifier chimiquement le dextran par estérification de sorte à le rendre plus hydrophobe (Sun *et al.*, 2004) et lui permettre de poursuivre son trajet dans le tractus digestif sans être dégradé ni dissous mais d'être dégradé sous l'effet des enzymes présentes dans le côlon.

Une deuxième approche a consisté également à rendre le dextran plus hydrophobe en réalisant un polymère à blocs (Chauvierre *et al.*, 2003b) à savoir un polymère constitué d'un bloc « dextran » et d'un second bloc « acryliques ». Arrivé dans le côlon, le bloc « dextran » se dégradera par l'action des bactéries et des enzymes et la partie acrylique se solubiliserait au pH rencontré, c'est-à-dire entre pH 6,8 et 7,4. Dans le cas où le pH serait abaissé, situation rencontrée dans certaines maladies inflammatoires du côlon, cet enrobage permettra néanmoins la libération du principe actif occlus dans cette forme suite à la dégradation enzymatique du bloc « dextran ».

Cette thèse se structure en quatre parties :

- Le premier chapitre bibliographique rappelle brièvement d'une part, des notions sur la physiologie du tube digestif, sur les facteurs endo- et/ou exogène affectant le transit d'une forme pharmaceutique orale le long du tractus gastro-intestinal et d'autre part, les principales approches déjà décrites dans la littérature pour délivrer des formes pharmaceutiques au niveau du côlon.
- Le second chapitre concerne la synthèse, la caractérisation et la dégradation enzymatique de trois familles d'esters de dextran (acétates, propionates et butyrates) avec trois degrés de substitutions (1, 2 et 3). Une évaluation *in vitro* des esters de dextran en tant qu'agents d'enrobage a également été réalisée.
- Le troisième chapitre est consacré à la synthèse, la caractérisation et la dégradation enzymatique des di, tri et tétra blocs copolymères à base des différents types de dextrans par polymérisation radicalaire en émulsion des monomères acryliques (acrylate de méthyle, méthacrylate de méthyle et acide méthacrylique) sur le bloc de dextran. Une évaluation *in vitro* de la potentielle utilisation de ces nouveaux copolymères à blocs a été réalisée pour s'assurer d'une délivrance spécifique des formes pharmaceutiques orales dans le côlon lorsqu'elles sont enrobées avec ces nouveaux polymères.
- Le quatrième chapitre de cette dissertation doctorale concerne les évaluations *in vitro* de la libération d'un principe actif, traceur, à partir de comprimés conventionnels enrobés avec différents types de dextrans copolymères à blocs acryliques dans des milieux mimant les conditions rencontrées dans le tractus gastro-intestinal.

Chapitre 1

Etude bibliographique

1. Appareil digestif

L'appareil digestif (Figure 2) est composé d'une part d'un "tube" et d'autre part d'organes "branchés" sur ce tube. Cet appareil est responsable de la transformation des aliments, de leur dégradation en protéines, glucides, sels minéraux, oligo-éléments, lipides et autres substances utilisables par l'organisme. Il permet également le transport de ces nutriments à travers la muqueuse intestinale vers la circulation sanguine de façon à ce qu'ils puissent être employés par l'organisme. Ces substances constituent les matières premières pour la fabrication, la réparation et le contrôle des différents systèmes de l'organisme.

Le tractus gastro-intestinal (TGI) est un écosystème complexe et ouvert aux microorganismes exogènes. Il est constitué d'un long conduit de 10 à 12 mètres, composé de muscles et de membranes, sa surface totale est estimée à 200-300 m². Il représente la plus grande surface du corps en contact avec l'environnement (Holzapfel et al., 1998). Les principaux paramètres physiologiques et les caractéristiques du fluide du tractus gastro-intestinal sont résumés dans le Tableau 1.

Le tube digestif commence avec la bouche, où les dents et la langue entament le processus de mastication de la nourriture. Ce processus est facilité par la présence de salive sécrétée par les glandes salivaires. La nourriture mastiquée et pré-digérée par la salive est avalée et descend jusque dans l'estomac grâce aux mouvements péristaltiques (contractions rythmées) de l'œsophage. Dans l'estomac, la nourriture est mélangée à de l'acide chlorhydrique qui poursuit le processus de dégradation (Banker and Rhodes, 2002). Lorsque la nourriture a subi ce processus de digestion gastrique le liquide résultant, appelé le chyme, franchit un sphincter appelé pylore pour entrer dans l'intestin grêle. Ce contenu gastrique y transitera jusqu'au gros intestin. Dans ce long tube intestinal aux multiples circonvolutions, les nutriments du chyme sont absorbés pour passer dans la circulation générale, laissant des résidus inutilisables. Ces résidus passent dans le côlon (où la majeure partie de l'eau est réabsorbée dans la circulation sanguine) et le rectum, où il est stocké avant son excrétion. Ces déchets solides, appelés fèces, sont compactés et, lors de la défécation, expulsés par le canal anal et l'anus.

D'un point de vue anatomique et fonctionnel, l'estomac peut être séparé en deux zones : la première est l'estomac proximal qui correspond au fundus et au corps. Il joue le rôle de réservoir pour les aliments provenant de l'œsophage, et possède une activité sécrétoire importante.

La deuxième zone est l'estomac distal qui correspond à l'antrum. Cette partie est essentiellement motrice. Elle assure la fragmentation et l'homogénéisation des solides. Elle régule la vidange aussi du chyme gastrique dans le duodénum (Mion, 2001).

Au niveau de l'estomac, les nourritures mastiquées provenant de la bouche subissent l'action de l'acide chlorhydrique et d'enzymes, comme la pepsine, la chymosine et la lipase. Sécrétés par les glandes gastriques, ces produits aident à digérer les glucides, les protéines et les lipides issus de l'alimentation. L'estomac a une capacité moyenne de 1 litre environ mais peut se distendre pour dépasser cette limite. Lorsque l'estomac est vide, ou presque vide, sa muqueuse se contracte en formant des replis, ou plissements gastriques. Alors qu'il était admis autrefois que les contractions de l'estomac en l'absence de nourriture étaient la cause de la sensation de faim, il est maintenant connu qu'elle est due principalement à la diminution du taux de glucose dans le sang (glycémie). Toutefois, les contractions de l'estomac peuvent souvent être ressenties lorsqu'elles s'ajoutent aux "gargouillements", elles servent à nous rappeler que nous avons faim.

L'intestin grêle est responsable de la fin du processus de digestion ainsi que de l'absorption des produits alimentaires. L'intestin grêle en lui-même est un tube enroulé étroit, mesurant environ 6 à 7 mètres de long. L'intestin grêle s'étend du duodénum (où il reçoit le chyme), à l'orifice iléo-caecal (où il fait passer les produits semi-liquides de la digestion vers le gros intestin). Les aliments traversent le tube digestif grâce aux contractions ondulatoires, appelées ondes péristaltiques, de la paroi intestinale. La digestion des aliments se poursuit grâce à la bile et autres sucs digestifs sécrétés dans le duodénum par la vésicule biliaire, le pancréas, et le foie. Les aliments en cours de digestion passent par les millions de villosités présentes sur la paroi interne de l'intestin. Ils permettent l'absorption de protéines et de glucides qui sont par la suite acheminés au niveau de capillaires sanguins. Ces derniers amènent les nutriments au niveau du foie où ont lieu les processus de transformations métaboliques.

Toute matière alimentaire non absorbée est stockée dans le gros intestin, jusqu'à ce que l'organisme ait partiellement réabsorbé l'eau qu'elle contient. Le reste est propulsé vers le rectum pour être expulsé par l'anus. Le gros intestin se divise en huit segments : le caecum, l'appendice vermiculaire, le côlon ascendant, le côlon transverse, le côlon descendant, le côlon sigmoïde, le rectum et l'anus.

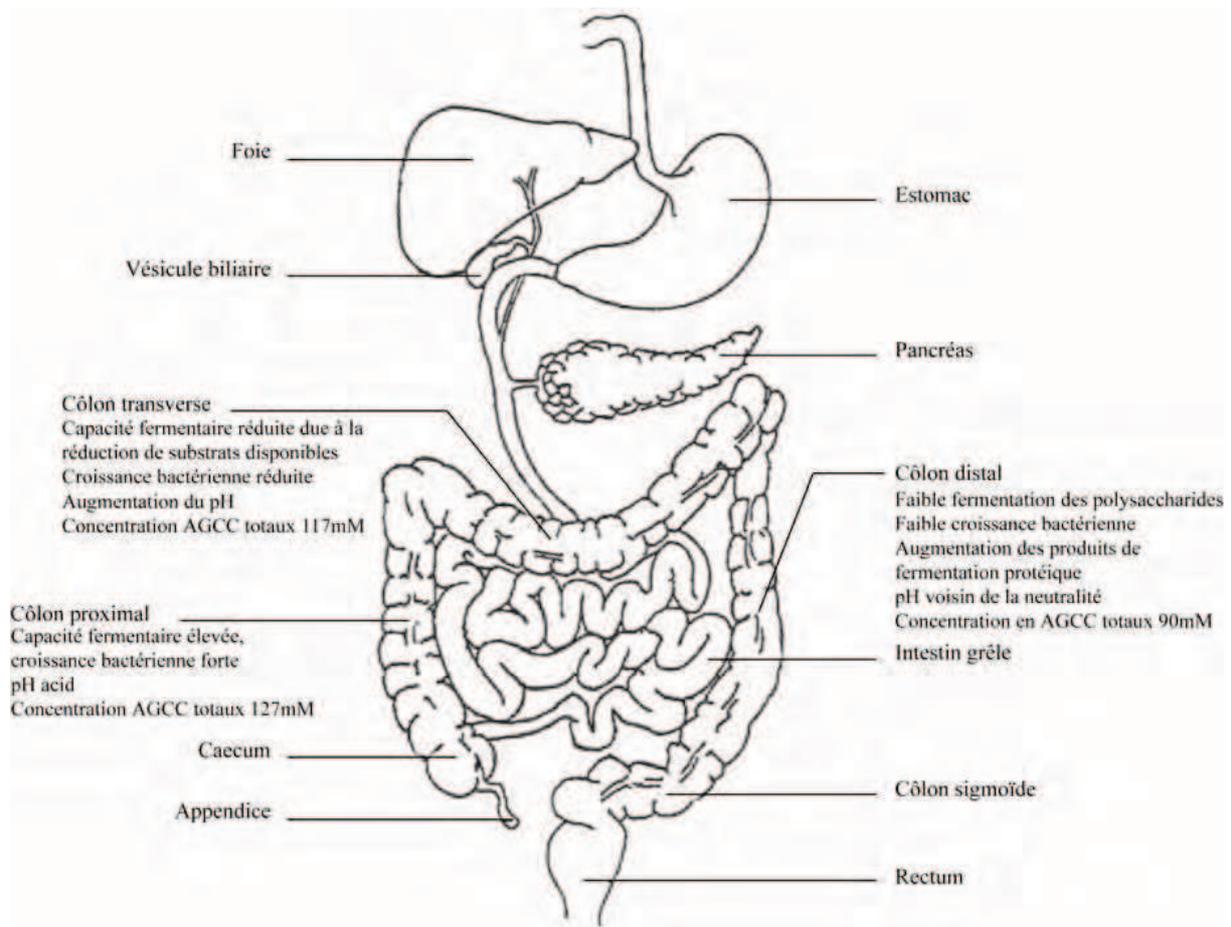


Figure 2: Anatomie du tractus gastro-intestinal de l'homme (Aggett *et al.*, 2003).

Tableau 1: Principaux paramètres physiologiques et caractéristiques du fluide du tractus gastro-intestinal (Vandamme et al., 2002; Rubinstein, 2007; McConnell et al., 2008a).

		Estomac		Intestin grêle		Gros intestin	
			Duodénum	Jéjunum	Iléum	Côlon proximal	Côlon distal
Volume total du fluide (mL)	PM	118 ± 82	212 ± 110*			187	
Volume du fluide libre (mL)	Nourriture	-	54 ± 41*			11±26	
	Jeûne	45 ± 18*	105 ± 72*			13±12	
Tension de surface (mNM ⁻¹)		35-45	32,3	28 ± 1	-	-	-
		33,6 ± 5,9		33,7 ± 2,8*			
Concentration de sel biliaire (mM)	Nourriture	0,06	11,2	8 ± 0,1	6-10	-	-
	Jeûne	0,2 ± 0,2	0,57-5,1	2 ± 0,2	-	-	-
				2,9 ± 2,9			
				0,8-5,5			
Débit de bile (µl min ⁻¹ kg ⁻¹)		-	1.5-15	-	-	-	-
Sécrétion d'acide (mEq/h)	Basale	1-5	-	-	-	-	-
	Maximum	6-40					
Phospholipides (mM)	Nourriture	-	-	3 ± 0.3	-	-	-
	Jeûne	-	-	0,2 ± 0,07	-	-	-
pH		1,0-2.5	-	6,6 ± 0,5	7,5 ± 0,5	6.4 ± 0.6	7 ± 0,7
Niveau bactérien (CFU/g contents)		1,0 x 10 ³	1 x 10 ^{4#}		1 x 10 ⁶ -10 ⁷	1 x 10 ¹¹ -10 ¹²	
Potentiel redox (mV)		-	-65,6 ± 89,7	-	-196,5 ± 96,8	-415 ± 72	-380 ± 110
Bicarbonate (mM)		-	6,7	6	40	-	30
				8,2	30		
Phosphate (mM)		-	-	-	-	-	-
Potassium (mM)		13,4 ± 3	-	5,4± 2,1		-	4,7 ± 1
Sodium (mM)		68 ± 29	-	142 ± 13		-	0,6± 0,3
Chlorure (mM)		102 ± 28	-	126 ± 19		-	0,3± 0,1
Calcium (mM)		0,6 ± 0,2	-	0,5 ± 0,3		-	21± 5,2
Magnésium (mM)		-	-	-	2,8	-	7 ± 1,1

Suite du tableau 1

Force ionique (mM)		0,1± 0,025	-	0,139 ± 0,014	-	-
Capacité du tampon (mmol/L/unité pH)	Nourriture	14 -28	18-30	2,4 -2,8	-	-
	Jeûne	7- 18	5,6 ; 4-13	2,97	-	-
Acides gras à chaîne courte (mmol)	PM	-	-	-	13 ±6	131 ± 9 80 ± 11
Amylase (U/mL)	Inter-digestive		100-150*			2-265U/g matériel fécal (amylase bactérienne)
	Pré postprandiale		150-300*			
	Tardif postprandial		150-300*			
Lipase (U/mL)	Inter digestive		100-400*			-
	Pré postprandiale		500-1500*			-
	Tardif postprandial		400-1000*			-
Trypsine (U/mL)	Inter digestive		20-50*			-
	Pré postprandiale		60-100*			-
	Tardif postprandial		500-1500*			-
Volume de gaz (mL)		36 ± 12	43*			182 ± 26
Longueur (cm)		20	20-30	150 -250	200 -350	125-150
Diamètre interne (cm)		-	3-4*			6
Durée du transit (h)		1-5	-	1-2	2-3	15-48
Surface (m ²)		0,2	0,02	100	100	3
Epaisseur moyenne de mucus (µm)		600	200*			100-200

PM= post mortem, - indique que les données non détectés, * indique que la valeur représente celle de l'intestin grêle entier, ~ indique que la valeur représente celle du gros intestin entier, # représente une valeur pour le duodénum et le jéjunum.

2. Anatomie du côlon

Le côlon constitue la partie basse du tractus gastro-intestinal. La Figure 3 représente l'anatomie du gros intestin, et plus particulièrement celle du côlon.

Le côlon proprement dit débute environ 5 cm au-dessus du fond du caecum par un segment appelé côlon ascendant. Cette partie est un peu plus étroite que le caecum et mesure environ 20 cm de long. L'angle hépatique, également appelé angle colique droit, situé sur la face inférieure du foie, présente un changement brutal de direction du côlon, vers le bas et vers l'avant. À la suite de l'angle hépatique se trouve un segment d'environ 45 cm nommé côlon transverse qui se termine par l'angle splénique ou angle colique gauche. Cet angle forme un second changement brusque de direction du côlon, vers le bas et vers l'arrière. Ce pli peut être marqué au point que la fin du côlon transverse soit en contact avec le segment suivant. Ce segment est nommé côlon descendant, il mesure environ 30 cm et est plus étroit que le côlon ascendant. La partie terminale du côlon est nommée côlon sigmoïde et mesure en moyenne 40 cm. Le côlon se termine par le rectum et le canal anal qui mesurent, respectivement environ 12 et 3 cm (Kirsner and Shorter, 1988; Vandamme *et al.*, 2002).

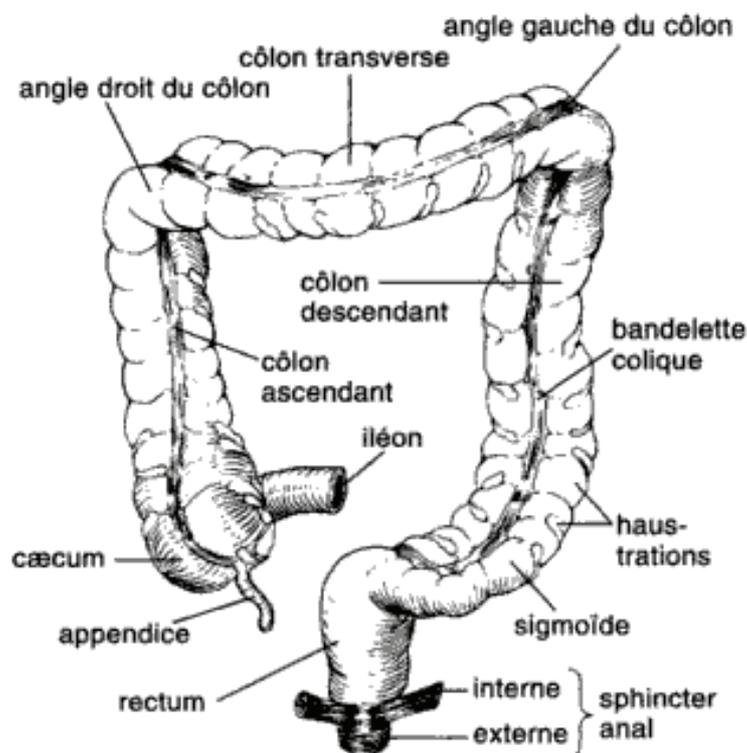


Figure 3: Anatomie du gros intestin (Ganong and Jobin, 2005b).

La paroi du côlon humain comprend les quatre couches fondamentales présentes dans les autres organes creux du tube digestif : la muqueuse, la sous-muqueuse, la couche musculaire et la séreuse (Figure 4). Elle se distingue par plusieurs caractéristiques importantes.

2.1.Tunique muqueuse

La tunique muqueuse correspond à une muqueuse qui tapisse l'intérieur du tube digestif. Près de 7 L de mucus sont sécrétés dans le tractus gastro-intestinal par jour.

L'épaisseur du mucus varie dans le tractus gastro-intestinal de l'homme. Elle est plus épaisse dans l'estomac (50-450 μm) que dans le côlon. Elle varie de 110 à 160 μm . Dans l'intestin grêle, l'épaisseur varie grandement selon l'activité digestive (Cone, 2009). La tunique muqueuse est constituée de trois couches (Washington *et al.*, 2001a):

1. Une couche formée d'un épithélium cylindrique simple qui est en contact avec le bol alimentaire, cette barrière protectrice lui permettant de faire face à des attaques agressives de nature chimique, mécanique ou bactérienne.
2. Un chorion composé d'un tissu conjonctif lâche auquel s'attachent les cellules épithéliales. En général, les vaisseaux sanguins, les ganglions lymphatiques et les petites glandes sont localisés à l'intérieur de cette couche.
3. A l'extérieur du chorion, il existe une mince couche de fibres musculaires lisses appelée muqueuse musculaire.

La muqueuse colique se distingue par plusieurs caractéristiques importantes. Ainsi, elle ne présente pas les villosités retrouvées au niveau de l'intestin grêle et présente un aspect relativement lisse. Elle est parsemée de nombreuses cryptes glandulaires qui s'ouvrent à sa surface. Par rapport à un cylindre de mêmes dimensions, le gros intestin qui ne possède que des cryptes, des microvilli et quelques replis, a seulement une surface de résorption de 10 à 15 fois plus élevée, alors que la surface de résorption de l'intestin grêle est 600 fois plus importante. Par conséquent, la surface de résorption totale du côlon varie de 0,5 à 1 m^2 alors que celle de l'intestin grêle dépasse 200 m^2 (Bernier *et al.*, 1988a).

2.2.Tunique sous muqueuse

Cette tunique est une couche épaisse composée d'un tissu conjonctif lâche. Elle se retrouve en profondeur dans la muqueuse et contient des vaisseaux sanguins et lymphatiques, des nerfs et dans certaines régions des glandes.

2.3. Tunique musculaire

Dans la plupart des régions du tube digestif, la tunique musculaire forme une double couche de tissu musculaire. Les fibres musculaires de la couche interne sont disposées en cercles, (transverse), autour du tube digestif tandis que les fibres externes s'orientent longitudinalement, selon leur grand axe. A plusieurs niveaux, les fibres circulaires s'épaississent pour former des sphincters. Ces derniers contrôlent le transit des aliments d'une région du tube digestif à une autre. A la partie supérieure de l'œsophage et à la partie inférieure du rectum, la tunique musculaire se compose de muscles squelettiques (muscles volontaires, striés). Dans le reste du tube digestif, se retrouve des muscles lisses (muscles involontaires). Les contractions rythmiques de ces muscles produisent le péristaltisme qui sert à déplacer les aliments vers l'anus.

2.4. Tunique séreuse ou adventice

La tunique la plus externe du tube digestif se compose principalement d'une couche de tissu conjonctif. Dans l'œsophage, cette couche conjonctive se mêle au tissu conjonctif des structures avoisinantes et s'appelle l'adventice. Dans le reste du tube digestif, le tissu conjonctif est recouvert d'un épithélium pavimenteux simple qui est en continuité avec le péritoine viscéral. La tunique externe s'appelle alors la séreuse.

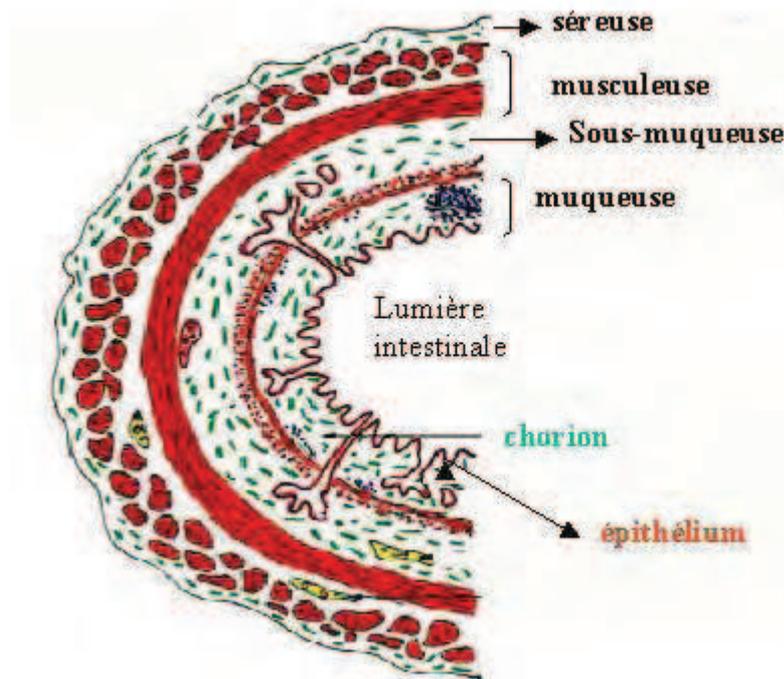


Figure 4: Représentations schématiques de la paroi intestinale (Bernier *et al.*, 1988a).

Comparé aux autres organes composant le tractus gastro-intestinal, c'est dans la lumière du côlon que se trouve le plus grand nombre de bactéries (10^{11} - 10^{12} bactéries/g de contenu colique). Ces bactéries métabolisent les nutriments composant les effluents déversés dans le côlon. Elles digèrent aussi un certain nombre de constituants alimentaires non digérés dans la partie haute du tractus gastro-intestinal tels que les sucres complexes (polysaccharides).

Les sucres simples et polysaccharides sont dégradés par fermentation bactérienne, les bactéries sécrètent de nombreux enzymes (Sinha and Kumria, 2001a), qui libèrent de l'acide lactique et des acides gras à chaîne courte (butyrate, propionate, acétate), et produisent aussi des gaz comme l'hydrogène, le méthane et le dioxyde de carbone (Cummings *et al.*, 1987; Topping and Clifton, 2001; Macfarlane and Macfarlane, 2003; Van den Mooter, 2006)

3. Fonctions du côlon

Le côlon est un organe d'environ 1,50 m. Sur le plan fonctionnel, le côlon est divisé en deux zones fonctionnelles:

- Le côlon proximal (côlon droit) comprend le cæcum, le côlon ascendant et une partie de côlon transverse. Il joue un rôle majeur dans l'absorption de l'eau et des électrolytes, ainsi que dans la fermentation de sucres non digérés.
- Le côlon distal (côlon gauche) comprend l'autre partie du côlon transverse, le côlon descendant, le côlon sigmoïde et le rectum. Il intervient surtout dans l'entreposage et l'évacuation des selles (Mayersohn, 2002).

3.1. Absorption de l'eau et du sel

C'est le site principal d'absorption de l'eau, du (des) sel(s) et des vitamines synthétisées dans le côlon par les bactéries. Sur les 1000 à 1500 mL de chyme iléal entrant quotidiennement dans le côlon (Le *et al.*, 2004), seuls 50 à 200 mL sont excrétés dans les fèces. Le transfert colique du chyme est relativement lent, environ 5 cm/h, ce qui favorise l'absorption des nutriments.

Les molécules simples (eau, électrolytes, acide aminés, hexoses) qui traversent les cellules intestinales ont une taille qui varie de 1,5 à 7-10 Å (Bernier *et al.*, 1988a). Ainsi, une étude *in vitro* de la perméabilité de la muqueuse colique chez le rat suggère que le côlon exclut les molécules sur la base de la taille et de la charge. Il a été calculé que la taille des pores est 2,3 Å dans le côlon humain par rapport à 8 Å dans le jéjunum et 4 Å dans l'iléon (Washington *et al.*, 2001a). La paroi du côlon diffère de celle de l'intestin grêle par plusieurs aspects. Tout

d'abord, la surface interne du gros intestin est relativement lisse, présentant des cryptes mais pas de villosités. Elle est aussi très riche en cellules à mucus. Les jonctions entre les cellules épithéliales du côlon sont plus serrées que celles de l'intestin grêle, ce qui prévient la diffusion des ions et la sortie d'eau (Marcil et al., 2004).

Le Tableau 2 résume l'ensemble des mouvements de l'eau dans le tube digestif. L'intestin reçoit chaque jour environ 2000 mL de liquide ingéré, ainsi que plus de 7000 mL de liquides sécrétés par la muqueuse et par les glandes digestives. En effet, 98% de ce liquide est réabsorbé, avec une perte de liquide journalière de seulement 200 mL dans les selles. Il y a très peu d'eau qui traverse la muqueuse gastrique. Toutefois, dans l'intestin grêle et le côlon, l'eau traverse la muqueuse dans les deux sens en fonction des gradients osmotiques.

Tableau 2: Le taux quotidien de renouvellement de l'eau (en mL) dans le tube digestif (Ganong and Jobin, 2005a).

Quantités ingérée (mL)	2000
Sécrétions endogènes	7000
• Glandes salivaires	1500
• Estomac	2500
• Bile	500
• Pancréas	1500
• Intestin	1000

	7000
Apport total	9000
Quantité réabsorbée	8800
• Jéjunum	5500
• Iléon	2000
• Côlon	1300

	8800
Résidu dans les fèces	200

Le côlon joue un rôle fondamental de contrôle du volume et de la composition ionique des selles (Figure 5). Physiologiquement, le côlon absorbe les ions sodium (Na^+) et chlorure (Cl^-), et sécrète des ions potassium (K^+) et des ions hydrogénocarbonates (CO_3H^-) entraînant une rétention d'eau aboutissant à la concentration des matières fécales. Cependant, l'osmolarité du soluté reste inchangée (Bernier *et al.*, 1988d; Ganong and Jobin, 2005a).

Ainsi, la concentration en ions sodium diminue de 100 mmol/L dans le caecum à 20 mmol/l dans le rectum. Parallèlement, le débit hydrique passe de 1 L/jour à la valvule iléocœcale à 0,1 L/jour à l'anus.

L'absorption des ions sodium est sous la dépendance d'un mécanisme électrogénique. La pénétration des ions sodium dans la cellule se fait selon le gradient de concentration, présent au pôle basal du colonocyte par la sortie active de ions sodium sous l'action de la pompe Na^+/K^+ ATPase. C'est l'aldostérone, hormone produite par la corticosurrénale, qui stimule la récupération active des ions sodium par l'organisme. L'absorption des ions chlorure se fait contre l'excrétion des ions hydrogencarbonates. Cette pompe n'est pas couplée au transport des ions sodium.

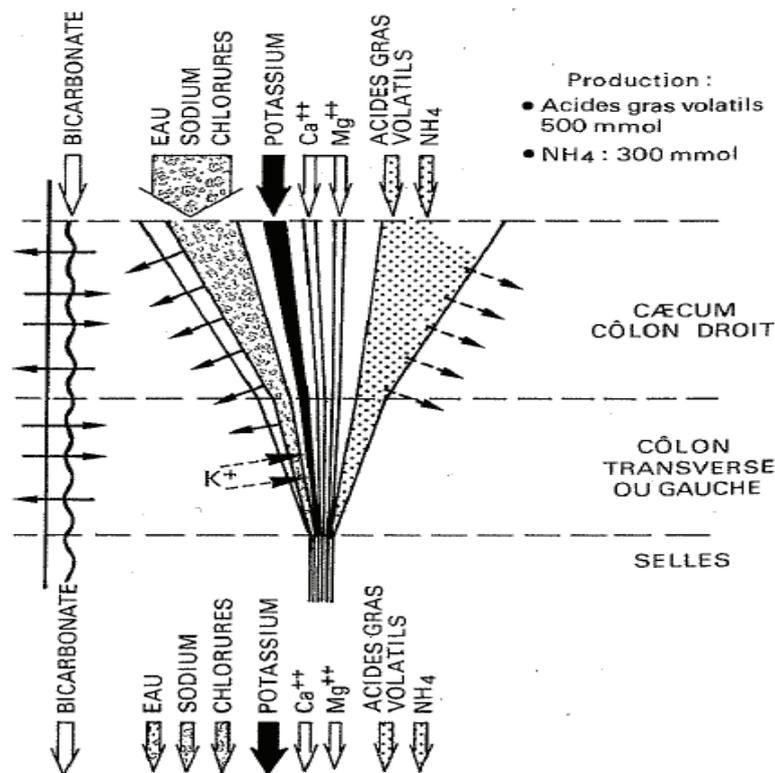


Figure 5: Représentation schématique de l'évolution des principaux ions dans le côlon (Bernier *et al.*, 1988d).

La sécrétion des ions potassium est sous la dépendance de la pompe Na^+/K^+ ATPase de la membrane basolatérale. Son excrétion au pôle apical se fait suivant un gradient de concentration, par l'intermédiaire de canaux potassiques spécifiques (Mion, 2001).

3.2. Les sécrétions coliques

Le mucus sécrété par les cellules glandulaires du côlon protège les parois intestinales des blessures et de l'activité bactérienne tout en constituant le support matériel des fèces. La sécrétion bicarbonatée, par échange avec les ions chlorures permet de neutraliser l'acidification résultant de l'action bactérienne.

3.3. L'activité bactérienne

Le microbiote intestinal exerce de nombreuses fonctions physiologiques dont les répercussions pour l'hôte sont, pour la plupart, bénéfiques. Parmi les grandes fonctions du microbiote, la fermentation des substrats disponibles au niveau du côlon, ils sont ainsi capables de convertir une grande variété de substrats (incluant glucides, protéines et lipides), générant une diversité de métabolites dont la plupart ont des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte, le rôle de barrière à la colonisation par les microorganismes pathogènes, le développement et la maturation du système immunitaire intestinal et les interactions avec les cellules épithéliales ont des rôles essentiels pour le maintien de la santé de l'hôte (Corthier, 2007; Philippe Gérard and Bernalier-Donadille, 2007).

3.4. Matières fécales et défécation

Les matières fécales contiennent 75% d'eau et 25% de matières solides. Les bactéries représentent environ un tiers du volume des matières fécales. La défécation est l'expulsion des fèces par l'anus dont la fréquence normale est supérieure à trois fois par semaine et inférieure à trois fois par jour.

4. Le côlon, site de libération spécifique de principes actifs

Les formes à libération ciblée permettent avant tout d'augmenter l'activité thérapeutique de principes actifs en les libérant de manière sélective au niveau de l'organe malade ou du site d'absorption. Ceci permet également de réduire les effets secondaires liés à l'action du médicament sur les autres parties de l'organisme. La sélectivité des formes à libération ciblée permet également de diminuer la dose administrée de principe actif et de limiter les pertes en principe actifs par dilution dans l'organisme (Rubinstein, 1990; Ibekwe *et al.*, 2004).

Les avantages et les inconvénients des systèmes à libération ciblée de principes actifs au niveau du côlon sont repris dans le Tableau 3. Ces systèmes permettent d'assurer des traitements locaux plus efficaces des pathologies du côlon, telles que les infections et les carcinomes. Le cancer du côlon (CC) est l'une des tumeurs les plus courantes, avec au moins un million de nouveaux cas diagnostiqués par an dans le monde, et représente la deuxième cause de mortalité pour le cancer (De Dosso *et al.*, 2009). D'autres maladies inflammatoires, y compris la maladie de Crohn et les colites ulcéraives, ainsi que les troubles du transit

colique tels que les diarrhées, constipation et le syndrome du côlon irritable (Jain *et al.*, 2007; Singh, 2007; Kumar and Mishra, 2008) peuvent être soignés.

En ce qui concerne la voie rectale (suppositoires et lavement) qui pourrait être à première vue la voie privilégiée pour traiter des affections coliques, elle ne l'est pas en réalité parce que les principes actifs n'atteignent pas toujours les sites généraux des maladies coliques et d'absorption colique (Wood *et al.*, 1985; Hardy *et al.*, 1986). De plus, cette voie d'administration est inconfortable pour la plupart des patients (Ibekwe *et al.*, 2004)

Tableau 3: Avantages et inconvénients de la délivrance ciblée d'un principe actif au niveau du côlon.

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Réduire les effets secondaires. ➤ Diminuer la dose administrée et économiser le principe actif. ➤ Peu/pas d'enzymes digestives. ➤ Temps de résidence du principe actif très long. ➤ Faible capacité métabolique de la muqueuse. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Surface d'absorption moins importante que celle de l'intestin grêle. ➤ Viscosité des contenus et diminution de liquide. ➤ Microbiote colique peut influencer sur la stabilité du principe actif par dégradation métabolique.

De plus, le côlon peut être utilisé comme porte d'entrée de xénobiotiques dans la circulation systémique. Des avancées significatives en matière de biotechnologie et de biochimie ont conduit à la découverte d'un grand nombre de molécules bioactives et de vaccins à base de peptides et de protéines. Toutefois, ces composés doivent encore être administrés, soit par voie parentérale (Bayat *et al.*, 2008) , soit par voie nasale (Van den Mooter, 2006). Cependant, quelques inconvénients évidents sont associés à l'administration parentérale de médicaments. Ils incluent un manque de confort pour les patients du fait de leur caractère envahissant et embarrassant. De plus, ces médicaments doivent être administrés à plusieurs reprises et surtout sur un long terme, pour les maladies chroniques comme le diabète. En outre, les injections sont coûteuses et les peptides affichent généralement une demi-vie courte. Ceci nécessite une administration fréquente pour maintenir les concentrations sanguines adéquates à une activité pharmacologique (Arhewoh and Okhamafe, 2004).

Pour les médicaments de poids moléculaires élevés tels que les protéines / peptides et autres macromolécules, le passage à travers les parois du tractus gastro-intestinal reste encore une des plus importantes difficultés qui devront être surmontées. Ce passage est nécessaire

afin de pouvoir exercer un effet systémique après une administration par voie orale (Kaparissides et al., 2006).

Face aux limitations liées à ces voies, l'administration par voie orale semble être la plus adéquate. Les peptides, protéines, oligonucléotides et vaccins ont une faible biodisponibilité par voie orale du fait de leur instabilité dans le tractus gastro-intestinal où des dégradations enzymatiques ont lieu.

L'administration orale de formes pharmaceutiques à libération colique permet de protéger les principes actifs de potentielles dégradations dans l'estomac et/ou l'intestin grêle. Ceci permet de privilégier leur absorption au niveau du côlon et d'augmenter leur biodisponibilité dans cette région du tractus gastro-intestinal (Rubinstein, 2005).

Par exemple, l'administration par voie orale de protéines et de peptides comme l'insuline serait exclue du fait de l'activité des peptidases intestinales. Comme le côlon présente une faible activité enzymatique par rapport aux autres régions du tractus gastro-intestinal, ceci permet d'amener ce type de substances actives à ce site, et par conséquent d'améliorer leur passage vers la circulation sanguine. Ce passage est favorisé par le temps de séjour particulièrement élevé au niveau du côlon. L'ensemble de ces facteurs sont en faveur de l'absorption colique.

Le côlon présente des propriétés intéressantes pour l'absorption de peptides et de protéines. Actuellement, un certain nombre de macromolécules figure dans l'arsenal pharmaceutique comme la vasopressine, la somatropine, la protiréline, les interférons, l'insuline, la calcitonine, et beaucoup d'autres qui ont différentes applications thérapeutiques (diabète insipide hypophysaire, infertilité, syndrome de Turner, endométriose, cancer et SIDA) sont considérées comme des candidats potentiels à l'administration colique (Patel et al., 2007).

De plus, l'absorption systémique au niveau du côlon peut être utilisée dans le cadre de la chronothérapie pour le traitement de maladies comme les troubles du rythme circadien, l'asthme, les angines, les arthrites et l'hypertension (Basit and Bloor, 2003; Singh, 2007).

En effet, les crises d'asthme, par exemple, sont plus fréquentes et plus importantes la nuit. En administrant un médicament antiasthmatique à libération colique le soir avant le coucher, il est possible d'obtenir une libération du principe actif après un temps de latence de 5 à 7 h. Cette durée correspond au temps du transit bouche - caecum, c'est-à-dire au moment de l'apparition des crises.

Les médicaments pertinents pour une administration colique sont énumérés dans le Tableau 4 (Jain *et al.*, 2007; McConnell *et al.*, 2009a).

Tableau 4: Importance du côlon dans l'absorption de médicaments (les maladies, les symptômes et les principes actifs) (Jain *et al.*, 2007; Patel *et al.*, 2007; McConnell *et al.*, 2009a).

Site ciblé	Maladies et conditions	Symptômes	Principes actifs
Traitement local	Maladie de Crohn	Diarrhée, douleur abdominale et gêne, sang dans les fèces, ulcères, diminution de l'appétit et perte de poids.	Hydrocortisone, Budesonide, Prednisolone, Sulfasalazine, Olsalazine, Mesalazine et Balsalazide, Infliximab
	Colites ulcéraives	Inflammation du rectum, saignement rectal, douleur rectale	Acide 5-aminosalicylique, Sulfasalazine, Balsalazide, Infliximab, Azathioprine et Mercaptopurine
	Côlon irritable	Effet de facteurs périnataux au moment du premier passage chez les prématurés	Dicyclomine, Hyoscine, Propantheline, Cimetropium, Mébévérine, Trimebutine, Scopolamine, Alosetron, Tegaserod
	Cancer colorectal	Douleurs abdominales ou gênes, sentiments de ballonnement, de flatulence, diarrhée ou constipation, présence de mucus dans les fèces	5-Fluorouracil, Leucovorine, Oxaliplatine, Irinotecan, bevacizumab et Cetuximab
	Diverticulite	Formation de poches à l'extérieur du côlon en raison d'infections bactériennes	Bactrim, Flagyl, Sulfatrim et Métronidazole
	Colite par antibiotiques	Croissance trop rapide du <i>Clostridium difficile</i> et sa production de toxine ultérieure	Clindamycine, Ampicilline, Amoxicilline et Céphalosporine
	Hirschsprung maladie	Constipation dans laquelle le mouvement de l'intestin arrive seulement une ou deux fois par semaine	Métronidazole, Vancomycine, Loperamide, Toxine botulique
Site d'absorption	Éviter le métabolisme des médicaments administrés par voie orale dans le tube digestif supérieur	---	Stéroïdes et Héparine
	Administration orale de peptides	----	Insuline, Calcitonine et Met-enképhaline
	Administration orale de vaccins	---	Vaccins contre la typhoïde
	Colites ulcéraives	Proctite ulcéreuse, pancolite, colite foudroyante	Prednisolone, Métsulfobenzoate, Pivalate de tixocortol, Propionate de Fluticasone, Béclo méthasone Dipropionate et Budesonide
Chronothérapie	Les crises sont plus fréquentes et plus exacerbées tôt le matin	Prednisone, Cortisol, Diclofénac de sodium, Ibuprofène, Pseudoéphédrine et β -Bloquant - Acébutolol, Atenolol, Bétaxolol, Bisoprolol	
	Hypertension		
	Asthme		
	Rhinites		
	Arthrites		
	Angine de poitrine		
	Cardiologie		

5. Les facteurs influant sur la performance de la libération ciblée des médicaments au niveau du côlon

Plusieurs facteurs sont capables d'influencer la cinétique de libération d'un principe actif à partir d'une forme pharmaceutique orale à libération colique. Parmi ces facteurs, on peut citer le pH gastro-intestinal, le temps de transit gastro-intestinal, la vidange gastrique, la microflore colique ainsi que les phénomènes d'absorption colique (Patel *et al.*, 2007).

5.1. Le pH gastro-intestinal

Le pH est un paramètre très important à prendre en compte lors de la conception des formes pharmaceutiques à libération ciblée de principes actifs. En effet, la stabilité, la dissolution et la résorption des principes actifs dépendent, le plus souvent, des variations de pH des fluides physiologiques gastro-intestinaux (Tableau 1).

Les valeurs du pH sont très basses en milieu gastrique (1 à 2,5) à jeun. Suite à l'ingestion d'un repas, les sécrétions acides gastriques augmentent rapidement au-delà des taux de base et atteignent environ 2-4 mmol/h chez les hommes et un peu moins chez les femmes. La capacité maximale est atteinte en moins de 90 min après ingestion. Les sécrétions acides moyennes après un repas varient entre 20 et 30 mmol/h (Charman *et al.*, 1997). En revanche, ce pH augmentera pour atteindre des valeurs de 2 à 5 après ingestion d'un repas. Ce fait est dû à un effet tampon et à une dilution causée par les aliments. Le pH augmente progressivement en passant dans l'intestin grêle d'une valeur de $6,5 \pm 0,5$ à une valeur de $7 \pm 0,5$ au niveau du jéjunum. Les valeurs les plus élevées sont rencontrées dans la partie terminale de l'intestin grêle au niveau de l'iléon ($7,5 \pm 0,5$).

A l'entrée du côlon ou plus exactement au niveau du caecum et/ou côlon ascendant (côlon proximal), le pH chute brutalement à une valeur de $6,4 \pm 0,6$ à cause de la présence d'acides organiques volatils à chaînes courtes produits par la fermentation bactérienne des polysaccharides et des glycérides. La valeur du pH remonte ensuite progressivement et atteint une valeur moyenne de ($7 \pm 0,7$) au niveau de la partie distale du côlon.

Les différences de pH, entre l'état à jeun et après l'administration d'un repas, peuvent aussi affecter la biodisponibilité de médicaments administrés par voie orale pour différentes raisons.

Plusieurs facteurs comme la prise de médicaments saccharidiques, l'alimentation et certaines maladies peuvent entraîner des variations de pH intra- et inter-sujets au sein du côlon. A titre d'exemple, le lactulose, un disaccharide semi-synthétique utilisé comme laxatif,

est fermenté par les bactéries du côlon et produit de grandes quantités d'acide lactique. Il en résulte une acidification du côlon avec une chute du pH jusqu'à une valeur de 5. Le même effet a été observé après l'administration de gomme guar, d'isphagule et d'une alimentation trop riche en fibres alimentaires (Watts and Illum, 1997; Topping and Clifton, 2001).

Des modifications de pH peuvent aussi avoir lieu au niveau du tractus gastro-intestinal dans diverses pathologies. C'est un facteur important influençant la biodisponibilité des médicaments destinés à être absorbés au niveau du côlon.

Par le passé, il a été montré que chez des patients souffrant de colite ulcéreuse le pH baisse de manière substantielle en-dessous des valeurs normales au niveau du côlon droit. Cependant, des résultats obtenus chez des patients atteints de la maladie de Crohn ont montré des résultats inverses (Nugent et al., 2001).

Le pH de l'intestin grêle reste inchangé dans le cas de la maladie de Crohn. En revanche, dans le côlon les valeurs du pH sont inférieures dans les états de maladie. Le pH moyen du côlon peut atteindre des valeurs de $4,7 \pm 0,7$ dans la colite ulcéreuse aiguë ainsi que le pH du côlon proximal peut atteindre une valeur aussi basse que 2,3 (Fallingborg et al., 1993). Dans la maladie de Crohn (active et inactive) le pH colique est significativement inférieur à celui de sujet en bonne santé, avec des valeurs de pH aux environs de 5,3 au niveau du côlon proximal et distal (McConnell *et al.*, 2008a).

5.2. La vidange gastrique

La vidange gastrique est un phénomène complexe, finement contrôlé et dont la finalité est de réguler l'arrivée des nutriments dans l'intestin grêle supérieur pour permettre le bon déroulement des phénomènes de digestion, d'absorption et pour assurer le confort digestif postprandial de l'individu.

Durant la phase de digestion des aliments, l'estomac est le siège de contractions péristaltiques contribuant à malaxer le bol alimentaire avec les sécrétions digestives. L'osmolarité de la boisson ingérée joue un rôle déterminant dans la vitesse de vidange de l'estomac. Les données de la littérature sur la vidange gastrique sont nombreuses, plusieurs facteurs semblent affecter le taux de vidange gastrique (Olsson and Holmgren, 2001). L'étude de Costill et Saltin (1974) a déjà permis de mettre clairement en évidence l'influence de l'osmolarité des solutions glucosées de réhydratation sur la vitesse de vidange gastrique. Au repos, après l'ingestion d'un bolus de 400 mL de solutés glucosés dont les osmolarités varient de 209 à 902 mOsm/l, les estimations du contenu gastrique réalisées à différents temps ont permis de montrer que la vitesse de vidange de l'estomac diminue lorsque l'osmolarité du

soluté augmente (Costill and Saltin, 1974). Le contenu calorique du repas est aussi un élément essentiel qui régule directement la vidange gastrique.

La vitesse de vidange gastrique est aussi contrôlée par des facteurs neuro-hormonaux (Minami and McCallum, 1984). Plusieurs hormones sont impliquées dans la régulation de la vidange gastrique. A titre d'exemple la pentagastrine et la cholécystokinine ralentissent cette vidange gastrique. Dans les conditions de stress, le système nerveux central et le système adrénergique régulent la motricité.

La vidange gastrique est également contrôlée par des boucles réflexes mises en jeu par différentes caractéristiques du chyme qui quitte l'estomac. Ces boucles réflexes ralentissent la vidange gastrique. La stimulation des récepteurs duodénaux qui peuvent être sensibles aux variations de pH, aux variations d'osmolarité et aux différents nutriments va être à l'origine d'un premier niveau de rétrocontrôle. Ultérieurement, l'arrivée des lipides, et à un degré moindre des glucides dans l'iléon terminal, déclenche un second mécanisme de rétrocontrôle, dit de frein iléal, médié par le peptide YY. La fermentation colique des glucides non absorbés dans l'intestin grêle terminal ralentit également la vidange gastrique et diminue le tonus fundique (Ducrotté, 2005; Rubinstein, 2007).

La durée du séjour gastrique des formes pharmaceutiques varie en fonction de leur taille, de leur densité, de l'état nutritionnel (à jeun ou non) du sujet et de la charge calorique des aliments ingérés. Les phénomènes de stress, de la dépression, et le sexe contribuent aussi à ces variations. La vidange gastrique des liquides et des petites particules solides (2-7 mm de diamètre) s'effectue aussi assez rapidement, quel que soit l'état nutritionnel du patient. En revanche, le temps de rétention d'une forme pharmaceutique plus grande est plus long. Ce dernier varie en fonction du volume du repas (Washington et al., 2001b; Patel et al., 2007).

Les résultats d'une étude menée sur l'administration orale d'un comprimé de grande taille et non désintégrant avec plusieurs régimes alimentaires sont repris à la Figure 6. Ces résultats ont clairement montré que la consommation continue de petits repas au long de la journée, peut retarder la vidange gastrique des comprimés de plus de 10 h. L'augmentation de la charge calorifique d'un repas liquide de presque 4 fois n'a pas conduit à une augmentation proportionnelle du temps de séjour gastrique. Toutefois, un repas constitué avec des aliments caloriques, semblable au repas liquide, a doublé presque le temps du séjour du comprimé.

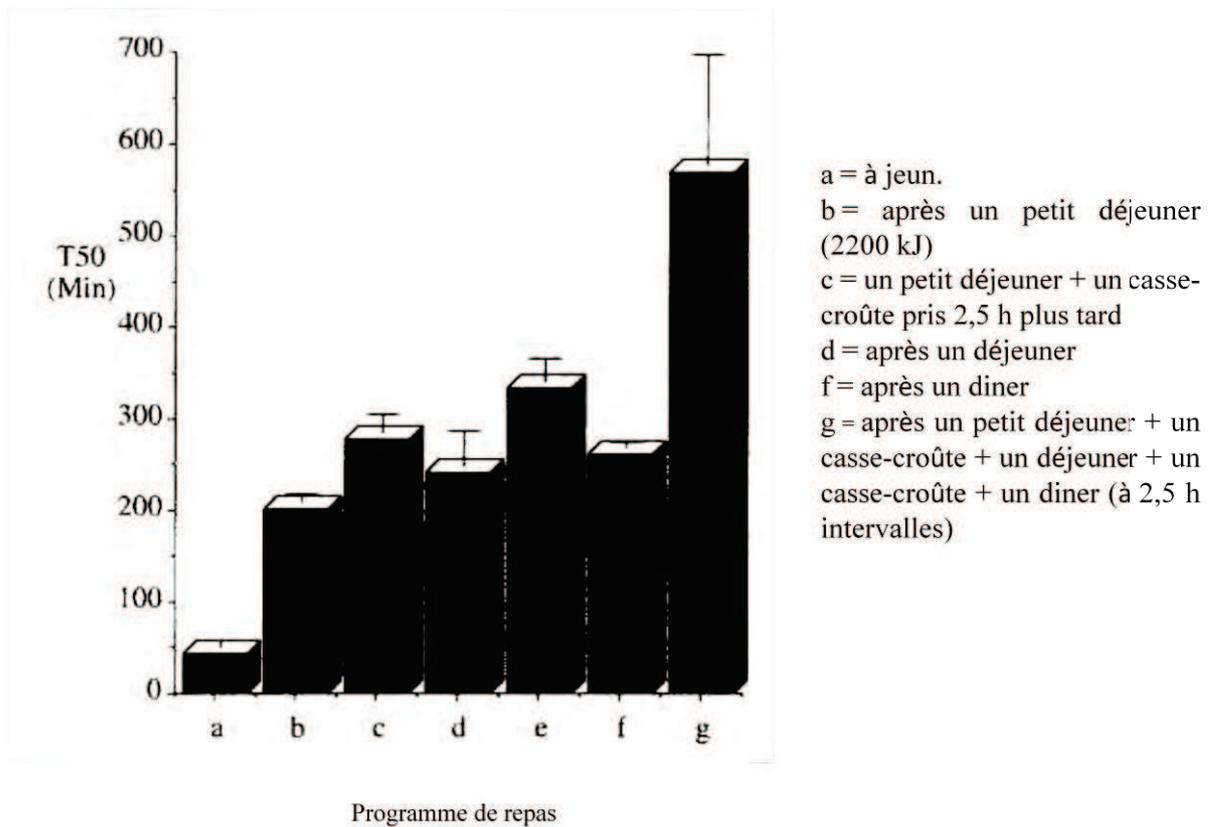


Figure 6: Temps de séjour gastrique d'un comprimé non désintégré (taille 11x 6 mm, densité 1,4 g/mL) avec différents régimes alimentaires (Washington *et al.*, 2001b).

La durée moyenne du séjour gastrique des comprimés d'ibuprofène marqués, déterminée par scintigraphie gamma sur des volontaires sains, est de $1,6 \pm 0,4$ h, $2,0 \pm 0,9$ h et $8,8 \pm 5,9$ h, respectivement à jeun, après un repas léger (646 kJ de charge calorique) et après un repas constant (3327 kJ de charge calorique) (Washington *et al.*, 2001b).

5.3. Le temps de transit gastro-intestinal

Le temps de transit des formes pharmaceutiques orales le long du tractus gastro-intestinal représente un facteur important dans la conception des formes orales à libération modifiée ou ciblée et, particulièrement, dans celle des formes à libération colique.

La durée de transit dans l'intestin grêle est indépendante d'influences externes. La durée de transit d'une forme pharmaceutique dans l'intestin grêle varie peu et est de l'ordre de 3-4 h. Une méta-analyse de données de transit dans l'intestin grêle n'a montré aucune différence entre les comprimés, les petites particules et les liquides (Davis *et al.*, 1986; McConnell *et al.*, 2008a)

Contrairement à l'estomac, la durée de transit dans l'intestin grêle est complètement indépendante des facteurs tels que l'état physique, la présence de nourriture et la taille de la forme pharmaceutique administrée (Patel et al., 2007).

En vue d'étudier l'influence de la chrono-nutrition et du temps d'ingestion sur la durée du transit intestinal, des comprimés, non désintégrés et radiomarqués, ont été administrés à dix volontaires sains, en présence de trois régimes alimentaires différents :

- (1) à jeun (comprimé administré à un estomac vide, quatre heures après un repas)
- (2) après un repas (comprimé administré après un repas)
- (3) avant un repas, (comprimé administré 45 min avant le repas).

Le transit du comprimé le long du tractus gastro-intestinal a été suivi en utilisant la scintigraphie gamma. Les durées moyennes du transit intestinal des comprimés à jeun et après un repas étaient très similaires et sont respectivement de 204 et 210 min. Cependant, ces temps sont significativement plus courts (environ de 141 min) comparés au comprimé administré avant le repas. Cette étude a montré qu'une administration avant un repas peut provoquer une diminution significative de la durée du transit intestinal (Fadda et al., 2009a).

Le type de forme pharmaceutique administré peut aussi influencer la durée du transit colique. Une étude in vivo chez l'homme a montré que les comprimés de grande taille (25x9 mm) parcourir le côlon ascendant d'avant petites particules (0.5-1.88mm), (McConnell et al., 2009a).

Généralement, le temps entre l'administration et l'arrivée à la valve iléo-cæcale dans les conditions normales est environ de 4 à 8 h à jeun et de 8 à 12 h après un repas. Cette différence peut être attribuée presque entièrement aux différences de la vidange gastrique et non du transit intestinal. Dans la plupart des situations la durée du transit intestinal est constante : 3 à 4 h (1 à 6 h).

La même technique a aussi été utilisée pour déterminer la durée du transit colique. Le temps d'arrivée d'un médicament dans le côlon peut varier en fonction des situations de 4 à 20 h. À la différence de l'intestin grêle, la dispersion du médicament dans le gros intestin peut se produire et le transit colique peut varier considérablement.

En général, les particules de plus de 6 millimètres de diamètre (par exemple, les formes pharmaceutiques monolithiques) progressent dans le gros intestin plus rapidement que les solutions ou les petites particules. Les formes pharmaceutiques comme les capsules ou les comprimés traversent le côlon en 15 à 30 h (1 à 60 h) sans tenir compte de leur densité.

Par contre, les solutions et les petites particules restent dans le côlon entre 25 à 40 h (6 à 50 h). Le transit colique varie en fonction du sexe (1,5 fois plus lente chez les femmes que chez les hommes) (Buhmann et al., 2007).

Parmi les méthodes utilisées pour mesurer la durée du transit total (bouche à anus), l'une consiste à étudier l'ingestion de chlorure de chrome au cours d'un repas chez un sujet sain. Les résultats du dosage du chlorure de chrome dans les selles (Figure 7) ont montré que l'apparition du chrome a lieu 23 h après ingestion et le maximum de radioactivité est observée après 36 h. A ce moment-là, seule la moitié du résidu alimentaire a été éliminée. Il faut encore attendre 4 jours et demi pour que le chlorure de chrome soit éliminé à 95% (Bernier et al., 1988b).

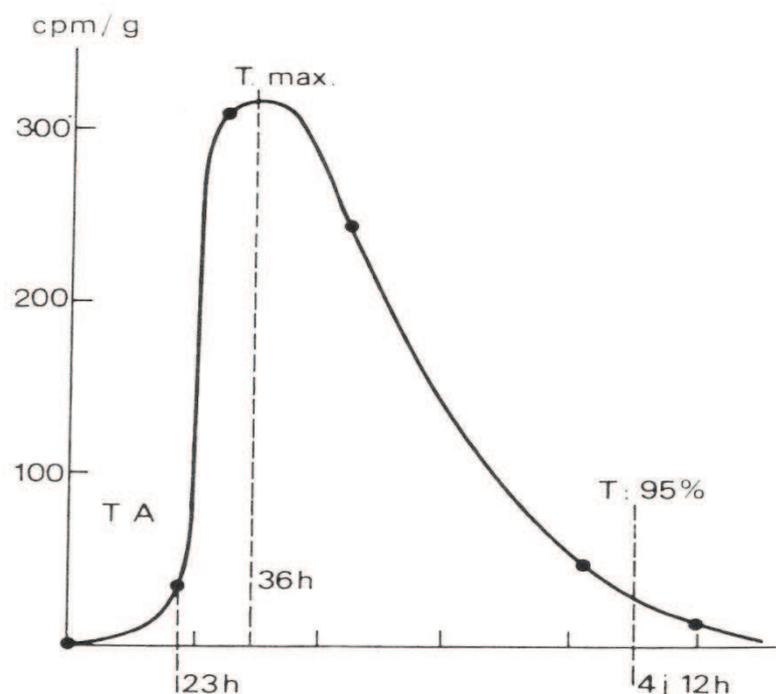


Figure 7: Elimination dans les selles des déchets provenant d'un repas déterminé. (TA= temps d'apparition, $T_{max.}$ = temps où le selles contiennent le plus de déchets) (Bernier *et al.*, 1988b).

Certaines pathologies peuvent également modifier la durée du transit colique. A titre d'exemple, le temps de transit est accéléré de façon significative lors d'une diarrhée dans le cas de la maladie de Crohn. Par contre, les maladies inflammatoires et le syndrome du côlon irritable ont peu d'effets sur les temps de transit.

Inversement, les patients atteints du syndrome d'intestin irritable voient souvent leur temps de transit intestinal réduit. Lors d'études antérieures, il a été constaté que les patients atteints d'une colite ulcéraire active présentent un transit colique significativement plus court que les sujet sains (24,3 h contre 51,7 h) (Hebden et al., 2000).

5.4.L'absorption des médicaments dans le côlon

Dans l'organisme humain, l'intestin grêle est sans doute le principal site d'absorption des médicaments, d'une part en raison de sa situation anatomique après l'estomac et d'autre part en raison de ses caractéristiques morphologiques telles que sa longueur et sa grande surface. L'intestin grêle est parfaitement conçu pour l'absorption des solutés. Par conséquent, la plupart des formes pharmaceutiques classiques administrées oralement sont absorbées au niveau de l'intestin grêle avant même d'atteindre le côlon.

Généralement, le côlon joue un rôle secondaire dans l'absorption des médicaments du fait de l'existence de plusieurs facteurs physiologiques inhérents à cet organe. Parmi ces facteurs, la faible surface colique, une irrigation sanguine réduite, une viscosité plus élevée du contenu colique et aussi une potentielle séquestration de certaines molécules par ce même contenu présent dans la lumière colique (Mrsny, 1992; Kinget et al., 1998).

Malgré les conditions défavorables d'absorption qui règnent dans le côlon, cet organe peut présenter un grand intérêt comme site spécifique d'absorption pour de nombreuses substances mal absorbées au niveau de l'intestin grêle. L'absorption au niveau du côlon peut également être utilisée pour des protéines et des peptides à visées thérapeutiques.

La fraction passant dans la circulation générale d'un médicament administré par voie orale est rarement de 100%, du fait soit de sa faible absorption, sujets à des phénomènes de métabolisation prés-systémique conduisant à une perte en substance active. Une fois sous forme solubilisée, le principe actif peut traverser la barrière intestinale. Outre le passage de cette barrière, constituée d'une monocouche d'entérocytes, plusieurs facteurs peuvent influencer l'absorption du principe actif (Tableau 5). Ils sont soit d'ordre physicochimique et dépendent ainsi des caractéristiques chimiques et biochimiques du principe actif au des conditions spécifiques d'administration. Ils peuvent aussi être d'ordre physiologique et dépendent alors de l'état physiopathologique et/ou nutritionnel du sujet. Ces facteurs physiologiques peuvent être la cause l'importance de la variabilité inter- et intra-individuelles pour la biodisponibilité du principe actif et de la conduire à des variations de l'efficacité thérapeutique du médicament.

Tableau 5: Facteurs influençant l'absorption gastro-intestinale (Kinget *et al.*, 1998; Lee and Mukherjee, 2007; Deferme *et al.*, 2008; Griffin and Driscoll, 2008).

Facteurs liés aux propriétés physico-chimiques de la substance active	Facteurs liés à la physiologie du TGI	Facteurs liés à la forme galénique
<ul style="list-style-type: none"> - Solubilité - pKa - Log P (coefficient de partage octanol/eau) - Interactions ioniques - Taille des particules - Capacité à former des liaisons hydrogènes 	<ul style="list-style-type: none"> -Vitesse de vidange gastrique - Motilité du TGI - pH - Surface d'absorption - Métabolisme intestinal - Mécanismes de transport - Enzymes impliquées dans la digestion - Débit sanguin - Pathologie du TGI 	<ul style="list-style-type: none"> -Effet des excipients sur la vitesse de dissolution et de désintégration -Effets biologiques des excipients

La majeure partie de l'absorption au niveau du gros intestin se produit dans la moitié proximale du côlon, donnant à cette partie le nom de côlon absorbant (Arhewoh *et al.*, 2005). La faible perméabilité d'un principe actif est attribuée à un certain nombre de propriétés intrinsèques à la structure chimique de la molécule. Ces propriétés comprennent la présence de groupements fonctionnels fortement chargés, un poids moléculaire élevé, une capacité significative à créer des liaisons hydrogènes et une grande surface polaire (Yuasa, 2008).

Il n'existe pas de relation évidente entre les propriétés physicochimiques des principes actifs (log P et la solubilité dans l'eau) et l'absorption au niveau du côlon. Cependant, l'absorption des médicaments au niveau du côlon a tendance à montrer des phénomènes similaires à ceux observés avec les médicaments issus du système de classification biopharmaceutique (BCS) (Figure 8). En général, les classes I et II de médicaments ont une perméabilité plus élevée dans le côlon par rapport à l'intestin grêle lorsque la diffusion passive est le principal mécanisme de transport membranaire. En revanche, les classes III et IV de médicaments présentent une plus faible perméabilité dans le côlon par rapport à l'intestin grêle (Lennernas and Abrahamsson, 2005; Bai *et al.*, 2006; McConnell *et al.*, 2009a).

	Forte solubilité	Faible solubilité
Forte perméabilité	<p>Classe I Forte perméabilité Forte solubilité</p>	<p>Classe II Forte perméabilité Faible solubilité</p>
Faible perméabilité	<p>Classe III Faible perméabilité Forte solubilité</p>	<p>Classe IV Faible perméabilité Faible solubilité</p>

Figure 8: Classification biopharmaceutique des substances actives (BCS) (Amidon *et al.*, 1995).

5.4.1. Absorption des principes actifs de faibles poids moléculaires

Afin de concevoir et de réaliser avec succès l'administration de médicaments au niveau du côlon, il est important de comprendre les caractéristiques de l'épithélium colique qui se présente comme un obstacle à l'absorption, mais aussi les caractéristiques physiologiques du côlon (environnement de la lumière).

La Figure 9 représente les différents mécanismes et plusieurs voies de passage à travers la muqueuse intestinale. En fait, les substances actives sont absorbées par diffusion passive de manière transcellulaire ou paracellulaire. La diffusion transcellulaire, la voie prédominante au niveau du côlon, est impliquée dans l'absorption des substances lipophiles. Par contre, la diffusion paracellulaire est impliquée dans l'absorption des substances hydrophiles ; elle ne joue qu'un rôle minime dans l'absorption des substances actives au niveau du côlon à cause de l'existence de nombreuses jonctions intercellulaires serrées appelées jonctions serrées (Watts and Illum, 1997; Kinget *et al.*, 1998; Mayersohn, 2002).

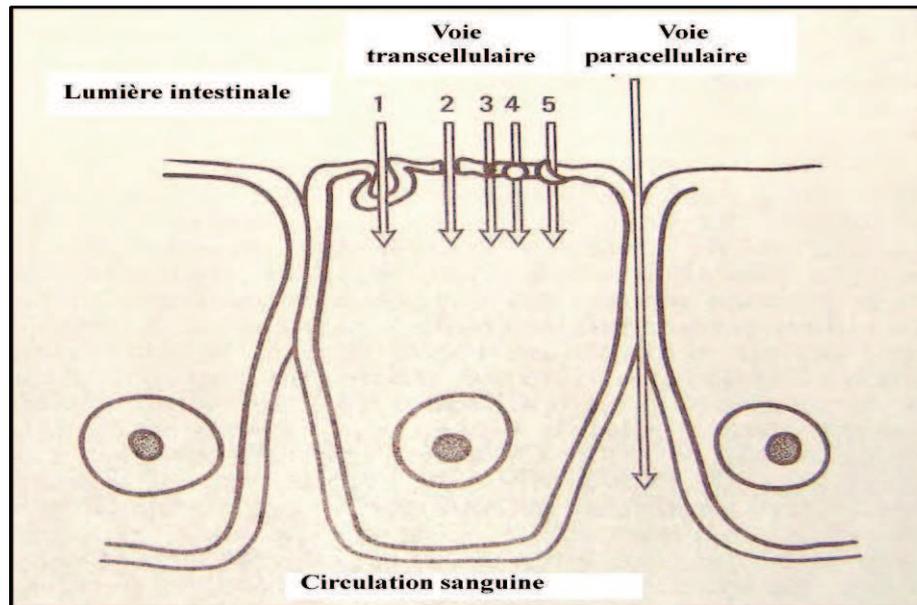


Figure 9: Voies de passage des médicaments à travers l'épithélium intestinal : la voie paracellulaire emprunte des pores sur les jonctions serrées, la voie transcellulaire utilise ; (1) l'interaction morphologique avec la membrane, (2) la diffusion passive à travers des pores, (3) la diffusion passive avec solubilisation dans la membrane, (4) la diffusion facilitée et (5) un transporteur actif (Meunier et al., 1988).

D'après la littérature scientifique, de nombreux principes actifs ont montré une bonne absorption au niveau du côlon humain par rapport aux autres organes du tractus gastro-intestinal. A titre d'exemple, nous pouvons citer le budésônide, le diclofénac, l'ibuprofène, le léfradafiban, le métoprolol, la nisoldipine, l'oxprénolol, la théophylline, et l'acide ursodéoxycholique (McConnell *et al.*, 2009a).

En ce qui concerne le mucus, présent à la surface de l'épithélium du côlon, il agit comme une barrière physique en raison de dispositions spécifiques et non spécifiques d'absorption de principes actifs. En fait, l'absorption du médicament dans le côlon est limitée par un certain nombre de barrière telles que: (i) le microbiote colique, nettement plus élevé dans le côlon distal, peut affecter la biodisponibilité des substances actives, (ii) le mucus de l'épithélium du côlon qui agit également comme une barrière physique, car certains médicaments peuvent se lier avec et améliorer le temps de transit et par conséquent son absorption. Par contre, les autres substances actives de faibles poids moléculaires telles que les céphalosporines, les pénicillines et les aminosides se lient au mucus. Cette liaison empêche d'atteindre la surface épithéliale. En outre, certaines molécules comme le carbachol et la sérotonine stimulent la sécrétion de mucus et peuvent donc réduire leur propre absorption ainsi que celle de toute substance active administrée en association (Lee and Mukherjee, 2007).

5.4.2. Absorption des peptides et des protéines

Les molécules peptidiques sont mal absorbées au niveau le tractus gastro-intestinal. Leur dégradation par l'acidité gastrique, les enzymes intestinaux et coliques, leur faible perméabilité au niveau des muqueuses du fait de leur taille, la rapidité du transit intestinal et l'effet du premier passage expliquent leur faible biodisponibilité par voie orale. Pourtant, l'un des objectifs majeurs visé par les formulations coliques est l'administration par voie orale de peptides, de protéines et d'autres macromolécules médicamenteuses. Le côlon est reconnu comme un site d'absorption plus favorable pour les peptides et les protéines que l'intestinal grêle. Ceci s'explique par le fait que le séjour colique est plus long et que, l'activité des peptidases et des protéolytiques y est relativement plus faible (Tozaki *et al.*, 2001; Arhewoh *et al.*, 2005; McConnell *et al.*, 2008a; McConnell *et al.*, 2009a).

Des peptidases telles que les aminopeptidases et les diaminopeptidases ont des concentrations plus faibles dans le côlon que dans l'intestin grêle. Toutefois, il a été démontré que la concentration d'autres enzymes tels que endoprotéase prolyl et collagénase sont de cinq à six fois plus élevées dans le côlon que dans l'intestin grêle, et par conséquent, l'hormone thyroïdienne (TRH), sera plus facilement hydrolysée dans le côlon que dans l'intestin grêle et le rectum. Par conséquent, les substances actives peptidiques qui sont des substrats pour l'endoprotéase prolyl et la collagénase seront probablement dégradées dans le côlon (McNally and Park, 2007).

Diverses solutions ont été proposées afin d'améliorer la biodisponibilité par voie orale des substances actives (Tableau 6). Ainsi, la dégradation par les fluides digestifs peut être limitée par l'administration simultanée d'inhibiteurs qui diminuent l'activité enzymatique du tractus gastro-intestinal. La vitesse de dissolution des molécules peu solubles peut être améliorée en réduisant la taille des particules de principe actif et en augmentant ainsi leur surface spécifique. Le passage à travers la muqueuse intestinale peut également être favorisé par l'utilisation de promoteurs d'absorption qui augmentent de façon transitoire la perméabilité de l'épithélium (Watts and Illum, 1997; Patel *et al.*, 2007; McConnell *et al.*, 2008a; McConnell *et al.*, 2009a).

Tableau 6: Les différentes classes des promoteurs d'absorption colique avec des exemples représentatifs (Kinget *et al.*, 1998; Lee and Mukherjee, 2007).

Classe	Exemples
Anti-inflammatoires non stéroïdiens	L'indométhacine, les salicylates, et le diclofénac
Acides gras	L'oléate de sodium, le caprate de sodium, le caprylate de sodium, et le laurate de sodium
Agents chélatants du calcium	Ethylènediamine tétraacétate de sodium (EDTA), et le citrate trisodique
Séquestrants calciques	
Glycérides	Phospholipides, polyoxyéthylène glycéryl esters, et glycérides d'acides gras à chaîne courte
Micelles mixtes	Le taurocholate de monooléine, le taurocholate d'acide oléique, et le glycocholate d'acide oléique
Polymères	L'amidon, le polycarbophile et le chitosans
Sels biliaires	Le glycochocholate, le taurocholate, et le déoxycholate de sodium
Surfactants	Le polyoxyéthylène lauryl éther, les aponines, et lauryl sulfate de sodium
Autres agents	L'acylcarnitine, l'azone (1-dodécylazacycloheptane-2-one), les acides dicarboxyliques, et les phénothiazines

Grâce à leurs actions inhibitrices vis-à-vis des enzymes protéolytiques, les inhibiteurs des protéases peuvent améliorer l'absorption colique des peptides et des protéines. Une étude *in-vivo* a montré que la biodisponibilité de la metképhamide après implantation intra-iléale chez le rat était quasi nulle. Cependant, elle atteint plus de 25% en présence de la puromycine comme inhibiteur de protéases (Langguth et al., 1997).

Cependant, l'utilisation de promoteurs d'absorption n'est pas sans inconvénients, surtout dans le cadre de thérapies chroniques. Ainsi, l'administration d'inhibiteurs enzymatiques peut affecter tout le processus de la digestion et peut à la fois engendrer une mauvaise assimilation des nutriments et empêcher la dégradation d'agents pathogènes. L'action des promoteurs d'absorption n'est quant à elle pas spécifique et favorise le transport dans la circulation sanguine non seulement du principe actif mais également des molécules potentiellement toxiques présentes dans la lumière intestinale (Kinget *et al.*, 1998; Wawrezynieck *et al.*, 2008). Il a été observé que la sensibilité de la muqueuse aux inhibiteurs et aux promoteurs d'absorption est différente le long du tractus gastro-intestinal. Cette sensibilité est dans l'ordre suivant: rectum > côlon > intestin grêle > estomac (Shen and Lin, 1994).

Enfin, différentes techniques ont été utilisées pour étudier l'absorption de la substance active au niveau du côlon : les méthodes indirectes qui utilisent les données pharmacocinétiques pour évaluer l'absorption et les méthodes directes comprenant la coloscopie, l'intubation et l'utilisation de la capsule de haute fréquence, de la scintigraphie gamma. Les méthodes directes sont aujourd'hui devenues les méthodes privilégiées pour étudier le transit gastro-intestinal (Kinget *et al.*, 1998).

6. Le microbiote gastro-intestinal

6.1.Introduction générale

La microflore est un terme utilisé pour désigner l'ensemble des micro-organismes vivant sur une surface comme celle du tractus gastro-intestinal. Initialement considérés comme des plantes, ces micro-organismes ont été incorrectement classés dans cet embranchement et ceci explique l'emploi du terme «flore». Etant donné que cette dénomination est scientifiquement incorrecte, le terme microbiote est préféré (Sousa *et al.*, 2008).

Le microbiote intestinal à l'état physiologique est une collection complexe et en équilibre de microorganismes qui cohabitent au sein du tractus gastro-intestinal. Il remplit un rôle physiologique de nutrition et de contrôle du système immunitaire de l'hôte (Isolauri *et al.*, 2002). Après une colonisation complète, le microbiote intestinal est considéré comme un organe acquis après la naissance. Ainsi, le nouveau-né, stérile à la naissance (Figure 10), est rapidement colonisé par une flore microbienne provenant des contacts humains, principalement de la mère, et de l'environnement. L'alimentation, la prise d'antibiotiques et l'hygiène jouent des rôles importants dans les séquences de colonisation bactérienne. A deux mois, le nourrisson héberge une flore dont la complexité se rapproche de celle de l'adulte mais dont les fonctions sont différentes suggérant ainsi une lente maturation du microbiote.

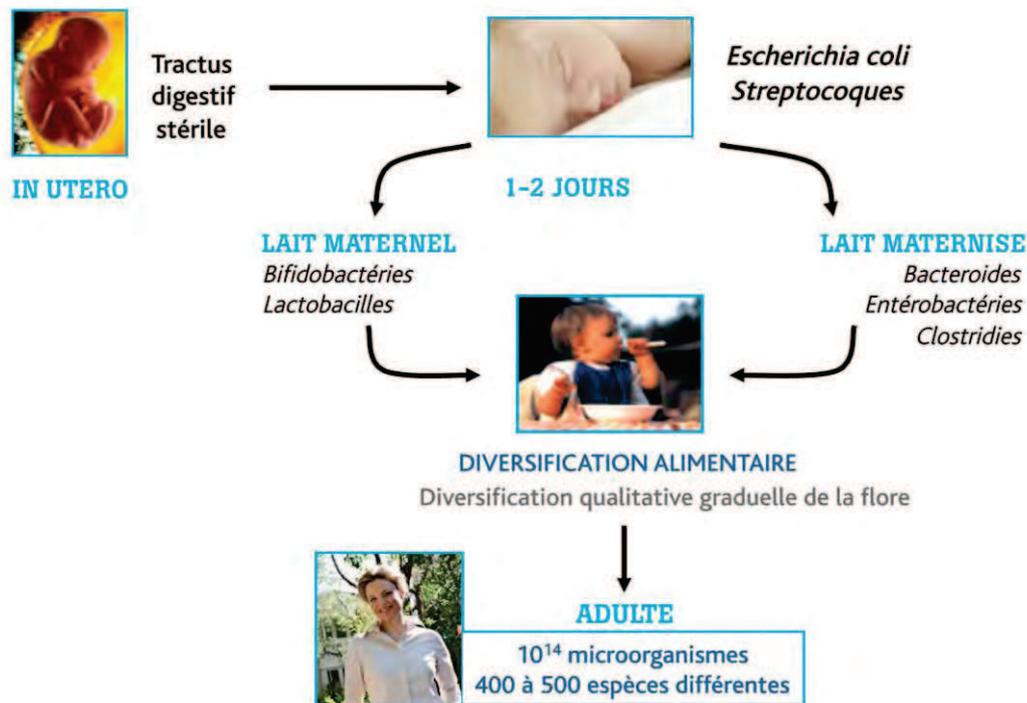


Figure 10: Différentes étapes de la colonisation intestinale (De Bodman, 2008).

La diversité des espèces bactériennes du microbiote est très variable d'un individu à l'autre et le nombre d'espèces communes à plusieurs individus est très restreint (Mangin et al., 2004; Marteau et al., 2004). L'équilibre de ce microbiote se constitue progressivement de la naissance à l'âge adulte. Ce long processus de colonisation bactérienne est sans doute responsable de l'unicité de chaque individu (Guillou *et al.*, 2006; De Bodman, 2008; Burcelin *et al.*, 2009).

Ce microbiote est constitué de 300 à 500 espèces différentes connues (Guarner and Malagelada, 2003). Ce nombre pourrait facilement atteindre 1000, bien qu'aucun catalogue exhaustif des espèces de l'écosystème du tube digestif n'ait encore été dressé (Joly et al., 2007). Le microbiote du tractus gastro-intestinal a été estimé à près de 10¹⁴ entités microbiennes. Ce nombre représente environ 10 fois le nombre total de cellules du corps humain (Sinha and Kumria, 2003b). Ces bactéries vivent sur l'épithélium des muqueuses, sur la couche de mucus et dans la lumière intestinale (McConnell *et al.*, 2009a). Dans ce microbiote, plusieurs types de bactéries coexistent comme des bactéries aérobies, anaérobies facultatives et anaérobies strictes. Ces associations font du microbiote un écosystème complexe (Jain et al., 2007).

La prévalence des bactéries dans le tractus gastro-intestinal dépend des conditions régnant dans le compartiment du tractus. Deux catégories de bactéries ont été identifiées : les

bactéries autochtones ou indigènes et les bactéries allochtones ou transitoires. La majorité des bactéries pathogènes sont allochtones et vivent normalement en harmonie avec l'hôte, excepté lorsque l'équilibre du système est rompu (Mackie *et al.*, 1999; Hao and Lee, 2004). Ainsi, les bactéries appartenant aux genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* protègent l'organisme contre les pathogènes opportunistes (Servin, 2004; Burcelin *et al.*, 2009).

6.2. Distribution du microbiote dans le tractus gastro-intestinal

Du point de vue microbiologique, la grande diversité des microorganismes (Tableau 7) module l'environnement gastro-intestinal qui peut différer grandement en fonction des germes présents. Ces conditions de colonisation influent aussi sur la survie d'autres microorganismes.

Dans le premier compartiment qu'est la cavité buccale, un grand nombre d'espèces essentiellement aérobies (10^7 unités formant colonies (UFC.mL⁻¹) est présent. Elles proviennent de l'alimentation et se trouvent dans la salive, les cavités des gencives et à la surface des dents. Dans le deuxième compartiment qu'est l'estomac, la concentration du microbiote est généralement inférieure à 10^3 UFC.mL⁻¹ du fait de sa forte acidité. De ce fait, l'estomac héberge sélectivement les microorganismes acidotolérants de type Gram positif et aérobies (Mackie *et al.*, 1999; Sinha and Kumria, 2003b).

Le troisième compartiment qu'est l'intestin grêle constitue une zone de transition entre la population disparate de l'estomac et le microbiote luxuriant du côlon. Dans des conditions normales, le microbiote de la première partie du duodénum est similaire à celui de l'estomac. Les espèces dominantes incluent entre autres les streptocoques et lactobacilles (Scheline, 1973; Mackie *et al.*, 1999).

Tableau 7: Distribution qualitative et quantitative du microbiote du TGI (en UFC.mL⁻¹) (Bernier *et al.*, 1988c; Vandamme *et al.*, 2002).

	Bouche	Estomac	Jéjunum	Iléon	Fèces
Total des bactéries énumérées	0-10 ⁷	0-10 ³	0-10 ⁵	10 ³ -10 ⁷	10 ¹⁰ -10 ¹²
Bactéries aérobies ou anaérobies facultatives					
- Entérobactéries	ND	0-10 ²	0-10 ³	10 ² -10 ⁶	10 ⁴ -10 ¹⁰
- Haemophilus	0-10 ⁶				
- Lactobacilles	0-10 ⁷	0-10 ³	0-10 ⁴	10 ² -10 ⁵	10 ⁶ -10 ¹⁰
- Micrococcus	0-10 ⁶	ND	ND	ND	ND
- Naesseriae	0-10 ⁶	ND	ND	ND	ND
- Staphylococcus	10 ⁶ -10 ⁷	0-10 ²	0-10 ³	10 ² -10 ⁵	10 ⁴ -10 ⁷
- Streptococcus	10 ⁶ -10 ⁷	0-10 ³	0-10 ⁴	10 ² -10 ⁶	10 ⁵ -10 ¹⁰
- Streptococcus salivarius	0-10 ⁶	0-10 ⁴	0-10 ⁶	10 ² -10 ⁶	10 ² -10 ⁸
Champignons et levures	ND	0-10 ²	0-10 ²	10 ² -10 ³	10 ² -10 ⁶
Bactéries anaérobies					
- Bactéroïdes	0-10 ⁶	Rare	0-10 ²	10 ³ -10 ⁷	10 ¹⁰ -10 ¹²
- Bifidobactéries	10 ⁷ -10 ⁸	Rare	0-10 ³	10 ² -10 ⁵	10 ⁸ -10 ¹²
- Coques à Gram (+)	ND	Rare	0-10 ³	10 ² -10 ⁵	10 ⁸ -10 ¹¹
- Clostridies	ND	Rare	Rare	10 ² -10 ⁴	10 ⁶ -10 ¹¹
- Eubactéries	ND	Rare	Rare	Rare	10 ⁹ -10 ¹²
Rapport Anaérobies/Aérobies	1/10	ND	ND	100/1	1000/1

ND = non détecté

Dans la dernière partie de l'intestin grêle, le microbiote est constitué d'une population de plus en plus anaérobie. Avec l'augmentation du pH, le nombre de bactéries Gram-négatives dépasse celui des Gram-positives. Les coliformes et les bactéries anaérobies telles que les bactéroïdes et les bifidobactéries sont régulièrement présents en concentrations substantielles jusqu'à environ 10⁷ UFC.mL⁻¹. Dans le dernier compartiment qu'est le côlon, le transit digestif est plus lent et son contenu est caractérisé par une teneur en oxygène pratiquement nulle, un potentiel redox très bas, un pH proche de la neutralité et une accumulation des résidus alimentaires (Macfarlane and Macfarlane, 2004). Il présente par conséquent des conditions très favorables à la croissance des germes anaérobies. La concentration bactérienne y atteint 10¹⁰ à 10¹² UFC.mL⁻¹. Plus de 50 genres et environ 400 espèces différentes y sont présents. Ceci correspond à environ 30 à 50% (en masse) du contenu colique (Topping and Clifton, 2001; Eckburg *et al.*, 2005; Jain *et al.*, 2007). Les bactéries dominantes sont les Bactéroïdes, les Bifidobactéries et les coques Gram-positifs.

Le microbiote colique est constitué presque uniquement de bactéries anaérobies strictes ou facultatives. En effet, le rapport entre ces bactéries et des bactéries aérobies est de l'ordre de (1000 :1) (Tableau 7). En fait, certains microorganismes sont présents en nombre plus important que d'autres. Il est estimé qu'un ensemble d'environ 40 espèces représente 99% du microbiote (Macfarlane and Macfarlane, 1997) sachant que les *Bactéroïdes* en représentent environ 32% (Sinha and Kumria, 2003b).

Plus de 99% de la population du gros intestin sont constitués de bactéries anaérobies strictes ou facultatives. La majeure partie vit sous la couche de mucus recouvrant la muqueuse colique (Croucher et al., 1983).

En effet, la plupart des bactéries composant le microbiote colique ne peut pas être cultivé suivant les techniques de microbiologie classique parce que ce sont des microorganismes anaérobies stricts ayant en plus des exigences particulières en nutriments. Selon les données actuelles disponibles, il est estimé que 40% à 80% du microbiote colique chez l'homme n'est pas cultivable. Les méthodes classiques de microbiologie ne permettent donc d'obtenir qu'une vue biaisée de la diversité de l'écosystème digestif (Guarner and Malagelada, 2003). Le microbiote colique donne naissance au microbiote fécal qui représente, à l'état sec, plus de 30% de la matière fécale. Cette dernière a une composition bactérienne très semblable à celle des fluides coliques.

6.3. Les facteurs majeurs influençant le microbiote gastro-intestinal

La composition et les fonctions du microbiote du tractus gastro-intestinal sont influencées par divers facteurs (Tableau 8) liés au changement des conditions physiologiques de l'hôte (âge, état de santé...etc), de la composition alimentaire et de circonstances environnementales (contamination par les pathogènes, antibiothérapie, chimiothérapie, climat, stress, hygiène) (Hopkins et al., 2002).

Des variations dans la composition quantitative et qualitative du microbiote intestinal peuvent être retrouvées chez des individus en bonne santé. En effet, une étude des matières fécales fraîchement récoltées chez 7 volontaires pendant une période de 7 mois a permis de démontrer non seulement l'existence de ces variations inter- et intra-individus, mais aussi des variations des concentrations en métabolites produits par l'activité des enzymes bactériennes (Ikeda et al., 1994). De plus, la composition du microbiote intestinal peut être différente d'une région géographique à une autre (Yang, 2008). Les divers facteurs mentionnés dans le tableau 8 peuvent perturber l'écosystème intestinal en favorisant le développement d'une espèce par rapport à une autre. Dans certains cas, ce déséquilibre peut être très favorable à la

prolifération de microorganismes opportunistes pathogènes pouvant compromettre la santé et le bien-être de l'hôte.

Tableau 8: Les principaux facteurs influençant la composition et la fonction du microbiote intestinal (Holzapfel et al., 1998; Vandamme, et al. 2002).

Facteurs influençant le microbiote gastro-intestinal	
1	<p>Facteurs inhérents à l'hôte</p> <ul style="list-style-type: none"> - pH, sécrétions (immunoglobulines, bile, sels, enzymes) - Motilité (péristaltisme gastro-intestinal) - Physiologie (variable selon les compartiments) - Cellules détachées, mucines, exsudats de tissus - L'âge - L'antibiotique
2	<p>Facteurs microbiens</p> <ul style="list-style-type: none"> - Adhésion - Motilité - Flexibilité nutritionnelle - Spores, capsules, enzymes, composants antimicrobiens - Vitesse de développement
3	<p>Interactions microbiennes</p> <ul style="list-style-type: none"> • Synergie <ul style="list-style-type: none"> - Coopération métabolique - Excrétion de vitamines et de facteurs de croissance - Changement du potentiel d'oxydoréduction, du pH et du taux en O₂ • Antagonisme/stimulation <ul style="list-style-type: none"> - Acides gras à chaîne courte, amines - Changement du potentiel d'oxydoréduction, pH et taux en O₂ - Composants antimicrobiens, sidérophores - Besoins nutritionnels, etc.
4	<p>Régime alimentaire</p> <ul style="list-style-type: none"> - Composition, fibres non digestibles, médicaments, etc.

6.4. Les importances physiologiques du microbiote intestinal

Ces microorganismes forment un microbiote et exercent notamment de nombreuses fonctions physiologiques (Figure 11): (a) métabolisme de fermentation des nutriments, (b) effet barrière pour, d'une part, protéger le système digestif contre les bactéries pathogènes et, d'autre part, stimuler le développement du système immunitaire.

En outre, l'activité bactérienne entraîne la formation de certaines vitamines (B12, K, thiamine, riboflavine) en plus d'autres produits de dégradation tels que les acides gras à chaîne courte (Marcil et al., 2004).

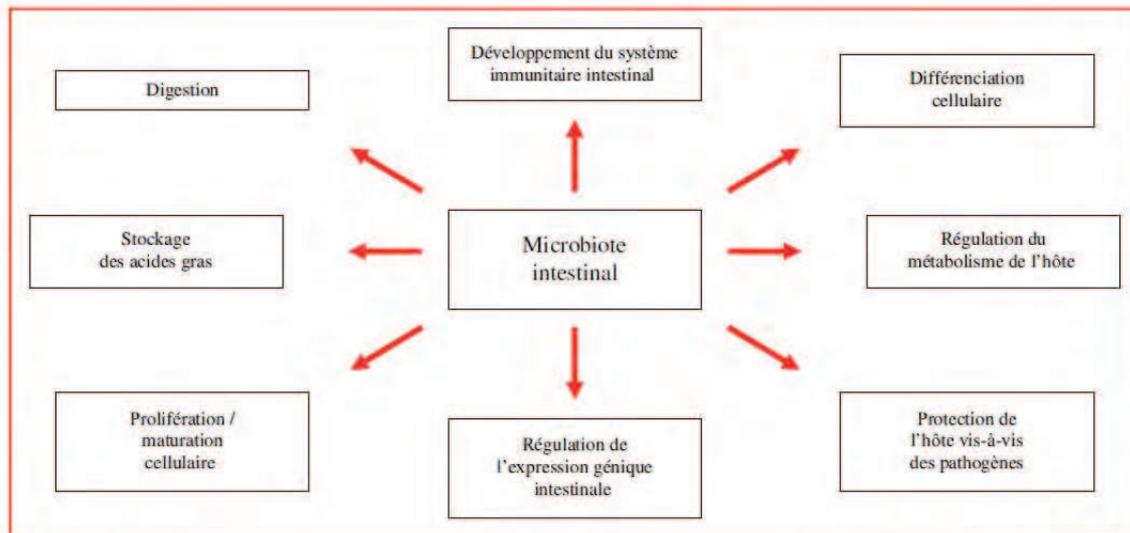


Figure 11: Les différentes fonctions physiologiques du microbiote intestinal (Burcelin *et al.*, 2009).

6.4.1. Rôle du microbiote intestinal dans le métabolisme intra-luminal du côlon

Le tractus gastro-intestinal humain contient un grand nombre de glycosidases capables d'hydrolyser des di- et oligosaccharides, ainsi que des polysaccharidases capables d'hydrolyser divers polysaccharides. Les glycosidases sont produites de façon endogène par les cellules de mammifères ou de façon exogène par les bactéries coliques. La composition et l'activité de glycosidases dans le tractus gastro-intestinal varie selon leur emplacement (à savoir l'estomac, l'intestin grêle et le côlon). Les glycosidases de l'estomac et l'intestin grêle sont liées aux membranes cellulaires ou excrétées par le pancréas dans la bile, alors que l'activité glycosidase du colon provient principalement de bactéries (Jain *et al.*, 2007). Les glycosidases produites par les bactéries du côlon humain sont citées dans le Tableau 9. Les glycosidases qui ont la plus forte activité sont l' α -L-arabinofuranosidase, la β -D-xylosidase, la β -D-galactosidase, la β - et l' α - D-glucosidases (Englyst *et al.*, 1987; Park *et al.*, 1993).

Tableau 9: L'activité enzymatique des différents types de glycosidases sur les populations mixtes de bactéries fécales de l'homme après 24 h de croissance sur différents substrats polysaccharides (Jain *et al.*, 2007).

Glycosidases	Glycosidases activités (nmol.h ⁻¹ .mg)			
	Amidon Culture	Arabinogalactane Culture	Pectine Culture	Xylane Culture
α -L-Arabinofuranosidase	1207	1054	963	764
β -D-Xylosidase	1168	1036	9093	788
α -D-Galactosidase	910	200	900	620
β -D-Galactosidase	1197	1095	947	739
β -D-Fucosidase	128	128	71	129
β -D-Galacturonidase	11	ND	ND	120
β -D-Glucuronidase	70	51	ND	ND
α -D-Glucosidase	1149	1020	947	681
β -D-Glucosidase	1001	859	769	572
α -D-Mannosidase	ND	ND	ND	19
β -D-Mannosidase	58	50	ND	38

ND= non détecté.

6.4.2. Métabolisme des résidus alimentaires dans le côlon

Le microbiote colique métabolise des substrats exogènes ne digérés dans les parties supérieures du tube digestif. Ces substrats correspondent à de l'amidon ou à des polysaccharides (cellulose, xylène, pectine, etc.) (Tableau 10). Il métabolise aussi des substrats endogènes provenant de l'intestin grêle, de la paroi du côlon, du pancréas et des sécrétions biliaires.

Tableau 10: Les espèces bactériennes impliquées dans la dégradation des différents polysaccharides (Jain *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2009).

Polysaccharide	Espèces bactériennes
Cellulose	Bactéroïdes
Sulfate de chondroïtine	Bactéroïdes
Cyclodextrine	Bactéroïdes
Dextran	Bactéroïdes
Galactomannane (Gomme guar)	Bactéroïdes et ruminococcus
Gomme arabique	Bifidobactéries
Mucine	Bactéroïdes, bifidobactéries et ruminococcus
Non-cellulose p-glucanes	Bactéroïdes
Pectine	Bactéroïdes, bifidobactéries et eubactéries
Amidon	Bactéroïdes, bifidobactéries, eubactéries etc
Xylane	Bactéroïdes et bifidobactéries
Glucomannane	Bactéroïdes

Schématiquement (Figure 12), les bactéries procèdent en deux étapes différentes. La première correspond à une hydrolyse classique des polysides présents. Elle met en jeu différentes enzymes bactériennes (α -glucosidases, β -glucosidases, β -galactosidases). Il en résulte la formation des sucres simples (Macfarlane et al., 1998) tels que le glucose, le fructose, le galactose ou le pentose. La deuxième étape correspond véritablement à la fermentation.

Les résultats de leur action sont la production des différents AGCC (acétique > propionique \geq butyrique, et accessoirement lactique) (Figure 2 et Tableau 1). Les concentrations en AGCC produites sont relativement constantes. Elles sont respectivement de 70, 25 et 15 mmol/l pour l'acide acétique, l'acide propionique et l'acide butyrique. Des gaz tels que le dioxyde de carbone, l'hydrogène et le méthane sont aussi produits (Cummings *et al.*, 1987; Aube *et al.*, 1995; Topping and Clifton, 2001; Macfarlane and Macfarlane, 2003).

D'autres isoacides comme l'isobutyrate et l'isovalérate sont aussi produits au cours de la fermentation des acides aminés issus de la protéolyse. Enfin, d'autres produits comme l'ammoniac, les phénols, les indoles et les amines résultent du métabolisme des protéines par le microbiote intestinal. Certains de ces produits sont potentiellement toxiques (Macfarlane and Macfarlane, 1997).

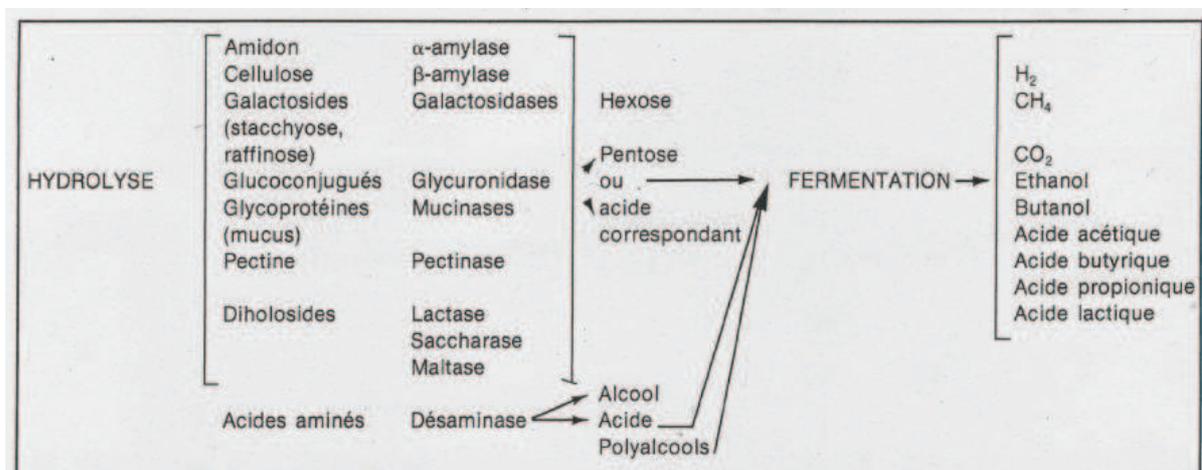


Figure 12: Schéma de l'hydrolyse et de la fermentation de différents glucides dans le côlon (Bernier *et al.*, 1988c).

La fermentation bactérienne est influencée par la structure chimique des polysaccharides amylicés et non amylicés. Par exemple la cellulose, insoluble dans l'eau, est relativement résistante à la dégradation bactérienne alors que les fibres solubles comme les pectines et les hémicelluloses sont largement fermentées (Aube *et al.*, 1995).

La capacité fermentaire bactérienne du microbiote varie tout au long du côlon. Le côlon droit est le siège d'une très forte activité fermentaire. Le taux de croissance bactérien et le pH y

sont élevés. C'est dans le côlon droit (côlon proximal) que la production d'AGCC est la plus forte. Tout le long du côlon, le contenu colique s'appauvrit progressivement en polysaccharides ce qui implique des modifications métaboliques pour le microbiote qui doit s'adapter. Dans le côlon transverse, la fermentation est ralentie du fait de la diminution de la quantité de substrat. La croissance bactérienne est elle aussi plus faible et le pH augmente. Au niveau du côlon gauche (côlon distal), la fermentation des polysaccharides et les croissances bactériennes sont pratiquement nulles du fait de l'épuisement du milieu en polysaccharides. Le pH est proche de la neutralité et la fermentation des composés protéiques s'intensifie. Même si tout au long du système colique la production d'AGCC diminue, les ratios entre les différents composés restent relativement stables (Macfarlane et Cummings, 1991).

Au niveau du côlon, les AGCC sont rapidement absorbés et stimulent l'absorption de l'eau et des sels. Les AGCC sont alors métabolisés principalement par les cellules épithéliales, le foie et les muscles. Seule une faible proportion des AGCC (inférieure à 5%) est retrouvée dans les fèces. L'une des plus importantes propriétés des AGCC est leur effet trophique sur les cellules épithéliales de l'intestin, le butyrate possédant le plus fort et le propionate le plus faible. L'acétate est le principal AGCC produit dans le côlon.

L'acétate est transporté jusqu'aux tissus et muscles où il est métabolisé. Le propionate pourrait inhiber la synthèse du cholestérol dans le foie, en bloquant l'utilisation de l'acétate. Le butyrate présente des propriétés intéressantes parce que, en plus de son effet trophique sur le tissu épithélial, il constitue une source d'énergie importante pour les cellules épithéliales du côlon, contrôlant la croissance et la différenciation cellulaire (Wolever *et al.*, 1991; Topping and Clifton, 2001; Sinha and Kumria, 2003b).

6.4.3. Métabolisme des médicaments dans le côlon

Le microbiote intestinal peut intervenir dans le métabolisme de certains médicaments (Tableau 11). Ainsi, les enzymes bactériennes jouent un rôle important dans le métabolisme de plus de trente médicaments. Ces modifications peuvent changer leur biodisponibilité et leur pharmacocinétique. Le microbiote gastro-intestinal possède cette capacité de métabolisation qui peut être égale ou supérieure à celle du foie (Sousa *et al.*, 2008; McConnell *et al.*, 2009a).

De nos jours, le nombre de médicaments atteignant le côlon est appelée à augmenter. Ceci est particulièrement vrai pour des médicaments développés en vue d'une libération modifiée ou ciblée au niveau du côlon. Ces médicaments sont des substrats potentiels pour la flore colique.

Tableau 11: Quelques exemples de réactions métaboliques initiées par le microbiote intestinal et leur substrat médicamenteux (Abu Shamat, 1993; Sousa *et al.*, 2008).

Type de réactions	Réactions	Exemples
Réduction	Dérivés nitroso	Clonazépam
	Sulfoxydes	Sulindac
	21-Hydroxycorticoides	Aldostérone
	Doubles liaisons	Digoxine
	Dérivés azoïques	Prontosil
Hydrolyses	Esters de nitrate	Glycéryl trinitrate
	Esters sulfatés	Picosulfate de sodium
	Esters succiniques	Carbénoxolone
	Amides	Méthotrexate
	Glucuronide	Morphine glucuronide
	Glucosides	Sennosides
Retrait de groupes fonctionnels	N-Déalkylation	Méthamphétamine
	Déamination	Flucytosine
Autres réactions	Ruptures des liens hétérocycliques	Lévamisole
	Clivage des chaînes latérales	Stéroïdes

Trois situations pharmacologiques potentielles peuvent donc se présenter suite au métabolisme bactérien d'un médicament: la survenue d'une inactivité, une activité pharmacologique plus importante ou encore une toxicité. A titre d'exemple, l'administration du sorivudine au Japon en 1993 a causé de nombreux accidents. Cette substance active a été transformée par le microbiote intestinal en (E) -5 - (2) bromovinyl uracile qui est très toxique en présence de 5-fluorouracile. 40 jours avant sa mise sur le marché Japonais, le sorivudine a été responsable de la mort quatre-vingts patients (Okuda et al., 1998).

7. Polysaccharides dans les systèmes spécifiques pour la délivrance colique de médicaments

7.1. Introduction

La structure des cycles des saccharides a été élucidée en 1930. Les polymères à base de cycles saccharidiques, les polysaccharides, ont ensuite été rapidement découverts dans tous les organismes vivants, végétaux (pectine, gomme guar, inuline), animaux (chitosane, chondroïtine sulfate), algues marines (alginates) et microbienne (dextran, pullulane) (Sinha and Kumria, 2003b; Jain et al., 2007). Les polysaccharides sont des macromolécules

constituées par l'enchaînement d'oses (monosaccharides) comme par exemple le glucose, le mannose, le fructose. Ils présentent une grande diversité dans leur structure, en termes de nature chimique des oses enchaînés, de type d'enchaînement, de longueur des chaînes, ou encore de taux de ramifications (Robyt, 1998; Chourasia and Jain, 2004).

Les polysaccharides sont des polymères abondants dans la nature, biodégradables, biocompatibles, et généralement disponibles à faible coût. Ces macromolécules sont intéressantes de part leurs nombreuses applications dans les domaines de l'alimentation, de la santé et de la cosmétique (Sinha and Kumria, 2001b). Comme nous l'avons précédemment expliqué, ces polysaccharides subissent une dégradation spécifique dans le côlon sous l'effet du microbiote colique qui sécrète différentes sortes d'enzymes telles que la β -D-glucosidase, la β -D-galactosidase, l'amylase, la pectinase, la xylanase, la β -D-xylosidase, la dextranase etc.

Grâce à ces propriétés, un grand nombre d'études ont été déjà réalisées afin d'exploiter ces macromolécules dans le domaine de la délivrance ciblée de principes actifs dans le côlon (Tableau 12), soit par un système d'enrobage et/ou un système matriciel, soit par un système de prodrogue (Sinha and Kumria, 2001b).

Malheureusement, la plupart d'entre eux sont généralement solubles et forment rapidement des gels dans les milieux aqueux, ce qui peut compromettre leur capacité à protéger les principes actifs lors du transit dans l'estomac et dans l'intestin grêle. En vue de surmonter ce problème d'hydrosolubilité, diverses stratégies ont été envisagées, y compris leur incorporation dans des polymères insolubles et leur modification physique ou chimique (Chourasia and Jain, 2003; Ibekwe *et al.*, 2004; Van den Mooter, 2006).

Tableau 12: Polysaccharides couramment utilisés dans la délivrance ciblée de médicaments au niveau du côlon (Chourasia and Jain, 2003; Sinha and Kumria, 2003b; Jain et al., 2007).

Polysaccharides	Chaîne principale	Chaîne secondaire	Source	Propriétés et utilisation
Amylose	α - 1,4 D-glucose	-	Végétale	Non ramifiés, excipients pour comprimés, ou systèmes d'enrobages
Alginate de calcium	1,4 acide α -L-guluronique 1,4 acide β -D-mannuronique	-	Algue marine	système d'enrobage
Arabinogalactane	α et β - 1,3 D-galactose	β - 1,2 et β - 1,3 L-arabinose et D-galactose	Végétale	pectine neutre, hémicellulose, utilisé comme épaississant dans l'industrie alimentaire
Chitosan	β - 1,4 glucosamine (N-acétyl-D-glucosamine)		Animale	Polymères de chitine désacétylée, excipients pour comprimés, systèmes d'enrobages et matriciels, préparation de gélules et agent améliorant l'absorption
Dextran	α - 1,6 D-glucose	α - 1,3 D-glucose	Bactérienne	utilisé en médecine comme substitut du plasma sanguin, comme agent d'enrobage, formé d'hydrogel
Gomme guar	α - 1,4 D-mannose	α - 1,6 D-glucose	Végétale	Utilisé dans le domaine alimentaire, agent liant et délitant dans les comprimés, systèmes matriciels, systèmes d'enrobages
Inuline	β - 1,2 fructofuranose	-	Végétale	Système d'enrobage ou hydrogel
Pectine	1,4 acide α -L-galacturonique et α - 1,6 D- rhamnose	D-galactose et D-arabinose	Végétale	Systèmes matriciels
Pullulane	α -1,6 maltotriose (un triholoside de glucose)	-	Fongique	systèmes d'enrobages
Scléroglycane	β - 1,4 D-glucose	β - 1,4 D-glucose	Fongique	Système matriciel
Xylane	β - 1,4 D-xylose	β - 1,3 L-arabinose	Végétale	Hémicellulose la plus abondante, dégradable

8. Le dextran

8.1. Historique, structure et origine

Pasteur en 1861 a découvert l'origine microbienne de la gélification de sirops de canne à sucre. En 1874, le composé à l'origine de cette gélification est nommé dextran. La structure chimique est représentée dans la figure ci-dessous (Figure 13). Plus tard, au début des années 1940, de nombreuses recherches ont permis de développer un agent substitut du plasma à base de dextran, ce qui permettait de rétablir le volume et la pression sanguine d'un patient en état de choc. Les dextrans font partie d'une famille de polysaccharides bactériens majoritairement linéaires, constitués par l'enchaînement d'unités glucopyranose liées en α -1,6 (Monsan et al., 2001; Heinze et al., 2006). Néanmoins, cette structure peut présenter des greffons liés à la chaîne principale en α -1,2, α -1,3 et/ou α -1,4. Le nombre, la longueur et la position de ces greffons sur l'unité glucopyranose dépendent des microorganismes qui produisent le dextran (Khalikova et al., 2005; Sun and Chu, 2006; Purama et al., 2009).

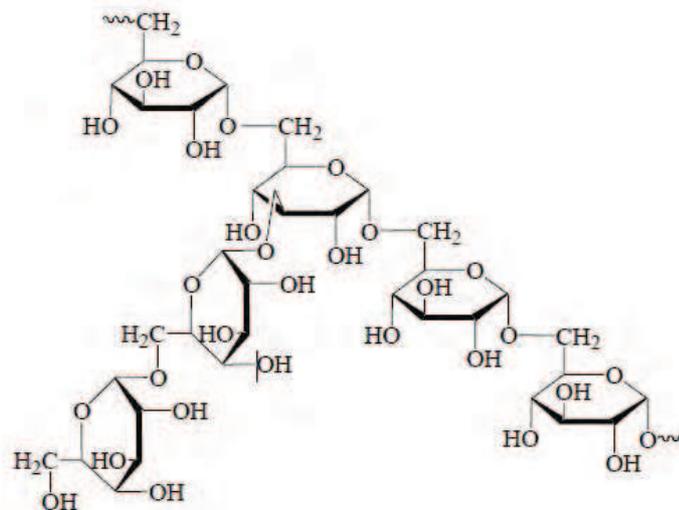


Figure 13: Structure du dextran issu de la souche *Leuconostoc Mesenteroides*.

La bactérie *Leuconostoc Mesenteroides* est le microorganisme le plus souvent utilisé dans la production commerciale du dextran, notamment pour des applications dans les domaines pharmaceutiques et biochimiques (de Belder, 2003; Heinze et al., 2006). Cette bactérie possède une enzyme (dextran-sucrase) qui convertit le saccharose en fructose et en dextran dit «natif» (Figure 14). La masse molaire des chaînes de dextran obtenues varie de quelques centaines à plusieurs dizaines de millions de g/mol.

C'est la raison pour laquelle le dextran «natif» subit une hydrolyse partielle après production, le plus souvent par l'acide chlorhydrique, pour conduire à des polymères de petite taille

(Monsan et al., 2001). Les dextrans sont ensuite séparés par fractionnement en utilisant un mélange eau/éthanol (Neuchl and Mersmann, 1995).

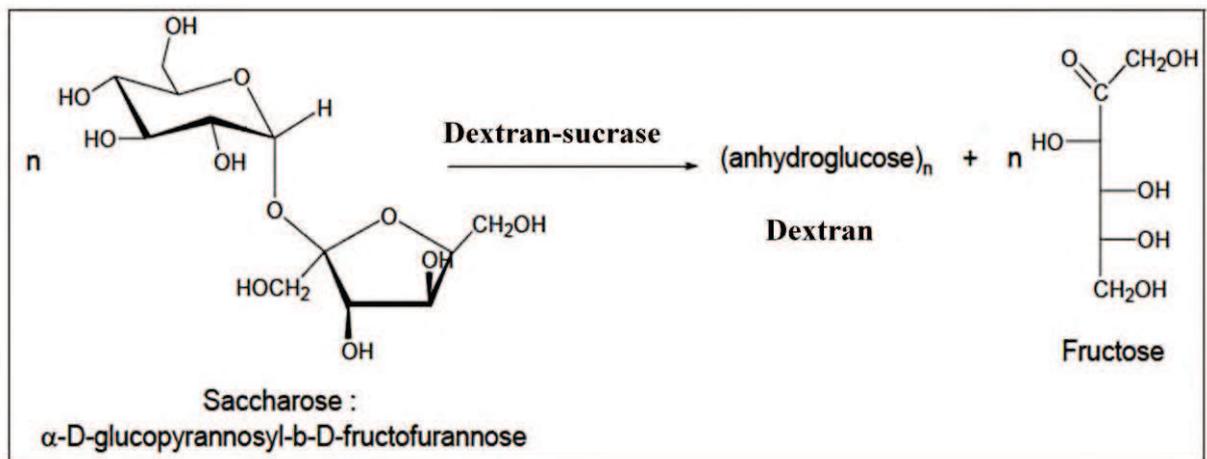


Figure 14: Transformation du saccharose en dextran.

Les dextrans sont généralement désignés par leur masse molaire moyenne, qui s'exprime en masse (M_w) sous le nom générique T_{Mw} (en kg/mol). (Ex. le dextran T_{70} a une masse moyenne de 70 kg/mol ou 70 kDa). Leur taux de ramification en α -1,3 est en général de 5%, mais 80% de ces ramifications sont des chaînes très courtes, généralement formées d'une ou deux unités D-glucose (Larsen, 1989). Ils ont la particularité de ne pas avoir de goût, d'être inodores, incolores et chimiquement inertes.

8.2. Propriétés physico-chimiques

Le dextran est un polymère très hydrophile. Tout comme les autres polysaccharides, il est très soluble dans l'eau, mais sa solubilité est fortement influencée par le taux de ramification. Un dextran avec un taux de ramification supérieur à 43% peut être considéré comme insoluble dans l'eau (Mehvar, 2000). Il est aussi soluble dans quelques solvants organiques polaires tels que le diméthylsulfoxyde (DMSO), le formamide, l'éthylène glycol, et le glycérol. Certaines fractions de dextrans adoptent un certain degré de cristallinité, et peuvent uniquement être mis en solution sous une température élevée (Hirata et al., 1999a; Hirata et al., 1999b).

Le groupement hydroxyle secondaire de la molécule de dextran est réactif, ce qui rend possible la production d'une variété de dérivés. Ainsi, en dehors de conditions extrêmes de pH ($\text{pH} < 2$), il est peu sensible à l'hydrolyse. Le dextran est beaucoup plus stable dans des conditions basiques (de Belder, 2003).

8.3. Aspects pharmacologiques et dégradation enzymatique

Comme la plupart des polymères hydrosolubles, les dextrans de faibles masses molaires (inférieures à 7000 g/mol) injectés dans le corps humain ou dans le système sanguin sont directement éliminés de l'organisme par le système de filtration rénale (Dellacherie, 1996; Mehvar, 2000). Par ailleurs, quelle que soit sa masse molaire, le dextran est entièrement dégradé en glucose par la dextranase (α -1 glucosidase), enzyme présente dans différents organes humains y compris le foie, la rate, les reins et la partie inférieure du tractus gastro-intestinal (Larsen, 1989; Mehvar, 2000). Dans le tractus gastro-intestinal, le dextran résiste à l'acidité gastrique, à l'activité enzymatique de l'intestin grêle et arrive intact dans le côlon, lieu où il est totalement hydrolysé par la dextranase puis fermenté en acides organiques à chaînes courtes par le microbiote colique.

Le dextran est donc totalement biodégradable, biorésorbable et par conséquent bioéliminable, cette dernière qualité étant indispensable pour une application *in vivo*. De plus, ses produits de dégradation sont des éléments constitutifs du système vivant et ne sont donc pas toxiques pour l'organisme (Wu, 2007). Le dextran est également hémocompatible et possède des effets antithrombotiques et activateurs du flux sanguin (réduction de l'agrégation des plaquettes, diminution de la viscosité du sang). Cela a conduit à son utilisation comme substitut du plasma sanguin (Mehvar, 2000; de Belder, 2003). En fait, en France ces substituts sont commercialisés sous les noms de Rhéomacrodex[®] et Macrodex[®] et sont respectivement à base de dextran T₄₀ et T₇₀.

8.4. Application dans le domaine biomédical

Outre son application comme substitut du plasma sanguin, les applications du dextran sont nombreuses. Ainsi, il peut être couplé à un principe actif grâce aux nombreux groupements hydroxyles présents le long de sa chaîne. Dans ce cas, le dextran constitue un prodrogue pour le principe actif et prolonge le temps de circulation du principe actif dans le sang, limite sa diffusion en dehors des vaisseaux sanguins, et le protège contre la dégradation chimique ou biologique. Sous cette forme, il peut également protéger un principe actif dans la première partie du tube digestif et ensuite assurer une libération spécifique dans le côlon. La libération du principe actif est obtenue après hydrolyse de la liaison dextran-principe actif par la dextranase. Un des premiers principes actifs qui ont été liés au dextran est l'insuline (Mehvar, 2000; Soppimath et al., 2001). D'autres prodrogues ont été synthétisées à base de

dextran avec différents agents thérapeutiques tels que des antibiotiques, des peptides, des enzymes ou des vitamines.

Le dextran est également préconisé pour la préparation d'hydrogels destinés à l'encapsulation et la libération ciblée de certains principes actifs (Hovgaard and Brøndsted, 1995). Le plus souvent, ces hydrogels sont obtenus par polymérisation radicalaire de groupements méthacrylate greffés sur le dextran. Le contrôle du taux de réticulation de ces réseaux permet de moduler leurs vitesses de dégradation et par conséquent la libération du principe actif (Franssen et al., 1999; Kim and Oh, 2005; Casadei et al., 2006; Paolicelli et al., 2008).

Les hydrogels à base de dextran trouvent également des applications dans le domaine analytique. Citons par exemple leur utilisation comme gels d'exclusion stérique comme le Sephadex[®] à base de dextran plus ou moins réticulé, selon le domaine de fractionnement souhaité (Monsan et al., 2001).

9. Méthodes de délivrance spécifique des médicaments au niveau du côlon

La littérature scientifique mentionne trois principales approches mise en œuvre dans le but d'administrer une forme pharmaceutique au niveau du côlon. La première approche est basée sur l'utilisation de formes rectales, la deuxième sur la modification chimique de principes actifs (ou prodrogues) et la dernière sur la modification galénique d'une forme pharmaceutique. Cette dernière comprend de nombreuses stratégies qui exploitent les diverses conditions physiologiques du tube digestif comme le pH, le temps de transit gastro-intestinal, le microbiote intestinal ou la pression intraluminaire. En conséquence, ces stratégies peuvent conduire à l'utilisation de polymères sensibles aux variations de pH, de formes galéniques à libération dépendante du temps de transit gastro-intestinal, ou de polymères dégradables spécifiquement par le microbiote situé dans le gros intestin (Chourasia and Jain, 2003; Van den Mooter, 2006; Singh, 2007).

Au cours des dernières décennies, plusieurs formes pharmaceutiques destinées à la délivrance spécifique colique ont été développées. Leurs avantages et inconvénients respectifs sont repris ci-dessous (McConnell *et al.*, 2009a).

9.1. Formes rectales

L'administration par voie rectale a été la première méthode utilisée pour délivrer directement les médicaments dans le côlon via l'utilisation de plusieurs formulations pharmaceutiques telles que les suppositoires, les mousses et les lavements (Ibekwe *et al.*,

2004; Van den Mooter, 2006; Batchelor and Conway, 2007). La forme rectale semble être un moyen très utile pour les administrations locale et systémique de médicaments lorsque le patient ne peut pas prendre des médicaments par voie orale (Shargel and Yu, 2007). En particulier, l'administration du médicament par voie rectale pourrait être indiquée dans le traitement de la colite ulcéreuse, lorsque les parties distales du côlon sont principalement concernées. A l'opposé, dans la maladie de Crohn, cette forme pourrait se révéler inefficace en raison d'une affection fréquente du tissu iléal (Meissner and Lamprecht, 2008). De plus, cette voie d'administration n'atteint généralement que le rectum et la partie inférieure du côlon distal et ne permet pas d'atteindre entièrement le côlon descendant. De plus, cette voie d'administration est inconfortable chez la plupart des patients (Ibekwe et al., 2004).

9.2. La formation de liaisons covalentes entre principe actif et transporteur : formulation d'une prodrogue

De manière générale une prodrogue peut être définie comme un dérivé pharmacologiquement inactif d'une substance active, permettant d'améliorer son administration. La substance active est libérée sous l'effet d'une transformation soit spontanée (chimique), soit enzymatique. La conception d'une prodrogue aide à surmonter les problèmes pharmaceutiques et pharmacocinétiques liés à la molécule elle-même (molécule parente). Cette démarche implique la formation d'une liaison covalente entre le principe actif et le transporteur (Figure 15).

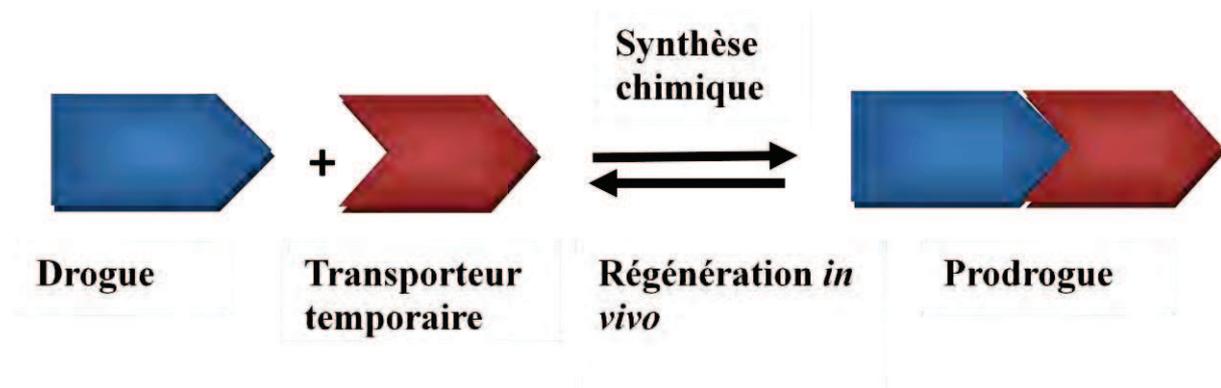


Figure 15: Conception générale de la synthèse de prodrogues.

En ce qui concerne le système de délivrance de médicaments dans le côlon, cette prodrogue doit n'être ni hydrolysée, ni absorbée dans la partie supérieure du tractus gastro-intestinal, mais subir une biotransformation dans le côlon de sorte à libérer *in situ* le principe actif. Cette biotransformation est réalisée principalement par une variété d'enzymes d'origine bactérienne présentes dans le côlon (Ex. azoréductase, nitroréductase, glucuronidase,

glycosidase, dextranase, estérases, cyclodextranase, etc.) (Chourasia and Jain, 2003; Kumar and Mishra, 2008). La première prodrogue développée fut la sulfasalazine prodrogue (Figure 16) au cours l'année 1942 pour le traitement des arthrites rhumatoïdes. Ce composé s'est rapidement révélé très efficace dans le traitement des maladies inflammatoires du côlon (Patel et al., 2007). Cependant, après une administration orale, la majeure partie de la sulfasalazine échappe à l'absorption intestinale et se retrouve intacte dans le côlon, où elle est réduite par le microbiote anaérobie en ses deux constituants : la sulfapyridine et l'acide 5-aminosalicylique (5-ASA). Malheureusement, la sulfapyridine est résorbée par la muqueuse colique et est responsable des nombreux effets secondaires systémiques liés à la sulfasalazine. Dès lors, de nouvelles générations de prodrogues ont été développées afin de délivrer le principe actif « mère » au niveau du côlon, en utilisant différents types des transporteurs (Tableau 13), en vue de minimiser les effets secondaires indésirables.

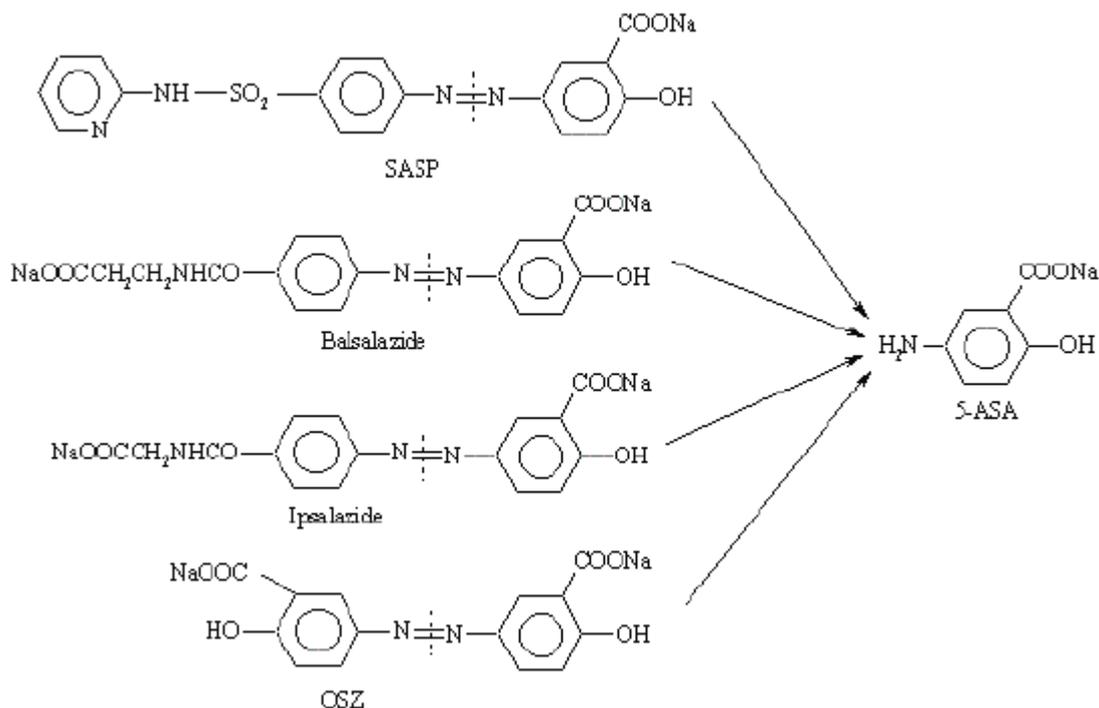


Figure 16: La structure chimique de la salazopyrine (SASP), de la balsalazide, de l'ipsalazide et de l'olsalazide (OSZ). La réduction de ces prodrogues azoïques par les bactéries du côlon conduit à la libération du 5-ASA (Chourasia and Jain, 2003).

D'après les études de (Sinha and Kumria, 2001a), il ressort que l'utilisation de vecteurs d'origine naturelle comme les dextrans et les cyclodextrines soit plus recommandée que les polymères synthétiques et ce en raison de la nature des produits de biodégradation *in vivo*, à savoir de simples saccharides qui n'ont pas d'effets nocifs pour la santé.

Bien que l'utilisation d'une prodrogue puisse augmenter la sélectivité du principe actif pour la cible visée, il faut cependant reconnaître que, comparées aux formes matricielles ou enrobées qui ont la faculté de véhiculer tous les principes actifs vers le côlon, les prodrogues présentent quelques inconvénients majeurs. Ces inconvénients se résument à des difficultés liées à la présentation de la prodrogue comme une nouvelle entité chimique. En effet, pour chaque principe actif, il est impératif de mettre au point un nouveau procédé de synthèse, nécessitant une nouvelle demande d'autorisation de mise sur le marché. De plus ces prodrogues ne peuvent être réalisées que si le principe actif initial renferme une fonction thiol ou amine.

Tableau 13: Différentes prodrogues développées pour la délivrance spécifique de principe actif au niveau du côlon(Sinha and Kumria, 2003b).

Vecteur	Principe actif	Groupe de liaison
Azoïque		
Sulfapyridine, P-Aminohippurate 5-ASA 4-Aminobenzyl- β -alanine	5-ASA	Azoïque
Acide aminé		
Glycine Tyrosine/méthionine Acide glutamique	Acide salicylique	Amide
Saccharide		
Glucose	Dexaméthasone/ Prednisolone	Glycosidique
Glucuronconjugué		
Acide glucuronique	Naloxone /Nalméfène Budésonide Dexaméthasone Menthol	Glucuronconjugué
Polymère		
Acide poly-L-aspartique Sulfanilamide éthylène polymère	Dexaméthasone 5-ASA	Amide Azoïque
Dextran		
	Naproxène 5-ASA 5-ASA Acide nalidixique	Ester Ester Azoïque Ester
Cyclodextrine	Biphényle d'acide acétique	Ester/ amide

9.3. Les systèmes basés sur les variations de pH

L'utilisation de polymères dont la solubilité est pH dépendante est basée sur les différences de pH qui existent le long du tractus gastro-intestinal. Le pH augmente progressivement de la sortie de l'estomac vers le tube digestif supérieur. Ces polymères entériques sont insolubles et imperméables au milieu acide rencontré dans l'estomac. Par contre, au fur et à mesure qu'ils progressent, ils deviennent de plus en plus solubles suite à l'augmentation du pH (Leopold, 1999; Siepmann et al., 2008). Ces polymères sont principalement employés pour assurer la libération spécifique de principes actifs au niveau de l'intestin grêle. La différence du pH a également été utilisée pour administrer des médicaments au niveau du côlon (Watts and Illum, 1997; Basit and Bloor, 2003).

Dans ce domaine, de nombreuses formes sont actuellement à l'étude. A titre d'exemple, on peut citer des systèmes enrobés ou des systèmes matriciels à base de polymères sensibles au pH.

L'enrobage représente l'approche technique la plus simple pour concevoir une formulation pharmaceutique à délivrance spécifique au niveau du côlon. Il offre également un avantage significatif en termes de coût et de facilité de fabrication. De ce point de vue, plusieurs formulations pharmaceutiques (comprimés, gélules, granules et minigranules) peuvent être pelliculées avec une ou plusieurs couches, en utilisant soit un soit plusieurs polymères entériques (Khan et al., 1999; Akhgari et al., 2005; Mastiholimath et al., 2007; Aimone et al., 2009), soit un polymère entérique et un autre polymère pH-indépendant (Gupta *et al.*, 2001; Rudolph *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2003; Singh, 2007).

Il existe sur le marché plusieurs types de polymères entériques commercialisés tels que les dérivés acryliques ou cellulosiques ainsi que la gomme-laque (Fukui *et al.*, 2001; Chourasia and Jain, 2003; Sinha and Kumria, 2003a; Singh, 2007).

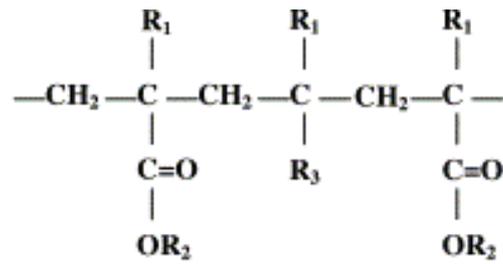
Les plus couramment étudiés pour la délivrance ciblée au niveau du côlon sont les dérivés acryliques, Eudragit[®], (Röhm GmbH, pharma polymères, Darmstadt, Allemagne) qui sont cités dans le Tableau 14 et dont la structure est donnée à la Figure 17. Ces polymères acryliques contiennent soit des groupements carboxyliques soit des groupements aminés. Néanmoins, à un pH donné (déterminé pour chacun), les groupements de ces polymères peuvent s'ioniser et ainsi permettre une expansion des chaînes polymères accompagnée par une forte augmentation de la viscosité et de l'élasticité, modifiant de la sorte la solubilité des ces polymères (Kim, 2004; Skalsky and Petereit, 2008).

L'Eudragit[®] S est reconnu pour son effet bénéfique dans le pelliculage de formes galéniques destinées à une délivrance spécifique au niveau du côlon. L'utilisation de ce polymère a permis de concevoir des gélules et des comprimés (Dew et al., 1982; Dew et al., 1983). A titre d'exemple, des comprimés ont été développés et commercialisés (Asacol[®], d'Ipocol[®], et de Mesren[®] MR) en utilisant ce principe (Fadda and Basit, 2005; Fadda *et al.*, 2008; Fadda *et al.*, 2009b). Ces comprimés contenant de la mesalazine sont indiqués dans le traitement de l'inflammation intestinale. Des études *in vivo* ont été réalisées sur des volontaires sains (Ibekwe *et al.*, 2006; Ibekwe *et al.*, 2008; McConnell *et al.*, 2008b) et d'autres souffrants de colite ulcéreuse (Schroeder et al., 1987; Sinha et al., 2003). Ces études ont démontré que, bien que le côlon ait été le site de désagrégation des formes pharmaceutiques administrées, le temps et le lieu du délitement sont extrêmement variables allant de la jonction iléo-caecale jusqu'à l'anse splénique. Néanmoins certaines formes sont expulsés intactes du tractus gastro-intestinal.

Ces problèmes ont été attribués soit à la basse de la valeur de pH dans le côlon souffrant d'inflammation, soit parce que les formes administrées sont influencées par d'autres facteurs physiologiques tels que le temps de latence à la jonction iléo-caecale, ou encore de la composition du fluide gastro-intestinal chez des volontaires sains.

Ces défauts de libérations rencontrés avec des polymères tels que l'Eudragit[®] S peuvent être également observés en utilisant des comprimés ou des granules. Ceci montre que l'utilisation de formes multiparticulaires comme les granules ne peuvent pas nécessairement éviter ces problèmes (McConnell *et al.*, 2008b).

Eudragit[®] FS a été développé pour surmonter des problèmes inhérents rencontrés avec d'autres polymères entériques. Bien que, ce polymère se dissout à un pH similaire de celui de l'Eudragit[®] S, il le fait avec à un rythme plus lent (Gao et al., 2006). Une étude *in vivo* chez l'homme a montré que l'Eudragit[®] FS se dissout plus lentement que l'Eudragit[®] S dans la partie inférieure du tractus gastro-intestinal, ce qui a pour conséquence de retarder davantage la libération du principe actif, bien qu'il y ait quelques variabilités inter- et intra- individuelles au niveau du site de la libération de la substance active dans l'intestin grêle distal et dans le côlon proximal. Il semblerait que l'Eudragit[®] FS soit plus approprié que d'autres polymères entériques pour l'administration de substances actives dans le côlon (Ibekwe et al., 2003).



R₁ = -CH₃, R₂ = -CH₃ and R₃ = -COOH (Eudragit[®] L and S)

R₁ = -CH₃, R₂ = -CH₂-CH₃ and R₃ = -COOH (Eudragit[®] L100-55 and L30D-55)

R₁ = -CH₃, R₂ = -CH₃ and R₃ = -COOCH₃ (Eudragit[®] NE30D)

R₁ = -CH₃, R₂ = -CH₃ and R₃ = -COOCH₂CH₂N⁺(CH₃)₃Cl (Eudragit[®] RL and RS)

Figure 17: Structure chimique de l'Eudragit[®] (Vandamme *et al.*, 2002).

Tableau 14: Structure chimique et caractéristiques de copolymères de méthacrylates solubles et insolubles (Kim, 2004; Skalsky and Petereit, 2008).

Copolymères solubles à base de méthacrylates				
Nom scientifique	Structure	Solubilité	Eudragit®	Forme commerciale
Poly (méthacrylate de butyle-co-méthacrylate de diméthylaminoéthyle- co- méthacrylate de méthyle)	BMA-DMAEMA-MMA = 25 :50 :25	< pH 5,0	E 100	Granules
			E PO	Poudre
			E 12,5	Solution organique
Poly (acide méthacrylique-co-acrylate d'éthyle)	MAA-EA = 50 :50	< pH 5,5	L 30 D-55	Dispersion aqueuse
Poly (acide méthacrylique-co-méthacrylate de méthyle)	MAA-MMA = 50 :50	< pH 6,0	L 100-55	Poudre
			L 100	Poudre
Poly (acide méthacrylique-co-méthacrylate de méthyle)	MAA-MMA = 30 :70	< pH 7,0	L 12,5	Solution organique
			S 100	Poudre
Poly (acrylate de méthyle-co- méthacrylate de méthyle-co- acide méthacrylique)	MA-MMA-MAA = 65 :25 :10	< pH 7,0	S 12,5	Solution organique
			FS 30 D	Dispersion aqueuse
Copolymères insolubles à base de méthacrylates				
Nom scientifique	Structure	Perméabilité	Eudragit®	Forme commerciale
Poly (acrylate d'éthyle-co-méthacrylate de méthyle)	EA-MMA = 30 :70	Moyenne	NE 30 D	Dispersion aqueuse
			NE 40 D	Dispersion aqueuse
Poly (acrylate d'éthyle-co-méthacrylate de méthyle)	EA-MMA = 70 :30	Moyenne	NM 30 D	Dispersion aqueuse
Poly (acrylate d'éthyle-co- méthacrylate de méthyle-co- méthacrylate de triméthylammonium-2 éthyle chlorure)	EA-MMA-TMAEMA = 30 :60 :10	Elevée	RL 100	Granule
			RL PO	Poudre
			RL 30 D	Dispersion aqueuse
			RL 12,5	Solution organique
Poly (acrylate d'éthyle-co- méthacrylate de méthyle-co- méthacrylate de triméthylammonium éthyle chlorure)	EA-MMA-TMAEMA = 30 :65 :5	Basse	RS 100	Granule
			RS PO	Poudre
			RS 30 D	Dispersion aqueuse
			RS 12,5	Solution organique

Le CODESTM (Figure 18) est un nouveau système développé pour répondre aux limitations liées aux approches dépendantes du pH et du temps de délitement, et d'assurer une délivrance ciblée dans le côlon (Watanabe et al., 1998; Katsuma et al., 2002). Ces sont en fait des comprimés contenant un principe actif et du lactulose (un disaccharide qui est métabolisé dans le côlon par le microbiote colique en acides gras à chaînes courtes). Ces comprimés sont enrobés successivement avec une couche d'Eudragit[®] E (soluble à pH inférieur à 5), puis par une deuxième couche entérique d'Eudragit[®] L. Après administration par voie orale, la couche entérique qui protège le comprimé contre les conditions acides de l'estomac, se dissout dans l'extrémité distale de l'intestin grêle. L'Eudragit[®] E empêche la libération du principe actif dans le milieu plus alcalin de l'intestin grêle. Dès l'entrée dans le côlon, le disaccharide, à l'intérieur du noyau du comprimé, se dissout et diffuse à travers la couche d'Eudragit[®] E. Ensuite, il sera dégradé par les enzymes bactériennes en acides organiques. Ces derniers vont baisser le pH entourant le comprimé en favorisant la solubilité de l'Eudragit[®] E, entraînant par conséquent la libération du principe actif à partir du noyau du comprimé (Li et al., 2002; Yang et al., 2003).

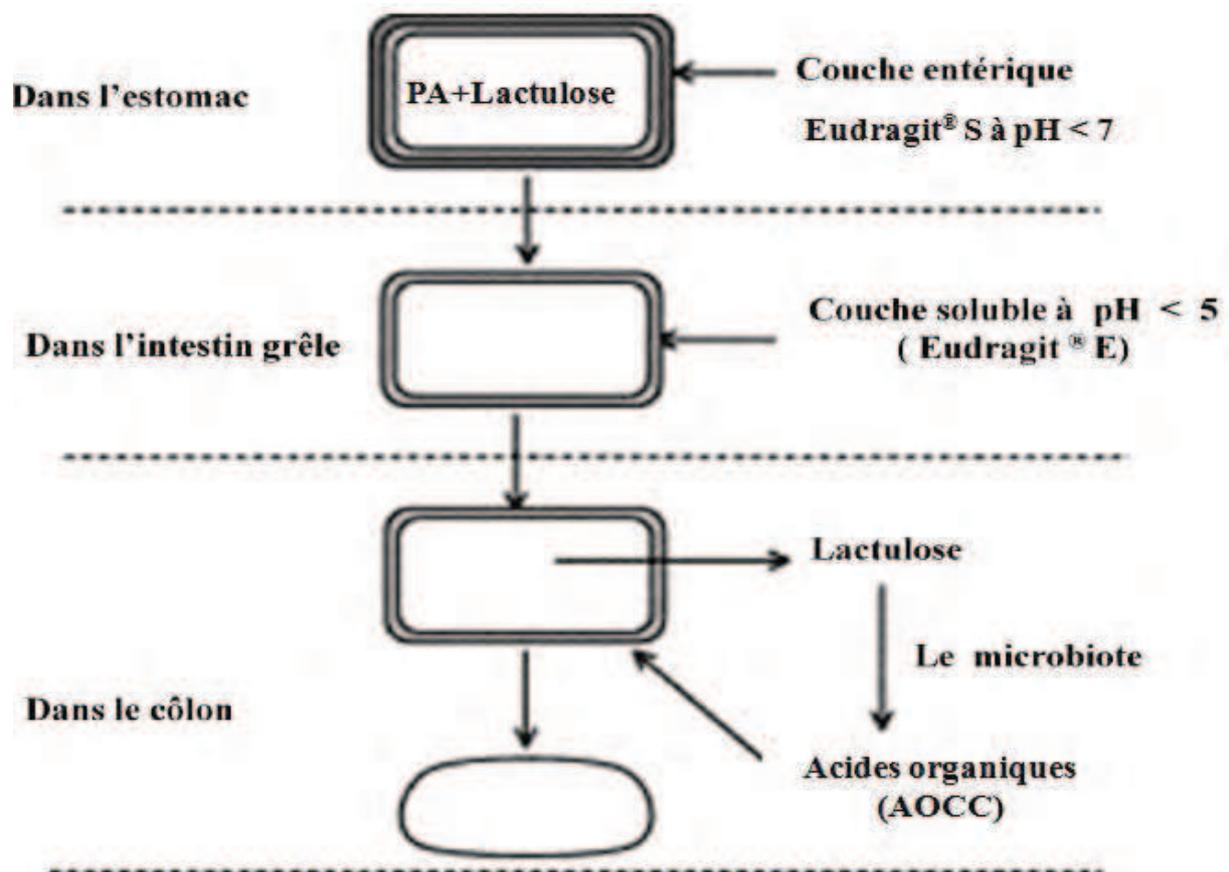


Figure 18: Schéma représentatif du trajet du CODESTM dans le tractus gastro-intestinal (Yang et al., 2002).

Plusieurs problèmes ont été rencontrés en utilisant des polymères à libération pH-dépendante. Parmi ceux-ci, on peut mentionner l'importante variabilité inter- et intra-individuelle des valeurs de pH existant au niveau du tractus gastro-intestinal, qui est largement influencé soit par le régime alimentaire soit par certaines pathologies (Rubinstein, 1995; Kinget et al., 1998). De plus, la valeur du pH au niveau de l'iléon terminal est souvent plus élevée que celle rencontrée au niveau du côlon.

Les polymères pH dépendant ne représentent pas le meilleur moyen pour obtenir une libération spécifique au niveau du côlon (Ashford *et al.*, 1993; Ibekwe *et al.*, 2004). Le temps de latence important à la jonction iléo-caecale ou de transit rapide à travers le côlon ascendant peut également se traduire par une absence de spécificité de libération pour certaines formulations (Ashford *et al.*, 1993; McConnell *et al.*, 2009a).

9.4. Les systèmes basés sur les durées du transit

Le temps de transit des formes pharmaceutiques administrées par voie orale, à travers l'estomac et le côlon est très variable et fortement influencé par de nombreux facteurs exogènes et/ou endogènes. Par contre, le temps de transit dans l'intestin grêle est assez constant : il est généralement de trois à quatre h en moyenne (Devereux et al., 1990; Podczeck et al., 2007a; Podczeck et al., 2007b). Cette approche est généralement basée sur l'idée qu'une forme pharmaceutique administrée par voie orale a besoin d'environ six h pour traverser la partie supérieure du tube digestif chez un sujet à jeun.

L'utilisation de polymères qui se dégradent après un intervalle de temps déterminé permettra de réaliser une libération spécifique dans le côlon. Toutefois cette libération peut être perturbée par certains facteurs physiologiques comme la durée de vidange gastrique (très variable et influençable par la taille et la densité de la forme pharmaceutique administrée), ou l'ingestion de repas (McConnell *et al.*, 2009a). Toutefois, les effets de la variation de la durée de vidange gastrique peuvent être minimisés en protégeant efficacement les formes galéniques par un enrobage entérique adéquat (Cheng et al., 2004; Mastiholimath et al., 2007).

(Ciftci and Groves, 1996) ont réalisé des études dans lesquelles des granules étaient préparées à partir de 5-fluorouracile et d'hydroxypropylméthylcellulose et enrobées avec de l'Eudragit®S.

Une étude pharmacocinétique *in vivo* chez des rates a montré que l'apparition du principe actif dans les tissus correspondait à l'arrivée des granules dans le caecum, c'est-à-dire 6 à 8 h après l'administration. Un autre système d'enrobage particulier a également été envisagé : il s'agit de comprimés à base de kétoprofène enrobés avec trois couches. Une

première couche extérieure entérique d'Eudragit[®] L assure la protection des comprimés dans l'estomac. Une couche intermédiaire est constituée d'hydroxypropylméthylcellulose qui gonfle et qui se dégrade lentement pour fournir un temps de latence de trois à quatre h. Enfin, une couche intérieure entérique constituée d'Eudragit[®] S fournit une garantie supplémentaire au cas où, par accident, les deux couches extérieures se désagrègeraient prématurément dans l'estomac (Gazzaniga et al., 1994).

L'évaluation *in vitro* et *in vivo* des ces formulations, appelées système Chronotropic[®], a montré que la libération du traceur a lieu après un temps de latence fortement dépendant de l'épaisseur de la couche d'hydroxypropylméthylcellulose (Sangalli et al., 1999; Sangalli et al., 2004).

Le système Time Clock[®], renfermant de l'acide 5-amino-salicylique (5-ASA), a été aussi développé et étudié par scintigraphie gamma chez des hommes sains. Il s'agit de comprimés enrobés avec une couche intérieure constituée d'un mélange de matériaux hydrophobes, de surfactant et d'hydroxypropylméthylcellulose comme polymère hydrosoluble, et d'une autre couche d'un polymère entérique d'Eudragit[®] L. Ces études ont montré que le site principal de libération est le côlon (Wilding et al., 1994; Steed et al., 1997).

Un système Pulsincap[®] (Watts and Illum, 1997; Wilding et al., 2001; Vandamme et al., 2002) a été développé pour la délivrance ciblée de médicaments dans le côlon. Il est constitué d'une gélule dont le corps est imperméable à l'eau. Après remplissage, la gélule est scellée à l'aide d'un polymère hydrophile présentant un certain pouvoir gélifiant et formé d'un hydrogel. La gélule est ensuite enrobée entièrement avec un polymère entérique. Les études *in vitro* et *in vivo* ont montré l'efficacité bénéfique de ce système. Lorsque le transit gastro-intestinal des formulations est suivi par scintigraphie gamma, il est constaté que chez six des huit sujets, la gélule a atteint le côlon avant de se désintégrer (Wilding et al., 1992). Ces études ont réalisées chez des sujets à jeun sans tenir compte des effets de la nourriture et de la durée de la vidange gastrique.

Une autre étude (Stevens et al., 2002) a montré que le site de libération des médicaments dans le tractus gastro-intestinal peut varier selon la nature de la nourriture.

Une autre forme pharmaceutique à délivrance colique (Clipper[®]) préparée à base d'un noyau contenant de l'acide 5-aminosalicylique et de l'hydroxypropylméthylcellulose a été enrobée avec de l'Eudragit[®] L100/55 (Rizzello et al., 2002).

Récemment, une nouvelle technologie permettant la délivrance ciblée du côlon a été envisagée en utilisant un comprimé matriciel (MMX[®] - tablet) constituée d'excipients

lipophiles et hydrophiles (carmellose Sodique, Carboxyméthylamidon sodique, talc, acide stéarique et cire de carnauba), associée à de l'acide 5-aminosalicylique (5-ASA).

Ces comprimés matriciels ont été enrobés avec un mélange d'Eudragit® L et S (Kamm et al., 2007; Lichtenstein and Kamm, 2008). Après l'administration par voie orale, et dès que le pH est supérieur à 7, la couche d'enrobage entérique se dégrade, le comprimé gonfle, et s'agissant d'une matrice hydrophile, une masse se forme et est constituée d'un gel visqueux. Ce dernière va se détériorer dans le côlon et libérer l'acide 5-aminosalicylique à proximité de la muqueuse colique à laquelle la matrice hydrophile adhérera par la suite (Sandborn et al., 2007).

Le temps de transit dans la partie supérieure du tube digestif peut être très variable : elle peut varier entre 30 min et neuf h (Davis et al., 1986). Ce temps est modifié au cours de certaines pathologies, en présence de certains médicaments ou de certains excipients comme le polyéthylène glycol, le mannitol ou encore le pyrophosphate acide de sodium (Adkin et al., 1995b; Adkin et al., 1995a; Basit et al., 2001; Basit et al., 2002).

9.5. Les systèmes basés sur l'utilisation des polysaccharides

La délivrance ciblée de médicaments au niveau du côlon reste à la fois un défi et une problématique de recherche. La spécificité exacte du site de libération est difficile, voire impossible à réaliser avec les méthodes traditionnelles actuelles (ex. polymères sensibles au pH). De plus, les systèmes actuels sont incapables de libérer le principe actif de manière spécifique et reproductible dans le côlon.

Inversement, les technologies basées sur la dégradation par bactéries dans la partie distal de l'intestin ont permis d'obtenir des résultats positifs en termes de spécificité et de reproductibilité (Basit et al., 2009).

(McConnell *et al.*, 2008b) ont réalisé une étude comparative *in vivo* de ces deux technologies (système de délivrance basés d'une part sur la dégradation bactérienne et d'autre part sur la sensibilité au pH de polymères) et ont conclu à une préférence basée sur l'activité microbienne.

Plusieurs polysaccharides (Tableau 12), dégradés par le microbiote colique ont été évalués quant à leur aptitude à délivrer spécifiquement des substances actives dans le côlon. L'avantage majeur de ces matériaux réside dans le fait qu'ils sont déjà utilisés comme excipients dans les domaines pharmaceutique ou alimentaire.

Par exemple, l'amylose, a été utilisée pour enrober des formulations galéniques destinées à une libération spécifique au niveau du côlon (Milojevic et al., 1995; Milojevic et al., 1996).

Malheureusement, de par leurs propriétés physicochimiques, les polysaccharides ne sont pas capables de protéger ces formulations dans la partie supérieure du tractus gastro-intestinal et ce à cause de leur hydrosolubilité et de leurs perméabilités. Pour surmonter ces difficultés et assurer une libération spécifique d'une substance active dans le tractus gastro-intestinal inférieur, l'amylose a été mélangée avec de l'éthylcellulose, polymère insoluble dans l'eau, avant d'être utilisée pour enrober des minigranules renfermant du 5-ASA.

Cet enrobage était constituée d'un mélange amylose/éthylcellulose dans un rapport (1 :4) (m/m) permettait de se dégrader dans les milieux gastrique et intestinale et d'assurer une libération constante de la substance active dès son arrivée dans le côlon et ce grâce à sa dégradation enzymatique (Cummings et al., 1996).

Des comprimés de mésalazine ont été préparés et enrobés avec ce mélange (amylose : éthylcellulose). Les études *in vitro* ont démontré l'influence du rapport des polymères et de l'épaisseur de l'enrobage sur la libération spécifique de la substance active de cette formulation au niveau de côlon (Basit et al., 2004; Wilson and Basit, 2005).

Récemment, (Basit et al., 2009) ont réalisé une étude *in vivo* menée chez des hommes sains alimentés et à jeun qui ont reçu par voie orale des granules de théophylline enrobés avec 20% d'un mélange amylose : éthylcellulose dans un rapport (1 :3). Cette étude a montré que chez les hommes alimentés, malgré le retard de vidange gastrique et la longue exposition à l'amylase pancréatique, une biodisponibilité intéressante a peu être observée, confirmant de la sorte la fiabilité et l'efficacité de cette technologie pour l'administration de substances actives au niveau du gros intestin.

Actuellement ce système de délivrance à base d'amylose et d'éthylcellulose est le seul qui ait été testé dans cadre de phases I et II et qui ait montré des résultats intéressants (McConnell *et al.*, 2009a).

Plusieurs autres méthodes ont été envisagées pour rendre l'amylose plus hydrophobe. Parmi celles-ci, on peut citer l'incorporation d'amylose à de l'Eudragit[®]. Ce dernier excipient a été ajouté pour éviter la solubilité de l'amylose dans la première partie du tractus gastro-intestinal et pour assurer une délivrance spécifique des substances actives dans le côlon (Basit and Ibekwe, 2007).

Dans un but identique, (Alias et al., 2007) ont préparé un copolymère à la base d'amylose sur lequel a été greffé du méthacrylate d'éthyle par polymérisation radicalaire.

Les chitosans constituent un autre groupe de polysaccharides naturels très intéressants pour l'administration colique de substances actives car, en plus de leur dégradation par le microbiote colique, ils possèdent des propriétés bioadhésives (Tozaki et al., 1996; Illum,

1998; Hejazi and Amiji, 2003). Des gélules à base de chitosan ont été préparées et ensuite enrobées avec du phtalate d'hydroxypropylméthylcellulose utilisé comme agent filmogène gastrorésistant.

Plusieurs études réalisées *in vitro* et *in vivo* chez des rats ont permis de mettre en évidence, après une administration par voie orale de ces systèmes de délivrance contenant de l'insuline et du 5-ASA, une libération spécifique de ces principes actifs dans le côlon (Yamamoto et al., 2000; Tozaki et al., 2002). D'autres auteurs (Lorenzo-Lamosa et al., 1998; Dubey et al., 2010) ont étudié de libération colique du diclofénac du 5-ASA et du chlorhydrate de camylofine à partir de microsphères de chitosans enrobées à l'aide d'Eudragit[®] L et S pour traiter des maladies inflammatoires de l'intestin. Dans un but similaire, (Wei et al., 2010) ont étudié la libération *in vitro* et *in vivo* chez des rats de 5-ASA contenu dans des granules enrobés avec un mélange de chitosan /Kollicoat[®] SR 30D. Ces formulations ont montré une libération spécifique de 5-ASA dans le côlon.

9.6. Autres systèmes

Les hydrogels sont des copolymères réticulés qui gonflent tout au long du tractus gastro-intestinal : ils peuvent être utilisés comme excipients matriciels ou comme excipients d'enrobage, pour assurer une délivrance ciblée d'un principe actif au niveau du côlon. Plusieurs copolymères synthétiques à base d'acide acrylique, de N,N-diméthylacrylamide et de N-terbutyl-acrylamide, peuvent être formés hydrogels après réticulation en utilisant des composés aromatiques azotés (Van Den Mooter *et al.*, 1992; Van Den Mooter *et al.*, 1993; Mahkam *et al.*, 2006). Le gonflement d'un hydrogel est conditionné par l'augmentation de l'ionisation et de la répulsion des charges de ses constituants. En atteignant le côlon, l'hydrogel a suffisamment gonflé pour permettre l'accès des enzymes bactériennes (Ex. azo-réductases). La coupure des ponts des liaisons -N=N- permet la libération du principe actif inclus dans la matrice constituée d'un hydrogel. La dégradation enzymatique des liaisons dans les hydrogels dépend largement du taux de gonflement (Brondsted and Kopecek, 1992).

Les études menées ces dernières années sur des systèmes basés sur la réduction d'azopolymères n'est pas encore permis d'obtenir des systèmes capables de libérer de manière complète et reproductible son contenu en principe actif dans le côlon ascendant. Par ailleurs, en plus de la lenteur de la dégradation bactérienne des hydrogels, la dégradation enzymatique des azo-polymères par le microbiote colique peut libérer des amines primaires aromatiques qui sont reconnues pour leur mutagénicité et leurs propriétés carcinogènes.

Lors de la conception de nouveaux excipients destinés à des formes galéniques destinées à libérer une substance active dans le côlon, les polymères naturels et leurs produits de dégradation normalement non résorbés par les muqueuses présentent moins de risques de toxicité que les composés azoïques de faible poids moléculaire (Van Den Mooter et al., 1997). D'autres polymères naturels tels que les polysaccharides, sont utilisés pour former d'hydrogels c'est le cas des pectines, des alginates, du chitosan, des dextrans, de la gomme guar et de l'amylose (Vandamme et al., 2002; Casadei et al., 2008; Colinet et al., 2009).

De manière séminaire de nombreux hydrogels biodégradables obtenus par réticulation chimique des dextrans à l'aide des diisocyanates (Hovgaard and Brøndsted, 1995; Simonsen et al., 1995), de la glutaraldéhyde (Brøndsted et al., 1998), du glycidyl méthacrylate (Hennink *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2007), et d'acrylate de méthyle (Franssen et al., 1999; Casadei et al., 2006) ont également été préparés. Leurs propriétés physiques telles que gonflement dans l'eau ainsi que la résistance mécanique, de même que leur dégradation enzymatique par le dextranase et par le microbiote intestinal, peuvent être contrôlées non seulement par le choix de l'agent réticulant et par le poids moléculaire du dextran mais aussi, par le degré de réticulation. Il a également été démontré que les libérations de différents principes actifs incorporés dans ces hydrogels sont plus rapides en présence de dextranases. De plus, des gélules ont été préparées avec des dextrans réticulés avec la glutaraldéhyde (Brøndsted et al., 1998). La libération *in vitro* de l'hydrocortisone à partir de ces gélules a été étudiée. Cette étude a mis en évidence que la libération de l'hydrocortisone à partir de ces gélules, est augmentée en présence de dextranase (Brøndsted et al., 1998).

La pression présente dans le tractus gastro-intestinal a également été utilisée pour assurer une libération ciblée d'une substance active au niveau du côlon (Singh, 2007; Kumar and Mishra, 2008). Cette pression est générée par des contractions musculaires de la paroi intestinale sur le bol alimentaire et une l'influence sur l'absorption et la propulsion du contenu intestinal. Cette pression est plus élevée dans le côlon que dans l'intestin grêle, en raison d'une augmentation de la viscosité du contenu intestinal résultant d'une absorption progressive d'eau le long du tractus gastro-intestinal.

Ainsi, des gélules à base de polymères insolubles tel que l'éthyle cellulose ont été développées pour résister aux pressions du tractus gastro-intestinal supérieur, et se désagréger sous la pression du côlon. Des études *in vivo* chez des chiens et chez l'homme ont montré que la taille et l'épaisseur des gélules ont un effet majeur sur la désagrégation des gélules dans le côlon (Takaya et al., 1995; Takaya et al., 1998; Jeong et al., 2001).

Dans ces études, le lieu précis de la désagrégation de la gélule n'est pas précisé car il y a un manque d'information quant à la pression dans chaque partie du tractus gastro-intestinal, et aussi sur sa variabilité inter- et intra- individuelle.

Un système osmotique (OROS-CT) (Figure 19) a été développé pour délivrer une substance active localement au niveau du côlon pour le traitement de maladies locales ou pour assurer une libération systémique (Theeuwes *et al.*, 1990). Ce système est constitué d'une ou plusieurs unités osmotiques encapsulées dans une gélule. Chaque unité comprend deux couches, une pour le principe actif et l'autre pour le gel osmotique. Une membrane polymère semi-perméable entoure cette unité. L'ensemble est enrobé par un polymère gastro-résistant entérosoluble.

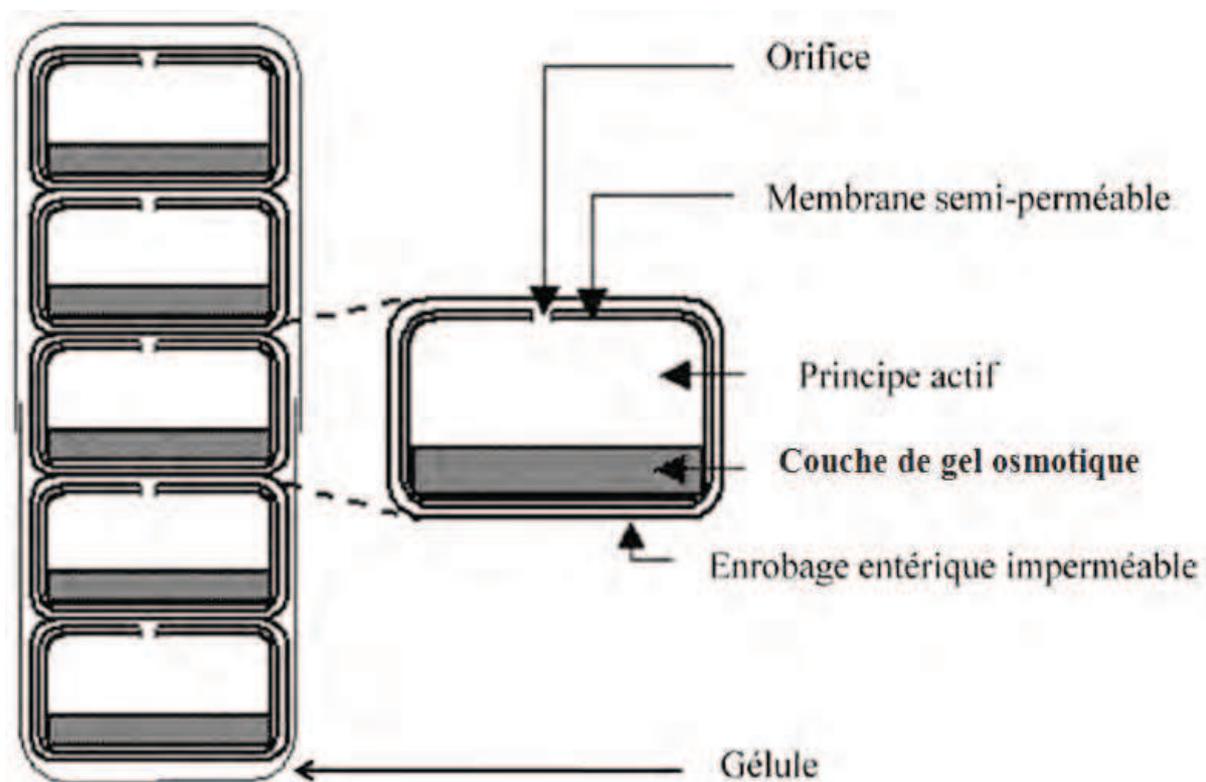


Figure 19: Coupe transversale du système osmotique OROS-CT (Chourasia and Jain, 2003).

Après une administration par voie orale, la gélule va se solubiliser dans l'estomac en libérant les unités osmotiques qu'elle contient. La couche d'enrobage entérique protégera cette unité dans l'estomac ensuite se solubilise dans le milieu alcalin de l'intestin grêle en permettant à l'eau de diffuser à travers de la membrane semi-perméable en causant le gonflement de la couche osmotique et par conséquent l'augmentation de la pression à l'intérieur. Cette pression va forcer le principe actif à sortir par l'orifice et la libérera de façon constante dans le côlon (Chourasia and Jain, 2003).

Partie expérimentale

Chapitre 2

Synthèses, caractérisation et dégradation enzymatique des différents esters de dextran

1. Objectifs et stratégie de synthèse

L'objectif de ce chapitre de thèse est de mettre en évidence l'intérêt de la modification chimique d'excipients telle que celle de polysaccharides afin de modifier leurs propriétés physicochimiques de manière à pouvoir les mettre en œuvre pour des applications pharmaceutiques particulières. Le dextran a été choisi comme excipient modèle afin de pouvoir l'utiliser comme agent d'enrobage ou matriciel dans une forme galénique destinée à assurer la délivrance ciblée de principes actifs au niveau du côlon.

Le dextran est une macromolécule d'origine naturelle constituée d'unités glucopyranose. Chacune de ces unités possède trois groupements hydroxyles susceptibles de donner lieu à des modifications chimiques modifiant de la sorte ses propriétés physicochimiques. Les modifications chimiques les plus fréquentes sont l'oxydation, l'estérification et l'éthérisation. Ces réactions d'hémi-synthèses sont souvent réalisées soit afin de réduire la gélification soit afin de diminuer son caractère hydrophile.

Afin d'augmenter l'hydrophobie du dextran, des réactions d'estérification des fonctions hydroxyles par des anhydrides d'acides ont été envisagées à l'aide de solvants organiques. La réaction d'estérification du dextran consiste à fixer des groupements hydrophobes (acétates, propionates, ou butyrates) sur les fonctions hydroxyles.

La stratégie scientifique consiste donc dans un premier temps à synthétiser et à caractériser trois nouvelles familles d'esters de dextran ayant différents degrés de substitution (DS). La seconde étape consiste à évaluer *in vitro* les esters de dextran comme agents d'enrobages. Pour ce faire, des films isolés ont été conçus en associant un copolymère acrylique tel que l'Eudragit® RL30D. La perméabilité d'un principe actif modèle à travers ces films isolés a également été évaluée *in vitro* dans différents milieux d'épreuve mimant les milieux gastro-intestinaux en présence ou en absence de dextranase.

2. Estérification de polysaccharides

2.1. Généralités sur les esters organiques de polysaccharides

De manière générale, la réaction d'estérification consiste en la condensation d'un alcool sur un acide pour donner un ester et de l'eau. Cependant, cette réaction est réversible et correspond en fait à un équilibre entre l'ester et l'acide (Figure 20).



Figure 20: Schéma général d'une réaction d'estérification.

Pour former préférentiellement l'ester, la réaction est le plus souvent réalisée à partir de dérivés d'acide : anhydride d'acide, chlorure d'acyle ou encore à partir d'un ester de cet acide (Figure 21). Ces réactions sont réalisées soit dans des milieux homogènes soit dans des milieux hétérogènes (exclusivement procédés commerciaux) en raison de la grande viscosité des solutions de polysaccharides, des coûts élevés des solvants, et de la facilité à réaliser un bilan dans le cas de conversions multiphasiques. Plusieurs solvants, composés, catalyseurs et conditions opératoires (température, temps) peuvent être mis en œuvre pour réaliser cette réaction d'estérification.

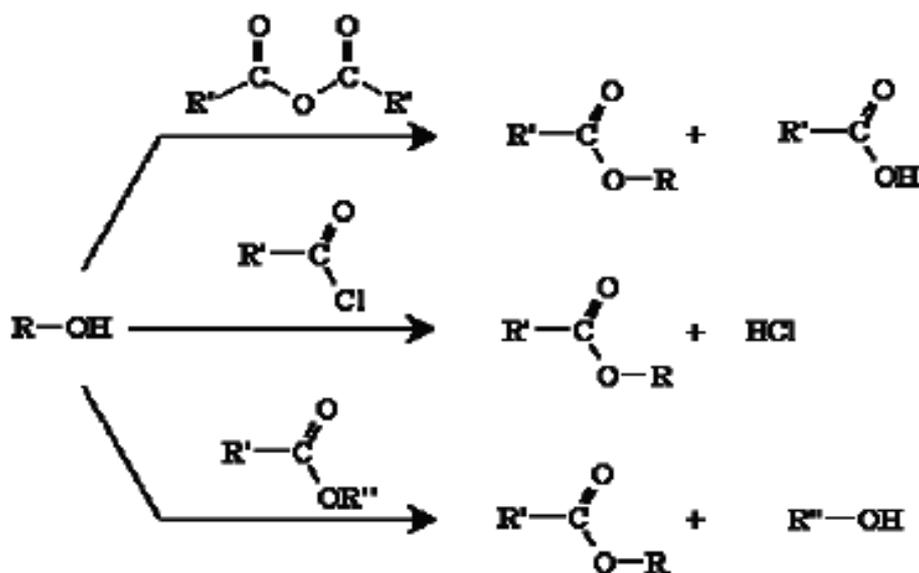


Figure 21: Synthèse d'esters à partir de dérivés d'acide.

2.2. Conditions hétérogènes

Les procédés industriels mis en œuvre pour réaliser cette réaction comprennent exclusivement des milieux hétérogènes. Ceci s'explique notamment par le coût élevé des solvants et la viscosité élevée des solutions de polysaccharides. Ainsi, la méthode la plus courante pour acétyler un polysaccharide consiste à le faire réagir avec un anhydride d'acide en milieu hétérogène.

Parmi les polysaccharides acétylés, l'acétate de cellulose est celui qui présente le plus d'intérêt d'un point de vue commercial. Celui-ci est préparé industriellement à l'aide d'un mélange d'acide et d'anhydride acétique en présence d'acide sulfurique comme catalyseur. Les réactions d'estérification réalisées avec des acides carboxyliques ou des anhydrides sont généralement accompagnées de dégradation des chaînes polysaccharidiques induites par la présence d'un milieu acide. Afin de limiter cette dégradation, l'estérification en présence d'une base tertiaire comme la pyridine ou la triéthylamine est recommandée. Ces bases jouent le rôle de capteurs de protons mais également le rôle de catalyseur de réaction. A titre d'exemple, on peut citer la cellulose triacétylée qui peut être obtenue après un temps de réaction de 6 à 10 jours à 60 °C (Wurzburg, 1964). L'addition de 4-diméthylaminopyridine (DMAP) permet de multiplier la réactivité de l'anhydride employé par un facteur 10^4 . L'efficacité catalytique de la DMAP est probablement due à la stabilisation par effet mésomère de l'ion acylpyridinium formé *in situ* qui joue un rôle important dans le cycle catalytique (Figure 22). Le faible encombrement stérique et le caractère donneur d'électron de l'amine secondaire contribuent également à cet effet catalytique (Xu *et al.*, 2005; Heinze *et al.*, 2006).

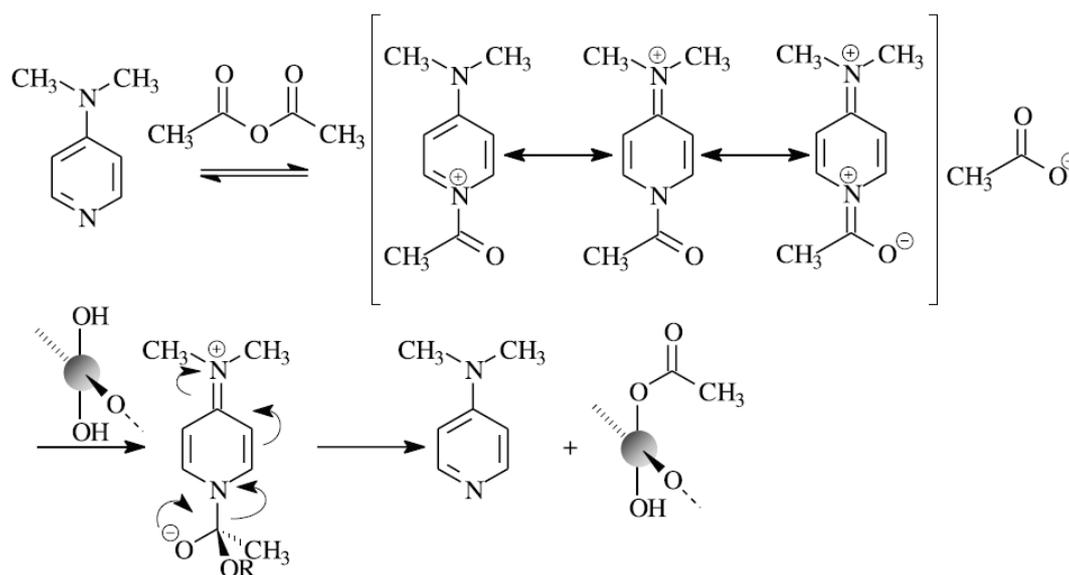


Figure 22: Mécanisme des réactions d'estérification avec l'anhydride acétique catalysées par le DMAP (Heinze *et al.*, 2006).

2.3. Conditions homogènes

Les réactions en milieux homogènes sont indispensables pour introduire des groupements ester sensibles et complexes qui nécessitent l'emploi de conditions plus douces. L'utilisation de conditions homogènes apporte également une meilleure efficacité de modification.

2.3.1. Le milieu aqueux

L'eau peut dissoudre ou gonfler la plupart des polysaccharides. En dépit du fait que ce n'est pas un solvant approprié pour les réactions d'estérification, l'eau a souvent été employée pour estérifier des polysaccharides tels que l'amidon, l'hémicellulose, ou la cellulose (Sun *et al.*, 2004). A titre d'exemple, l'amidon 2-aminobenzoate a été obtenu après gonflement dans l'eau et par réaction avec de l'anhydride isatoïque en présence de soude (Figure 23)

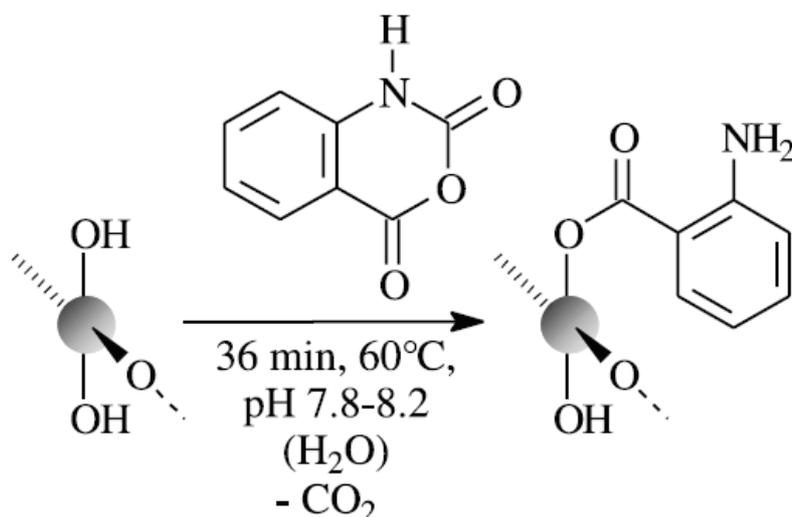


Figure 23: Synthèse de l'amidon 2-aminobenzoate en milieu aqueux (Heinze *et al.*, 2006).

Cependant, en milieu aqueux, l'hydrolyse des réactifs (anhydride d'acide ou halogénure d'acyle) ou encore la compétition entre l'hydrolyse des esters formés et l'estérification, dans le cas de l'utilisation d'acide carboxylique, conduisent généralement à un faible degré de substitution.

En outre, des sels inorganiques hydratés ont également été utilisés comme nouveaux solvants d'estérification de polysaccharides, notamment dans le cas de la cellulose. Ces composés fondus, de formule générale $\text{LiX} \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($\text{X} = \text{I}^-, \text{NO}_3^-, \text{CH}_3\text{COO}^-, \text{ClO}_4^-$), dissolvent la cellulose de haute masse molaire (Fischer *et al.*, 1999; Leipner *et al.*, 2000; Thümmeler *et al.*, 2010). Ainsi, l'acétylation partielle (DS= 2,4) de la cellulose est par exemple obtenue dans un milieu de thiocyanates de sodium, de potassium et de lithium ($\text{NaSCN}/\text{KSCN}/\text{LiSCN}, 2 \text{ H}_2\text{O}$) à 130

°C en utilisant de l'anhydride acétique (Heinze *et al.*, 2006). Cependant, ces hautes températures peuvent entraîner la dégradation de certains polysaccharides. De plus, la modification chimique dans ce type de solvant semble non-sélective. Ainsi l'ordre de réactivité reconnu des trois fonctions hydroxyle d'une unité glucopyranose n'est pas respectée (Arranz and Sánchez-Chaves, 1988).

2.3.2. Solvants organiques

L'utilisation du DMSO comme solvant est relativement intéressant puisque celui-ci permet de solubiliser de nombreux polysaccharides. C'est un solvant peu toxique (DL₅₀ chez le rat par voie orale = 14500 mg/kg) et généralement considéré inerte chimiquement (Heinze *et al.*, 2006). Cependant, pour certaines conditions opératoires, le DMSO peut agir comme un agent oxydant du nucléophile employé et former des composés sulfurés. Ces réactions sont illustrées dans le cas de l'oxydation via le DMSO et de l'oxydation de Swern (Mancuso *et al.*, 1979).

L'estérification d'un polysaccharide dissous dans le DMSO par réaction avec un anhydride et activée par un catalyseur nucléophile est l'une des méthodes les plus simples à mettre en œuvre à l'échelle du laboratoire (Heinze *et al.*, 2006). Ainsi, l'amidon, le pullulane et le dextran ont été estérifiés dans le DMSO par l'anhydride succinique en présence de DMAP (Bruneel and Schacht, 1994; Yoshimura *et al.*, 2006).

Quelques cas particuliers d'estérification de polysaccharide ont été menés dans des solvants tels que le formamide, le mélange de formamide et diméthyl formamide, la N-méthyl-2-pyrrolidone, et la pyridine (Ferruti *et al.*, 1979; Zhang *et al.*, 1998; Yoshimura *et al.*, 2006). Plus récemment, des liquides ioniques (Figure 24) ont été utilisés comme solvants, notamment lors de l'acétylation de la cellulose ou de l'hémicellulose. Ces solvants, considérés comme respectueux de l'environnement, ont des propriétés intéressantes telles qu'une haute stabilité thermique, une pression de vapeur négligeable et une polarité ajustable. Ainsi, après réaction à 100°C, il est possible d'atteindre des degrés de substitution (DS) proches de 2,7.

Des solvants multi-composants, composés d'un sel dissous dans un solvant aprotique dipolaire, peuvent être utilisés pour solubiliser les polysaccharides. Ainsi, une combinaison de chlorure de lithium (LiCl) avec le DMF, la 1,3-diméthyl-2-imidazolidinone (DMI) ou encore le N-N-diméthylacétamide (DMAc) a été testée. Ce système de solvants a permis la synthèse d'une grande gamme d'esters très variés et ainsi des études des propriétés de ces esters ont pu être menées. Cependant, la difficulté de recyclage du sel de lithium est un frein majeur à tout développement industriel de cette méthode de synthèse.

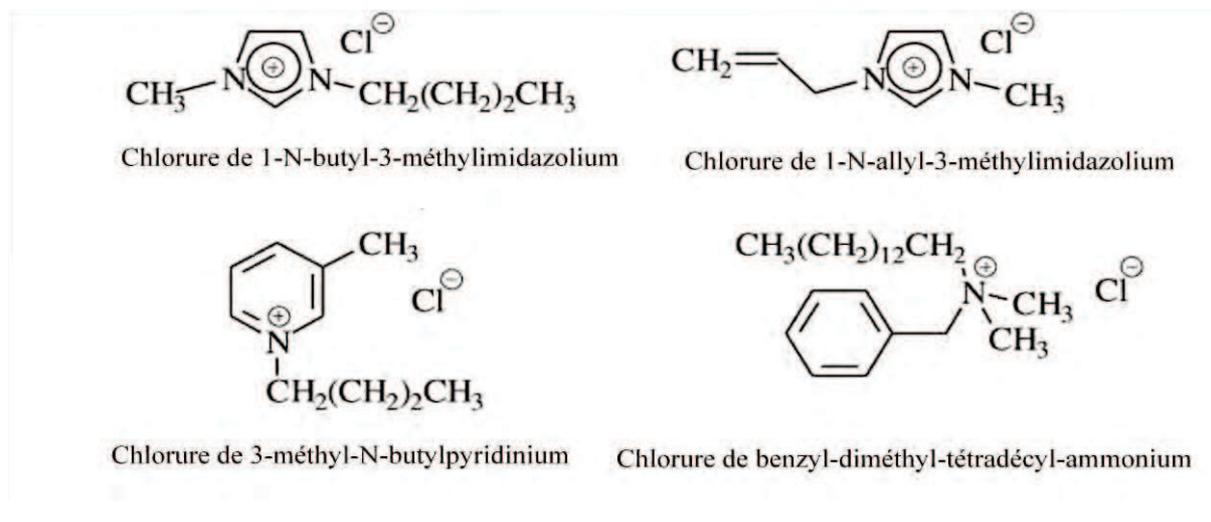


Figure 24: Structures de liquides ioniques (Heinze *et al.*, 2006).

Des études menées sur l'estérification de polysaccharides en phase homogène ont montré que le groupement hydroxyle primaire, en position 6, (par exemple dans le cas de l'amidon) est estérifié préférentiellement et que les hydroxyles sont ensuite substitués en position 2 puis 3. Par contre, dans le cas de polysaccharides qui ne possèdent pas de groupement hydroxyle primaire, comme dans le cas du dextran, c'est le groupement hydroxyle en position 2 qui est estérifié préférentiellement. Les groupements hydroxyles en position 4 puis 3 sont ensuite substitués (Kennedy *et al.*, 1989; Heinrich and Mischnick, 1999; Heinze *et al.*, 2006).

2.4. Degré de substitution

Le degré de substitution est le nombre de fonctions hydroxyles substituées par unité répétitive présente dans la structure du polysaccharide. Dans le cas du dextran, il ne dépasse pas 3. Il existe plusieurs méthodes de détermination du DS des esters carboxyliques de la cellulose. La plus ancienne technique encore très utilisée aujourd'hui est la technique dite de volumétrie. L'ester de cellulose est saponifié puis on procède à un dosage en retour de l'acide chlorhydrique ajouté en excès après l'hydrolyse basique (Genung and Mallatt, 1941). Elle a été utilisée dans de nombreuses études avec de légères modifications (Wang and Tao, 1994; Thiebaud and Borredon, 1995). Cependant, l'hydrolyse alcaline s'avère difficile à cause du caractère hydrophobe présent dans les échantillons hautement substitués avec de longues chaînes (Edgar *et al.*, 2001). Le résultat de la titration est également perturbé par une précipitation des sels d'acides gras à température ambiante.

Le DS peut également être déterminé par une hydrolyse basique des esters de cellulose suivie d'une quantification de l'acide libre après dérivatisation (méthylation) par

spectrométrie de masse GC-MS (Heinrich and Mischnick, 1999). Une autre méthode, apparentée à la volumétrie, consiste en l'aminolyse des groupes esters par action de pyrrolidine, en présence de pyridine comme catalyseur, à 80°C. Les quantités d'alkylpyrrolidine sont ensuite déterminées par analyse chromatographique en phase gazeuse (CPG) permettant de cette façon de calculer le DS (Samarnayake and Glasser, 1993). Cependant, cette méthode s'est révélée être peu quantitative pour des esters avec de longues chaînes et/ou des DS élevés à cause de l'encombrement stérique. De plus, cette méthode nécessite de trouver les étalons appropriés pour la calibration de la CPG.

La RMN en phase liquide du proton et/ou du carbone est également utilisée pour la détermination du DS dans le cas d'esters polysaccharidiques solubles dans les solvants organiques deutérés. Cette méthode est basée sur le rapport des intégrations des protons (ou carbones) des chaînes greffées sur celles des protons (ou carbones) du polysaccharide (Kim *et al.*, 1999; Maris *et al.*, 2001; Heinze *et al.*, 2006; Sun and Chu, 2006; Teramoto and Shibata, 2006; Thümmeler *et al.*, 2010).

Outre l'analyse quantitative, cette technique permet de réaliser une analyse structurale des esters de dextran et de déterminer la distribution des groupes fonctionnels.

Cette méthode présente cependant l'inconvénient de ne pas être applicable aux esters de DS trop faibles car elle nécessite la solubilisation complète de l'échantillon. Pour pallier à ce problème, la RMN à l'état solide se révèle être un outil d'investigation très adapté (Buchanan *et al.*, 1987). Le DS peut être déterminée par analyse élémentaire. Cette technique a permis de développer des équations pour la mesure du DS d'esters d'amylose (Otto, 1994). Plus tard, ces équations ont été appliquées à la mesure du DS d'esters de polysaccharide monosubstitués et hétérosubstitués (Vaca-Garcia *et al.*, 2001). Cette méthode s'est révélée être assez simple et efficace. Plus récemment, la spectroscopie proche infrarouge est apparue comme un outil très puissant de détermination du DS d'esters de cellulose. L'avantage de cette technique est qu'elle permet de différencier le réactif qui est juste adsorbé sur le polysaccharide de celui qui lui est lié par des liaisons covalentes (Peydecastaing *et al.*, 2006).

3. Matériels et méthodes

3.1. Matériels

Le dextran 70 kDa, l'anhydride acétique, l'anhydride propionique, l'anhydride butyrique, le citrate de triéthyle, la dextranase (EC-233-803-9 From *Penicillium* sp, 10- 25 unités/mg), la 4-diméthylaminopyridine (DMAP), le nitrate de magnésium hexahydraté, l'acétate d'ammonium, le méthanol, l'azoture de sodium, le tartrate de potassium et de sodium, l'acide 3,5-dinitrosalicylique, le phénol, l'isopropanol, le chloroforme, l'éthanol, le dichlorométhane (DCM), le tétrahydrofurane (THF), et l'acétone sont fournis par Sigma Aldrich Chimie (Saint-Quentin Fallavier, France). La théophylline anhydre est obtenue auprès de FMC (Bezons, France).

Le diméthylsulfoxyde, l'acétate d'éthyle (AcOEt), le chlorure de sodium, le sulfate de sodium et le bicarbonate de sodium sont fournis par Roth Carl (Lauterbourg, France). L'Eudragit® RS 30 D (ERS 30) a été fourni par SPCI (Lyon – France) (distributeur de Röhm Pharma, Darmstadt, Allemagne). Tous les solvants utilisés sont de qualité analytique.

3.2. Synthèse des esters de dextran

La synthèse des esters de dextran (Figure 25) est réalisée dans le DMSO en présence de DMAP comme catalyseur (Heinze *et al.*, 2006; Yoshimura *et al.*, 2006). Les conditions de synthèse sont résumées dans le Tableau 15. De manière brève, cette synthèse s'effectue de la façon suivante : une quantité précise de dextran (10 g) est dissoute dans du diméthylsulfoxyde dans un ballon bicol à fond rond sous agitation à l'aide d'un agitateur magnétique dont la vitesse d'agitation est fixée à 500 tours par minute et maintenu à 80°C dans un bain d'huile. La réaction a été réalisée en présence d'un condenseur à reflux auquel est attaché un tube de séchage contenant du chlorure de calcium.

Le catalyseur, le 4-diméthylaminopyridine, est ensuite introduit à raison de 10 à 20 % en masse de la quantité de dextran. Une fois le DMAP dissous, la solution d'anhydride d'acide est ajoutée lentement goutte à goutte pendant 30 min, à la solution précédente. Le mélange des différents réactifs est homogénéisé pendant une période prédéterminée (Tableau 15). Ensuite, le mélange est refroidi à température ambiante, puis versé lentement dans 1000 mL d'eau distillée sous une forte agitation pendant trente minutes.

Le polymère précipité est filtré à l'aide d'un filtre de porosité de 3 µm. Le précipité est ensuite dissous dans 300 mL d'acétate d'éthyle et rincé successivement à l'eau distillée (3x50 mL), à l'aide d'une solution aqueuse saturée en bicarbonate de sodium (2x50 mL), à l'eau

distillée (1x50), à l'aide d'une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium (1x50) et enfin à l'eau distillée (1x50). La phase organique (acétate d'éthyle) est séchée sur du sulfate de sodium anhydre, et filtrée sur papier filtre. Ensuite, le filtrat est évaporé sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le résidu sec obtenu après évaporation du solvant organique est dissous dans une quantité minimale de méthanol puis versé lentement dans 1000 mL d'eau distillée sous une forte agitation afin de précipiter le polymère. Le polymère précipité est séparé par filtration, séché dans une étuve ventilée à 50 °C pendant 24 h.

En ce qui concerne l'acétate de dextran DS1, à la fin de la réaction, le mélange réactionnel est placé dans des membranes de dialyse de type Spectra/Pro (seuil de coupure 12-14 kDa) et dialysé pendant 72 h contre 1 litre d'eau. L'eau est renouvelée trois fois pendant les 90 premières minutes et ensuite une fois chaque 24 h. Après la dialyse, le mélange est congelé dans l'azote liquide puis est lyophilisé (Alpha 2-4 LCS, Bioblock Scientific, Illkirch, France).

Tableau 15: Conditions des réactions, degré de substitutions et rendement d'estérification du dextran.

Esters de dextran	DS th	DS ^{Cal}	Volume d'anhydride d'acide (mL)	Volume de DMSO (mL)	Temps de la réaction (h)	R (%)
Butyrates de dextran	3	3,02	30,2	80	4	94,43
	2	1,98	20,1	80	4	92,16
	1	0,98	10,07	80	4	90,12
Propionates de dextran	3	2,97	24,1	80	4	93,54
	2	1,92	16,1	80	4	92,23
	1	0,97	8,03	80	4	90,01
Acétates de dextran	3	2,93	17,9	200	12	92,13
	2	1,91	11,9	200	12	91,83
	1	0,96	5,97	200	12	90,05

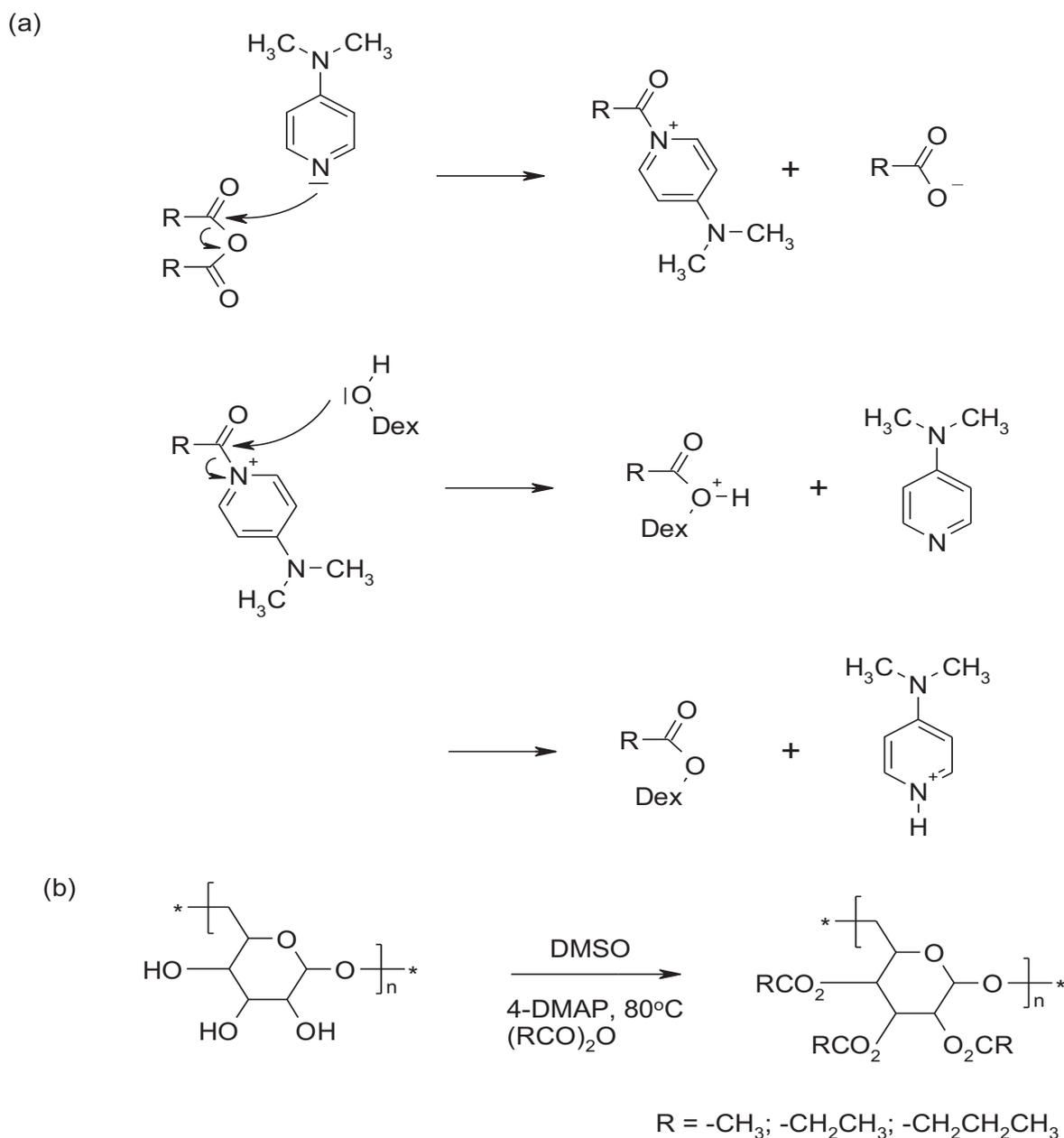


Figure 25: Mécanisme d'estérification du dextran avec l'anhydride d'acides catalysé par le DMAP (a), schéma général de la synthèse d'ester de dextran (b).

3.3.Caractérisation des esters de dextran

Les esters de dextran ont été caractérisés par spectroscopies Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF), RMN ¹H et RMN ¹³C. Les spectres IRTF ont été enregistrés sur un spectrophotomètre Nicolet 510 en mode ATR après 32 acquisitions avec une résolution de 4 cm⁻¹ en transmission.

Les études de résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton (¹H) et du carbone (¹³C) ont été effectuées à l'aide d'un spectromètre de type Bruker Avance PDX 300 (Karlsruhe, Allemagne) opérant à 300 MHz pour la RMN du proton et à 100,6 MHz pour la RMN ¹³C.

Les spectres ont été obtenus avec une sonde QNP de 5 mm. Les échantillons ont été préparés en solution à 10/15% en masse. Le chloroforme deutéré (CDCl₃) est utilisé pour les esters de dextran et le diméthylsulfoxyde deutéré (DMSO-d₆) a servi à solubiliser le dextran. Les acquisitions ont été effectuées à température ambiante. Les déplacements chimiques sont donnés en ppm en référence au tétraméthylsilane (TMS) interne. Les spectres RMN ¹H sont enregistrés de sorte à caractériser les esters de dextran synthétisés et de façon à déterminer le degré de substitution (DS). Ainsi le DS de chacun des esters de dextran a été calculée à partir de l'équation suivante:

$$DS = \frac{7x}{ny} \quad (1)$$

Où x correspond aux superficies intégrées de tous les protons du groupe ester ; y correspond aux superficies intégrées de tous les protons du dextran ; et n correspond au nombre d'atomes d'hydrogène présents dans le groupe ester (Maris *et al.*, 2001).

La solubilité des esters de dextran a été déterminée après immersion de 20 mg d'échantillon dans un mL de solvant pendant 24 h, suivie d'une filtration et d'un séchage de la fraction non soluble (Teramoto and Shibata, 2006).

Les rendements de la synthèse sont calculés par le rapport entre la masse d'ester de dextran récupéré et la masse d'ester de dextran attendue pour un rendement de 100%. Les masses calculées tiennent compte du degré de la substitution déterminée par RMN ¹H.

3.4. Etude de la dégradation enzymatique *in vitro* des différents esters de dextran

Afin d'étudier la dégradation enzymatique de différents esters de dextran synthétisés, 30 mg de chaque ester de dextran ont été incubés dans 30 mL de tampon d'acétate d'ammonium (5 mM, pH5,5) contenant 0,02% (m/v) d'azoture de sodium comme agent de conservation et de dextranase (enzyme). Cette étude est réalisée respectivement à trois concentrations d'enzymes (0,5 ; 5 et 10 U/mL). L'ensemble est ensuite placé dans un incubateur à 37 °C sous agitation (50 secousses par minute). A différents intervalles de temps (2, 6, 24 et 48 h), un échantillon de 2 mL est prélevé du milieu, sans remplacement par du milieu frais. Cet échantillon est incubé dans un bain d'eau à 95 °C pendant 10 min pour désactiver la dextranase.

Pour déterminer la concentration des oligosaccharides dégradés suite à l'action de la dextranase, 200 µl de solution de sulfite de sodium (30 mg/mL) et 2 mL de réactif de Sumner (0,2 g/mL de tartrate de potassium et de sodium ou sel de Rochelle, 10 mg/mL d'acide 3,5-dinitrosalicylique, 10 mg/mL d'hydroxyde de sodium et 2 mg/mL de phénol) ont été ajoutés à

l'échantillon. Ensuite, l'échantillon est incubé dans un bain-marie à 95 °C pendant 15 min. Après refroidissement, l'absorbance de la solution est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Shimadzu[®], UV 160, Kyoto, Japon) à 620 nm, contre un témoin réactif. La concentration en sucres réducteurs est déterminée à partir d'une droite d'étalonnage préétablie en mesurant les absorbances de plusieurs solutions de concentrations connues en glucose, préalablement traitées de la même manière (Hennink *et al.*, 1997; Franssen *et al.*, 1999).

3.5. Préparation de films isolés

Pour préparer les films isolés, 10% (m/m) de la solution d'Eudragit[®] RS 30 D (ERS) sont dissous dans de l'eau distillée à laquelle est ajouté le citrate de triéthyle comme agent plastifiant dans un rapport (1 : 6) (plastifiant : polymère sec). Une quantité précise d'acétate de dextran de DS=1, sous forme de poudre, est dissoute dans l'eau. La solution d'acétate de dextran est ensuite ajoutée lentement à la solution d'ERS sous agitation magnétique.

Les pourcentages de masses sèches d'ester de dextran ajoutées à la solution contenant les Eudragit[®] sont respectivement de 0, 10, 20 et 30% (m/m) par rapport à la masse sèche d'Eudragit[®]. Les films isolés sont obtenus après étalement d'un volume précis de solution dans un moule en téflon. Le séchage est réalisé sous hotte ventilée pendant 24 h à température ambiante. Lorsque les films sont secs, les moules sont transférés pendant 24 h dans une enceinte climatique dont l'humidité relative est de 100%. Les films sont alors découpés pour réaliser les différentes expérimentations.

Les épaisseurs des films sont contrôlées à l'aide d'un comparateur d'épaisseur (Kafer, Allemagne). Les films ayant une épaisseur moyenne comprise entre 150 et 200 µm ont été sélectionnés. La valeur moyenne résulte de la prise de cinq mesures à des endroits différents. Les films isolés obtenus sont alors conservés dans une enceinte climatique dont l'humidité relative est de 50%. Ce taux d'humidité est obtenu en introduisant dans l'enceinte climatique une solution saturée (66% m/m) de nitrate de magnésium hexahydraté à température ambiante.

3.6. Etude de perméabilité d'un principe actif modèle à travers les films isolés

Cet essai est réalisé dans des cellules de diffusion (Figure 26) (Grown Glass Co., Inc., Somerville, New Jersey, USA) alternativement dans du liquide gastrique simulé (LGS) à pH 1,2 sans pepsine, dans du liquide intestinal simulé (LIS) à pH 6,8 sans pancréatine (USP XXVIII, 2005) et dans du liquide colique simulé (LCS) à pH 6,4 (Wei *et al.*, 2009). Les

milieux accepteur et donneur des cellules de diffusion sont séparés par le film isolé étudié. La surface du film exposée est de $3,46 \text{ cm}^2$ et le même film sert pour les différents milieux d'épreuve.

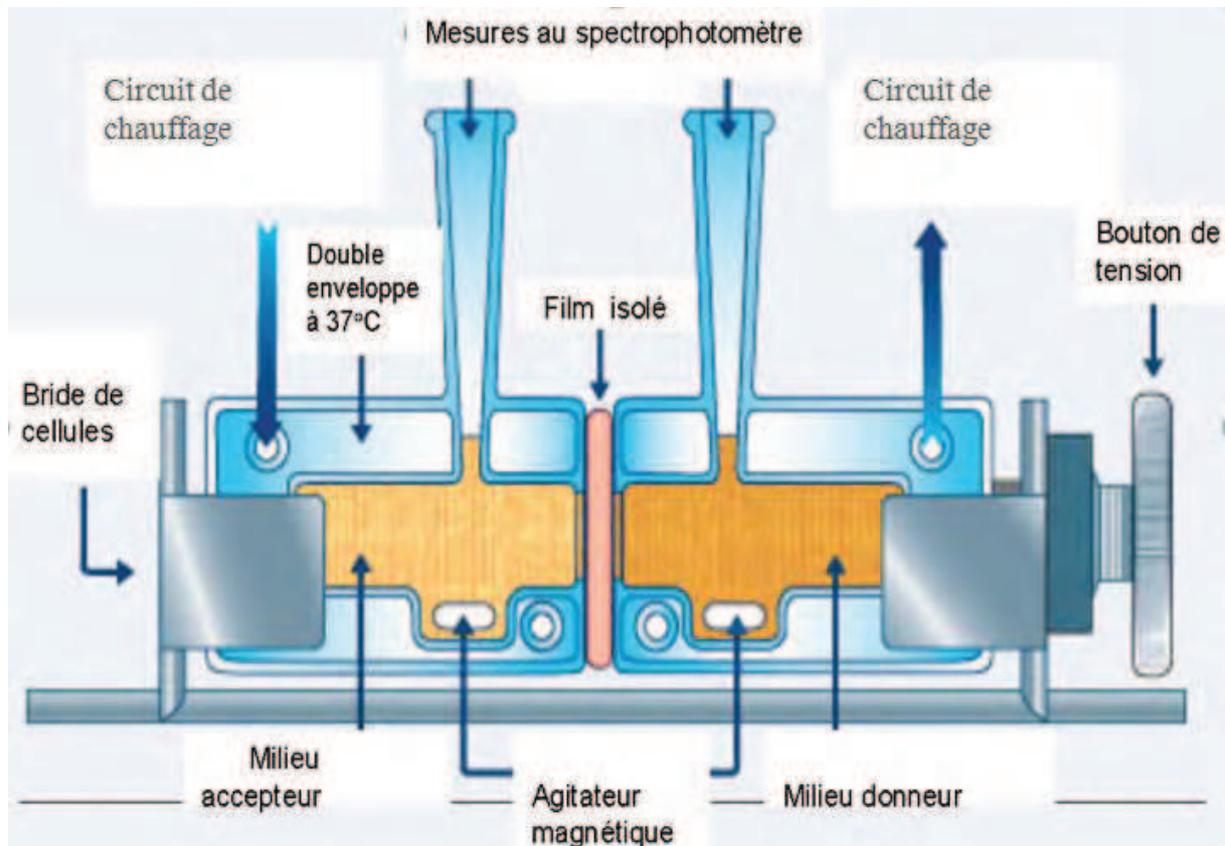


Figure 26: Représentation schématique des cellules de diffusion pour les études de perméabilité (Stringer and Peppas, 1996; www.permegear.com/sbs.htm, 2010).

Les compartiments donneur et accepteur ont tous les deux un volume de 100 mL de LGS, LIS et LCS sans ou avec trois concentrations de dextransase (0,5 ; 5 et 10 U/mL). La température est maintenue à 37°C par une circulation du fluide caloporteur (eau) et chaque compartiment est agité sans interruption par un agitateur magnétique. Différentes expérimentations ont été mises en place pour évaluer la perméabilité d'un principe actif modèle, la théophylline, à travers des films isolés.

En ce qui concerne la théophylline, le milieu donneur a une concentration initiale en théophylline de 3 g/l. Les expériences de perméabilité ont été réalisées pendant trois heures dans chaque milieu d'épreuve (LGS et LIS) et 18 h dans le LCS. A intervalles prédéterminés (1, 2 et 3 h) un échantillon de 10 mL est prélevé du chaque milieu accepteur. Un échantillon supplémentaire a été prélevé à 18 h du milieu LCS. Chaque prélèvement est remplacé par le même volume du milieu frais correspondant.

La cinétique de transfert des principes actifs est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Shimadzu[®], UV 160, Kyoto, Japon) à la longueur d'onde de 272 nm. Chaque détermination de perméabilité a été répétée trois fois et la quantité cumulée de principe actif a été corrigée suite à l'ajout.

En appliquant la première loi de la diffusion de Fick dans des conditions « Sink », la perméabilité d'un principe actif a été définie selon la relation suivante :

$$\frac{d_M}{d_t} = \frac{DSKC_d}{h} = PSC_d \quad (2)$$

Où M représente la quantité de principe actif diffusant (mg) par unité de temps ; S est la surface du film exprimée en cm², C_d est la concentration de principe actif dans le compartiment donneur en (g/l), h est l'épaisseur du film, K est le coefficient de diffusion effectif, et P (DK/h) est la perméabilité exprimée en cm/s. La perméabilité est calculée par l'équation suivante :

$$P = \frac{\text{Pente}}{SC_d} \quad (3)$$

Où la pente a été obtenue à partir de la quantité de principe actif qui a diffusé à travers du film par unité de temps (Lin and Lu, 2002; Akhgari *et al.*, 2006a).

3.7. Statistiques

Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ±ESM. Ils sont analysés par one way ANOVA et le test de comparaison multiple de Student-Newman-Keuls a été utilisé pour déterminer le niveau de signification statistique (p=0,05) des différences observées.

4. Résultats et discussion

4.1. Synthèse et caractérisation de différents esters de dextran

Dans notre étude, nous avons choisi le DMSO comme solvant d'estérification en milieu homogène. Parmi les différents agents d'estérification qui peuvent être mis en oeuvre, les anhydrides d'acide ont été utilisés de nombreuses fois pour estérifier divers polysaccharides (Marcazzan *et al.*, 1999; Yoshimura *et al.*, 2006) et dans le cas particulier du dextran (Gagnaire and Vignon, 1977), en utilisant une quantité catalytique de DMAP.

Trois sortes d'esters de dextran ont été synthétisées : il s'agit de butyrates de dextran (DexBut), propionates de dextran (DexPro) et d'acétate de dextran (DexAce), avec trois

degrés de substitution (1, 2 et 3) (Tableau 15). Le schéma général et le mécanisme de la réaction sont présentés dans la Figure 25.

L'objectif de ces modifications chimiques est de diminuer la solubilité du dextran dans l'eau. Les groupes hydroxyles du dextran réagissent avec le groupement carboxylique des anhydrides d'acides pour former un lien ester et produire un polymère plus hydrophobe.

La solubilité des ces esters de dextran a été évaluée dans différents solvants, les résultats sont repris dans le Tableau 16.

La comparaison entre ces résultats permet de conclure que deux facteurs influencent la solubilité dans les solvants organiques : le degré de substitution et la longueur de la chaîne d'ester greffée sur le dextran (Bauer and Kesselhut, 1995). Ainsi, les esters de dextran avec un degré de substitution élevé et une longue chaîne d'ester sont solubles dans les solvants organiques et insolubles dans l'eau. Par contre, les esters de dextran à faible degré de substitution et à courte chaîne d'esters sont de moins en moins solubles dans les solvants organiques et de plus en plus solubles dans l'eau. C'est le cas, par exemple, de l'acétate de dextran avec un degré de substitution (DS) égale à 1.

Tableau 16: Solubilité des esters de dextran dans l'eau et des différents solvants organiques.

Esters de dextran	Eau	Chloroforme	THF	AcOEt	Acétone	Isopropanol	MeOH	DCM
Butyrates de dextran (Dex.But) DS= 3	I	S	S	S	S	PS	I	S
Butyrates de dextran (Dex.But) DS= 2	I	S	S	S	S	S	S	S
Butyrates de dextran (Dex.But) DS= 1	I	I	S	I	I	I	S	I
Propionates de dextran (Dex.Pro) DS= 3	I	S	S	S	S	I	PS	S
Propionates de dextran (Dex.Pro) DS= 2	I	S	S	S	S	S	S	S
Propionates de dextran (Dex.Pro) DS= 1	PS	S	S	I	I	I	S	I
Acétates de dextran (Dex.Ace) DS= 3	I	PS	PS	I	I	I	PS	S
Acétates de dextran (Dex.Ace) DS= 2	I	PS	I	I	I	I	S	PS
Acétates de dextran (Dex.Ace) DS= 1	S	I	I	I	I	I	PS	I

S (Soluble) : Obtention d'une solution limpide

PS (Partiellement soluble) : Quand le solvant est devenu nuageux.

I (Insoluble) : Quand le polymère reste insoluble intacte dans le solvant.

4.2. Caractérisation par spectroscopies

4.2.1. Les spectres IRTF

Les spectres IRTF ont permis de mettre en évidence l'estérification effective du dextran. Ainsi la

Figure 27 représente les spectres du dextran et de différents butyrates de dextran. La comparaison entre eux permet d'observer plusieurs nouvelles bandes caractéristiques des groupements esters greffés ;

- A 1740 cm^{-1} se situent les bandes de vibration correspondant à la liaison C=O des fonctions esters.
- A 1350 cm^{-1} se situent les bandes de vibration correspondant à la liaison C-O des fonctions esters.
- A 1253 et 1154 cm^{-1} apparaissent respectivement les bandes de déformation des groupements CH_3 et des CH_2 de fonctions esters.

Néanmoins, la large bande correspondant aux fonctions alcool résiduelles sur le dextran, située à $3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$, disparaît progressivement lorsque le taux de modification augmente (

Figure 27) (Arranz and Sánchez-Chaves, 1988; Sun *et al.*, 2004). De manière générale, le même résultat a été observé pour le propionate de dextran et pour l'acétate de dextran.

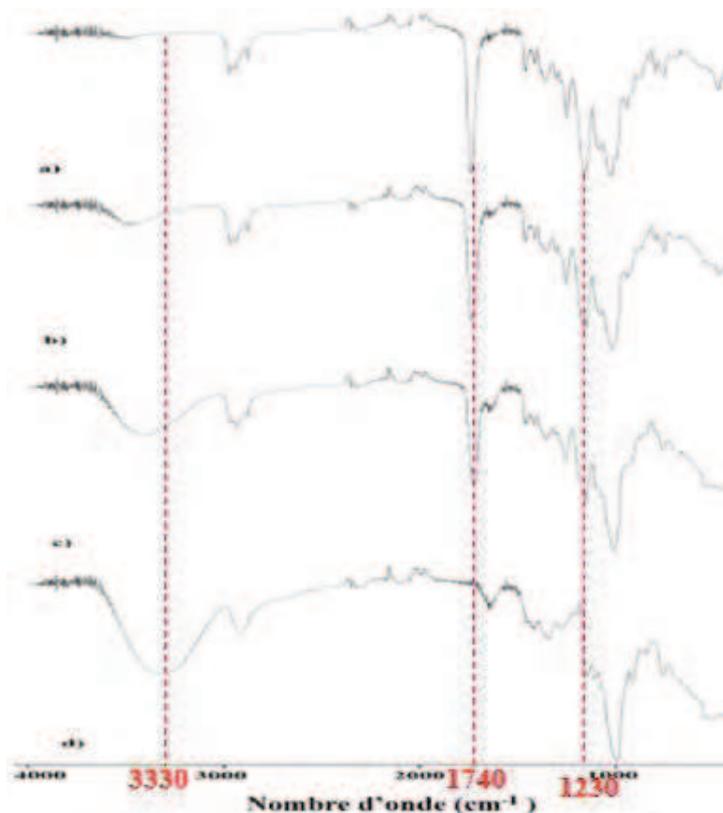


Figure 27: Spectres IRTF du dextran 70 (d) et des butyrates de dextran avec différents degrés de substitution, DS.3 (a), DS.2 (b) et DS.1(c).

4.2.2. Les spectroscopies RMN ^1H et ^{13}C

La spectroscopie RMN est l'une des techniques les plus employées pour obtenir des informations sur la structure des polysaccharides et de leurs dérivés. Malgré une précision relative (environ 5% d'erreur sur l'intégration d'un pic), son utilisation rapide et aisée en ont fait une technique de choix pour notre étude.

L'estérification du dextran a bien évidemment été vérifiée par RMN ^1H et ^{13}C .

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C du dextran et différents esters de dextran ont été enregistrés : leurs déplacements chimiques sont respectivement repris dans le Tableau 17 et le Tableau 18.

La Figure 28 représente les spectres RMN ^1H et ^{13}C du dextran dans le DMSO- d_6 . Dans la Figure 28 (b) le pic correspondant au proton anomérique ($\text{H}_{\text{anomérique}}$) est situé vers 4,7 ppm. Les fonctions hydroxyles (OH^2 , OH^3 et OH^4) résonnent sous forme de doublets localisés à 4,4 ppm, 4,8 ppm et 4,88 ppm. Les pics situés entre 3,0 et 3,9 ppm sont attribués aux six protons glycosidiques (H^2 à H^5 et deux protons de H^6).

Dans le cas des spectres RMN ^1H des esters de dextran (Tableau 18), nous avons observé une influence des fonctions esters greffés sur les déplacements chimiques des protons glucosidiques. Dans le cas du dextran, les pics correspondant aux protons glucosidiques (H^2 , H^3 , H^4 , H^5 et $\text{H}^{6-6'}$) sont situés dans la zone (3,0 - 4,2) ppm. Lorsqu'une fonction OH est modifiée, les déplacements chimiques de ces protons glucosidiques vont évoluer vers la zone (3,4 - 5,6) ppm (Tableau 18). Divers auteurs ont d'ailleurs relaté ce phénomène lors de l'estérification du dextran. Ils ont démontré que le déplacement chimique des protons glucosidiques était modifié de 1 à 1,5 ppm vers la zone blindée du spectre RMN ^1H lors de l'estérification (Arranz *et al.*, 1987; Arranz and Sánchez-Chaves, 1988). Ce phénomène de variation du déplacement chimique des protons glucosidiques est moins visible sur un spectre RMN ^{13}C .

L'ensemble des résultats obtenus par spectroscopies IRTF, RMN ^1H et RMN ^{13}C , qui sont en accord avec la littérature, permettent de confirmer la synthèse de ces différentes familles d'esters de dextran (butyrates de dextran, propionates de dextran et d'acétates de dextran) (Arranz and Sánchez-Chaves, 1988; van Dijk-Wolthuis *et al.*, 1997; Ferreira *et al.*, 2002; de Belder, 2003).

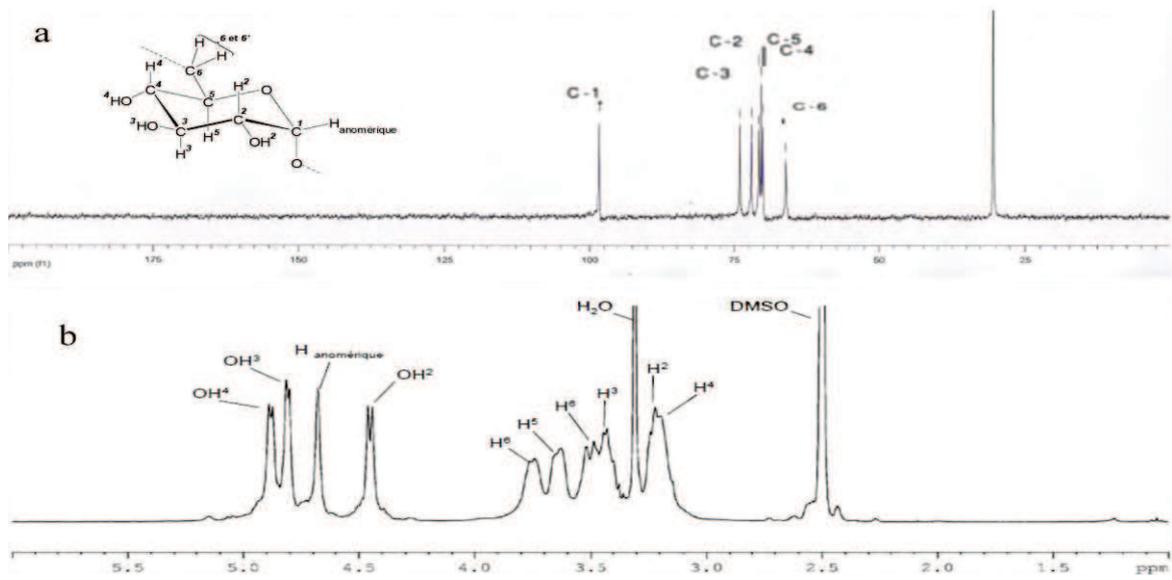


Figure 28: Spectres RMN ^{13}C (a) et RMN ^1H (b) du dextran dans DMSO- d_6 .

Tableau 17: Déplacements chimiques (ppm) du dextran dans le DMSO-d₆.

Position	1	2	3	4	5	6	6'
RMN ¹ H	4,6 - 4,7	3,1 - 3,3	3,4 - 3,5	3,1 - 3,3	3,6 - 3,7	3,7 - 3,8	3,4 - 3,6
RMN ¹³ C	98,3	72,0	73,5	70,3	70,5	66,2	66,2

Tableau 18: Déplacements chimiques (ppm) des différents esters de dextran dans le CDC¹³.

Ester de dextran	RMN ¹ H							
	-CH ₃	-CH ₂ -CH ₃	-CH ₂ -CH ₃	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	-C=O	Dextran
Acétates de dextran	1,9 - 2,2	-	-	-	-	-	-	3,4 - 5,6
Propionates de dextran		2,2 - 2,5	0,9 - 1,2	-	-	-	-	3,4 - 5,6
Butyrates de dextran	-	-	-	2,2 - 2,45	1,5 - 1,7	0,85 - 1,0	-	3,4 - 5,6
	RMN ¹³ C							
	-CH ₃	-CH ₂ -CH ₃	-CH ₂ -CH ₃	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	-C=O	Dextran
Acétates de dextran	20,9	-	-	-	-	-	170,3	65,6 - 97,7
Propionates de dextran	-	27,3	9,0	-	-	-	173,3	65,6 - 97,7
Butyrates de dextran	-	-	-	35,8	18,8	13,5	172,2	65,6 - 97,7

4.3. Etude de la dégradation enzymatique *in vitro* des esters de dextran

Les études concernant les différents esters de dextran partiellement ou entièrement substitués concernent également leur dégradation enzymatique *in vitro* par l'enzyme dextranase. Ainsi, le dextran modifié doit toujours être dégradé par la dextranase pour nous permettre de l'utiliser dans les systèmes d'enrobages ou matriciels destinés à la libération spécifique d'un principe actif au niveau du côlon où la dextranase hydrolyse les liaisons α -1,6 du dextran, et conduit à la formation de molécules de dextrose.

Les études *in vitro* de la dégradation enzymatique des différents esters de dextran ont été menées à trois concentrations de dextranase. Les résultats sont présentés dans la Figure 29 (a, b, c). Les résultats montrent que les esters de dextran avec un faible degré de substitution (DS=1) sont bien dégradés par la dextranase surtout quand l'ester de dextran apporte un substituant à courte chaîne tel que l'acétate de dextran. Cette dernière montre une forte dégradabilité comparée aux autres esters de dextran de même degré de substitution.

Ces études ont montré que la dégradation des esters de dextran diminue ensuite rapidement avec l'augmentation du degré de substitution et devient négligeable lorsque le degré de substitution augmente (DS=2 et DS=3).

Cette étude de la dégradation enzymatique nous a permis également de montrer que la dégradation enzymatique augmente progressivement avec l'augmentation de la concentration en dextranase. Une relation linéaire a également été observée entre la quantité de glucose dégradée et le temps d'exposition dans le milieu d'épreuve.

Selon la littérature, ce phénomène a été également constaté par plusieurs auteurs qui ont observé que le rapport entre la dégradabilité de dérivés du dextran par la dextranase est inversement proportionnel au type de groupement chimique substitué et au degré de substitution DS de molécules de dextran (Park *et al.*, 1993; Mehvar, 2000; Chiu *et al.*, 2002).

La différence de comportement de dégradation enzymatique observée entre les différents esters de dextran peut être attribuée à deux causes :

- Il est estimé que le mécanisme d'attaque du dextran réclame quatre unités successives de α -1, 6 glucose pour l'hydrolyse de la chaîne du dextran (Bauer and Kesselhut, 1995) ;
- Ensuite pour les esters de dextran fortement substitués (DS>1), la cristallinité et l'abondance des substituants rendaient difficiles la biodégradation des esters de dextrans.

Les résultats de cette étude permettent de conclure que les esters de dextran biodégradables

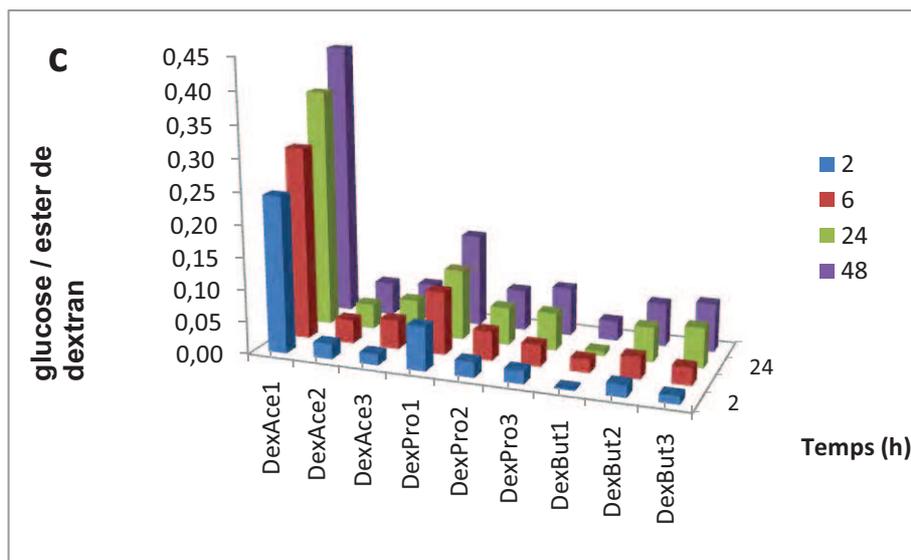
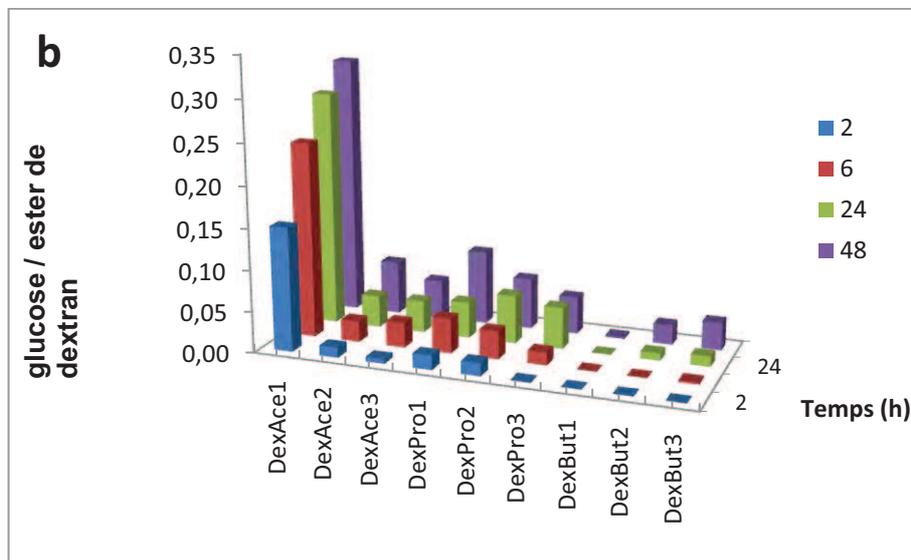
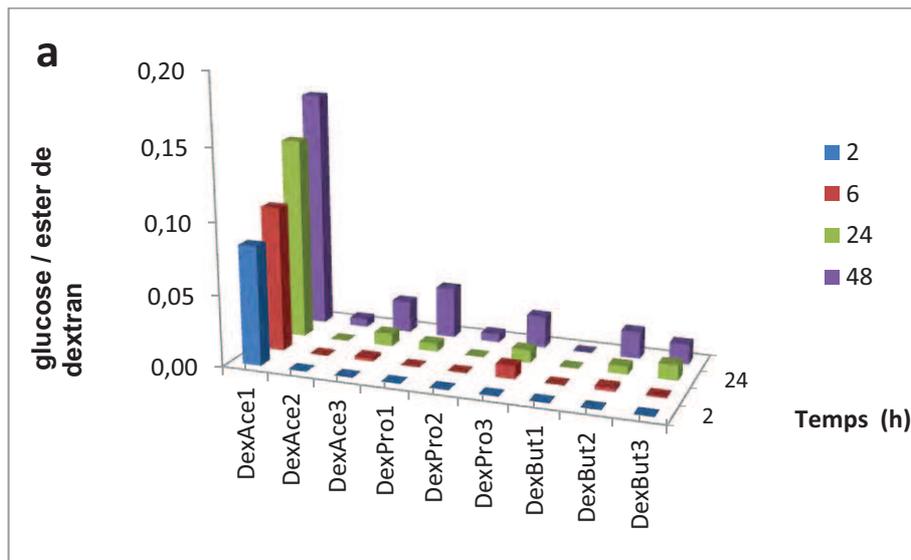


Figure 29: Dégradation enzymatique de différents esters de dextrans avec la dextransase à la concentration de 0,5 U/mL (a), de 5 U/mL (b) et de 10 U/mL (c).

partiellement substitués tel que l'acétate de dextran DS=1, sont de bons candidats pour l'élaboration de films biodégradables spécifiquement au niveau du côlon.

4.4. Etude de la perméabilité

L'ester de dextran ayant montré une bonne dégradation *in vitro*, a été sélectionnée pour préparer des films en l'associant à l'ERS en milieu aqueux. Les études de perméabilité des films préparés ont été réalisées afin d'évaluer le potentiel de ces films comme un moyen pour la délivrance spécifique des médicaments dans le côlon.

Ces études nous permettent d'évaluer la cinétique de libération de la théophylline à travers ces différents films *in vitro* dans des conditions simulant les milieux gastro-intestinaux. Ainsi, la perméabilité de films d'enrobage est considérée comme une propriété physique très importante dans la mesure où elle peut conditionner la libération des principes actifs enrobés avec ce film mixte.

Le choix de la théophylline comme traceur dans nos études de perméabilité a été guidé par les propriétés physicochimiques, analytiques, et pharmacologiques de cette substance active antiasthmatique. En effet, ce principe actif est très bien résorbé le long du tractus gastro-intestinal y compris dans le côlon (McConnell *et al.*, 2009b). Il peut également être incorporé dans une formulation destinée à la libération colique, car le traitement de l'asthme pourrait être amélioré par l'utilisation d'une telle formulation. Enfin, la solubilité et les caractéristiques de la perméabilité de la théophylline ne sont pratiquement pas influencées par le pH du milieu, ce qui facilite grandement l'interprétation des résultats.

Les résultats de perméabilité de la théophylline à travers des différents films testés sont représentés dans la Figure 30 et le Tableau 19.

L'analyse de ces résultats nous permet de constater, de manière générale, une visible augmentation de la perméabilité de la théophylline à travers les films contenant de l'acétate de dextran par rapport aux films d'ERS pure. Cette significative augmentation de la perméabilité est inversement proportionnelle à la concentration d'acétate de dextran (DS=1) dans les films étudiés. Néanmoins, une relation linéaire a également été observée entre la quantité de principe actif libérée et le temps d'exposition dans les différents milieux d'épreuve.

Ces effets ont été rencontrés dans tous les milieux d'épreuve gastro-intestinaux.

La différence de perméabilité entre les films mixtes, renfermant différentes proportions d'acétate de dextran et le film d'ERS pur, peut être attribuée directement à la présence de l'acétate de dextran dans les films qui confère une augmentation de leur hydrophilie et par conséquent leur perméabilité.

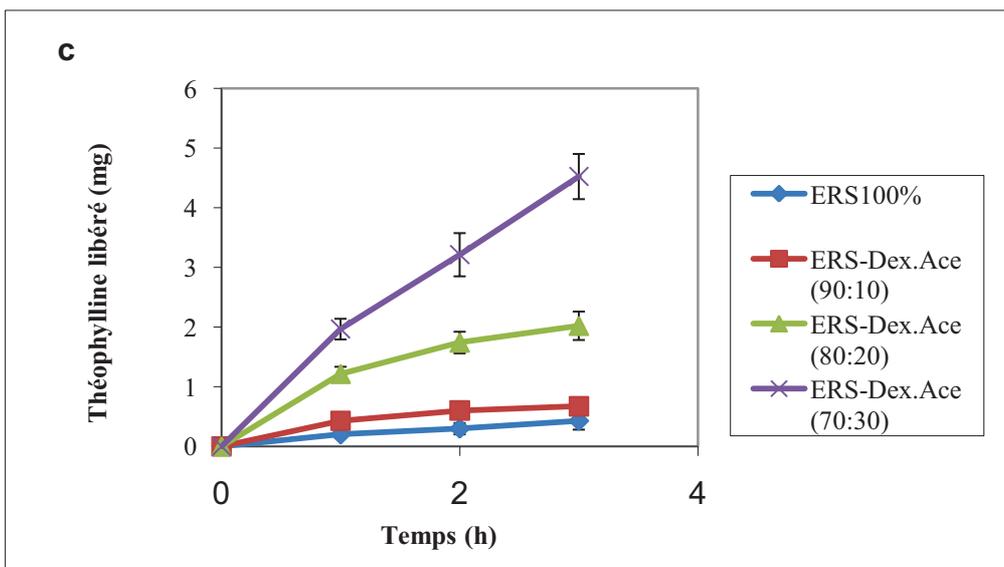
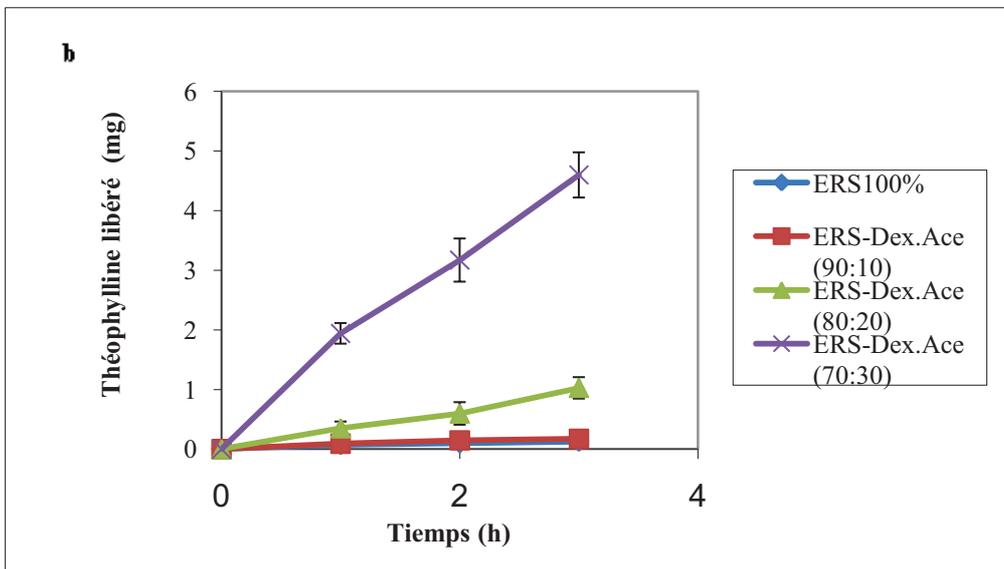
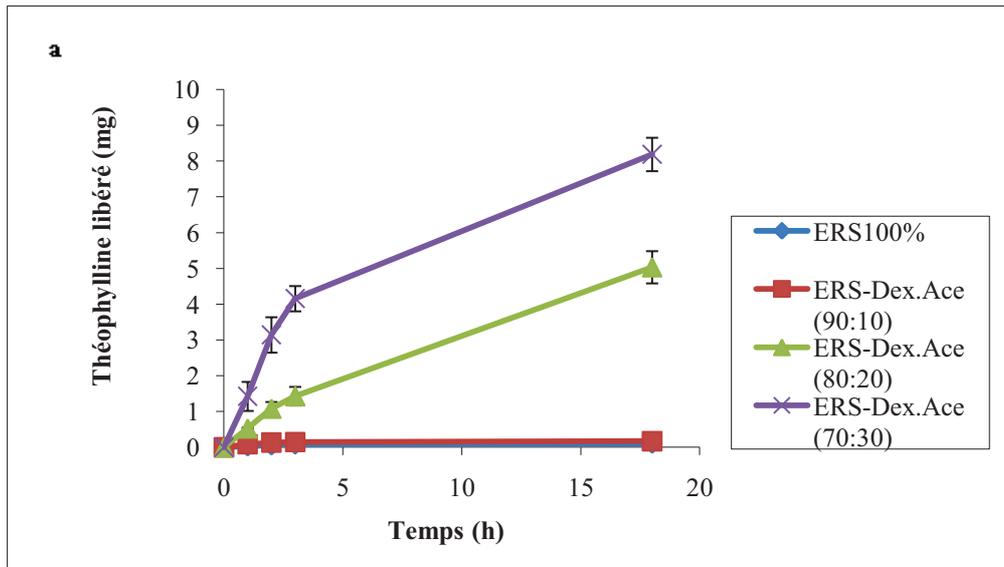


Figure 30: Libération de la théophylline à travers des films dans différent milieux gastro-intestinaux LGS (a), LIS (b) et LCS (c).

Tableau 19: Perméabilité de la théophylline à travers de différents films en l'absence et en présence de dextranase.

Formulations	P x 10 ⁻⁵ (cm/s)					
	LGS	LIS	LCS	LCS + 0,5 U/mL dextranase	LCS + 5 U/mL dextranase	LCS + 10 U/mL dextranase
ERS 100%	1,266 ± 0,145	0,3753 ± 0,024	0,310 ± 0,034	-	-	-
ERS:Dex.Ace (DS=1) (90:10)	1,990 ± 0,045	0,510 ± 0,270	0,552 ± 0,047	0,546 ± 0,046	0,601 ± 0,316	0,8 ± 0,251
ERS:Dex.Ace (DS=1) (80:20)	6,006 ± 0,238	3,048 ± 0,179	14,954 ± 0,260	14,411 ± 0,416	15,01 ± 0,316	16,31 ± 0,223
ERS:Dex.Ace (DS=1) (70:30)	13,442 ± 0,378	13,656 ± 0,401	24,320 ± 0,332	21,566 ± 0,406	23,32 ± 0,316	24,12 ± 0,33

P= Perméabilité

ERS = Eudragit RS 30D

Dex.Ace (DS=1)= Acétates de dextran

La comparaison des résultats de la perméabilité de la théophylline, dans le LCS en présence et en absence d'enzyme (Tableau 19), montre une faible augmentation de la perméabilité avec l'augmentation de la concentration de l'enzyme dextranase dans le LCS. Cet effet peut également être attribué d'une part à la faible concentration d'enzyme dextranase et d'autre part à l'inaccessibilité des esters à la dextranase due à la bonne miscibilité d'esters de dextran dans un copolymère non dégradable, non gonflé et non dissous comme l'Eudragit RS 30D.

5. Conclusion

Dans cette étude, différents esters de dextran ont été synthétisés avec trois degrés de substitutions. Ces synthèses ont permis de réduire l'hydrophilie du dextran de manière à pouvoir les utiliser dans des systèmes d'enrobage ou matriciels d'une forme pharmaceutique orale destinée à la libération spécifique dans le côlon. Les études de la dégradation enzymatique *in vitro* ont montré que la plupart des esters de dextran ne sont pas dégradés suite à l'action de la dextranase. L'absence de dégradation dans le microbiote colique ne permet pas pour la plupart d'entre eux d'être utilisés dans le domaine de la délivrance ciblée de substances actives dans le côlon.

Les esters de dextran qui ont montré une bonne dégradation enzymatique *in vitro* (acétate de dextran avec DS=1) ne peuvent délivrer spécifiquement une substance active intacte dans le côlon et ce à cause de leurs solubilités dans les milieux gastro-intestinaux rencontrés.

Chapitre 3

Synthèse, caractérisation et dégradation enzymatique de di, tri, et tétra blocs copolymères à base de dextran

1. Objectifs et stratégie de synthèse

L'obtention simultanée de plusieurs propriétés physicochimiques au sein d'un seul matériau constitue un atout non négligeable pour diverses applications (emballages, pharmaceutiques, automobiles, ...). En effet, l'obtention d'un seul matériau permet dans certains cas d'associer les avantages de deux polymères de natures différentes. Dans le cadre des travaux de recherche de cette thèse de doctorat, nous cherchons à obtenir un matériau destiné à un usage pharmaceutique qui combinerait à la fois les propriétés physicochimiques de certains polysaccharides, une dégradabilité par le microbiote ou les enzymes coliques, et les propriétés physicochimiques et filmogènes des polyacrylates, dans le but de réaliser un système « universel » pour la libération spécifique des substances actives au niveau du côlon.

Un des moyens pour parvenir à tels résultats est de recourir à des copolymères à blocs. Dans ce chapitre, seront présentés les résultats d'une série de synthèses de copolymères constitués d'une chaîne polysaccharidique et plus particulièrement de dextrans de différents poids moléculaires (70 ; 45 ; 10 et 1,5 kDa) sur laquelle sont copolymérisés un ou plusieurs blocs de polyacrylates (polyacrylate de méthyle, polyméthacrylate de méthyle ou acide polyméthacrylique). Les synthèses de diblocs, triblocs et tétrablocs copolymères ont été réalisées par copolymérisation radicalaire en émulsion. Par la suite, leurs dégradations enzymatiques, leurs propriétés filmogènes et, bien évidemment, leurs effets en termes de perméabilité ont été évalués pour mettre en évidence leur potentielle utilisation dans le domaine de la délivrance ciblée de substances actives au niveau du côlon.

2. Généralités sur les copolymères

2.1. Les copolymères à blocs

Un copolymère à blocs est défini comme un polymère comprenant des molécules dans lesquelles il y a un arrangement linéaire des blocs (Figure 31). Un bloc est défini comme une portion de molécule polymère dans laquelle les motifs constitutifs ont au moins un motif constitutionnel ou une configuration absente des portions adjacentes (IUPAC, 1974).

D'une manière générale, le mélange de deux homopolymères A et B immiscibles conduit à une séparation de phases donnant lieu à la coexistence de deux phases, l'une riche en homopolymère A, l'autre en homopolymère B.

Dans un copolymère à blocs, si deux composants A et B sont liés entre eux chimiquement, la séparation de phases ne peut avoir lieu qu'à une échelle microscopique, typiquement de quelques centaines d'Angströms. Cette séparation se différencie de celle des

mélanges des homopolymères, ce qui conduit à des tailles de l'ordre de quelques micromètres ou plus (macroséparation).

Grâce à la maîtrise des méthodes de synthèse, il est possible aujourd'hui d'obtenir des copolymères à blocs avec un changement de composition graduel ou avec des caractéristiques spécifiques.

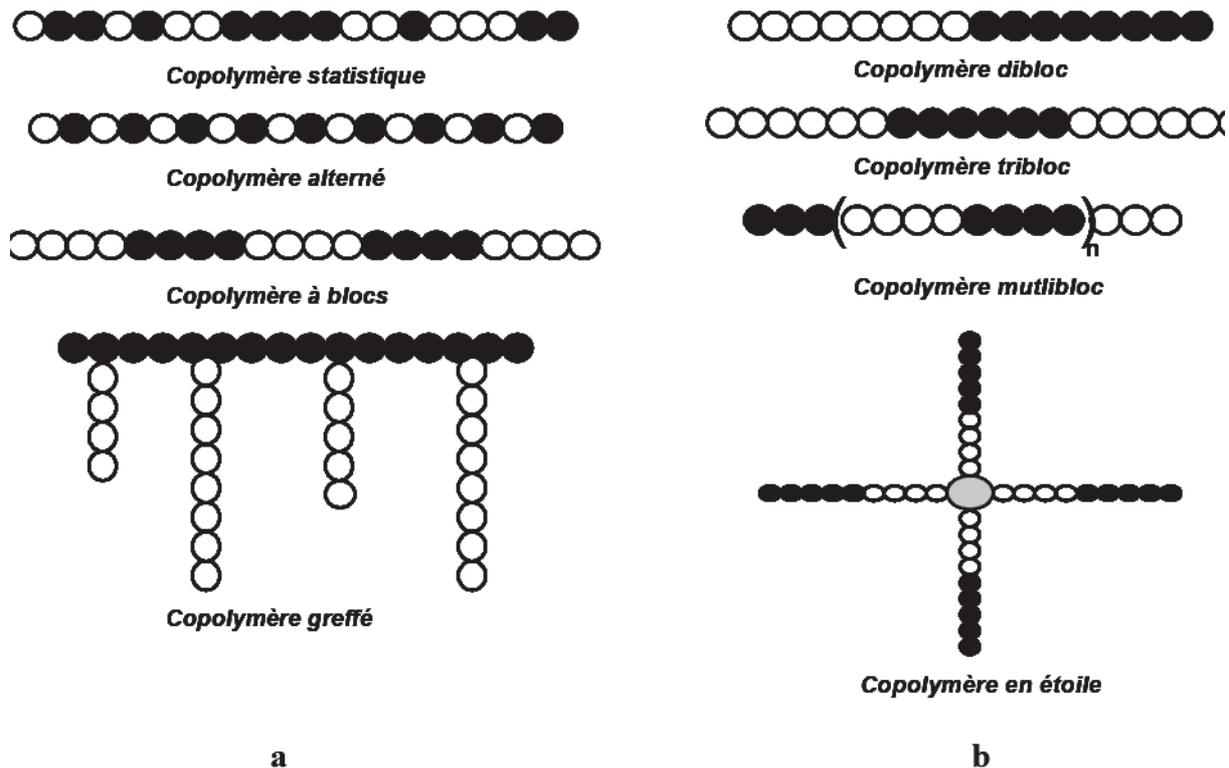


Figure 31: Exemples d'architectures de copolymères (Kumar *et al.*, 2001).

2.2. Polymère greffé

Les polymères greffés correspondent à des composés macromoléculaires obtenus par polymérisation de monomères sur des polymères préformés ou sur des matériaux inorganiques (Figure 31). De tels polymères préformés peuvent être des caoutchoucs, des polysaccharides, des polymères de condensation, des homopolymères.

2.3. Les copolymères amphiphiles

Les copolymères amphiphiles sont des composés organiques possédant une longue chaîne aliphatique linéaire associée soit à une charge cationique, soit à une charge anionique. De manière générale, lorsqu'il qualifie un polymère, ce terme traduit la présence au sein de la macromolécule de blocs ou segments liés de manière covalente et ayant un caractère hydrophile pour les uns et hydrophobe pour les autres (IUPAC, 1974). Lorsque la partie

hydrophile est une unité appelée « ose », un oligosaccharide ou un polysaccharide, ce copolymère amphiphile s'appelle glycopolymère.

Par conséquent, un glycopolymère est une macromolécule contenant une partie polymère de synthèse et une partie contenant des sucres (unité ose, oligosaccharide ou polysaccharide). Selon le sens strict ou élargi de la définition, la partie sucre assure ou non une certaine activité biologique. Bien que de nombreux articles ont été réalisées sur des glycopolymères constitués d'une unité ose, di- ou trisaccharide, peu de travaux sur les glycopolymères comportant une partie polysaccharidique sont mentionnés dans la littérature et la maîtrise de l'architecture des composés synthétisés est très rare (Dupayage *et al.*, 2008).

3. La Polymérisation Radicalaire

Parmi toutes les techniques de polymérisation (anionique, cationique ou radicalaire), la polymérisation radicalaire est celle qui présente les exigences expérimentales les plus avantageuses. Ces exigences se resument notamment en termes de purification des réactifs, de conditions de température et de pression, de procédés ou de gammes de monomères polymérisables. Ceci explique sa large utilisation dans le domaine industriel et elle reste à l'heure actuelle la technique la plus étudiée au niveau académique (Moad and Solomon, 2006).

La polymérisation radicalaire est une méthode de polymérisation très utilisée parce qu'elle s'applique à un très grand nombre de monomères insaturés tels que : esters acryliques ou méthacryliques, styréniques, acrylonitrile, chlorure de vinyle, etc.

De plus, elle peut être réalisée par des procédés et des conditions opératoires diverses. Le mécanisme réactionnel impliqué dans la polymérisation radicalaire consiste en une réaction en chaîne pour laquelle le site réactionnel est un radical libre. Ce mécanisme comprend quatre étapes élémentaires qui peuvent avoir lieu simultanément. Ces étapes correspondent à l'initiation, à la propagation, au transfert et à la terminaison.

3.1. Polymérisation en milieu hétérogène

3.1.1. Généralités

Les procédés de polymérisation radicalaire en milieu aqueux dispersé sont très utilisés dans l'industrie. Selon les conditions expérimentales, c'est-à-dire la nature des composés (monomère, tensioactif, initiateur,...) et selon le mécanisme de formation des particules, plusieurs procédés peuvent être décrits tels que l'émulsion, la miniémulsion et la suspension (Moad and Solomon, 2006).

Contrairement aux procédés en milieu homogène comme la polymérisation en masse, qui se déroule au sein du mélange monomère/polymère, ou la polymérisation en solution qui nécessite une bonne solubilisation des monomères et des polymères, les procédés de polymérisation en milieu aqueux dispersé sont très intéressants. En fait, ils présentent de nombreux avantages (Moad and Solomon, 2006) :

- Aucun solvant organique autre que le (s) monomère (s) ne sont requis ;
- D'un point de vue thermodynamique, la chaleur de la réaction est absorbée par la phase aqueuse et permet ainsi d'éviter les emballements thermiques ;
- Les conversions finales sont plus élevées et il reste donc très peu de monomère résiduel ;
- Les vitesses de polymérisation et les degrés de polymérisation sont plus élevés ;
- La viscosité des produits obtenus est plus faible ;
- La mise en œuvre et l'utilisation de ces produits peut se faire directement (latex) ou bien indirectement (film à partir de latex) ;
- Ces produits sont utilisés dans de nombreux domaines (peintures, adhésifs...).

3.1.2. Les différents procédés

Il est possible de distinguer trois principaux procédés : le procédé discontinu, le semi-continu et le continu.

Dès l'instant où tous les réactifs sont mis en contact, le procédé discontinu ne permet de faire varier que quelques paramètres tels que la température, la géométrie ou le type de réacteur et la vitesse d'agitation.

Il se conçoit que le procédé semi-continu est beaucoup plus attrayant d'un point de vue industriel que le procédé discontinu parce qu'il est plus flexible. En effet, il est possible d'influer non seulement sur tous les paramètres mais aussi sur la durée et la vitesse d'introduction des réactifs restants (monomère, tensioactif, initiateur,...). Ces paramètres supplémentaires vont permettre en outre de mieux contrôler la vitesse de polymérisation, la composition d'un copolymère, la stabilité de l'émulsion ou encore la structure des particules. A cela, il est possible de rajouter la polymérisation dans laquelle un latex déjà constitué est introduit dans le réacteur et sert d'initiateur pour une nouvelle étape de polymérisation.

3.2. Polymérisation en milieu homogène

3.2.1. Polymérisation en masse

La polymérisation en masse s'effectue en l'absence de solvant, le monomère lui-même devenant le solvant de réaction. Ce type de polymérisation présente l'avantage d'être très rapide et permet ainsi d'augmenter le taux de conversion des monomères. Ce procédé est utilisé dans la plupart des grosses unités de production. Elle permet également d'obtenir des masses molaires moyennes très élevées et de contrôler les longueurs de chaîne grâce à l'introduction d'un agent de transfert. Cependant, la viscosité du milieu réactionnel augmentant considérablement au cours de la polymérisation, il devient difficile d'assurer un mélange par agitation, notamment en fin de réaction.

Par conséquent, les réactions les plus exothermiques peuvent être très difficilement contrôlées et peuvent donner lieu à la formation de gels ou des emballements thermiques.

3.2.2. Polymérisation en solution

Dans ce type de procédé, la polymérisation s'effectue dans un solvant du monomère et du polymère. Le principal avantage de cette polymérisation est la faible augmentation de la viscosité du milieu, comparée à celle de la polymérisation en masse. La température du milieu réactionnel est limitée par la température d'ébullition du mélange solvant / monomère. Ceci permet d'éviter tout emballement du réacteur et d'obtenir des masses molaires importantes. Le solvant agit donc à la fois comme un volant thermique et un réducteur de viscosité. Néanmoins, plusieurs inconvénients sont à noter :

- La dilution dans le solvant conduit à diminuer la concentration en monomère, ce qui engendre un ralentissement de la réaction et une chute du rendement.
- Le solvant peut jouer le rôle d'agent de transfert. Cela engendre une diminution de la longueur moyenne de la chaîne macromoléculaire.
- Les quantités importantes de solvant mises en jeu induisent la mise en place de réacteurs de gros volumes dont les coûts d'investissement sont élevés. De plus, il faut prévoir des unités de recyclage du solvant pour diminuer les coûts de fonctionnement.
- La récupération du polymère est obtenue généralement par précipitation dans un solvant adapté. Cette opération se révèle bien souvent difficile et est relativement onéreuse car il est souvent difficile de faire précipiter le polymère sous une forme pulvérulente, facilement filtrable. De plus, le retraitement du surnageant est une opération coûteuse (généralement par distillation).

Ce type de procédé est généralement utilisé pour la production de polymères de faibles masses molaires. Les solvants utilisés présentent des constantes de transfert élevées (chloroforme ou tétrachlorométhane). Ce procédé est également utilisé lorsque le polymère est directement utilisable sous sa forme dissoute. A titre d'exemple, on peut citer les solutions de poly (acrylates) qui peuvent être directement utilisées dans l'industrie des peintures et des vernis.

4. Polymérisation radicalaire en émulsion par voie redox

Un procédé de polymérisation en milieu aqueux dispersé est plus adéquat pour réaliser des greffages sur des macromolécules d'origines naturelles. Ces procédés permettent d'effectuer un greffage de monomères insaturés tels que des monomères acryliques par une polymérisation radicalaire sur des polysaccharides (Casinos, 1992; Moad and Solomon, 2006). Cette méthode nécessite un déclenchement de la réaction à l'aide des initiateurs qui oxydent divers substrats organiques dans un milieu acide. Ces mécanismes impliquent généralement des intermédiaires radicalaires (Mr *et al.*, 2000).

De nombreux couples redox contenant des composés organiques et inorganiques considérés comme initiateurs de polymérisation ont été utilisés. Les oxydants les plus couramment utilisés sont les peroxydes, les persulfates, les permanganates, et les sels de transition de métaux tels que le nitrate d'ammonium et de cérium (IV). Ces oxydants présentent un potentiel d'oxydo-réduction qui diffère en fonction des divers agents réducteurs utilisés comme les alcools, les aldéhydes, les amines, les amides, les cétones, les acides, les thiols (Yildiz and Hazer, 2000; Jayakumar *et al.*, 2005).

La polymérisation radicalaire par voie redox est la méthode de polymérisation radicalaire la plus intéressante parce que (Cigdem and Ufuk, 2005) :

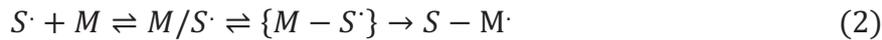
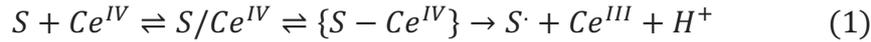
- le temps d'induction est très court ;
- l'énergie d'activation est basse ;
- la production de polymères à poids moléculaires élevés se fait avec un très bon rendement ;
- Le contrôle de la réaction à basse température est aisé et ce, dû à la réduction des réactions secondaires (homopolymères).

Dans ce type de réaction, l'oxydant forme initialement un complexe en réagissant avec une molécule organique. Par la suite, ce complexe se décompose en produisant des radicaux libres qui vont initier la polymérisation.

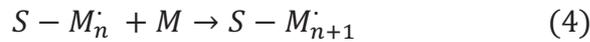
Lorsque ces derniers se trouvent en présence d'un monomère, ils peuvent initier la polymérisation (Han *et al.*, 2003; Kumbar *et al.*, 2003; Echeverria *et al.*, 2005; Romaškevič *et al.*, 2007).

Le mécanisme général d'une polymérisation radicalaire en émulsion par redox de cérium (IV) est représentée à la Figure 32 (Casinos, 1992; Mr *et al.*, 2000).

- Initiation



- Propagation



- Terminaison

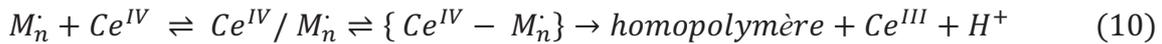
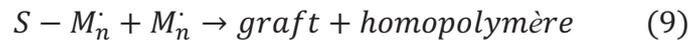
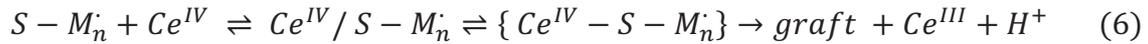


Figure 32: Mécanisme général d'une polymérisation radicalaire en émulsion par oxydoréduction de cérium (IV). Ainsi, S représente un substrat polysaccharidique et M représente un monomère (Casinos, 1992; Mr *et al.*, 2000).

Sur le plan de la polymérisation, l'intervention de l'ion cérium, dans le cadre des réactions, conduit à l'apparition d'un proton dans le milieu suite à l'oxydation d'une espèce organique. Ce phénomène engendre une diminution de pH au fur et à mesure que la réaction se déroule.

Cette méthode de polymérisation a été utilisée pour préparer le dextran-b-poly alkylcyanoacrylate (Figure 33). Elle consiste à disperser une solution de nitrate d'ammonium et de cérium (IV), $(NH_4)_2Ce(NO_3)_6$, dans l'émulsion en présence du dextran. La phase

continue doit être acidifiée (HNO_3 , $\text{pH}=1$). L'ion Ce^{+4} est capable d'ouvrir le cycle glucopyranose du dextran par réaction d'oxydation et permet ainsi la production d'un radical libre macromoléculaire. Lorsque l'oxydation par l'ion Ce^{+4} est obtenue, la chaîne de dextran est divisée en deux parties : un fragment long et un fragment court. Au même moment, un radical est créé sur la chaîne de l'un des fragments du dextran. Suite à la formation de ce radical, les monomères se polymérisent par réaction radicalaire à partir de ce macroamorceur (Chauvierre *et al.*, 2003b).

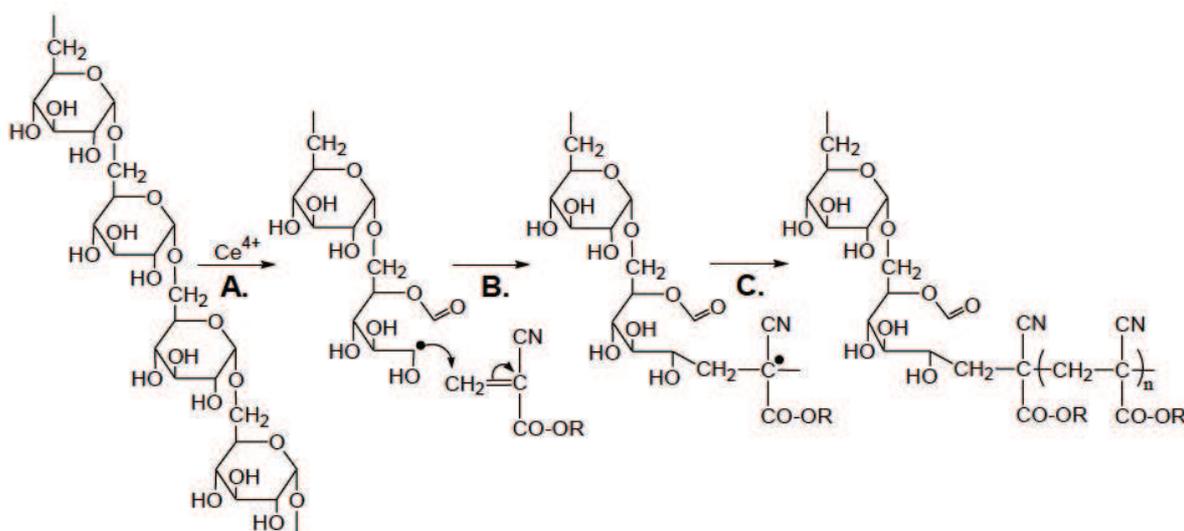


Figure 33: Mécanisme de la polymérisation redox des alkylcyanoacrylates (ACAs) sur le dextran pour former le dextran-b-PACA (Chauvierre *et al.*, 2003b).

Cependant, sur la Figure 33, A représente la formation du radical macromoléculaire, B l'initiation de la polymérisation des ACAs par le radical macromoléculaire et C la prolongation de la chaîne et la formation d'un copolymère à bloc Dex-b-PACA.

La même méthode a été utilisée pour synthétiser plusieurs copolymères diblocs comprenant un bloc hydrophobe tels que : le poly méthacrylate de glycidyle, le poly isobutyl cyanoacrylate d'une part et un bloc polysaccharidique tels que le dextran, le chitosan, la pectine et l'amidon d'autre part (Castellano *et al.*, 1997; Chauvierre *et al.*, 2003a; Han *et al.*, 2003; Alias *et al.*, 2007).

5. Matériels et méthodes

5.1. Matériels

Le dextran (70, 45, 10 et 1,5 KDa), l'acrylate de méthyle (MA), méthacrylate de méthyle (MMA), l'acide méthacrylique (MAA), l'acide nitrique, le nitrate de cérium

ammonium sont fournis par Sigma Aldrich Chimie (Saint-Quentin Fallavier, France). La théophylline anhydre est obtenue auprès de FMC (Bezons, France).

5.2. Synthèses de copolymères à tétra blocs de type Dex-A-B-C

La synthèse des différents copolymères à blocs repose sur l'initiation d'une méthode de polymérisation radicalaire par voie redox en utilisant les ions cérium (IV) (Chauvierre *et al.*, 2003b; Bertholon *et al.*, 2006). Le mécanisme général de copolymérisation est montré sur la

Figure 34. Les conditions de synthèse sont résumées dans le Tableau 20. Le méthacrylate de méthyle et l'acide méthacrylique ont été distillés respectivement à température de 85 et de 140°C sous vides avant la réaction.

De manière brève, cette synthèse s'effectue de la façon suivante : 2,2 g de dextran sont préalablement dissous dans 32 mL d'acide nitrique (0,2 mol/L) dans un ballon tricol de 500 mL muni d'un condenseur. Le mélange réactionnel est mis sous agitation magnétique et sous atmosphère inerte (courant d'argon) à 60 °C. L'argon est utilisé pour éliminer l'oxygène dissous qui agirait comme inhibiteur de la réaction. Après 20 min, les volumes prédéterminés des solutions de cérium (IV) (0,08 mol/l) et du premier monomère sont ajoutés sous forte agitation. Après 20 min, les quantités prédéterminées de cérium (IV) (0,08 mol/l) et du deuxième monomère sont ajoutés sous forte agitation. Après 20 min les quantités prédéterminées de cérium (IV) (0,08 mol/l) et du troisième monomère sont ajoutés sous forte agitation. Enfin, 20 min après la dernière addition, le barbotage d'argon a été stoppé et la réaction se poursuit encore pendant 50 min sous agitation douce. Le mélange réactionnel (suspension blanche) est refroidi à température ambiante et est ensuite placé dans une membrane de dialyse (Spectra/Por Membrane, avec un seuil de coupure de 500 g/mol) et est dialysé pendant 72 h contre 1 litre d'eau. L'eau utilisée est renouvelée trois fois pendant les 90 premières min et ensuite une fois chaque 24 h. Après la dialyse, le mélange est récupéré sous forme sèche suite à une étape de lyophilisation (Alpha 2-4 LCS, Bioblock Scientific, Illkirch, France).

Tous les copolymères à blocs synthétisés sont repris dans le Tableau 20. Le nombre de copolymères à blocs souhaités figure pour chaque type de copolymères.

Les copolymères à triblocs et tétra blocs sont respectivement préparés à la base de quatre types de dextran (Tableau 20). Des dextrans de masses moléculaires de 70 ; 45 ; 10 et 1,5 kDa ont été mis en œuvre pour réaliser les différentes réactions.

Tableau 20: Condition de synthèse des différents copolymères à blocs préparés.

Copolymères à blocs	Volume (mL)		Volume (mL)		Volume (mL)	
	MA	Ce ⁺⁴	MMA	Ce ⁺⁴	MA A	Ce ⁺⁴
Dex70-b-PMA	13,8	50	-	-	-	-
Dex70-b-PMMA	-	-	13,8	48	-	-
Dex70-b-PMAA	-	-	-	-	13,8	50
Dex70-b-P(MA-b-MMA) (50 :50) Dex (5)	6,8	25	6,8	25	-	-
Dex-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (65 :25 :10) Dex (1)	9,1	32	12,5	3,5	5	1,4
Dex-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (1:1 :1) Dex (2)	4,66	16,66	4,66	16,66	4,6	16,66
Dex-b-P(MA-b-MAA) (70 :30) Dex (3)	10	35	-	-	15	4
Dex-b-P(MA-b-MAA) (90 :10) Dex (4)	12,6	45	-	-	1,4	5

B= bloc ; P= polymère

5.3. Purification des copolymères à blocs

Les produits récupérés après la réaction de polymérisation correspondent à des produits bruts comprenant des copolymères à blocs, du dextran libre et aussi des homopolymères libres. Il est nécessaire de les purifier.

Pour déterminer la quantité de dextran libre, la quantité du produit brut récupéré a été dispersée dans l'eau sous agitation pendant 30 min puis placée dans une membrane de dialyse (Spectra/Por Membrane MWCO avec un seuil de coupure de 100, 40-45,12-14 et 1,5 kDa) dépendant respectivement du type de dextran (70 ; 45 ; 10 et 1,5 kDa) et dialysé pendant 72 h contre 1 litre d'eau. L'eau est renouvelée trois fois pendant les 90 premières min et ensuite une fois chaque 24 h. Après la dialyse, le mélange est congelé dans l'azote liquide puis est lyophilisé (Alpha 2-4 LCS, Bioblock Scientific, Illkirch, France). La quantité de dextran libre est déterminée par analyse gravimétrique.

Pour déterminer la quantité d'homopolymère, l'extraction est réalisée à l'aide d'un Soxhlet, méthode la plus couramment rencontrée. Le produit précédent a été placé dans un extracteur de type Soxhlet en présence de 200 mL d'acétone (Dex-b-PMA, Dex-b-PMMA) (Fanta *et al.*, 1982; Derkaoui *et al.*, 2008), de méthanol (Dex-b-MAA) ou de tétrahydrofurane (les autres copolymères à blocs) (Kim *et al.*, 2007) pendant 18 h. Suite à l'extraction, le produit est séché à 50°C pendant 24 h. La quantité d'homopolymère est déterminée par analyse gravimétrique

(Alias *et al.*, 2007). Le copolymère à blocs à base de dextran qui résulte de cette purification correspond au produit « pur ».

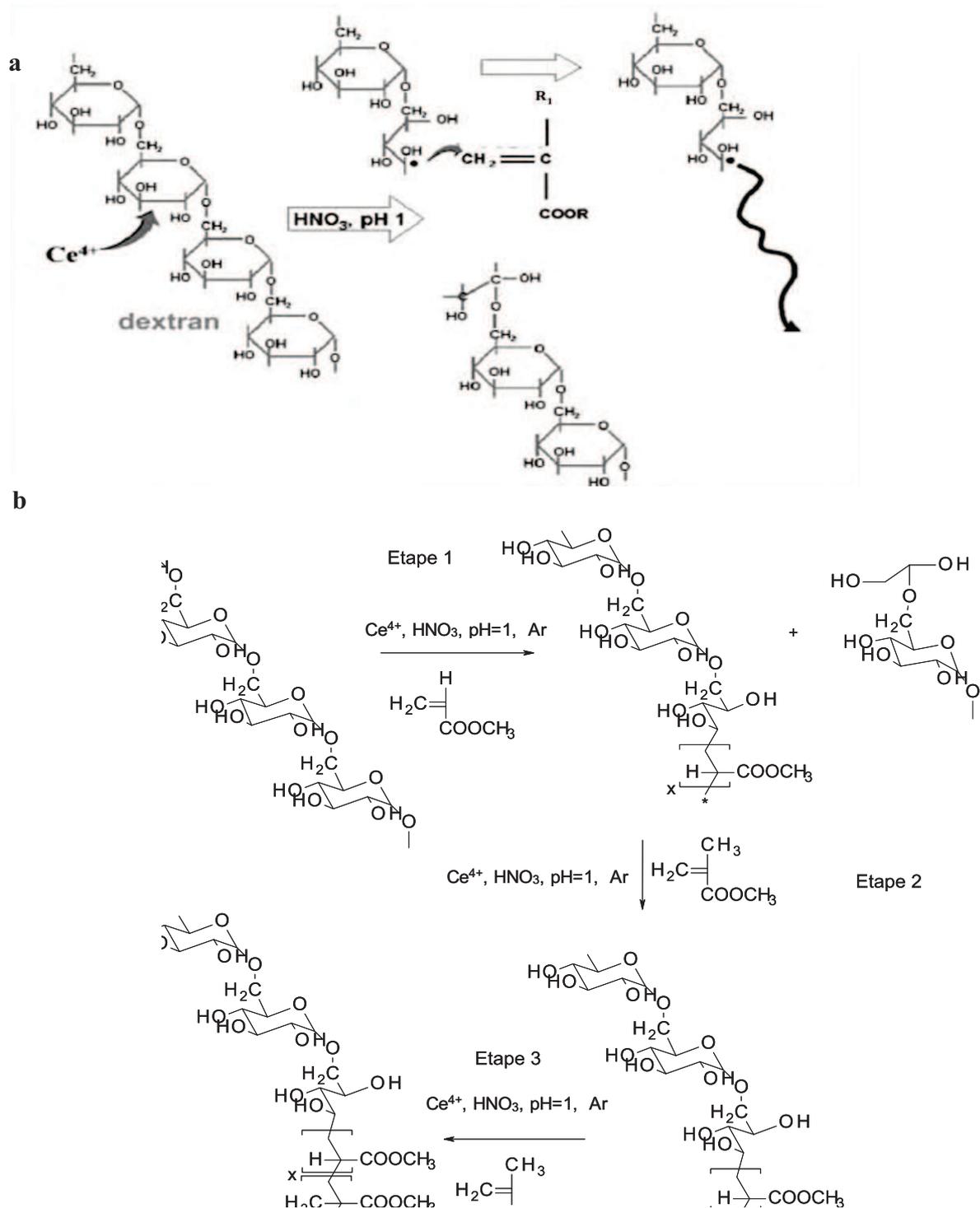


Figure 34: Schéma général représentant le (a) mécanisme de polymérisation radicalaire par voie redox, (b) la synthèse du dextran-b-P (MA-b-MMA-b-MAA).

5.4. Caractérisation des copolymères à blocs

Les mêmes méthodes que celles décrites dans le chapitre précédent (chapitre 2, paragraphe 3.3) ont servi à caractériser les copolymères à blocs à base de dextrans. Il est important de préciser que le DMSO d_6 a été utilisé pour préparer les échantillons destinés à une analyse par RMN 1H et du ^{13}C .

5.5. Paramètres de la copolymérisation

Pour bien identifier et caractériser les différents types des copolymères à blocs synthétisés, plusieurs paramètres doivent être déterminés (Alias *et al.*, 2007).

5.5.1. Pourcentage d'efficacité de greffage GE%

Il s'agit du pourcentage de la quantité du copolymère à bloc pur (après l'extraction au Soxhlet) par rapport à la quantité du copolymère à blocs brut.

$$GE\% = \frac{\text{Copolymère à blocs purs (g)}}{\text{Copolymère à blocs bruts (g)}} \times 100 \quad (1)$$

5.5.2. Pourcentage de greffage G%

Il s'agit du pourcentage de la quantité des copolymères à blocs acryliques par rapport à la quantité du bloc de dextran.

$$G\% = \frac{\text{Copolymères à blocs acryliques (g)}}{\text{Bloc de dextran (g)}} \times 100 \quad (2)$$

Pour déterminer la quantité des copolymères à blocs acryliques, une méthode d'hydrolyse dans l'acide chlorhydrique (1 N) a été utilisée pour hydrolyser le bloc de dextran. La réalisation se fait de la manière suivante. Dans un ballon de 50 mL muni d'un condenseur, une quantité de l'ordre de 150 mg de copolymère à blocs pur est placée dans 25 mL d'acide chlorhydrique (1N) sous agitation magnétique à 150 °C dans un bain d'huile pendant 6 h. Lorsque cette opération est terminée, les blocs acryliques précipités sont récupérés par filtration, sont nettoyés à l'aide d'un solvant adapté et ensuite sont séchés à 50°C pendant 24 h. Ensuite, ces copolymères à blocs acryliques ont été caractérisés par RMN 1H . Les filtrats ont été placés dans un ballon de 50 mL et le volume a été complété à l'aide d'eau distillée. Pour déterminer la concentration des oligosaccharides

dégradés suite à l'hydrolyse acide, la méthode au réactif de Sumner a été utilisée (précédemment expliquée au chapitre 2, paragraphe 3.4) (Hennink *et al.*, 1997; Franssen *et al.*, 1999).

5.5.3. Pourcentage de conversion total TC%

Il s'agit du pourcentage de la quantité des copolymères à blocs acryliques (homopolymères libres inclus) par rapport à la quantité des monomères initiaux utilisés.

$$TC\% = \frac{\text{Copolymères à blocs acryliques (g)}}{\text{Monomères initiaux (g)}} \times 100 \quad (3)$$

5.5.4. Pourcentage des homopolymères libres FP%

Il s'agit du pourcentage de la quantité d'homopolymères à blocs acryliques isolés après l'extraction au Soxhlet par rapport à la quantité de copolymère à blocs brut.

$$FP\% = \frac{\text{Homopolymères acryliques (g)}}{\text{Copolymère à blocs bruts (g)}} \times 100 \quad (4)$$

5.5.5. Pourcentage du dextran libre FD%

Il s'agit du pourcentage de la quantité de dextran libre isolé par rapport à la quantité de copolymère à blocs brut.

$$FD\% = \frac{\text{Dextran libre (g)}}{\text{Copolymère à blocs bruts (g)}} \times 100 \quad (5)$$

5.6. Etude de la dégradation enzymatique *in vitro* des différents copolymères à blocs à base de dextrans par la dextranase

La méthode d'étude de la dégradation enzymatique *in vitro* précédemment décrite (Chapitre 2, paragraphe 3.4) a été mise en œuvre. Une concentration de 15 U/mL en dextranase a été mise en œuvre pour étudier la dégradation enzymatique.

5.7. Préparation de films isolés

Pour préparer les films isolés à base de différents copolymères à blocs à base de dextrans, le protocole suivant a été utilisé. 15% (m/m) du copolymère à blocs à base de dextran sont dispersés dans un mélange de tétrahydrofurane et de méthanol (50:50) sous forte agitation magnétique pendant 24 h. Par la suite, une solution de citrate de triéthyle a été

ajoutée comme plastifiant dans un rapport (1 : 6) (plastifiant : copolymère sec). Une solution à 10% (m/m) de copolymère à blocs à base de dextran est obtenue en ajoutant un mélange de tétrahydrofurane et de méthanol (50:50). Une agitation magnétique est maintenue pendant quatre h. Les dispersions finales sont passées à travers un tamis de 0,5 mm d'ouvertures de mailles, pour éliminer les éventuels agglomérats, avant d'être immédiatement utilisées pour préparer les films. Les films isolés sont obtenus après étalement d'un volume précis de dispersion dans un moule en téflon. Le séchage est réalisé sous hotte ventilée pendant 24 h à température ambiante. Lorsque les films sont secs, les moules sont transférés pendant 24 h dans une enceinte climatique dont l'humidité relative est de 100%. Les films sont alors découpés pour réaliser les différentes expérimentations.

Les épaisseurs des films sont contrôlées à l'aide d'un comparateur d'épaisseur (Kafer, Allemagne). Les films ayant une épaisseur moyenne de 150 à 200 μm ont été sélectionnés. La valeur moyenne résulte de la prise de cinq mesures différentes. Les films isolés obtenus sont alors conservés dans une enceinte climatique dont l'humidité relative est de 50%. Ce taux d'humidité est obtenu en introduisant dans l'enceinte climatique une solution saturée (66% m/m) de nitrate de magnésium hexahydraté à température ambiante.

5.8. Etude de perméabilité du principe actif à travers le film isolé

La méthode précédemment décrite dans le Chapitre 2 (paragraphe 3.6) a été mise en œuvre pour étudier la perméabilité du principe actif à travers le film isolé mais sans dextranase.

6. Résultats et discussions

6.1. Synthèse et caractérisation des nouveaux copolymères à blocs à base de dextrans

La synthèse des différents copolymères diblocs (Tableau 21) a été réalisée selon une méthode de polymérisation radicalaire en émulsion par voie redox qui a été largement utilisée pour synthétiser des copolymères diblocs à base de polysaccharides (Figure 34). A cette méthode décrite dans la littérature, une ou deux étapes successives supplémentaires ont été ajoutées afin de préparer respectivement les triblocs et les tétrablocs copolymères.

Le choix des monomères acryliques ou méthacryliques est basé sur le fait que leurs copolymères sont non toxiques. A titre d'exemple, la littérature mentionne pour l'Eudragit[®] FS une dose de 20 mg/kg (Skalsky and Petereit, 2008). De plus, ces copolymères bénéficient déjà d'une longue expérience d'utilisation dans le domaine pharmaceutique, notamment pour

l'enrobage de formes galéniques pour protéger et/ou modifier la libération des principes actifs.

Les rôles des blocs polymères acryliques dans les copolymères à blocs à base de dextran sont très variables. Les blocs de polyacrylate de méthyle et de polyméthacrylate de méthyle constituent des polymères hydrophobes qui permettent de rendre le dextran insoluble dans les milieux aqueux. Le bloc d'acide polyméthacrylique possède un rôle très important dans ce système, car il permet de solubiliser les copolymères à blocs de dextrans à des valeurs bien définies de pH. Ce bloc polymère anionique possède des groupements carboxyliques qui vont s'ioniser lorsque le pH intestinal augmentera et conduira à la solubilisation des copolymères à blocs dans la partie inférieure du tractus gastro-intestinal (Siepmann *et al.*, 2008; Skalsky and Petereit, 2008). Par conséquent, le taux d'acide polyméthacrylique présent dans les copolymères à base de dextrans permettra de faire varier le lieu de la solubilisation dans le tube digestif. Les différents copolymères à blocs de dextrans synthétisés présentent des solubilités très variables dans des solvants organiques tels que le tétrahydrofurane, le méthanol ou l'isopropanol, l'eau, mais également dans des solutions aqueuses tamponnées à pH 1,2 ; 6,4 et 7,2.

Suite à ces analyses de solubilités, il a été constaté que ces copolymères à blocs à base de dextran 70, 45 et 10 kDa sont insolubles dans les solvants organiques mentionnés ci-dessus. Les copolymères à blocs à base de dextrans 1,5 ont montré une bonne solubilité dans ces solvants. Cette dernière observation peut s'expliquer par la petite taille du bloc de dextran dans ce type de copolymère à blocs synthétisés. En ce qui concerne la solubilité en milieux aqueux, ces copolymères à blocs ne se dissolvent ni dans l'eau ni dans un tampon à pH 1,2. Les copolymères à blocs à base de dextran constitués d'un bloc d'acide polyméthacrylique se solubilisent légèrement (en formant des suspensions) dans les solutions constituées de tampons à pH 6,4 et 7,2. Il a été observé que ce comportement est directement proportionnel au taux d'acide polyméthacrylique présent dans les copolymères à blocs à base de dextrans synthétisés (Tableau 21) (Skalsky and Petereit, 2008).

Les paramètres de la copolymérisation des différents copolymères à blocs à base de dextran synthétisés sont mentionnés au Tableau 21. Les valeurs reprises dans ce tableau permettent de constater que :

- Parmi les copolymères diblocs synthétisés, c'est le dex-b-PMA qui présente le taux de greffage (G%), l'efficacité de greffage (GE%) et le taux de conversion total (TC%) les plus élevés comparé aux autres diblocs copolymères (dex-b-PMMA et au dex-b-PMAA).

Tableau 21: Différents paramètres caractéristiques des copolymères à blocs à base de dextrans et d'acides polyacryliques.

Copolymères à blocs à base de dextrans	GE%	G%	TC%	FP%	FD%	Rapport entre les blocs polyacryliques (RMN ¹ H)	Rapport du Dextran : blocs polyacryliques
Dex70-b-PMA	69	1333	54	15	17	-	(17: 83)
Dex70-b-PMMA	50	322	28	26	15	-	(21: 79)
Dex70-b-PMAA	31	106	17	29	23	-	(30: 70)
Dex70-b-P(MA-b-MMA) (50 :50)	75	674	74	13	12	(59 : 41)	(15 :50 :35)
Dex70-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (65 :25 :10)	70	1255	70	13	14	(70: 23: 6)	(12: 62: 20: 6)
Dex70-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (1 :1 :1)	73	950	58	14	12	(48: 28: 24)	(9: 43: 26: 22)
Dex70-b-P(MA-b-MAA) (70 :30)	77	936	66	12	11	(83: 17)	(8: 77: 15)
Dex70-b-P(M-b-MAA) (90 :10)	69	1125	77	19	12	(94: 6)	(9: 86: 5)
Dex45-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (65 :25 :10)	69	1031	74	18	13	(71: 22: 6)	(11: 63: 21: 5)
Dex45-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (1 :1 :1)	76	957	59	14	10	(47: 29: 24)	(9: 42: 27: 22)
Dex45-b-P(MA-b-MAA) (70 :30)	71	826	62	16	13	(81: 19)	(10: 74: 16)
Dex45-b-P(MA-b-MAA) (90 :10)	71	1133	60	17	12	(94: 6)	(9: 86: 5)
Dex10-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (65 :25 :10)	68	1008	76	19	13	(70: 23: 7)	(7: 65: 21: 7)
Dex10-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (1 :1 :1)	66	957	66	20	14	(47 :34 :19)	(12 :41 :30 :16)
Dex10-b-P(MA-b-MAA) (70 :30)	71	929	77	15	14	(86: 14)	(10: 77: 13)
Dex10-b-P(MA-b-MAA) (90 :10)	70	914	82	18	12	(94: 6)	(10: 86: 4)
Dex1,5-b-P(MA-b-MMA-b-MAA)(65 :25 :10)	87 ⁽¹⁾	1088	71	- ⁽²⁾	13	(72: 23: 5)	(12: 63: 20: 5)
Dex1,5-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (1 :1 :1)	86 ⁽¹⁾	957	62	- ⁽²⁾	14	(46: 29: 26)	(9: 41: 27: 23)
Dex1,5-b-P(MA-b-MAA) (70 :30)	67 ⁽¹⁾	950	70	- ⁽²⁾	13	(84: 16)	(8: 78: 14)
Dex1,5-b-P(MA-b-MAA) (90 :10)	87 ⁽¹⁾	1008	72	- ⁽²⁾	13	(94: 6)	(9: 86: 5)

- (1) la quantité de l'homopolymère est incluse.
- (2) indéterminé parce que les copolymères à blocs à base de dextran1,5 sont solubles dans les solvants organiques utilisés.

- Les triblocs et les tétrablocs copolymères synthétisés présentent des paramètres de la copolymérisation (GE%, G% et TC%) quasiment similaires.
- Quel que soit le type de copolymère à bloc synthétisés (diblocs, triblocs et tétrablocs), on constate que le pourcentage des homopolymères libres (PF%) et du dextran libres (DF%) varient entre 10% et 30 %.

6.2. Etudes spectroscopiques

Tous les copolymères à blocs à base de dextrans synthétisés ont été purifiés avant d'être analysés par les différentes méthodes d'analyses spectroscopiques.

6.2.1. Caractérisation par spectroscopie IRFT

Dans une première approche, les copolymères à blocs à base de dextrans ont été caractérisés par analyses IRFT. Cette méthode, extrêmement rapide et simple, permet de révéler la présence de certains groupements fonctionnels caractéristiques. En premier lieu, les bandes caractéristiques du dextran (Figure 35) seront décrites puis les bandes caractéristiques des différents types copolymères à blocs à base de dextrans seront détaillées. Dans le cadre de ces études, seules les bandes présentant un intérêt pour notre étude seront citées.

Tout d'abord, le spectre IRFT du dextran peut être décomposé suivant les fonctions qui le constituent :

- De 3000 à 3600 cm^{-1} , on observe principalement les vibrations d'élongations des liaisons O-H des fonctions alcools.
- Les bandes situées entre 1300 et 1450 cm^{-1} représentent les vibrations de déformation des fonctions O-H des groupes alcools.
- Entre 950 et 1200 cm^{-1} apparaissent les bandes de vibrations des liaisons C-O de ces mêmes groupes.
- La bande aux environs de 2900 cm^{-1} correspond aux vibrations d'élongations de la liaison C-H.

La modification chimique du dextran par copolymérisation radicalaire en émulsion des différents blocs acryliques sur le bloc de dextran se traduit sur les spectres IRFT (Figure 35) par la modification de plusieurs bandes et l'apparition d'autres :

- L'apparition d'une bande importante située aux environs de 1735 cm^{-1} , caractéristique de la fonction ester ou acide ;
- L'augmentation des vibrations d'élongation des CH_2 symétriques (2850 cm^{-1}) et asymétriques (2920 cm^{-1}), l'augmentation des vibrations de déformation hors du

plan des CH₂ (720 cm⁻¹) ainsi que l'augmentation des vibrations de déformation dans le plan des liaisons C-H (1468 cm⁻¹) traduisent également l'augmentation du nombre de chaînes de polymères (CH₂ et CH₃) ;

- L'apparition d'une bande située aux environs de 1330 cm⁻¹ correspond aux vibrations d'élongation des CH₃.

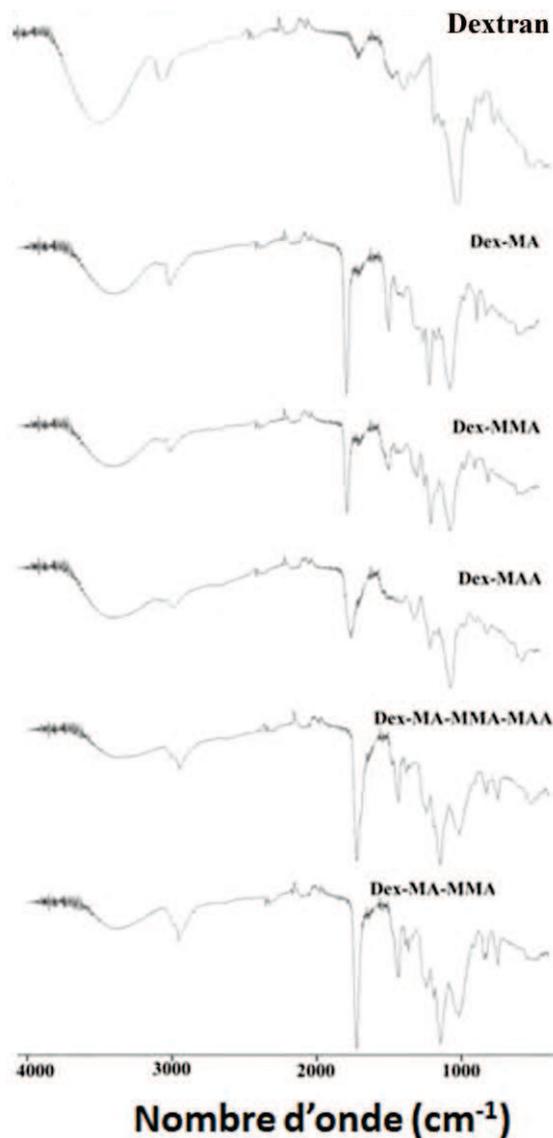


Figure 35: Spectres IRFT du dextran et des différents copolymères à blocs à base de dextrans et d'acides acryliques.

De manière générale, les bandes observées montrent une variation de leur importance qui peut être corrélée aux taux et aux types de monomère copolymérisés avec les dextrans. Ces observations montrent que les dextrans ont réellement été modifiés et sont en accord avec les travaux de la littérature traitant des dextrans modifiés suite à une copolymérisation avec

des monomères acryliques tels que le cyanoacrylate d'isobutyle ou l'acrylate de méthyle (Chauvierre *et al.*, 2003b; Derkaoui *et al.*, 2008).

6.2.2. Caractérisation par spectroscopies RMN ^1H et ^{13}C .

La spectroscopie RMN est l'une des techniques les plus employées pour obtenir des informations sur la structure des polysaccharides et de leurs dérivés. Son utilisation rapide et aisée en ont fait une technique de choix pour notre étude. Afin de déterminer l'ordre de copolymérisation des différents monomères acryliques, des analyses en RMN ^1H et ^{13}C ont respectivement été réalisées. Les spectres des copolymères à blocs à base de dextran70 ont présenté à la Figure 36. Les déplacements chimiques correspondants des différents groupements composants des copolymères à blocs à base de dextrans 70 sont repris dans le Tableau 22. En ce qui concerne les déplacements chimiques correspondants les autres copolymères à blocs à base d'autres dextrans (45, 10 et 1,5), nous observons qu'ils sont quasiment localisés aux mêmes positions.

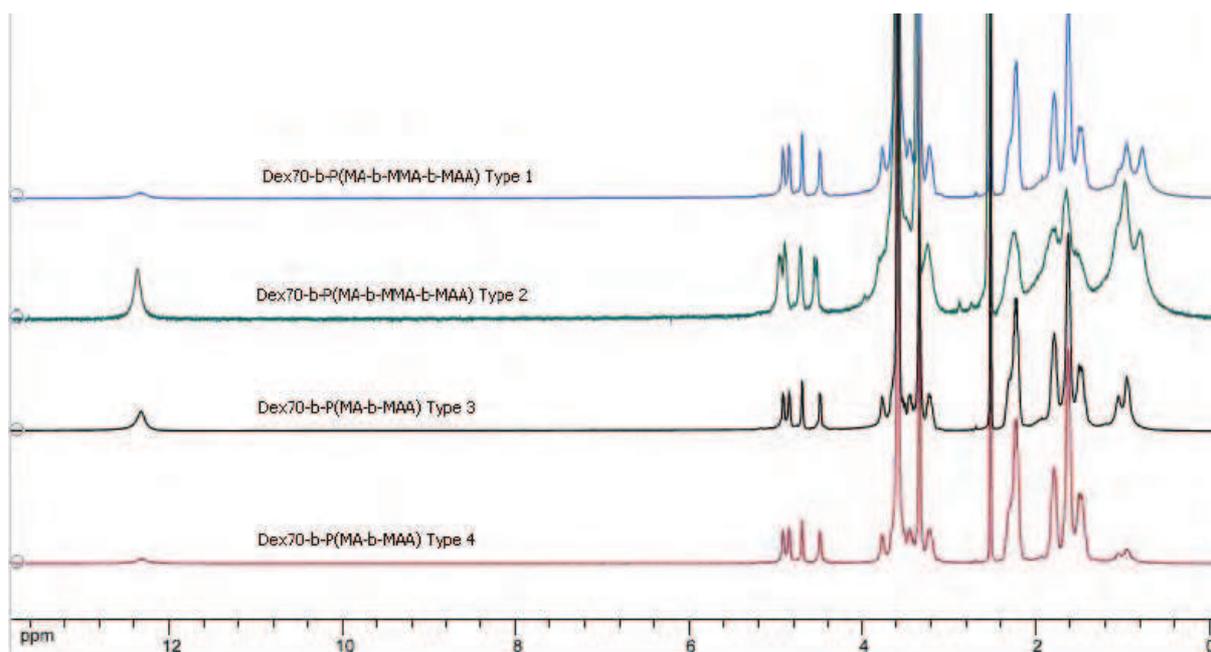


Figure 36: Spectre RMN ^1H des différents types des copolymères à blocs à base de dextran 70 dans DMSO-d_6 .

La Figure 36 représente les spectres RMN ^1H des différents types de copolymères à blocs à base de dextran 70 où le pic correspondant au proton anomérique ($\text{H}_{\text{anomérique}}$) du dextran est situé vers 4,7 ppm. Les fonctions hydroxyles (OH^2 , OH^3 et OH^4 situées respectivement sur les carbones 2, 3 et 4 d'une unité glucopyranose du dextran) sont localisées à 4,45, 4,88 et 4,92 ppm. En établissant une comparaison entre ce dernier et le spectre RMN ^1H du dextran (Figure 37 b), nous pouvons constater que les déplacements

chimiques des motifs dextran sont quasiment identiques, et qu'aucune influence des fonctions des copolymères acryliques n'est observé sur les déplacements chimiques des protons glucosidiques.

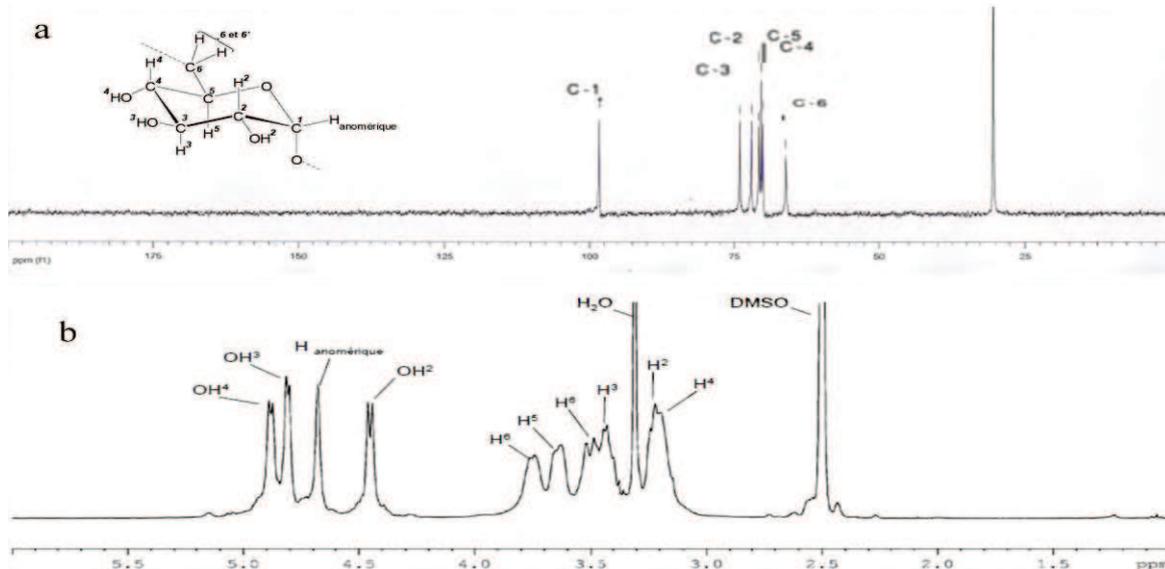


Figure 37: Spectres RMN 13C (a) et RMN 1H (b) du dextran dans du DMSO-d6.

La

Figure 38 représente le spectre RMN ¹H du Dex10-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (47 :34 :19). Ce spectre permet de distinguer les pics suivants : des trois larges pics communs (a, d et e) qui sont situés respectivement à 1,2-2,0 ; 3,5-3,7 et 0,4-1,2 ppm, le premier (a) correspond au groupement méthylène CH₂ des PMA, PMMA et PMAA. Le deuxième (d) correspond au groupement méthyle CH₃ du PMMA et au PMAA. Le dernier (e) correspond au groupement méthyle O-CH₃ lié au groupement ester du PMA et du PMAA.

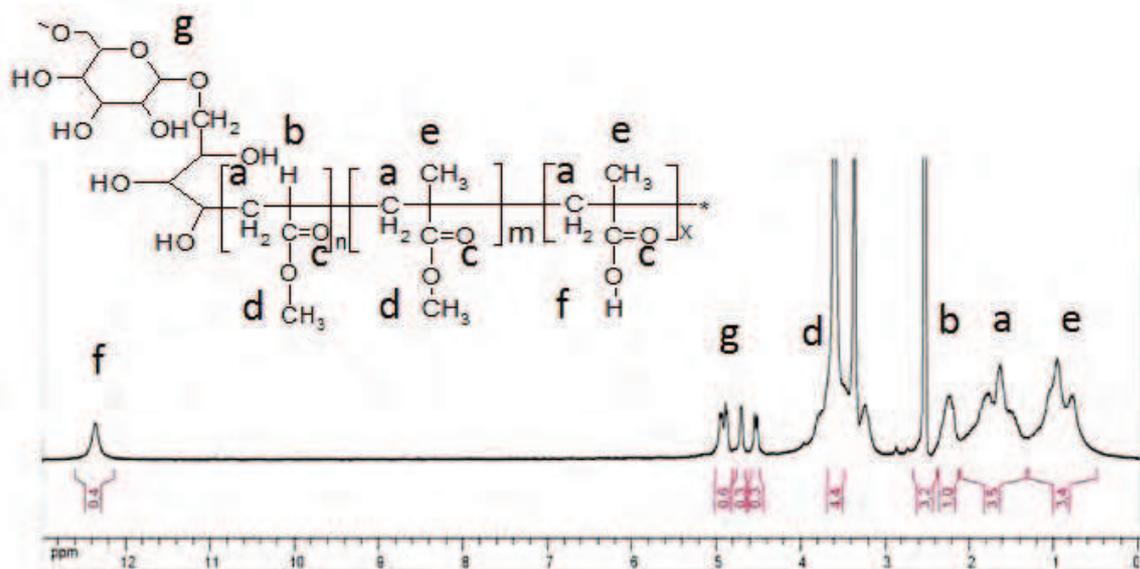


Figure 38: Spectre RMN 1H du dex10 (2) dans du DMSOd6.

Aussi que trois pics différentiels (b, g et f) qui sont situés respectivement à 2,2-2,4 ; 4,6-4,7 et 12,1-12,4 ppm. Ces trois pics correspondent respectivement au proton du groupement CH du bloc polyacrylate de méthyle (b), au proton anomérique de dextran (g) et au proton du groupement hydroxyle du bloc d'acide polyméthacrylique.

La Figure 39 représente le spectre RMN ¹H du dex-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) avant (A) et après (B) hydrolyse acide. Ces spectres permettent de mettre en évidence que ces copolymères à blocs sont bien composés d'un bloc de dextran et de trois blocs polyacryliques.

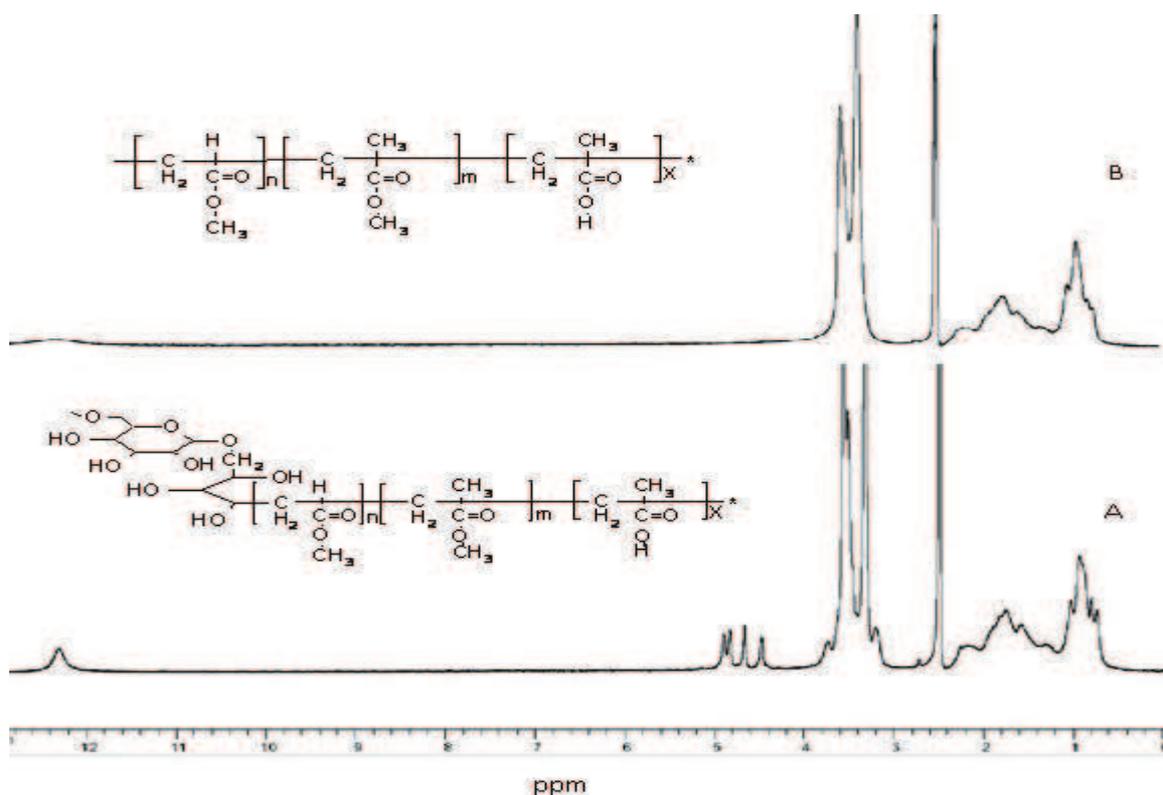


Figure 39: Spectres RMN 1H du dextran70 –b-P(MA-b-MMA-b-MAA) de type 2 avant (A) et après (b) hydrolyse acide.

Tableau 22: Déplacements chimiques (ppm) des différentes fonctions composants les différents types de copolymérisés à blocs à base de dextrans 70 avec des acryliques à blocs dans du DMSOd6.

Copolymères à blocs à base de dextran	RMN ¹ H (ppm)									
	a	b	c	d	e	f	H Anomérique	OH ²	OH ³	OH ⁴
Dex70-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (65 :25 :10)	1,2-2,0	2,1- 2,4	-	3,5- 3,7	0,4- 1,2	12,2- 12,4	4,6- 4,7	4,4-4,5	4,8-4,9	4,9- 5,0
Dex70-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (1 :1 :1)	1,2-2,0	2,0- 2,4	-	3,5- 3,7	0,4- 1,1	12,1- 12,3	4,6- 4,7	4,4-4,5	4,8-4,9	4,9- 5,0
Dex70-b-P(MA-b-MAA) (70 : 30)	1,2- 1,9	2,1- 2,3	-	3,5- 3,7	0,8- 1,1	12,2- 12,4	4,6- 4,7	4,4- 4,5	4,8- 4,9	4,9- 5,0
Dex70 -b-P(MA-b-MAA) (90 : 10)	1,4- 1,9	2,2- 2,4	-	3,5- 3,7	0,8-1,1	12,2- 12,4	4,6- 4,7	4,4- 4,5	4,8- 4,9	4,9- 5,0
Dex70-b-PMA	1,3- 1,9	2,1- 2,4	-	3,5- 3,7	-	-	4,6- 4,7	4,4- 4,5	4,8- 4,9	4,9- 5,0
Dex70-b-PMMA	1,3- 2,3	-	-	3,5- 3,7	0,4- 1,2	-	4,6- 4,7	4,4-4,5	4,8- 4,9	4,9- 5,0
Dex70-b-MAA	1,3-2,1	-	-	-	0,6- 1,2	12,1-12,6	4,6- 4,7	4,4-4,5	4,8- 4,9	4,9- 5,0
Dex70-b-P(MA-b-MMA)	1,2- 2,0	2,1- 2,4	-	3,5- 3,7	0,4- 1,1	-	4,6- 4,7	4,4- 4,5	4,8- 4,9	4,9- 5,0

Les valeurs du rapport des blocs copolymères polyacryliques entre eux et du rapport du bloc polysaccharidique / blocs polyacryliques sont mentionnées dans le Tableau 21. Ces dernières ont été calculées à partir des spectres RMN ^1H enregistrés de chaque copolymère à blocs selon la méthode décrite ci-dessous.

Selon la Figure 38 le rapport entre la superficie intégrée de chaque signal et la somme totale des superficies intégrées d'un proton de chaque bloc polyacrylique permet de déterminer le rapport de chacun d'entre eux.

La superficie intégrée du CH (a) du PMA avec un proton = 1,0 (1)

La superficie intégrée du OH (f) du PMAA avec un proton = 0,4 (2)

La superficie intégrée du CH_3 (e) du PMAA et PMMA avec six protons = 3,4 (3)

La superficie intégrée du $\text{H}_{\text{anomérique}}$ du dextran avec un proton = 0,3 (4)

A partir de (2) et (3) : 1 proton du PMMA = 0,73 (5)

A partir de (1), (2) et (5) : $1\text{H}_{\text{PMA}} + 1\text{H}_{\text{PMMA}} + 1\text{H}_{\text{PMAA}} = 1 + 0,73 + 0,4 = 2,13$ (6)

Le rapport entre les polymères acryliques est le suivant :

P(MA-b-MMA-b-MAA) (47 :34 :19)

On peut également mentionner qu'avec (4) à (6) :

$1\text{H}_{\text{PMA}} + 1\text{H}_{\text{PMMA}} + 1\text{H}_{\text{PMAA}} + 1\text{H}_{\text{anomérique}} = 2,43$ (7)

La relation (7) permet de calculer le rapport entre chaque proton et la somme des tous et par conséquent le rapport de chaque bloc dans les copolymères à blocs à base de dextran.

Dex10-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (12 :41 :30 :16)

La même méthode est été utilisée pour déterminer les rapports de tous les copolymères à blocs à base de dextrans synthétisés.

Ces résultats de RMN ^1H permettent de conclure que nous avons un copolymère à blocs composé d'un bloc polysaccharidique (dextran) et d'autres blocs linéaires polyacryliques liés entre eux avec une liaison covalente et ils sont en accord avec ceux mentionnés dans la littérature traitant des polysaccharides copolymérisés de la même manière (Han *et al.*, 2003; Bertholon *et al.*, 2006).

L'attribution des différents pics a été effectuée grâce à la RMN ^{13}C (J-mode) qui permet de différencier les carbones selon le nombre de protons qu'ils portent (Figure 40). Dans ce type d'analyse, les carbones primaires et tertiaires ont un signal négatif, contrairement aux carbones quaternaires et secondaires qui ont un signal positif. Ainsi, l'attribution des pics correspondant aux groupements CH_2 et aux $\text{C}=\text{O}$ de liaison ester ou acide devient évidente.

La comparaison entre l'attribution des pics du bloc du dextran dans la Figure 40 et ceux du dextran natif présenté à la Figure 37a nous permet de constater que les pics représentatifs ont quasiment le même déplacement chimique.

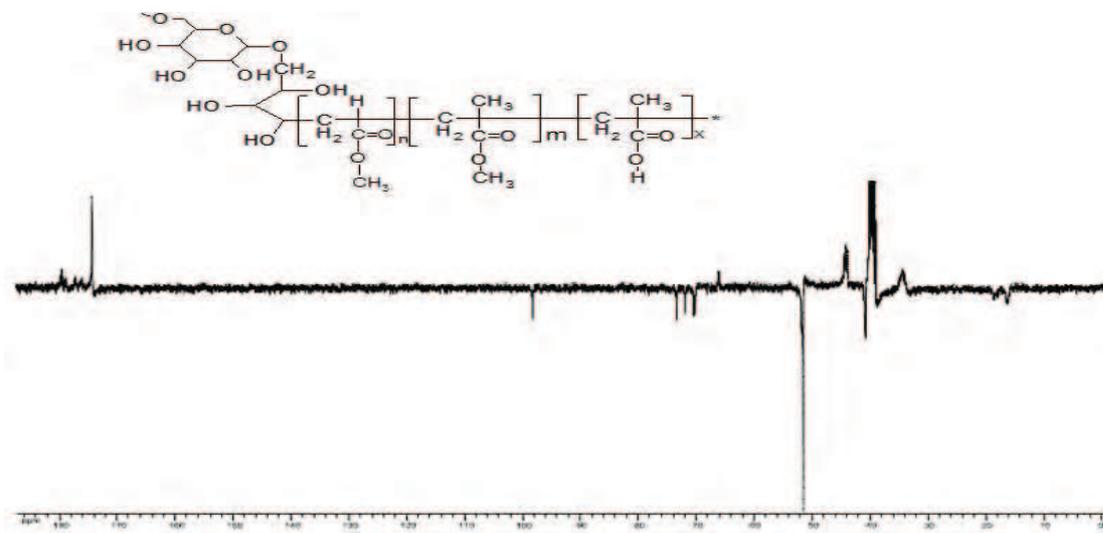


Figure 40: Spectre RMN ^{13}C (J-mode) du dex70-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) dans le DMSO- d_6 ($\underline{\text{C}}\text{H}$ du PMA située à 41 ppm, $\underline{\text{C}}$ (quaternaire) du PMMA et PMAA située à 44 ppm, CH_3 du PMMA et PMAA situé à 15-18 ppm, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ du PMA, PMMA et PMAA est situé à 34 ppm, $\text{O}-\underline{\text{C}}\text{H}_3$ du PMA et PMMA est situé à 52 ppm, $\underline{\text{C}}=\text{O}$ de PMAA, PMMA et PMA sont respectivement situés à 180, 176 et 178 ppm et ceux du dextran sont situés entre 66 et 98 ppm).

Ces résultats de RMN ^{13}C (J-mode) confirment que les copolymères à blocs à base de dextrans synthétisés sont en accord avec les travaux de la littérature (Gurruchaga *et al.*, 1992; Zhao *et al.*, 2005; Derkaoui *et al.*, 2008; Dupayage *et al.*, 2008).

6.3. Etude *in vitro* de la dégradation enzymatique des copolymères à blocs à base de dextrans

Les études *in vitro* de la dégradation enzymatique des différents copolymères à blocs à base de dextrans ont été réalisées avec une concentration de 15 U/mL en dextranase. Les résultats sont présentés à la Figure 41(A, B, C, D) et à la Figure 42.

De manière générale, ces résultats montrent d'une part, une dégradation enzymatique par la dextranase pour tous les copolymères à bloc synthétisés quel que soit le poids moléculaire du bloc de dextran (70 ; 45 ; 10 et 1,5 kDa). Cette dégradation augmente progressivement au cours du temps. D'autre part, les copolymères à blocs tels que Dex (2) et Dex (3) sont dégradés plus rapidement que le Dex (1) et le Dex (4) (Figure 41). Cet effet est attribué au taux de bloc d'acide polyméthacrylique présent dans chaque copolymère à blocs.

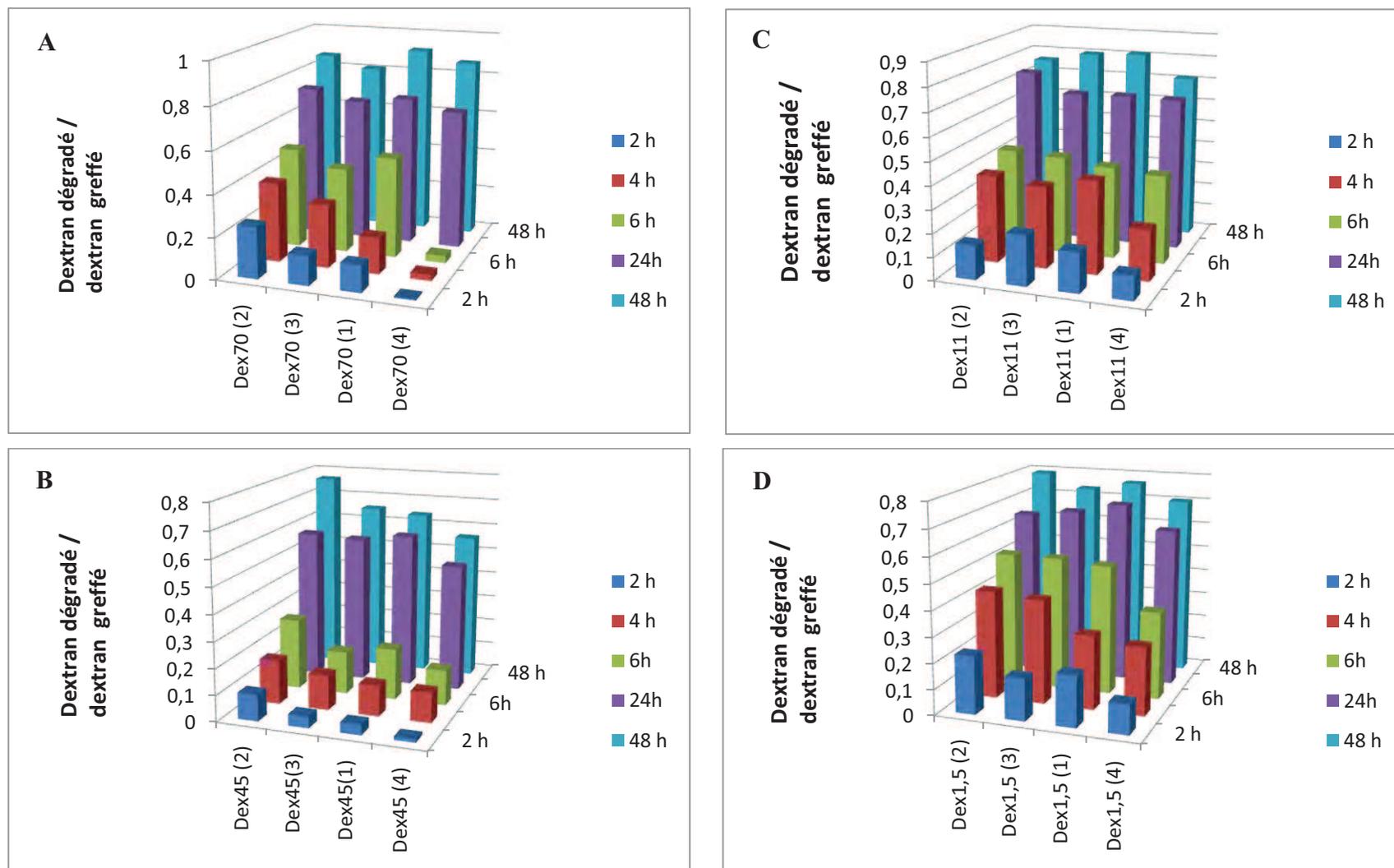


Figure 41: Dégradation enzymatique in vitro des différents types des copolymères à blocs à base de dextran 70 (A), de dextran 45 (B), de dextran 10 (C) et de dextran 1,5 (D).

Cependant les groupements carboxyliques de ce bloc s'ionisent dans le milieu d'incubation en facilitant l'action de la dextranase. Ce qui accélère la vitesse de dégradation au départ de l'incubation.

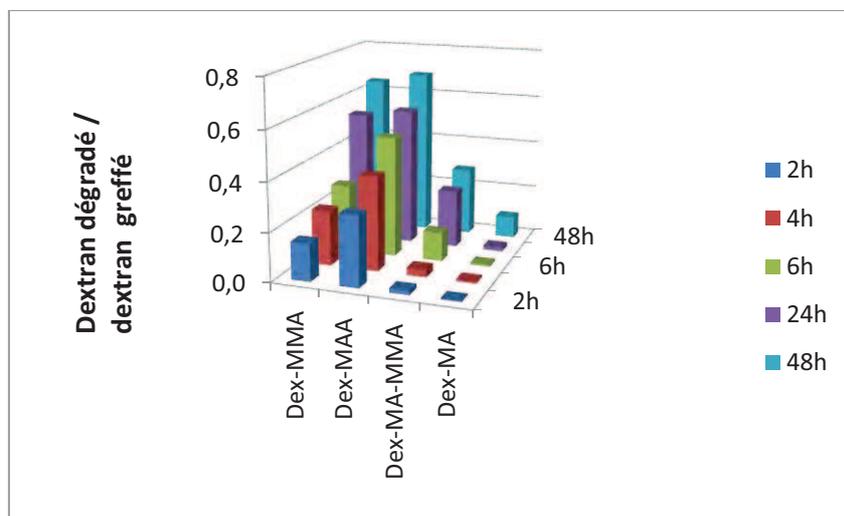


Figure 42: Dégradation enzymatique in vitro des différents copolymères à blocs à base de dextran 70.

Ces résultats nous permettent de conclure que la présence et le taux du bloc d'acide polyméthacrylique dans les copolymères à blocs, jouent un rôle clé dans leur dégradation enzymatique.

En cas d'absence du bloc d'acide polyméthacrylique (Figure 42), on peut observer que le taux de greffage (G%) joue un rôle dans la dégradation enzymatique de ces copolymères à blocs. Lorsque ce taux est élevé, la dégradation enzymatique est ralentie, et le taux de dégradation est négligeable à la fin de l'incubation, c'est le cas du Dex-b-PMA (G% = 1333). En revanche, la dégradation est progressivement augmentée lorsque le taux du greffage est moins élevé. C'est le cas du Dex-b-P(MA-b-MMA) qui présente un G% = 674 et du Dex-b-PMMA qui présente également un G% = 322.

Un taux de greffage élevé entraîne une réticulation de la chaîne des blocs acryliques, ce qui va rendre la dégradation enzymatique plus difficile.

Ces résultats de la dégradation enzymatique ont permis d'étudier la perméabilité de la théophylline à travers des films préparés à partir de différents copolymères à blocs.

6.4. Etude *In vitro* de la perméabilité de la théophylline à travers des films isolés

Les résultats de dégradations obtenus *in vitro* nous ont encouragé à étudier la propriété filmogène de ces copolymères à blocs à base de dextrans et également leurs perméabilités afin

d'évaluer leurs potentiels d'utilisation pour la délivrance spécifique de substances actives au niveau du côlon. Cette étude de perméabilité permet d'évaluer *in vitro* la cinétique de libération de la théophylline à travers des films dans des conditions mimant les milieux gastro-intestinaux. Les résultats de perméabilité de la théophylline à travers différents films étudiés sont présentés dans le Tableau 23.

Tableau 23: Perméabilité de la théophylline à travers des films isolés dans des milieux mimant les milieux gastro-intestinaux.

Copolymères à blocs	Perméabilité P x 10 ⁻⁵ (cm/s)		
	LGS	LIS	LCS
Dex70-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (70 :23 :6)	0,493 ± 0,032	2,436 ± 0,168	5,599 ± 0,232
Dex70-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (48 :28 :24)	1,469 ± 0,045	2,292 ± 0,103	6,615 ± 0,142
Dex70-b-P(MA-b-MAA) (83 :17)	1,055 ± 0,211	Film cassé	-
Dex70-b-P(MA-b-MAA) (94 :6)	0,425 ± 0,022	3,531 ± 0,108	4,523 ± 0,187
Dex45-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (71 :22 :6)	0,205 ± 0,095	1,148 ± 0,135	1,436 ± 0,108
Dex45-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (47 :29 :24)	1,821 ± 0,114	5,652 ± 0,162	Film cassé
Dex45-b-P(MA-b-MAA) (81 :19)	2,235 ± 0,204	Film cassé	-
Dex45-b-P(MA-b-MAA) (94 :6)	3,94 ± 0,161	21,49 ± 0,355	24,49 ± 0,381
Dex10-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (70 :23 :7)	0,037 ± 0,033	0,071 ± 0,115	0,094 ± 0,213
Dex10-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (47 :34 :19)	1,021 ± 0,099	5,98 ± 0,201	Film cassé
Dex10-b-P(MA-b-MAA) (86 :14)	2,872 ± 0,258	Film cassé	-
Dex10-b-P(MA-b-MAA) (94 :6)	0,212 ± 0,019	1,312 ± 0,155	3,672 ± 0,174
Dex1,5-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (72 :23 :5)	0,508 ± 0,032	1,303 ± 0,101	8,129 ± 0,189
Dex1,5-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (46 :29 :26)	0,899 ± 0,045	Film cassé	-
Dex1,5-b-P(MA-b-MAA) (84 :16)	1,893 ± 0,199	Film cassé	-
Dex1,5-b-P(MA-b-MAA) (94 :6)	0,134 ± 0,022	0,147 ± 0,068	1,567 ± 0,101
Dex70-b-P(MA-b-MMA) (59 :41)	0,051 ± 0,014	0,055 ± 0,011	0,057 ± 0,013

L'analyse des résultats obtenus nous permet de constater que les copolymères à blocs à base de dextrans de types Dex (1) et Dex (4) montrent une faible perméabilité à la théophylline dans des milieux LGS et LIS, et une perméabilité progressivement augmentée dans le LCS. Par contre, les copolymères à blocs à base de dextrans de types Dex (3) et Dex (2) n'ont pas pu être évalués dans le LCS suite à leur solubilisation dans le LIS. Les copolymères à blocs à base de dextran de type Dex (5) ont montré une perméabilité négligeable et constante dans les milieux d'épreuve mimant les milieux gastro-intestinaux.

Ces différents comportements ont été observés pour les différents types des copolymères à blocs à base de dextran et peuvent être corrélés aux taux d'acide polyméthacrylique dans chacun d'entre eux. Cependant, lorsque la teneur en acide polyméthacrylique dans les copolymères à blocs à base de dextrans dépasse 10%, ceux-ci perdent progressivement leur capacité à empêcher de la libération les principes actifs dans la partie supérieure du tractus gastro-intestinal et par conséquent ne permettent pas d'assurer une libération spécifique au niveau du côlon.

Les résultats de cette étude permettent de conclure que les copolymères à blocs à base de dextrans du type Dex (1) et Dex (4) ont bonne aptitude à protéger un principe actif modèle tel que la théophylline dans la partie supérieure du tractus gastro-intestinal et permettre une libération progressive de ce type de principe actif au niveau du côlon.

7. Conclusion

La modification chimique par copolymérisation avec des polymères acryliques par voie radicalaire en émulsion a été appliquée avec succès à différents types de dextrans. Des di, tri et tétra blocs copolymères ont été synthétisés. L'ensemble des caractérisations sur ces composés ont été réalisées et permettent de les identifier.

Les résultats encourageants obtenus à la suite des études *in vitro* de la dégradation enzymatique et de la perméabilité d'un traceur tel que la théophylline à travers des films isolés, nous permettent d'envisager de potentielles utilisations de ces copolymères à blocs à base de dextrans comme excipients pour la préparation de formes pharmaceutiques à libération colique.

Chapitre 4

Etudes de la libération *in vitro* d'un traceur à partir de comprimés enrobés avec différents types des copolymères à blocs à base de dextrans

1. Objectifs et stratégie de synthèse

L'objectif de ce chapitre de thèse est d'évaluer le potentiel des copolymères à blocs à base de dextrans en tant qu'excipients pour délivrer de manière spécifique des substances actives dans le côlon. Afin d'étudier la libération d'un traceur, des comprimés de théophylline ont été préparés par granulation humide. Ces comprimés ont été enrobés à l'aide d'un procédé en lit d'air fluidisé à l'aide de dispersions aqueuses des différents types des copolymères à blocs à base de dextrans. Afin d'être efficace l'enrobage doit posséder trois propriétés essentielles qui sont ; (i) la protection de la substance active au cours du transit dans la partie supérieure du tractus gastro-intestinal ; (ii) la dégradation par le microbiote du côlon et/ou (iii) se solubiliser au pH neutre rencontré au niveau du côlon.

Pour tous les comprimés enrobés, la cinétique de libération de la théophylline a été étudiée *in vitro* dans différents milieux d'épreuve mimant les milieux gastro-intestinaux en présence ou en absence de dextranase. L'influence de plusieurs paramètres de formulation (teneur des enrobages en copolymère à blocs à base de dextrans, longueur de la chaîne de dextran, types de blocs polyacryliques) ont été étudiés quant à de la libération de la théophylline à partir de comprimés.

2. Introduction

Les comprimés, qui constituent une des formes posologiques les plus simples et les plus utilisées (Charman and Charman, 2003), sont majoritairement constitués d'excipients et d'une ou de plusieurs substances actives. La modulation de la libération de ces dernières est souvent nécessaire, de manière à lui fournir une protection contre les conditions de son environnement externe. Pour répondre à ce besoin, l'industrie pharmaceutique a depuis longtemps mis au point des systèmes de libération modifiée (Alderborn, 2002).

3. Fabrication de comprimés

La voie orale est la méthode la plus courante pour administrer des principes actifs (Charman and Charman, 2003). Ce fait peut être attribuable à son emploi facile et sécuritaire, à son volume réduit, au dosage précis par unité qu'il permet, à sa stabilité à la conservation, à sa facilité de production industrielle à grande échelle et à son coût de fabrication relativement peu élevé (Allen, 1998; Sastry *et al.*, 2000).

Un comprimé conventionnel se définit comme étant une préparation solide contenant une simple dose d'un ou de plusieurs ingrédients actifs obtenu par la compression d'un volume

uniforme de particules d'une poudre (Pharmacopée Européenne 6ème édition, 2007). Les substances actives sont dispersées dans un ou plusieurs excipients, substances sans activité thérapeutique utilisées pour faciliter la préparation de ces formes pharmaceutiques. Selon leur nature, les excipients peuvent jouer différents rôles tels que ceux d'agents diluants, liants, désintégrants ou lubrifiants (Tableau 24) (Allen, 1998; Li *et al.*, 2004). Dans la formulation de comprimés, certains colorants et saveurs peuvent également être ajoutés afin de conférer une apparence et un goût attrayants. Plusieurs types de comprimés existent; ils sont habituellement conçus pour être avalés, croqués, dispersés dans l'eau avant administration.

Tableau 24: Exemples d'excipients (liste non exhaustive) utilisés pour préparer de comprimés, reliés à leurs fonctions précises (Allen, 1998; Lee, 2008).

Fonction de l'excipient	Exemples d'excipients
Diluant	<ul style="list-style-type: none"> • Lactose • Sucrose • Mannitol • Amidon
Liant	<ul style="list-style-type: none"> • Eau • Alcool • Amidon (état pâteux) • Sirop de sucrose • Solution de gélatine • Solutions de polymères (polyéthylène glycol, polyvinylpyrrolidone) dans l'eau, l'alcool ou mélange eau –alcool
Désintégrant	<ul style="list-style-type: none"> • Dérivés cellulosiques • Amidon • Mélange effervescents
Lubrifiant / Agent de d'écoulement / Antiadhérant	<ul style="list-style-type: none"> • Stéarate de calcium, de magnésium ou de zinc • Amidon • Talc • Polyéthylène glycol • Cires

3.1. Propriétés d'une poudre avant compression

Après la réalisation d'un mélange d'excipients et de principes actifs, la poudre obtenue doit présenter certaines caractéristiques préalables à la compression et ce, dans le but de lui assurer une bonne comprimabilité et de bonnes propriétés d'écoulement (Lee, 2008).

3.1.1. Propriétés d'écoulement

L'écoulement d'une poudre est influencé par diverses caractéristiques des particules telles que leur taille, la distribution granulométrique de leur taille, leur forme, leur texture, leur énergies de surface, leur composition chimique ainsi que leur teneur en humidité (Li *et al.*, 2004). L'écoulement instantané et régulier d'une poudre est essentiel à la fabrication industrielle de comprimés de poids et de propriétés physico-chimiques uniformes et permet d'éviter le décalottage des comprimés en production à haute vitesse (Staniforth, 2002).

3.1.2. Comprimabilité

La comprimabilité est directement reliée aux caractéristiques d'écoulement de la poudre. Elle se définit comme étant la capacité d'une poudre à être réduite sous forme de comprimés de dureté donnée (Leunberger, 1982; Lee, 2008). La dureté d'un comprimé est influencée par le type et le nombre de liaisons possibles entre les particules d'une poudre, puis par l'aire de la surface de contact interparticulaire (Van Veen *et al.*, 2000). En ne tenant pas compte de la modification d'énergie de contact de surface, la manière idéale d'apporter des modifications aux forces interparticulaires d'une poudre est de modifier la surface de contact entre les particules. Cela devient possible, par la réduction de la taille des particules et l'augmentation de l'étendue de la distribution des tailles de ces particules (Li *et al.*, 2004). Les caractéristiques devant être rencontrées par une poudre avant compression sont donc analysées par des mesures de taille des particules et sont habituellement assurées par l'observation d'une distribution normale de ces tailles (Randall, 1995). Ainsi, il est possible de garantir de faibles variations de poids, de bonnes propriétés mécaniques, de faibles proportions de décalottage et de faibles forces de friction à l'éjection des comprimés lors de leur fabrication (Alderborn, 2002).

3.2. Modification des propriétés d'une poudre avant compression : granulation

Dans le cas où une poudre possède les caractéristiques appropriées dès la première étape de fabrication, soit le mélange physique des différentes poudres, l'obtention de comprimés peut être réalisée par compression directe (Figure 43). Cependant, une étape de granulation est souvent nécessaire afin de moduler les caractéristiques d'une poudre dans le but d'améliorer sa comprimabilité (Alderborn, 2002; Van den Dries and Vromans, 2003; Williams *et al.*, 2004).

La granulation est un procédé par lequel les particules d'une poudre sont destinées à adhérer entre elles, de sorte à former de plus grosses entités nommées granules. Ces dernières sont, par la suite, appelées à subir un traitement de broyage, selon les propriétés recherchées de la poudre à comprimer (Bolhuis and VChowhan, 1996). Il existe deux types de granulation : celle réalisée par voie sèche et celle réalisé par voie humide.

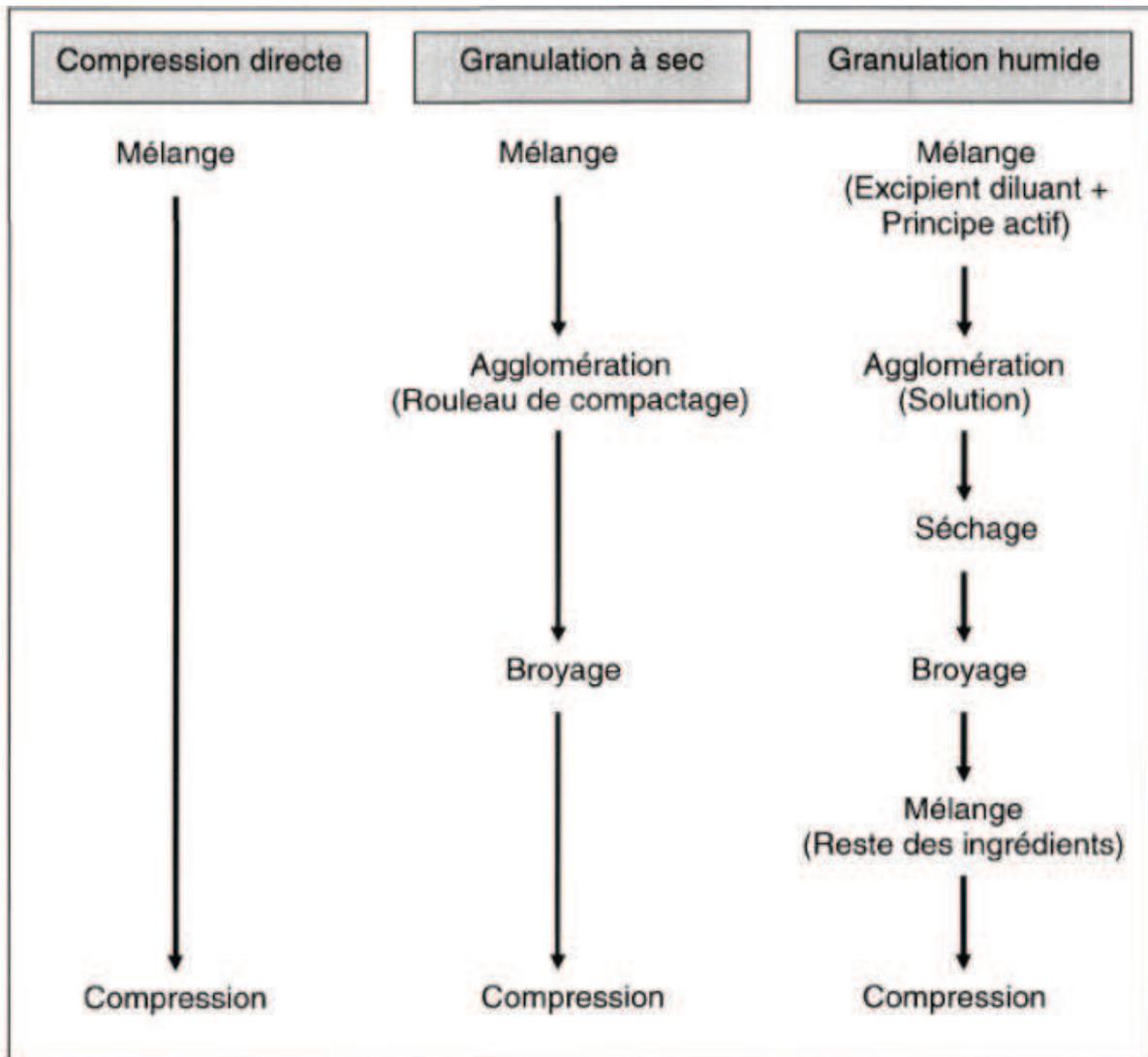


Figure 43: Schéma représentant les étapes de la compression directe, de la granulation par voie sèche et de la granulation par voie humide (Summers and Aulton, 2002).

3.2.1. Granulation à sec

La granulation à sec se fait par compaction d'une poudre suivie d'un broyage ou d'un simple tamisage. Ce traitement est suffisant pour provoquer l'adhésion des particules entre elles et contribue à l'obtention de propriétés adéquates d'écoulement et de comprimabilité

d'une poudre. L'ajout d'agents favorisant la compression est réalisé à la fin du procédé juste avant cette dernière (Summers and Aulton, 2002).

3.2.2. Granulation par voie humide

La granulation peut être définie comme étant un procédé par lequel de fines particules sont liées entre elles pour former des agglomérats. Les liaisons interparticulaires se forment en présence d'un agent liant (Iveson *et al.*, 2001; Schaefer *et al.*, 2004).

La granulation humide, quant à elle, implique la mise en contact du mélange de poudre à un solvant ou à une solution liant-agglutinant. Les particules de la poudre sont ainsi appelées à s'agglomérer entre elles afin de former des granules. L'humidité joue un rôle majeur dans cette étape car elle contribue à augmenter les forces d'adhésion entre les particules. Il est à noter que les étapes décrites à la Figure 43 sont parfois appelées à être modifiées, car il n'y a pas systématiquement une étape de broyage suite au séchage lorsque seule une étape de tamisage suffit (Tenou and Fitzpatrick, 1999; Goldszal and Bousquet, 2001; Palzer, 2005).

Quatre stades principaux sont habituellement observés suite à l'humidification d'une poudre et ces derniers sont observés en fonction de la quantité d'eau ajoutée (Figure 44). Le premier d'entre eux est le stade *pendulaire* où se créent des ponts liquides entre chacune des particules. Vient ensuite le stade *funiculaire* où les espaces interparticulaires se remplissent de liquide jusqu'à saturation, observée au stade *capillaire*. Le dernier stade est celui de *dispersion* où les particules solides se trouvent sporadiquement étalées dans la phase liquide. La granulation des poudres utilisées en technologie pharmaceutique doit cependant être arrêtée au stade funiculaire (Goldszal and Bousquet, 2001). Plus les groupements susceptibles d'interagir avec le solvant utilisé en granulation sont nombreux et exposés, plus l'interaction solvant-particules est importante et plus le rapprochement des particules est favorisé (Foster *et al.*, 2005).

Le solvant introduit dans l'étape de granulation peut être éliminé des granules par séchage. Celles-ci sont ensuite broyées de manière à obtenir la taille requise des particules. Les granules peuvent également être forcées à travers un crible leur donnant ainsi la forme de grains qui sont ensuite séchés et tamisés (Alderborn, 2002).

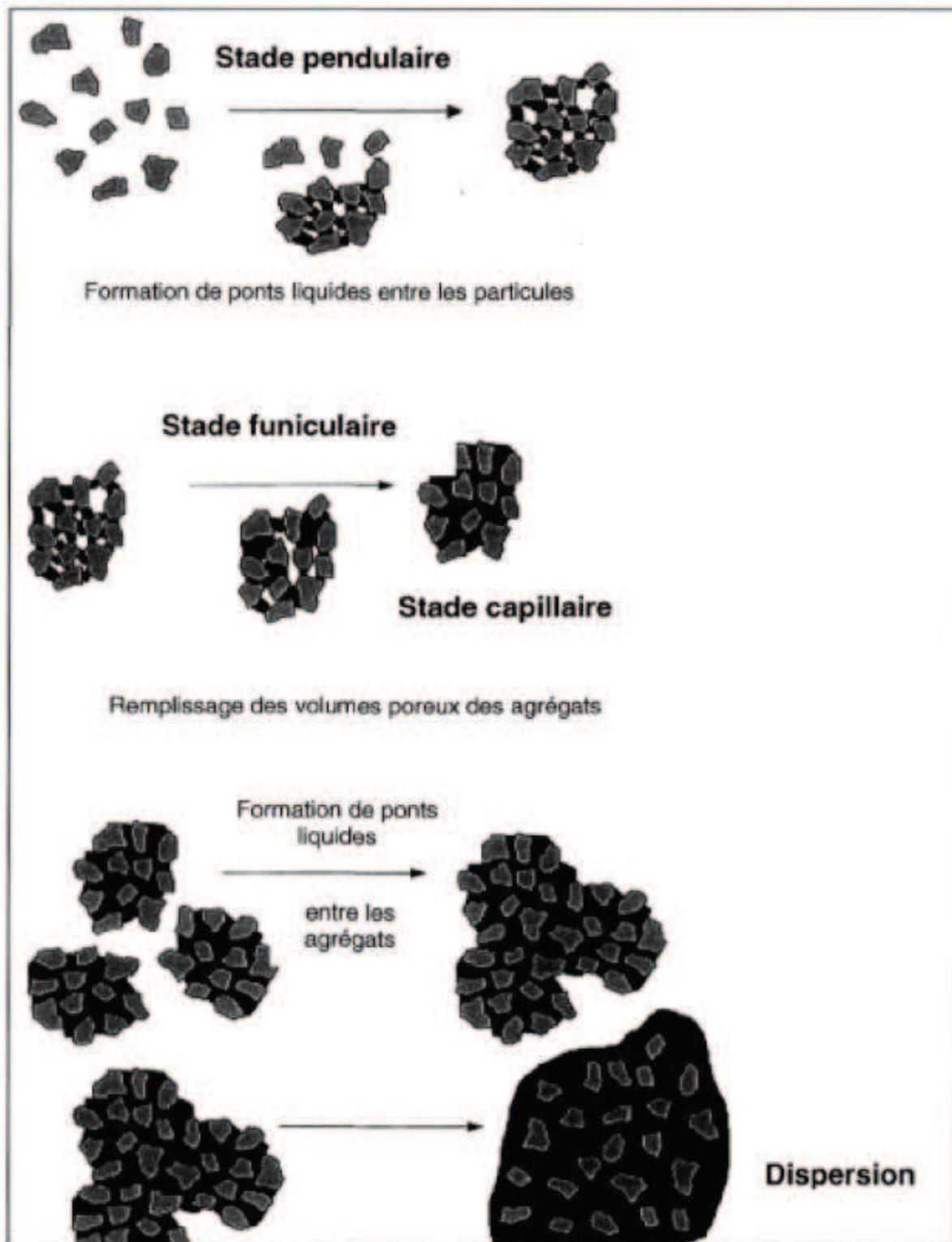


Figure 44: Schéma des quatre stades représentant les interactions macroscopiques observées entre un liquide et une poudre (Goldszal and Bousquet, 2001).

3.3. Compression

La poudre obtenue suite au traitement de granulation est transformée sous forme de comprimés à l'aide d'une presse. Cette dernière peut être de type rotatif ou de type hydraulique informatisé. Ce dernier type est plutôt utilisé en tant qu'outil pilote servant à simuler l'effet obtenu par l'utilisation d'une presse rotative. Cette dernière, également nommée presse multistation, permet l'obtention de rendements de l'ordre de 10 000 comprimés par minute et plus (Alderborn, 2002). Elle fonctionne avec un nombre fixe de matrices et de poinçons, lesquels sont mobiles verticalement (Figure 45). La poudre se retrouve dans la matrice par gravité et les poinçons sont serrés afin de la comprimer. Les forces impliquées dans le mécanisme de liaison des particules d'une poudre en compression sont prioritairement des interactions de type van der Waals (Luangtana-Anan and Fell, 1990; Adolfsson and Nyström, 1996; Li *et al.*, 2004). Cependant, les liaisons hydrogène, les mécanismes d'emboîtement, la fonte partielle due à des températures locales très élevées au moment de la compression, la formation de couches d'adsorption, la formation de ponts entre liquides ainsi que les forces électrostatiques, magnétiques et de valence contribuent également aux phénomènes de liaison des particules d'une poudre (Ek *et al.*, 1995).

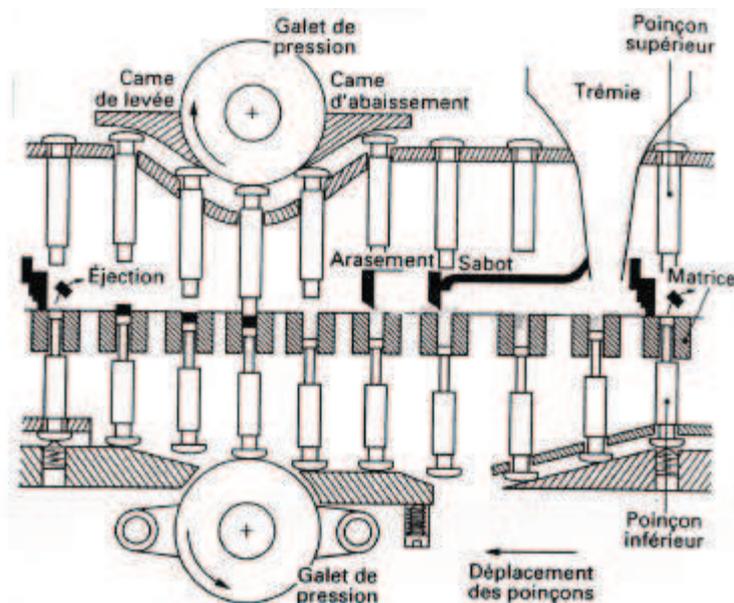


Figure 45: Schéma de principe de la compression sur presse rotative (Levacher, 2006).

4. Généralités sur l'enrobage par film (Pelliculage)

Cette technique consiste à enrober un matériau support avec des agents filmogènes. En séchant, ces agents filmogènes vont former une pellicule (quelques dizaines de microns

d'épaisseur) autour du noyau. Le liquide de pelliculage est pulvérisé sur les noyaux en mouvement. Ainsi le pelliculage ne modifie ni la forme, ni la masse des comprimés.

Ce film doit être dépourvu d'action pharmacologique, être homogène, continu, lisse, souvent brillant et éventuellement coloré. Il doit, en outre, posséder une bonne résistance mécanique, une bonne adhérence au support et assure une protection convenable du médicament.

L'enrobage s'applique généralement à toutes les formes orales solides telles que les comprimés, les capsules molles et les gélules, les granulés ou les microgranules (Brossard and Lefort Des Ylouses, 1984).

L'enrobage par un polymère est l'une des méthodes d'obtention d'une forme à libération modifiée où la vitesse de libération du principe actif est, dans ce cas, inversement proportionnelle à l'épaisseur du film (Leopold, 1999; Charman and Charman, 2003).

La composition d'un liquide de pelliculage type est la suivant : (i) un agent filmogène, (ii) un agent plastifiant, (iii) un agent colorant (facultatif), (iv) un solvant dans lequel les composants précédents sont mis en solution ou en dispersion selon leurs caractéristiques. Ce solvant peut être organique (alcool, acétone, chlorure de méthylène, etc) ou aqueux (eau). Le choix du solvant se fait au moment de la formulation, en fonction d'un ensemble de paramètres tels que les caractéristiques du filmogène, la compatibilité du principe actif avec l'eau, etc. (Thioune *et al.*, 1997; Bauer *et al.*, 1998). Ces deux types de pelliculage, en milieu aqueux et en milieu organique, coexistent aujourd'hui en production, chacun ayant leurs avantages et leurs inconvénients (Tableau 25). La tendance actuelle est cependant plutôt orientée vers le pelliculage en milieu aqueux, du fait des contraintes industrielles imposées par l'utilisation des solvants organiques (Levacher, 2006).

Tableau 25: Avantages et inconvénients des deux types de solvants utilisés au cours du pelliculage (Levacher, 2006).

	Solvants aqueux	Solvant organique
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> • Elimine les inconvénients des solvants organiques 	<ul style="list-style-type: none"> • Opération rapide • Pas nécessaire de disposer d'équipement pourvus de systèmes de séchage performant
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> • Opération plus longue • Utilisation de polymères soluble ou dispersibles dans l'eau • Equipements performants au niveau séchage 	<ul style="list-style-type: none"> • Nécessité d'installation antidéflagrante • Installation d'un système de récupération des solvants • Dangereux • Coût des solvants • Problèmes de résidus des solvants dans les comprimés

4.1. Formation du film à partir d'une dispersion aqueuse

La solidité du film résultant de l'évaporation de l'eau est assurée par l'enchevêtrement et l'empilement de molécules qui forment un réseau de plus en plus dense au fur et à mesure de l'évaporation de l'eau (Bindschaedler *et al.*, 1983; Bauer *et al.*, 1998). Lors de son élaboration, le film passe par trois phases successives, correspondant à sa structuration en réseau macromoléculaire à mesure de l'évaporation de l'eau dans lequel est dissout le polymère. A l'état liquide, le latex est formé de particules en suspension dans l'eau. Pour aboutir à un film continu, les particules doivent entrer en contact, se déformer puis fusionner. La Figure 46 illustre ces différentes étapes (Carlin *et al.*, 2008; Kucera *et al.*, 2008).

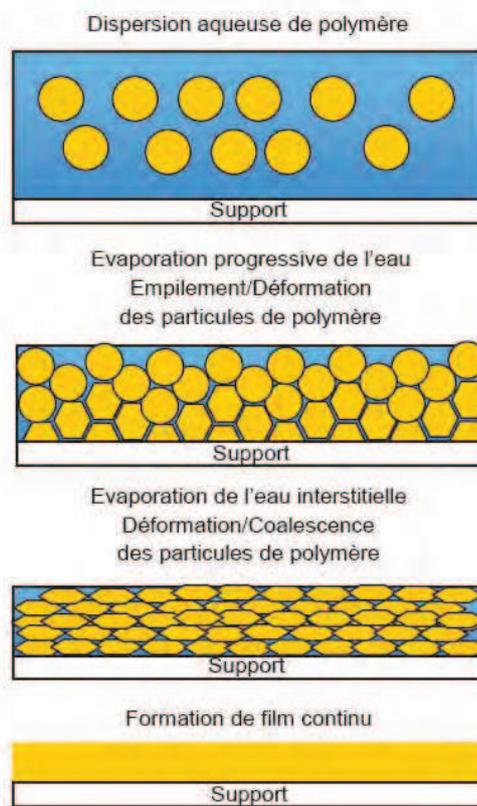


Figure 46: Processus de formation d'un film à partir d'une dispersion aqueuse de polymères insolubles (Yang, 2009).

Au fur et à mesure que l'eau s'évapore, les particules entrent en contact, se déforment puis fusionnent. Les forces qui sont à l'origine de ce processus de déformation ont été expliquées par plusieurs théories (Bauer *et al.*, 1998)

Une étude a démontré que ces forces résultant de la tension superficielle du polymère et engendrées par la courbure négative de la surface de particules, appelée force de Laplace,

fournissent l'énergie nécessaire à la coalescence des sphères (Figure 47) (Dillon *et al.*, 1951; Bauer *et al.*, 1998).

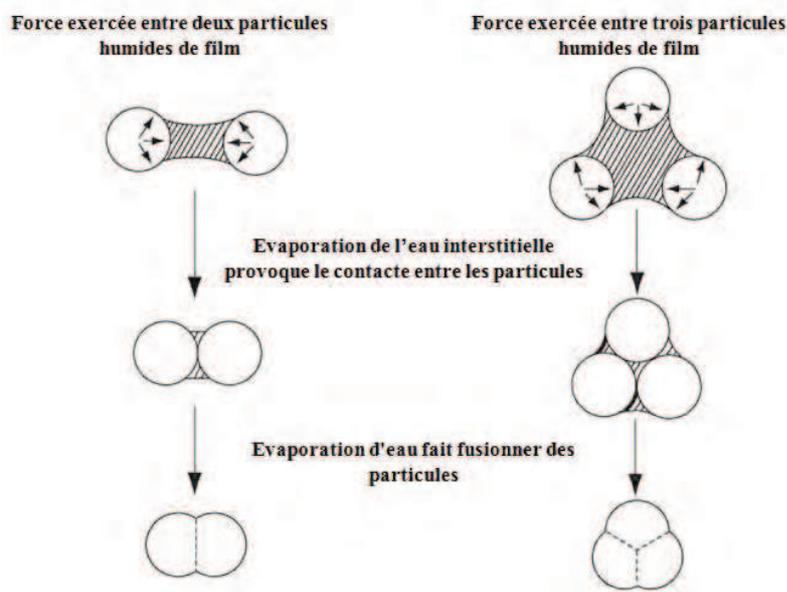


Figure 47: Processus de la coalescence des particules pendant la phase d'évaporation des particules pendant la phase d'évaporation (Carlin *et al.*, 2008).

Une autre étude a montré que la coalescence des sphères est provoquée principalement par des forces capillaires, générées par une tension superficielle eau/air, engendrées par la formation entre les particules, pendant l'évaporation de l'eau (Figure 47) (Brown, 1956; Bauer *et al.*, 1998).

Une autre analyse montre que les deux théories proposées ci-dessus n'expliquent pas entièrement les propriétés physiques des films obtenus : il faut en effet parler de l'interdiffusion des segments terminaux des chaînes de polymère à travers l'interface particule/ particule, sans quoi le film serait non homogène et pulvérulent (Millili *et al.*, 1990).

5. Matériels et méthodes

5.1. Matériels

La théophylline anhydre et l'amidon de blé sont fournis par Cooper Rhone (Melun, France). Le talc, le citrate de triéthyle, le stéarate de magnésium et le silicium sont fournis par Sigma Aldrich Chimie (Saint-Quentin Fallavier, France). La cellulose microcristalline (Avicel[®] PH101) est fourni par (Avicel[®]- Seppic,- Lyon, France). Le lactose monohydraté est fourni par (Albert Isliker and Co. Zurich, Suisse). L'Eudragit[®] FS 30 D (EFS 30) a été fourni par SPCI (Lyon – France).

5.2. Préparation et évaluation des comprimés nus de théophylline

Les comprimés de théophylline nus, dont la composition est reprise dans le Tableau 26, ont été obtenus par granulation humide (Sriamornsak *et al.*, 2003; Fan *et al.*, 2009). Tous les constituants sont tamisés sur un tamis de largeur de maille de 0,8 mm avant d'être mélangés. L'ensemble du principe actif et des différents excipients à l'exclusion du stéarate de magnésium sont homogénéisés pendant 2 min dans un mélangeur-malaxeur de type Stephan[®] UMC 5 (Hameln, Allemagne). Au cours de l'opération d'homogénéisation du mélange dans le Stephan[®] UMC 5, de l'eau est ajoutée dont la quantité est dépendante de l'humidité ambiante. Le mélange de poudres humides obtenues sont granulées à l'aide d'un granulateur Erweka[®] (Heusenstamm, Allemagne) équipé d'une grille d'ouverture de mailles de 1,6 mm avant d'être séchées dans une étuve ventilée à 45 °C pendant 12 h.

Afin de calibrer les granulés séchés, ceux-ci sont passés à travers un tamis de 1,6 mm de largeur de maille. Le stéarate de magnésium, utilisé comme agent lubrifiant, est finalement ajouté et est mélangé pendant une minute dans un mélangeur de type Turbula[®] (Basel, Suisse).

Tableau 26: Composition des comprimés de théophylline non enrobés.

Composition		Quantité pour un comprimé (mg)	% en masse par rapport au poids du comprimé
1	Théophylline anhydre	100	26,66
2	Lactose	183,25	48,86
3	Avicel [®] PH101	73	19,46
4	Amidon de blé	15	4
5	Stéarate de magnésium	3,75	1
Poids total		375	100
Indice de comprimabilité		12,19 %	
Indice d'Hausner		1,13	
Ecoulement		7 sec/100 g	(inférieur à 10 sec)

Deux méthodes ont été mises en œuvre pour caractériser les propriétés rhéologiques des produits granulés, directement par écoulement et indirectement par tassement (Pharmacopée Européenne 6eme édition, 2007). Différents indices ont été proposés pour caractériser la poudre : l'indice de compressibilité ou l'indice de Carr (ICARR, %) (Carr, 1965) et l'indice d'Hausner (IHausner) (Hausner, 1967). L'indice d'Hausner indique que la

différence de cet indice, par rapport à 1 est représentative des frictions interparticulaires qui limitent l'écoulement. Carr a proposé un classement de l'aptitude à l'écoulement des poudres, en fonction de la valeur d' I_{CARR} (Tableau 27).

Tableau 27: Aptitude à l'écoulement des poudres (USP XXVIII, 2005).

Indice d'Hausner	Indice de compressibilité (Carr) (%)	Aptitude à l'écoulement
1,00 – 1,11	1 – 10	Excellent
1,12 – 1,18	11 - 15	Bonne
1,19 – 1,25	16 – 20	Assez bonne
1,26 – 1,34	21 – 25	Passable
1,35 – 1,45	26 – 31	Médiocre
1,46 – 1,59	32 – 37	Très médiocre
Supérieure à 1,60	Supérieure à 38	Extrêmement médiocre

Ce mélange est ensuite comprimé à l'aide d'une comprimeuse alternative Frogerais[®] (Vitry-sur-Seine, France) instrumentée à l'aide de poinçons bombés de 10 mm de diamètre avec une force de compression égale à 100 N. Les différentes caractéristiques des comprimés nus sont ensuite mesurées: l'uniformité de masse, la dureté, le comportement de désagrégation, la friabilité et la teneur en théophylline (Pharmacopée Européenne 6eme édition, 2007).

5.3. Préparation des dispersions utilisées pour l'enrobage

Les compositions des différentes dispersions d'enrobage sont reprises dans le Tableau 28. Les quantités adéquates de chaque copolymère à blocs à base de dextran ont été dispersées dans de l'eau désionisée (10% m/m) sous une forte agitation pendant 24 h. Le talc et le citrate de triéthyle, ajouté respectivement comme agent antiagrégant et plastifiant (30%, 20% m/m par rapport aux copolymères secs respectivement) sont préalablement dispersés dans l'eau désionisée en présence de l'émulsion de silicone avant d'être ensuite ajoutés aux dispersions des copolymères sous simple agitation (Semde *et al.*, 2000; Sriamornsak *et al.*, 2003). Finalement, la teneur totale en matière sèche de chaque dispersion a été ajustée à sa concentration souhaitée avec de l'eau désionisée. Toutes les dispersions sont finalement passées à travers un tamis de 0,5 mm d'ouvertures de mailles de sorte à éliminer les gros agglomérats, avant d'être immédiatement utilisées pour l'enrobage des comprimés par la méthode mettant en œuvre un lit d'aire fluidisé.

Tableau 28: Composition des dispersions d'enrobage de différentes formulations utilisées.

Composition (g)	Dex70 (1)	Dex70 (2)	Dex70 (3)	Dex70 (4)	Dex70 (5)	Dex45 (1)	Dex10 (1)	Dex 1,5(1)	E FS 30D
Copolymères à blocs (à l'état sec)	50	50	50	50	50	50	50	50	166,67
Talc	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Citrate de triéthyle	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Emulsion de silicone	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Eau	924	924	924	924	924	924	924	924	807,33
Teneur en résidu sec de la dispersion % (m/m)	7,6	7,6	7,6	7,6	7,6	7,6	7,6	7,6	7,6
Taux d'enrobage appliqué % (m/m)	15, 10 et 4,9	10	10	10	10	10	10	10	10

Dex 70 (1) = Dextran 70-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (70: 23: 6)

Dex 70 (2) = Dextran 70-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (48: 28: 24)

Dex 70 (3) = Dextran 70-b-P(MA-b-MAA) (83: 17)

Dex 70 (4) = Dextran 70-b-P(MA-b-MAA) (94: 6)

Dex 70 (5) = Dextran 70-b-P(MA-b-MMA) (59 : 41)

Dex 45 (1) = Dextran 45-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (71: 22: 6)

Dex 10 (1) = Dextran 10-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (70: 23: 7)

Dex 1,5 (1) = Dextran 1,5-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (72: 23: 5)

EFS 30 D = Eudragit® FS 30 D

5.4. Enrobage des comprimés

L'enrobage des comprimés a été réalisé grâce à un lit d'air fluidisé à l'aide d'un appareillage d'une contenance maximale d'environ 1,0 kg de type Ventilus 1/2,5 (INNOJET[®], Steinen, Allemagne) (Behzadi *et al.*, 2005). La charge initiale en comprimés de théophylline anhydre mise en œuvre est de 150 g. Les comprimés sont d'abord chauffés dans le lit d'air fluidisé pendant 10 min à des températures de 3 à 5 °C au-dessus de celles adoptées durant l'opération d'enrobage.

L'ensemble des conditions mise en œuvre pour l'opération d'enrobage des comprimés avec les différentes dispersions est résumé dans le Tableau 29. L'opération d'enrobage est poursuivie jusqu'à ce que la quantité voulue de film d'enrobage soit déposée sur les noyaux. Pendant toute l'opération d'enrobage une agitation modérée et continue des dispersions est maintenue afin d'éviter la sédimentation des particules solides

Au cours de l'enrobage, des contrôles de masse des comprimés ont été effectués afin de connaître l'augmentation de masse des comprimés et par conséquent le taux d'enrobage au cours du temps. Parallèlement, l'aspect des comprimés est également observé afin de détecter tout défaut de surface et d'apprécier l'aspect extérieur de l'enrobage.

Tableau 29: Conditions opératoires mise en œuvre lors des enrobages des comprimés de théophylline anhydre.

Paramètres	Copolymères à blocs	Eudragit [®] FS 30D
Charge initiale en comprimés nus (g)	150	150
Température d'air d'entrée (°C)	36	36
Température d'air de sortie (°C)	33	33
Température du produit (°C)	38	38
Débit de pulvérisation (g/min)	1 – 2	1,1- 1,9
Pression de pulvérisation (bar)	1,7	1,7
Débit d'air de sustentation (m ³ /h)	95	95

À l'issue de la période de pulvérisation, les comprimés enrobés sont séchés pendant 10 min, dans le même lit d'air fluidisé à températures de 3 à 5 °C au-dessus de celles mise en œuvre pour l'opération d'enrobage. A la fin du processus d'enrobage, les comprimés ont été séchés pendant 24 h dans une étuve à 40 °C afin d'obtenir le murissement complet des films déposés.

5.5. Etude de la libération *in vitro* de la théophylline à partir de comprimés enrobés

L'étude de libération *in vitro* de la théophylline à partir de comprimés enrobés a été réalisée à l'aide d'un appareil de dissolution de type USP III (BIO-DIS[®], RRT9, Caleva Ltd., Royaume-Uni) de sorte à mimer les changements de pH rencontrés le long du tractus digestif (Wong *et al.*, 1997; Klein *et al.*, 2008).

L'étude est réalisée à $37 \pm 0,5$ °C consécutivement dans trois milieux mimant le liquide gastrique simulé LGS, le liquide intestinal simulé LIS et le liquide colique simulé LCS. Pour le milieu d'épreuve colique, différentes variantes ont été testées à savoir à pH 7,2 et à pH 6,4 en présence ou en absence de dextranase (15 U/mL). L'ensemble des conditions opératoires mise en œuvre lors des études sont repris dans le Tableau 30

Tableau 30: Conditions opératoires mise en œuvre lors des études de la libération *in vitro*.

Phase	Phase I LGS	Phase II LIS	Phase III LCS
Volume (mL)	250	250	250
pH	1,2	6,8	7,2
Temps (h)	2	3	19
Vitesse (mouvement vertical de bas en haut et de haut en bas /min)	20	20	5

L'influence du pH sur la cinétique de libération du principe actif à partir des comprimés enrobés a également été étudiée à différents pH (1,2 ; 5 ; 6 ; 6,8 et 7,2) à l'aide du même appareillage avec les paramètres suivants : volume du milieu d'épreuve : 250 mL pendant 24 h et 20 mouvements de bas en haut et en bas par minute.

Des échantillons de 5 mL ont été prélevés à intervalles réguliers, sans remplacement du milieu de dissolution. Le dosage de la théophylline a été effectué en mesurant l'absorbance des différents échantillons prélevés, dilués de façon appropriés, à l'aide d'un spectrophotomètre UV-VIS à 272 nm (Shimadzu[®] 2401 PC, Kyoto, Japon). Les concentrations en théophylline, calculées à partir de la droite d'étalonnage préétablie, permettent de déterminer les pourcentages (% m/m) de théophylline libérés au cours du temps. Chaque étude de libération a été répétée trois fois.

6. Résultats et discussions

6.1. Préparation et enrobages des comprimés

Les comprimés nus de théophylline sont préparés par granulation humides. Les analyses de pharmacotechnie ont été réalisées selon les normes de la Pharmacopée Européenne (6^{ème} édition, 2007). Les résultats sont représentés dans le Tableau 31.

Tableau 31: Caractéristiques des comprimés nus de théophylline.

	Uniformité de masse (mg)	Dureté (N)	Désagrégation (min)	Friabilité % (m/m)	Teneur en % PA
Moyenne	380,05	115,6	<1	0,23	101,54
SD	4,45	3,77	-	0,045	2,01
Conforme aux normes de la Pharmacopée Européenne 6 ^{ème} édition, 2007					

Afin de préparer les comprimés de théophylline, différentes d'excipients ont été utilisés pour réaliser la formulation. A ce titre l'Avicel PH 101 a été utilisé en granulation humide comme agent liant et diluant. Le lactose a été utilisé comme agent diluant. L'amidon de blé a été utilisé comme agent liant et d'agent désintégrant. Le stéarate de magnésium est utilisé comme agent lubrifiant et anti-adhérent.

Le choix de la théophylline comme traceur dans nos études peut être justifié par ses propriétés physico-chimique, analytique et pharmacologique. En effet, la théophylline est bien résorbée dans tout le tractus gastro-intestinal y compris dans le côlon (McConnell *et al.*, 2009a). Elle peut également être incorporée dans une formulation colique destinée à améliorer le traitement de l'asthme (Basit, 2005; Van den Mooter, 2006).

Les valeurs d'écoulement, d'indice de comprimabilité et d'indice de Hausner (Tableau 26) confirment les bonnes propriétés d'écoulement des granulés préparés. Par conséquent, ces résultats préjugent d'une bonne aptitude à l'écoulement dans la trémie d'alimentation de la machine à comprimer et par conséquent d'un bon remplissage de la matrice. Ces résultats sont en cohérence avec la régularité de masse des comprimés.

L'utilisation de comprimés à désagrégation rapide (inférieur à 1,0 min) est nécessaire afin de pouvoir interpréter plus facilement les résultats des testes de dissolution effectués sur les comprimés enrobés avec les copolymères synthétisés dans le cadre de ce travail doctoral. En effet, puisque la désagrégation des comprimés nus et la libération du principe actif qui s'en suit sont très rapides, tout retard observable quant à la libération du principe actif à partir des comprimés enrobés peut être, évidemment, attribué à la présence de l'enrobage.

La présence de plastifiants ou de substances de charges hydrophobes a tendance à diminuer la perméabilité à l'eau des enrobages. Cette diminution de perméabilité peut se traduire par une amélioration de la résistance de l'enrobage au cours de son passage gastro-intestinal. Inversement, la désagrégation prématurée des comprimés qui pourront être observés dans la partie supérieure du tractus gastro-intestinal serait attribuée aux propriétés physico-chimiques des copolymères à blocs à base de dextrans utilisés.

Des essais préliminaires d'enrobages ont permis de déterminer le pourcentage de perte de solution d'enrobage au cours du procédé cette perte est évaluée à 5%. Le gain de poids correspondant à chaque copolymère à blocs à base de dextran utilisé pour réaliser les comprimés enrobés est repris au Tableau 26.

Le talc, de granulométrie inférieure à 5 μm , a été utilisé comme agent antiagrégant destiné à réduire les problèmes de collage au cours des opérations d'enrobage. L'émulsion de silicone a été utilisée comme agent anti-mousse lors de la préparation des dispersions aqueuses pour enrobage (Bauer *et al.*, 1998). Le pelliculage est réalisé à faible débit de pulvérisation, au début du processus de pulvérisation (40 premières min), afin de déposer une couche de pelliculage lisse et d'éviter les problèmes de collage au cours des opérations.

Au cours de l'opération d'enrobage, plusieurs prélèvements de comprimés (20 comprimés) réalisés afin de contrôler l'aspect et la masse des comprimés. Tous les comprimés enrobés présentent un enrobage homogène, lisse, brillant sans irrégularité de surface.

6.2. Etude de la libération *in vitro* de la théophylline à partir de comprimés enrobés

Les études de la libération *in vitro* de la théophylline à partir de comprimés enrobés avec différents types copolymères à blocs à base de dextrans ont été menées à l'aide d'un appareil de dissolution de type USP III (BIO-DIS[®], RRT9). Cet appareil de dissolution semble être le plus pratique et la plus efficace que l'appareil de type USP II pour estimer la libération de principe actif au cours du transit gastro-intestinal (Yang, 2008).

Les résultats de l'influence des différents paramètres de formulation sur la libération de la théophylline à partir des comprimés enrobés sont repris ci-dessous. Les quantités de théophylline libérées au cours du temps sont exprimées en pourcentage par rapport à la théophylline totale contenue dans les comprimés de départ.

6.2.1. Etude de l'influence de la composition des blocs polyacrylique sur la libération de la théophylline

L'objectif de cette étude était de mettre en évidence les effets de l'enchaînement des copolymères polyacryliques constitutifs des copolymères à blocs à base dextrans 70 sur les cinétiques de libération de la théophylline et d'évaluer les comportements de ces copolymères à blocs à base de dextrans dans des milieux d'épreuves qui simulent le passage dans le tractus gastro-intestinal. Les résultats de la libération de la théophylline à partir des comprimés nus et enrobés sont présentés dans la Figure 48.

Les comprimés nus ont été désagrégés dans le LGS en libérant presque la totalité de la théophylline après une heure dans le milieu d'épreuve. Comme il est mentionné ci-dessous, l'utilisation de comprimés à libération rapide permet d'évaluer plus facilement l'effet protecteur des enrobages.

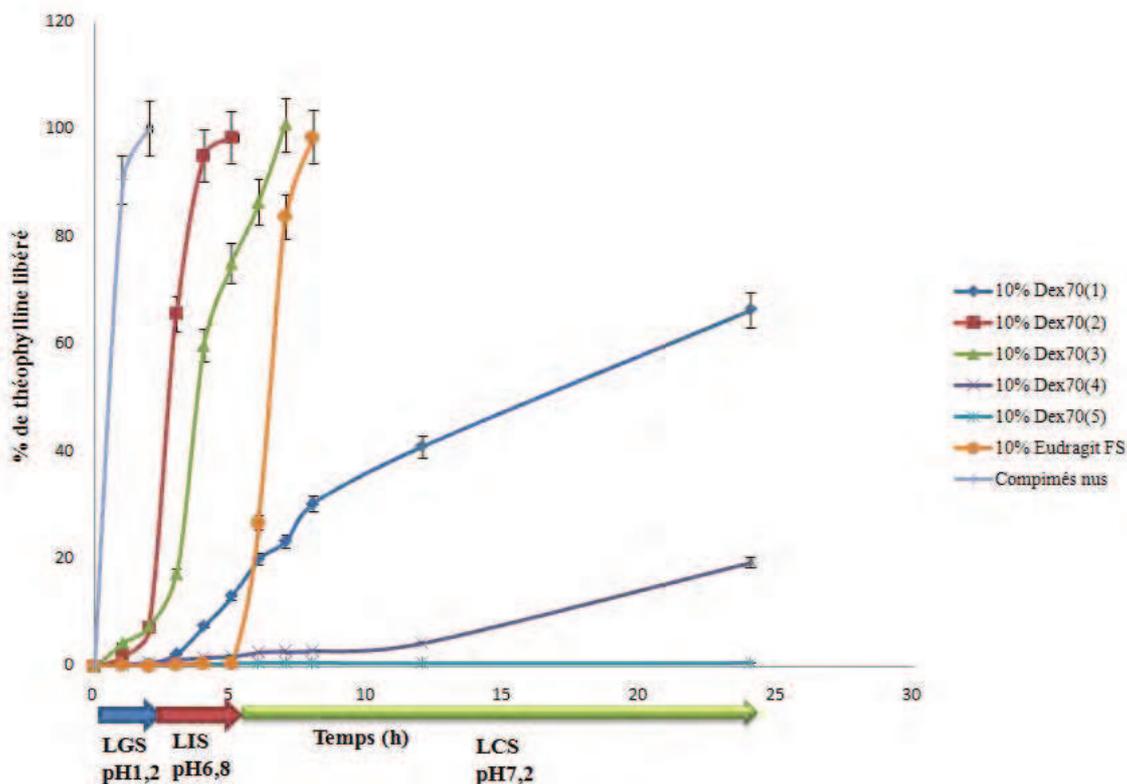


Figure 48: Influence de l'enchaînement des copolymères polyacryliques sur la libération de la théophylline. Dex70(1) : Dex70-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (70: 23: 6); Dex70(2) : Dex70-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (48: 28: 24); Dex70(3) : Dex70-b-P(MA-b-MAA) (83: 17); Dex70(4) : Dex70-b-P(MA-b-MAA) (94: 6); et Dex70(5) : Dex70-b-P(MA-b-MMA) (59 : 41).

Les résultats repris dans la Figure 48 montrent que la cinétique de libération de la théophylline à partir de comprimés enrobés varie suivant le type d'enchaînement des

copolymères polyacryliques et en particulier, le taux d'acide polyméthacrylique dans les blocs polyacryliques. En effet, lorsque ce taux est supérieur à 15%, dans les cas des Dex70 (2) et Dex70 (3), les comprimés enrobés se sont désagrégés dans le LIS en libérant complètement la théophylline contenue. Lorsque ce taux est inférieur à 8%, dans les cas des Dex70 (1) et Dex70 (4), les enrobages présents sur les comprimés permettent de protéger la théophylline contenue dans les LGS et LIS. Dans ces cas, la libération de la théophylline est progressivement augmentée dans le LCS. L'utilisation de Dex70(5) qui ne possède pas de séquence d'acide polyméthacrylique ne permet pas d'assurer la libération de la théophylline dans le milieu visé.

La comparaison entre les résultats obtenus permet de conclure que la vitesse de libération de la théophylline à partir des comprimés enrobés est directement proportionnelle à la teneur en acide polyméthacrylique dans les différents copolymères à blocs méthacrylique utilisés pour effectuer l'enrobage. Ainsi la cinétique de la libération de la théophylline se fait selon l'ordre suivant :

$$\text{Dex70 (2)} > \text{Dex70 (3)} > \text{Dex70(1)} > \text{Dex70(4)} > \text{Dex70(5)}$$

Cet effet peut-être attribué à l'augmentation de la teneur en groupements carboxyliques (COOH^{-1}) qui sont ionisés à pH neutre, ce qui contribue d'une part à hydrater plus facilement le copolymère en lui donnant une consistance d'hydrogel et d'autre part à augmenter la vitesse de libération de la théophylline à travers la couche d'enrobage (Kim, 2004; Skalsky and Petereit, 2008).

En ce qui concerne les comprimés enrobés avec 10% d'Eudragit® FS (qui contient 10% de PMAA), les résultats montrent que la libération de la théophylline est négligeable dans les LGS et LIS. Par la suite, une libération rapide est amenée endéans les deux heures qui suivent à pH 7,2. Cette libération est due à la solubilité de la couche d'enrobage suite à la valeur du pH rencontré, ce qui conduit également à la désagrégation des comprimés.

L'ensemble des résultats obtenus nous permet de conclure qu'un copolymère à blocs contenant moins de 10% d'acide polyméthacrylique est capable de protéger un principe actif dans l'estomac et l'intestin grêle. Néanmoins, il pourrait permettre une libération progressive du principe actif dans le côlon suite à l'augmentation du pH.

Les étapes du processus de libération du principe actif à partir de ce type d'enrobage peuvent être résumées de la manière suivante. Tout au long du tractus digestif, il y a :

- Ionisation du groupement carboxylique,
- Pénétration du milieu de dissolution à travers l'enrobage,
- Dissolution du principe actif à l'intérieur de la forme galénique,

- Diffusion vers l'extérieur, à travers le film d'enrobage, du principe actif dissous selon plusieurs mécanismes de libération possibles (Figure 49).

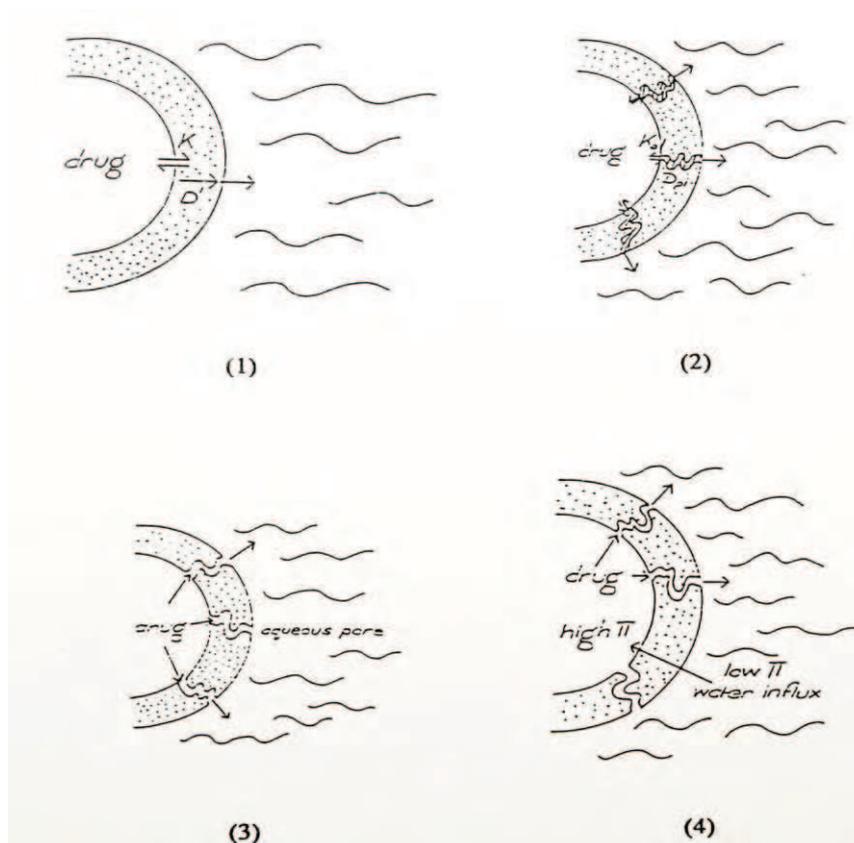


Figure 49: Schéma des différents mécanismes de libération des substances actives à partir des comprimés enrobés par de polymères insolubles : (1) solubilisation / diffusion à travers la phase homogène formée par les polymères plastifiés ; (2) solubilisation / diffusion à travers des pores constitués par le plastifiant ; (3) diffusion à travers des pores aqueux ; (4) libération sous impulsion d'un gradient des pressions osmotiques (Ozturk *et al.*, 1990).

6.2.2. Etude de l'influence du poids moléculaire du bloc de dextran sur la libération de la théophylline

Cette étude a pour but d'évaluer l'importance du type du dextran sur la libération de la théophylline à partir de comprimés enrobés respectivement avec 10% de différents copolymères à blocs qui possèdent tous les mêmes séquences polyacrylique et qui se différencient par le poids moléculaires de différents dextrans. Il s'agit de P (MA-b-MMA-b-MAA) (65 :25 :10), et de différents poids moléculaires de dextran (70 ; 45 ; 10 et 1,5 kg/mol).

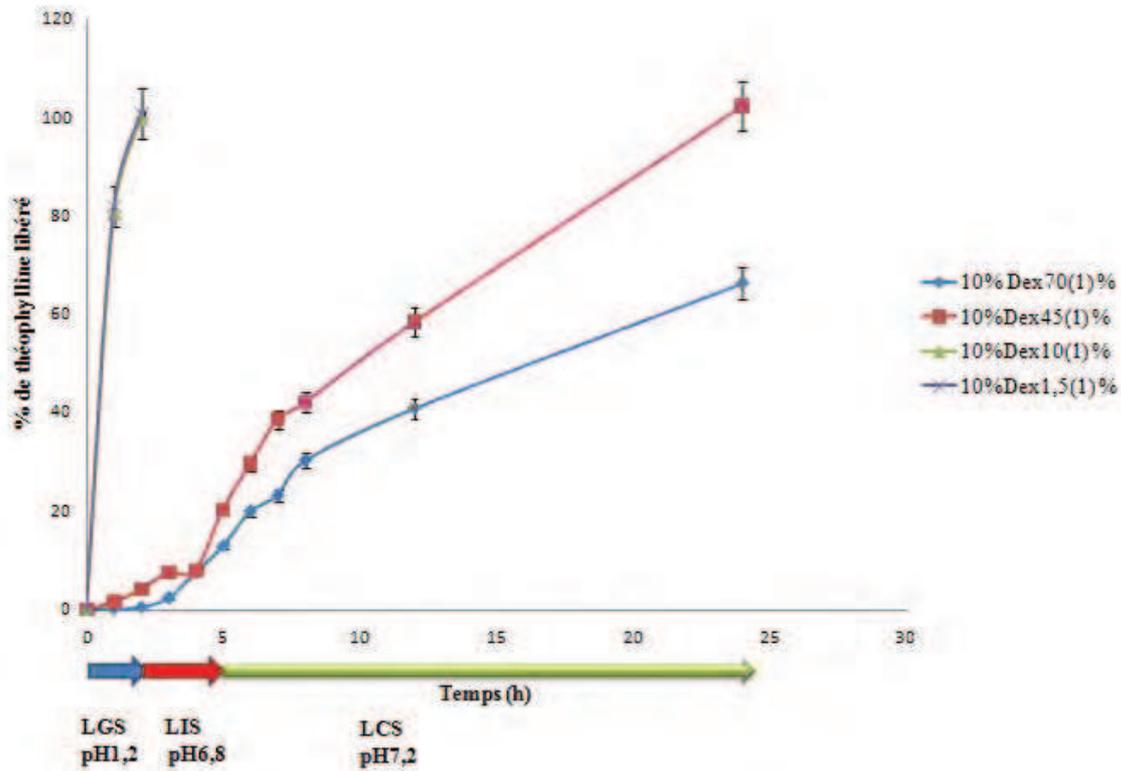


Figure 50: Influence des poids moléculaire de blocs dextrans sur la cinétique de libération de la théophylline.

La Figure 50 montre l'influence des poids moléculaires des blocs dextrans sur la cinétique de libération de la théophylline à partir de comprimés enrobés. L'examen de la Figure 50 permet de constater que la libération de la théophylline à partir de comprimés enrobés avec Dex10 (1) et Dex1,5 (1) a lieu rapidement dans le LGS et est quasiment totale après 2 h. Ces résultats signifient que ces enrobages ne permettent pas de protéger les comprimés pendant le temps de séjour gastrique. En revanche, les enrobages avec Dex 45 (1) et Dex 70 (1) permettent une protection satisfaisante des comprimés dans les LGS et LIS, ainsi la quantité de théophylline libérée est, dans ces deux cas, inférieure à 20%. En revanche, la libération de la théophylline a lieu de manière plus importante dans le LCS. La Figure 50 permet également d'observer une libération totale de la théophylline pour des comprimés enrobés avec Dex45 (1). Cependant, elle n'atteint que 70% dans le cas d'un enrobage avec Dex70 (1). Ces études ont montré également que l'enrobage avec Dex45(1) et Dex70 (1) peuvent ralentir de manière satisfaisante la libération dans la première partie du tractus gastro-intestinal.

Cette effet peut-être attribuer à réticulation entre la chaîne de dextran et la chaîne de polyacrylate, cependant, quand la chaîne de dextran plus longue la réticulation sera plus efficace et plus sériée.

6.2.3. Etude de l'influence du pourcentage d'enrobage sur la libération de la théophylline à partir de comprimés enrobés.

L'épaisseur de l'enrobage constitue également un paramètre important dont le formulateur doit prendre en compte pour réguler la vitesse de la libération des principes actifs à partir des formes pharmaceutique enrobées.

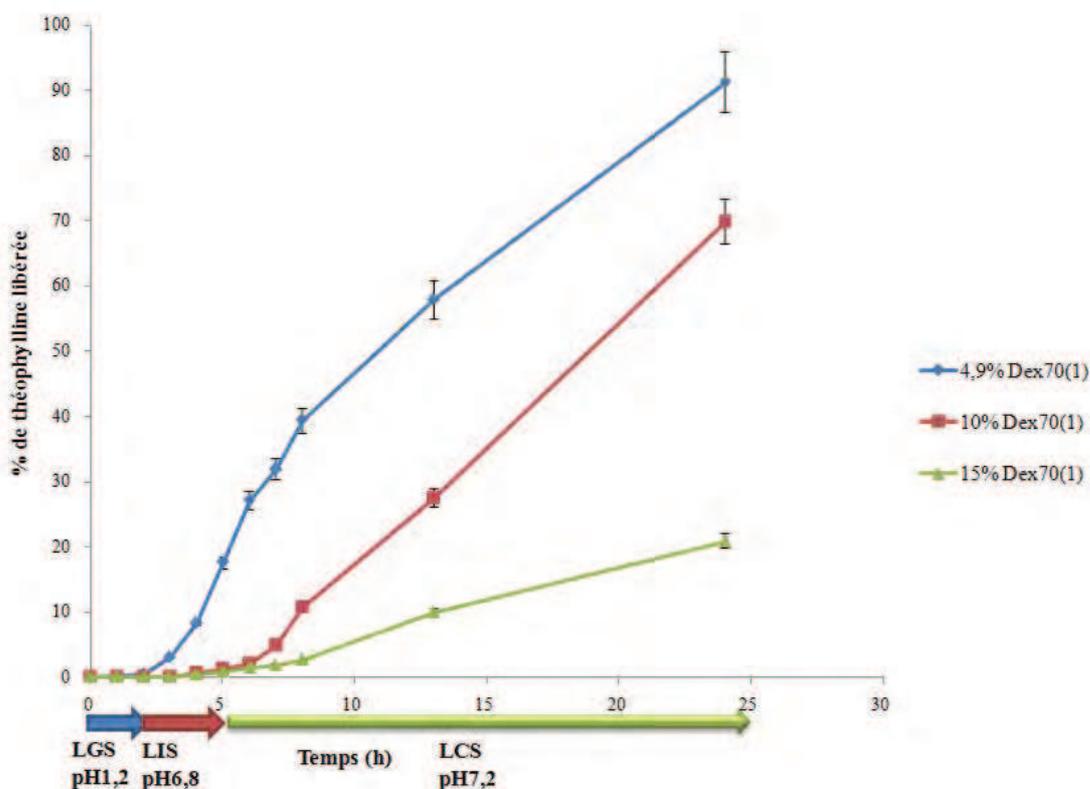


Figure 51: Influence du pourcentage d'enrobage sur la libération de la théophylline à partir des comprimés enrobés avec Dex70(1).

Les résultats de libération de la théophylline à partir de comprimés enrobés respectivement avec 4,9, 10 et 15% m/m de Dex70(1) sont présentés dans la Figure 51.

Ces résultats montrent que la libération de la théophylline à partir des comprimés enrobés est inversement proportionnelle au pourcentage d'enrobage. Ainsi, un ralentissement de plus en plus important de la libération de la théophylline est constaté lorsque le pourcentage d'enrobage passe de 4,9 à 15% m/m (Basit *et al.*, 2004; Kaur and Kim, 2009). Les résultats obtenus permettent de mettre en évidence l'efficacité du Dex70(1) à protéger des comprimés

lors de leur passage dans les LGS et LIS avec une teneur en enrobage ne dépassant pas 5% m/m.

6.2.4. Etude de l'influence du pH sur la libération de la théophylline

Cette étude a pour objectif de mettre en évidence la sensibilité des copolymères à blocs vis-à-vis la variation du pH rencontrée au cours du tractus gastro-intestinal sur la libération de la théophylline à partir de comprimés enrobés avec 10% m/m du Dex70(1) a été évaluée.

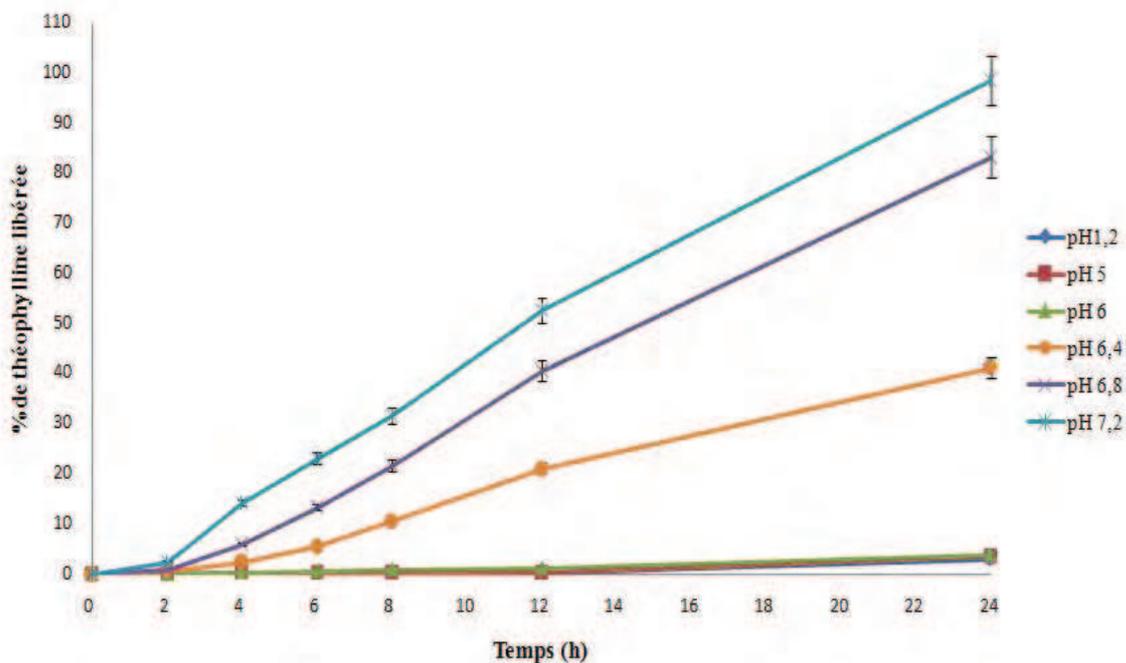


Figure 52: Influence du pH sur la vitesse de libération de la théophylline à partir de comprimés enrobés avec 10% m/m de Dex70 (1).

Les résultats de la libération de la théophylline à partir de comprimés enrobés à différents pH sont présentés dans la Figure 52. Ces résultats montrent que la libération à un pH inférieur ou égal à 6 est négligeable. Ainsi, la libération ne dépasse pas 5% à l'issue des 24 heures dans ces différents milieux d'épreuve. La cinétique de la libération est progressivement augmentée à partir de pH 6,4. Une libération totale est observée à l'issue des 24 heures lorsque le comprimé enrobé est dans un milieu d'épreuve à pH 7,2.

Ces résultats permettent de conclure qu'une augmentation significative de la libération a lieu à partir de certains pH, plus particulièrement aux pH supérieurs ou égaux à 6,4. Par conséquent,

la libération à partir des comprimés enrobés avec ces copolymères à blocs à base de dextran est, bien évidemment, dépendante du pH (Akhgari *et al.*, 2006b; Silva *et al.*, 2009).

Cette étude a également permis de mettre en évidence que les copolymères à blocs à base de dextran ont la capacité à protéger les principes actifs contenus dans un comprimé lors de son trajet dans la partie supérieure du tractus gastro-intestinal et permettent d'assurer une libération constante au niveau du côlon.

6.2.5. Etude de l'influence de la dextranase sur la vitesse de la libération de la théophylline à partir de comprimés enrobés avec 10% du Dex70(1).

Cette étude a pour objectif de mettre en évidence l'influence de la dextranase sur la vitesse de la libération de la théophylline à partir de comprimés enrobés. Elle a été réalisée à deux pH (6,4 et 7,2) en présence d'une concentration constante de dextranase.

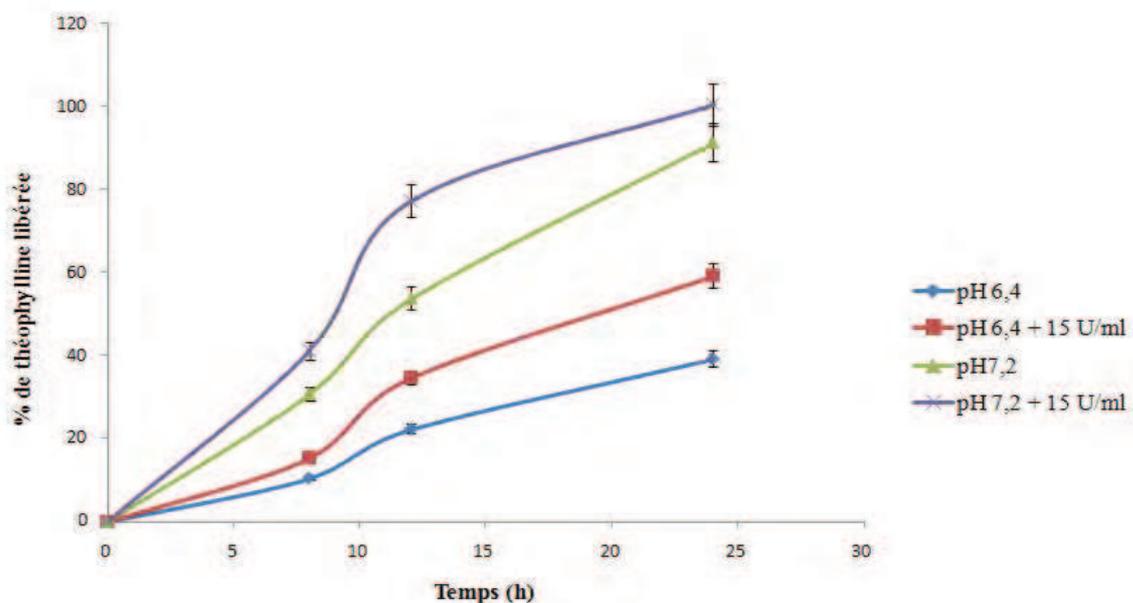


Figure 53: Influence de la dextranase sur la vitesse de la libération de la théophylline à partir de comprimés enrobés.

Les résultats de la libération de la théophylline sont présentés dans la Figure 53. Les courbes montrent que la libération de théophylline à partir de comprimés enrobés est augmentée en présence de dextranase (Bronsted *et al.*, 1998; Chiu *et al.*, 1999). Aussi que, la libération de la théophylline est plus importante à pH 7,2 en présence ou en absence de dextranase.

7. Conclusion

Afin d'évaluer l'aptitude des différents copolymères à blocs à base de dextrans synthétisés à délivrer des principes actifs dans la partie inférieure du tractus gastro-intestinal, des études de libération *in vitro* dans différents milieux d'épreuve mimant les milieux gastro-intestinaux ont été effectués sur des comprimés de théophylline enrobés avec différents copolymères à blocs à base de dextrans.

Ces études ont montré que la cinétique de libération de la théophylline varie fortement en fonction de deux principaux facteurs à savoir d'une part la composition et l'enchaînement de différentes séquences des blocs (poids moléculaire du bloc du dextran, teneur en acide polyméthacrylique), et d'autre part les conditions opératoires mise en œuvre lors des études (pH, teneur en enrobage), et enfin un facteur physiologique liée à la présence de dextranase.

De l'ensemble des résultats obtenus, il apparaît clairement que :

L'enrobage avec des copolymères à blocs à base de dextran 70 constitué d'un faible taux d'acide polyméthacrylique ont démontré une aptitude à protéger la forme pharmaceutique et son principe actif contenu au cours du trajet dans la partie supérieure du tractus gastro-intestinal et de délivrer l'ensemble du principe actif en concentration suffisante dans le côlon.

L'utilisation des enrobages à base de copolymère à blocs à base de dextran constitués d'une proportion importante d'acide polyméthacrylique (supérieure à 15%) ne permet pas d'assurer de libérer de manière spécifique des principes actifs dans le côlon.

L'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre ont démontré clairement que certains copolymères à blocs à base de dextrans peuvent constituer de nouveaux excipients très intéressants pour la préparation de formes pharmaceutiques orales innovantes à libération coliques.

Chapitre 5

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Au cours de ces dernières décennies, des progrès importants ont été réalisés dans le développement des systèmes qui permettent de délivrer les médicaments dans le côlon. Ces progrès ont permis d'assurer une libération locale ou systémique de substances actives au niveau du tube digestif.

Les systèmes agissant sur l'activité enzymatique du microbiote colique sont probablement ceux qui présentent le plus d'avantages pour assurer la libération des principes actifs au niveau du côlon. L'intérêt des polysaccharides dans la préparation de systèmes pour administration colique réside dans le fait qu'ils sont d'origine naturelle, non toxique et spécifiquement dégradés par les enzymes bactériennes du microbiote colique. Les dextrans font partie d'une famille de polysaccharides bactériens majoritairement linéaires et hydrosolubles. Pour l'utilisation qui est recherchée, ils doivent cependant être transformés en dérivés insolubles dans l'eau, dans les fluides gastro-intestinaux et être dégradés dans le côlon.

L'étude que nous avons entreprise a consisté à synthétiser de nouveaux excipients à base de dextran et destinés à un usage pharmaceutique. Plus précisément, ces excipients avaient pour but d'être utilisés comme agents d'enrobage ou agent matriciel d'une forme pharmaceutique solide à libération ciblée ou systémique au niveau du côlon. La bonne solubilité de ce type de polysaccharides et leurs faibles propriétés filmogènes les empêchaient d'être utilisés comme bons excipients permettant de délivrer spécifiquement au niveau du côlon des substances actives issues des formes pharmaceutiques orales.

Dans un premier temps, différents esters de dextran ont été synthétisés avec trois degrés différents de substitutions. Ces synthèses ont permis de réduire l'hydrophilie du dextran de manière à pouvoir les utiliser dans des systèmes d'enrobage ou matriciels d'une forme pharmaceutique orale destinée à la libération spécifique dans le côlon. Les études de biodégradabilité *in vitro* ont montré que la plupart des esters de dextran ne sont pas dégradés suite à l'action de la dextranase. L'absence de leur dégradation dans le microbiote colique ne permet pas pour la plupart d'entre eux d'être utilisés dans le domaine de la délivrance ciblée de substances actives au niveau du côlon. Inversement, les esters de dextran qui ont montré une forte hydrosolubilité et une bonne dégradation enzymatique *in vitro* (acétate de dextran avec un degré de substitution égal à 1) ne sont, non plus, pas adaptés pour amener spécifiquement une substance active intacte au niveau du côlon.

Dans une deuxième partie, nous avons étudié des systèmes d'enrobages en utilisant des copolymères multi blocs. Ces macromolécules sont composées d'une part, d'un bloc polysaccharides tel que le dextran et d'autre part, d'un bloc polyacrylique. Pour les synthétiser, une modification chimique par copolymérisation avec des polymères acryliques par voie radicalaire en émulsion a été appliquée avec succès sur différents types de dextrans. Des di, tri et tétra blocs copolymères ont été synthétisés. Un ensemble d'études a été réalisée sur ces composés et ils ont permis de mieux les identifier et de les caractériser.

Des résultats encourageants ont été obtenus à la suite de nos études de dégradation enzymatique *in vitro* et de la perméabilité à travers des films isolés d'une substance active modèle, la théophylline. Ils nous permettent d'envisager de potentielles utilisations de ces copolymères à blocs à base de dextrans comme excipients pour la préparation de formes pharmaceutiques orales à libération colique spécifique.

Au cours de ces études, l'aptitude des différents copolymères à blocs dans la libération de principes actifs dans la partie inférieure du tractus gastro-intestinal a également fait l'objet d'investigations. Des études de libération *in vitro* dans différents milieux d'épreuve mimant les milieux gastro-intestinaux ont été effectuées sur des comprimés contenant de théophylline et enrobés avec différents copolymères à blocs à base de dextrans.

Ces études ont montré que la cinétique de libération de la théophylline varie fortement en fonction de deux principaux facteurs qui sont la composition et l'enchaînement des différentes séquences des blocs (poids moléculaire du bloc du dextran, teneur en acide polyméthacrylique). Néanmoins, nous avons aussi observé que les conditions opératoires lors de la mise en œuvre de ces études (pH, teneur en enrobage) et la présence de dextranase (facteur physiologique) influent aussi beaucoup sur la performance des copolymères à blocs.

A l'issue de nos travaux, l'ensemble de nos résultats ont clairement mis en évidence que :

- L'enrobage avec des copolymères à blocs à base de dextran 70 constitué d'un faible taux d'acide polyméthacrylique permet de protéger efficacement au cours du transit gastro-intestinal la forme pharmaceutique et le principe actif qu'il contient. Selon les différents essais réalisés *in vitro*, ces copolymères devraient permettre de délivrer *in vivo* l'ensemble du principe actif en concentration suffisante dans le côlon.
- L'utilisation des enrobages à base de copolymères à blocs à base de dextran constitués d'une proportion importante d'acide polyméthacrylique (supérieure à 15%) ne permet pas d'assurer une libération spécifique des principes actifs au niveau du côlon.

L'ensemble des résultats présentés dans ce travail a démontré clairement que certains copolymères à blocs à base de dextrans peuvent constituer de nouveaux excipients très intéressants pour la préparation de formes pharmaceutiques orales innovantes à libération colique.

Enfin, nos travaux offrent de nombreuses perspectives. Ils encouragent notamment la mise en œuvre d'études *in vivo* chez l'animal, ce qui permettraient de confirmer l'efficacité de nos formes pharmaceutiques solides enrobées avec un ou plusieurs types de copolymères à blocs à base de dextran 70. De tels travaux permettraient de renforcer nos résultats *in vitro* et susciter le développement de tels copolymères à blocs en tant qu'agent d'enrobage ou matriciel pour délivrer spécifiquement un principe actif au niveau du côlon.

Il serait également intéressant de synthétiser et d'utiliser des copolymères à blocs à base de dextrans de tailles plus élevée (Dextran 100 ou 200 kDa).

Aussi qu'une étude de l'effet de différents types de plastifiants (hydrophobe ou hydrophile) sur la cinétique de la libération.

Chapitre 6

Références

- Abu Shamat, M. (1993). The role of the gastrointestinal microflora in the metabolism of drugs. *International journal of pharmaceutics* **97**, 1-13.
- Adkin, D. A., Davis, S. S., Sparrow, R. A., Huckle, P. D., Phillips, A. J., and Wilding, I. R. (1995a). The effect of different concentrations of mannitol in solution on small intestinal transit: implications for drug absorption. *Pharmaceutical research* **12**, 393-396.
- Adkin, D. A., Davis, S. S., Sparrow, R. A., Huckle, P. D., Phillips, A. J., and Wilding, I. R. (1995b). The effects of pharmaceutical excipients on small intestinal transit. *British journal of clinical pharmacology* **39**, 381-387.
- Adolfsson, A., and Nyström, C. (1996). Tablet strength, porosity, elasticity and solid state structure of tablets compressed at high loads. *International journal of pharmaceutics* **132**, 95-106.
- Aggett, P. J., Agostoni, C., Axelsson, I., Edwards, C. A., Goulet, O., Hernell, O., Koletzko, B., Lafeber, H. N., Micheli, J. L., Michaelsen, K. F., Rigo, J., Szajewska, H., and Weaver, L. T. (2003). Nondigestible carbohydrates in the diets of infants and young children: a commentary by the ESPGHAN committee on nutrition. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **36**, 329-337.
- Aimone, A. M., Connolly, B., Chaudhary, S., Lugtu-Pe, J., Martinuzzi, F., Pencharz, P., and O'Connor, D. L. (2009). A combination of pH-sensitive caplet coatings may be an effective noninvasive strategy to deliver bioactive substances, nutrients, or their precursors to the colon. *Applied physiology, nutrition, and metabolism* **34**, 893-900.
- Akhgari, A., Afrasiabi Garekani, H., Sadeghi, F., and Azimaie, M. (2005). Statistical optimization of indomethacin pellets coated with pH-dependent methacrylic polymers for possible colonic drug delivery. *International journal of pharmaceutics* **305**, 22-30.
- Akhgari, A., Farahmand, F., Afrasiabi Garekani, H., Sadeghi, F., and Vandamme, T. F. (2006a). Permeability and swelling studies on free films containing inulin in combination with different polymethacrylates aimed for colonic drug delivery. *European journal of pharmaceutical sciences* **28**, 307-314.
- Akhgari, A., Sadeghi, F., and Garekani, H. A. (2006b). Combination of time-dependent and pH-dependent polymethacrylates as a single coating formulation for colonic delivery of indomethacin pellets. *International journal of pharmaceutics* **320**, 137-142.
- Alderborn, G. (2002). Tablets and compaction In *Pharmaceutics: The science of dosage form design* (M. E. Aulton, Ed.), pp. 397-440. Churchill Livingstone, England.

- Alias, J., Goñi, I., and Gurruchaga, M. (2007). Enzymatic and anaerobic degradation of amylose based acrylic copolymers, for use as matrices for drug release. *Polymer degradation and stability* **92**, 658-666.
- Allen, L. V. (1998). *The art, science, and technology of pharmaceutical compounding*. American pharmaceutical association, Washington.
- Amidon, G. L., Lennernas, H., Shah, V. P., and Crison, J. R. (1995). A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res* **12**, 413-420.
- Arhewoh, I. M., Ahonkhai, E. I., and Okhamafe, A. O. (2005). Optimising oral systems for the delivery of therapeutic proteins and peptides. *African journal of biotechnology* **4**, 1591-1597.
- Arhewoh, I. M., and Okhamafe, A. O. (2004). An overview of site-specific delivery of orally administered proteins/peptides and modelling considerations. *Journal of Biomedical Sciences* **3** 7-20.
- Arranz, F., San Roman, J., and SANCHEZ-CHAVES, M. (1987). ¹³C NMR study of the selectivity in the modification of dextran with ethyl chloroformate. *Macromolecules* **20**, 801-806.
- Arranz, F., and Sánchez-Chaves, M. (1988). ¹³C nuclear magnetic resonance spectral study on the distribution of substituents in relation to the preparation method of partially acetylated dextrans. *Polymer* **29**, 507-512.
- Ashford, M., Fell, J. T., Attwood, D., and Woodhead, P. J. (1993). An in vitro investigation into the suitability of pH-dependent polymers for colonic targeting. *International journal of pharmaceuticals* **91**, 241-245.
- Aube, A. C., Cherbut, C., and Galmiche, J. P. (1995). Acides gras à chaîne courte : rôle en pathogénie intestinale et potentiel thérapeutique en gastroentérologie. *Hépatogastro* **2**, 447-455.
- Bai, J. P., Guo, J. H., and Chaubal, M. V. (2006). Use of nonactive pharmaceutical excipients in oral drug formulations: Biopharmaceutical classification system considerations In *Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery systems* (A. Katdare, and M. V. Chaubal, Eds.), pp. 181-195. Taylor and Francis Group, New York.
- Banker, G. S., and Rhodes, C. T. (2002). Modern pharmaceuticals. *Marcel Dekker Inc.*
- Basit, A. W. (2005). Advances in colonic drug delivery. *Drugs* **65**, 1991-2007.
- Basit, A. W., and Bloor, J. (2003). Perspectives on colonic drug delivery *Business briefing: Pharmatech* **May** 189-190.
- Basit, A. W., and Ibekwe, V. C. (2007). Colonic drug delivery formulation In *World intellectual property organization. WO 2007/122374*

- Basit, A. W., Newton, J. M., Short, M. D., Waddington, W. A., Ell, P. J., and Lacey, L. F. (2001). The effect of polyethylene glycol 400 on gastrointestinal transit: implications for the formulation of poorly-water soluble drugs. *Pharmaceutical research* **18**, 1146-1150.
- Basit, A. W., Podczeck, F., Michael Newton, J., Waddington, W. A., Ell, P. J., and Lacey, L. F. (2004). The use of formulation technology to assess regional gastrointestinal drug absorption in humans. *European journal of pharmaceutical sciences* **21**, 179-189.
- Basit, A. W., Podczeck, F., Newton, J. M., Waddington, W. A., Ell, P. J., and Lacey, L. F. (2002). Influence of polyethylene glycol 400 on the gastrointestinal absorption of ranitidine. *Pharmaceutical research* **19**, 1368-1374.
- Basit, A. W., Short, M. D., and McConnell, E. L. (2009). Microbiota-triggered colonic delivery: robustness of the polysaccharide approach in the fed state in man. *Journal of drug targeting* **17**, 64-71.
- Batchelor, H., and Conway, B. (2007). Targeting infections within the gastrointestinal tract. In *Advanced drug formulation design to optimize therapeutic outcomes* (R. O. Williams III, D. R. Taft, and J. T. Mcconville, Eds.). Informa Healthcare, New York.
- Bauer, K. H., and Kesselhut, J. F. (1995). Novel pharmaceutical excipients for colon targeting. *STP pharma sciences* **5**, 54-59.
- Bauer, K. H., Lehmann, K., Osterwald, H. P., and Rothgang, G. (1998). *Coated pharmaceutical dosage forms: Fundamentals, manufacturing techniques, biopharmaceutical aspects, test methods and raw materials*. CRC Press, Stuttgart.
- Bayat, A., Dorkoosh, F. A., Dehpour, A. R., Moezi, L., Larijani, B., Junginger, H. E., and Rafiee-Tehrani, M. (2008). Nanoparticles of quaternized chitosan derivatives as a carrier for colon delivery of insulin: Ex vivo and in vivo studies. *International journal of pharmaceutics* **356**, 259-266.
- Behzadi, S. S., Klocker, J., Huttlin, H., Wolschann, P., and Viernstein, H. (2005). Validation of fluid bed granulation utilizing artificial neural network. *International journal of pharmaceutics* **291**, 139-148.
- Bernier, J. J., Andrian, J., and Vidon, N. (1988a). Anatomie fonctionnelle du tube digestif. In *Les aliments dans le tube digestif* pp. 25-42. Doin, Paris
- Bernier, J. J., Andrian, J., and Vidon, N. (1988b). Côlon et formation de la selle. In *Les aliments dans le tube digestif* pp. 101-114. Doin, Paris.
- Bernier, J. J., Andrian, J., and Vidon, N. (1988c). Les bactéries et les aliments dans le côlon. In *Les aliments dans le tube digestif*, pp. 383-411. Doin, Paris.
- Bernier, J. J., Andrian, J., and Vidon, N. (1988d). Les fonctions coliques (Absorption et motricité). In *Les aliments dans le tube digestif* pp. 413 - 424. Doin Paris.

- Bertholon, I., Lesieur, S., Labarre, D., Besnard, M., and Vauthier, C. (2006). Characterization of dextran-Poly(isobutylcyanoacrylate) copolymers obtained by redox radical and anionic emulsion polymerization. *Macromolecules* **39**, 3559-3567.
- Bindschaedler, C., Gurny, R., and Doelker, E. (1983). Notions théoriques sur la formation des films obtenus à partir de microdispersions aqueuses et application à l'enrobage. *Labo Pharma, Problèmes et techniques* **31**, 389-394.
- Bolhuis, G. K., and VChowhan, Z. T. (1996). Materials for direct compaction In *Pharmaceutical powder compaction technology* (G. Alderborn, and C. Nyström, Eds.), pp. 419-500. Marcel Dekker, New York.
- Brøndsted, H., Andersen, C., and Hovgaard, L. (1998). Crosslinked dextran--a new capsule material for colon targeting of drugs. *Journal of controlled release* **53**, 7-13.
- Brøndsted, H., Andersen, C., and Hovgaard, L. (1998). Crosslinked dextran - A new capsule material for colon targeting of drugs. *Journal of controlled release* **53**, 7-13.
- Brøndsted, H., and Kopecek, J. (1992). Hydrogels for site-specific drug delivery to the colon: In vitro and in vivo degradation. *Pharmaceutical research* **9**, 1540-1545.
- Brossard, C., and Lefort Des Ylouses, D. (1984). Prolongation d'action pour la voie orale par des techniques de macroenrobage par film *Labo pharma, problèmes et techniques* **32**, 857-871.
- Brown, G. L. (1956). Formation of films from polymer dispersions. *Journal of polymer science* **22**, 423-434.
- Bruneel, D., and Schacht, E. (1994). Chemical modification of pullulan. III: Succinylation. *Polymer* **34**, 2656-2658.
- Buchanan, C. M., Hyatt, J. A., and Lowman, D. W. (1987). Two-dimensional NMR of polysaccharides: spectral assignments of cellulose triesters. *Macromolecules* **20**, 2750-2754.
- Buhmann, S., Kirchhoff, C., Ladurner, R., Mussack, T., Reiser, M. F., and Lienemann, A. (2007). Assessment of colonic transit time using MRI: a feasibility study. *European radiology* **17**, 669-674.
- Burcelin, R., Luche, E., Serino, M., and Chabo, C. (2009). Flore intestinale : de nouveaux concepts pour la régulation du métabolisme énergétique. *Sang thrombose vaisseaux* **21**, 322-333.
- Carlin, B., Li, J.-X., and Felton, L. A. (2008). Pseudolatex dispersions for controlled drug delivery. In *Aqueous polymeric coatings for pharmaceutical dosage forms* (J. W. McGinity, and L. A. Felton, Eds.), pp. 1-46. Informa Healthcare, New York.
- Carr, R. L. (1965). Evaluating flow properties of solids. *Chemical engineering science* **18**, 163-168.
- Casadei, M. A., Cerreto, F., Cesa, S., Giannuzzo, M., Feeney, M., Marianecchi, C., and Paolicelli, P. (2006). Solid lipid nanoparticles incorporated in dextran hydrogels: a

- new drug delivery system for oral formulations. *International journal of pharmaceutics* **325**, 140-146.
- Casadei, M. A., Pitarresi, G., Calabrese, R., Paolicelli, P., and Giammona, G. (2008). Biodegradable and pH-sensitive hydrogels for potential colon-specific drug delivery: Characterization and in vitro release studies. *Biomacromolecules* **9**, 43-49.
- Casinos, I. (1992). Role of ceric ion in the heterogeneous graft polymerization of olefins on cellulose. *Polymer* **23**, 1304-1315.
- Castellano, I., Goñi, I., Gurruchaga, M., Velasco, M. V., Muñoz, A., and Jimenez-Castellanos, M. R. (1997). Contribution to the study of new graft copolymer matrices for drug delivery systems. Technological study *International journal of pharmaceutics* **146**, 71-79.
- Charman, S. A., and Charman, W. N. (2003). Oral modified-release delivery System dans Modified-release drug delivery technology. In *Modified release drug delivery technology* (M. J. Rathbone, J. Hadgraft, and M. S. Roberts, Eds.), pp. 1-10, New York.
- Charman, W. N., Porter, C. J., Mithani, S., and Dressman, J. B. (1997). Physiochemical and physiological mechanisms for the effects of food on drug absorption: the role of lipids and pH. *Journal of pharmaceutical sciences* **86**, 269-282.
- Chauvierre, C., Labarre, D., Couvreur, P., and Vauthier, C. (2003a). Novel polysaccharide-decorated poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles. *Pharmaceutical research* **20**, 1786-1793.
- Chauvierre, C., Labarre, D., Couvreur, P., and Vauthier, C. (2003b). Radical emulsion polymerization of alkylcyanoacrylates initiated by the redox system dextran-cerium(IV) under acidic aqueous conditions. *Macromolecules* **36**, 6018-6027.
- Chen, F. M., Zhao, Y. M., Sun, H. H., Jin, T., Wang, Q. T., Zhou, W., Wu, Z. F., and Jin, Y. (2007). Novel glycidyl methacrylated dextran (Dex-GMA)/gelatin hydrogel scaffolds containing microspheres loaded with bone morphogenetic proteins: formulation and characteristics. *Journal of controlled release* **118**, 65-77.
- Cheng, G., An, F., Zou, M.-J., Sun, J., Hao, X.-H., and He, Y.-X. (2004). Time- and pH-dependent colon-specific drug delivery for orally administered diclofenac sodium and 5-aminosalicylic acid. *World journal of gastroenterology* **10**, 1769-1774.
- Chiu, H.-C., Hsiue, G.-H., Lee, Y.-P., and Huang, L.-W. (1999). Synthesis and characterization of pH-sensitive dextran hydrogels as a potential colon-specific drug delivery system. *Journal of biomaterials science, polymer edition* **10**, 591-608.
- Chiu, H. C., Wu, A. T., and Lin, Y. F. (2002). Synthesis and characterization of acrylic acid-containing dextran hydrogels. *Polymer* **42**, 1471-1479.
- Chourasia, M. K., and Jain, S. K. (2003). Pharmaceutical approaches to colon targeted drug delivery systems. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **6**, 33-66.

- Chourasia, M. K., and Jain, S. K. (2004). Polysaccharides for Colon Targeted Drug Delivery. *Drug delivery: Journal of delivery and targeting of therapeutic agents* **11**, 129-148.
- Ciftci, K., and Groves, M. J. (1996). Delivery of antitumor compounds to the rat colon: In vitro and in vivo evaluation. *International journal of pharmaceuticals* **145**, 157-164.
- Cigdem, Y., and Ufuk, Y. (2005). Redox polymerization of methyl methacrylate with allyl alcohol 1,2-butoxylate-block-ethoxylate initiated by Ce(IV)/HNO₃ redox system. *European polymer journal* **41**, 177-184.
- Colinet, I., Dulong, V., Mocanu, G., Picton, L., and Le Cerf, D. (2009). New amphiphilic and pH-sensitive hydrogel for controlled release of a model poorly water-soluble drug. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceuticals* **73**, 345-350.
- Cone, R. A. (2009). Barrier properties of mucus. *Advanced drug delivery reviews* **61**, 75-85.
- Corthier, G. (2007). Flore intestinale et santé : quels enjeux ? *Nutrition clinique et métabolisme* **21**, 76-80.
- Costill, D. L., and Saltin, B. (1974). Factors limiting gastric emptying during rest and exercise. *Journal of applied physiology* **37**, 679-683.
- Croucher, S. C., Houston, A. P., Bayliss, C. E., and Turner, R. J. (1983). Bacterial populations associated with different regions of the human colon wall. *Applied and environmental microbiology* **45**, 1025-1033.
- Cummings, J. H., Milojevic, S., Harding, M., Coward, W. A., Gibson, G. R., Botham, R. L., Ring, S. G., Wraight, E. P., Stockham, M. A., Allwood, M. C., and Newton, J. M. (1996). In vivo studies of amylose-and ethylcellulose-coated [¹³C]glucose microspheres as a model for drug delivery to the colon. *Journal of controlled release* **40**, 123-131.
- Cummings, J. H., Pomare, E. W., Branch, W. J., Naylor, C. P., and Macfarlane, G. T. (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* **28**, 1221-1227.
- Davis, S. S., Hardy, J. G., and Fara, J. W. (1986). Transit of pharmaceutical dosage forms through the small intestine. *Gut* **27**, 886-892.
- de Belder, A. N. (2003). Dextran, pp. 1-62. Amersham Biosciences, Piscataway.
- De Bodman, D. (2008). Et si la santé de demain passait par la flore intestinale ? In *Dossier de presse*, pp. 1-18. PiLeJe La micronutrition, Paris.
- De Dosso, S., Sessa, C., and Saletti, P. (2009). Adjuvant therapy for colon cancer: present and perspectives. *Cancer Treat Rev* **35**, 160-166.
- Deferme, S., Annaert, P., and Augustijns, P. (2008). In vitro screening models to assess intestinal drug absorption and metabolism. In *Drug absorption studies in situ, in vitro and In silico models* (C. Ehrhardt, and K. J. Kim, Eds.), pp. 182-215. Springer-Verlag, New York

- Dellacherie, E. (1996). Polysaccharides in oxygen-carrier blood substitutes. In *Polysaccharides in medicinal applications* (S. Dumitriu, Ed.), pp. 525-544. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Derkaoui, S. M., Avramoglou, T., Barbaud, C., and Letourneur, D. (2008). Synthesis and characterization of a new polysaccharide-graft-polymethacrylate copolymer for three-dimensional hybrid hydrogels. *Biomacromolecules* **9**, 3033-3038.
- Devereux, J. E., Newton, J. M., and Short, M. B. (1990). The influence of density on the gastrointestinal transit of pellets. *The Journal of pharmacy and pharmacology* **42**, 500-501.
- Dew, M. J., Hughes, P. J., and Lee, M. G. (1982). An oral preparation to release drugs in the human colon. *British journal of clinical pharmacology* **14**, 405-408.
- Dew, M. J., Ryder, R. E., Evans, N., Evans, B. K., and Rhodes, J. (1983). Colonic release of 5-amino salicylic acid from an oral preparation in active ulcerative colitis. *British journal of clinical pharmacology* **16**, 185-187.
- Dillon, R. E., Matheson, L. A., and Bradford, E. B. (1951). Sintering of synthetic latex particles. *Journal of colloid science* **6**, 108-117.
- Dubey, R., Omrey, P., Vyas, S. P., and Jain, S. K. (2010). Development and characterization of colon specific drug delivery system bearing 5-ASA and camylofine dihydrochloride for the treatment of ulcerative colitis. *Journal of drug targeting*.
- Ducrotté, P. (2005). Physiologie de la vidange gastrique. In *Xème journée normande d'anesthésie-réanimation*. (P. Ducrotté, Ed.), pp. 1-3, Rouen.
- Dupayage, L., Save, M., Dellacherie, E., Nouvel, C., and Six, J. L. (2008). PMMA-Grafted dextran glycopolymers by atom transfer radical polymerization. *Journal of polymer science: Part A: polymer chemistry* **46**, 7606-7620.
- Echeverria, I., Silva, I., Goni, I., and Gurruchaga, M. (2005). Ethyl methacrylate grafted on two starches as polymeric matrices for drug delivery. *Journal of applied polymer science* **96**, 523-536.
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., and Relman, D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **308**, 1635-1638.
- Edgar, K. J., Buchanan, C. M., Debenham, J. S., Rundquist, P. A., Seiler, B. D., Shelton, M. C., and Tindall, D. (2001). Advances in cellulose ester performance and application *Progress in polymer science* **26**, 1605-1688.
- Ek, R., Wormald, P., Ôstelius, J., Iversen, T., and Nyström, C. (1995). Crystallinity index of microcrystalline cellulose particles compressed into tablets. *International journal of pharmaceutics* **125**, 257-264.
- Englyst, H. N., Hay, S., and Macfarlane, G. T. (1987). Polysaccharide breakdown by mixed populations of human faecal bacteria. *FEMS Microbiology letters* **45**, 163-171.

- Fadda, H. M., and Basit, A. W. (2005). Dissolution of pH responsive formulations in media resembling intestinal fluids : bicarbonate versus phosphate buffers. *Journal of drug delivery science and technology* **15**, 273-279.
- Fadda, H. M., McConnell, E. L., Short, M. D., and Basit, A. W. (2009a). Meal-induced acceleration of tablet transit through the human small intestine. *Pharmaceutical research* **26**, 356-360.
- Fadda, H. M., Merchant, H. A., Arafat, B. T., and Basit, A. W. (2009b). Physiological bicarbonate buffers: stabilisation and use as dissolution media for modified release systems. *International journal of pharmaceutics*.
- Fadda, H. M., Mohamed, M. A., and Basit, A. W. (2008). Impairment of the in vitro drug release behaviour of oral modified release preparations in the presence of alcohol. *International journal of pharmaceutics* **360**, 171-176.
- Fallingborg, J., Christensen, L. A., Jacobsen, B. A., and Rasmussen, S. N. (1993). Very low intraluminal colonic pH in patients with active ulcerative colitis. *Digestive diseases and sciences* **38**, 1989-1993.
- Fan, L. F., He, W., Chang, Y. Z., Xiang, B., Du, Q., Wang, F., Qin, M., and Cao, D. Y. (2009). Studies of chitosan/Kollicoat SR 30D film-coated tablets for colonic drug delivery. *International journal of pharmaceutics* **375**, 8-15.
- Fanta, G. F., Burr, R. C., and Doane, W. M. (1982). Graft polymerization of acrylonitrile and methyl acrylate onto hemicellulose. *Journal of applied polymer science* **27**, 4239-4250.
- Ferruti, P., Tanzi, M. C., and Vaccaroni, F. (1979). Synthesis and exchange reactions of biodegradable drug-binding matrices. *Macromolekulare chemie* **180**, 476-482.
- Fischer, S., Voigt, W., and Fischer, K. (1999). The behaviour of cellulose in hydrated melts of the composition $\text{LiX} \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ($\text{X} = \text{I}^-, \text{NO}_3^-, \text{CH}_3\text{COO}^-, \text{ClO}_4^-$). *Cellulose* **6**, 213-219.
- Foster, K. D., Bronlund, J. E., and Paterson, A. H. J. T. (2005). The prediction of moisture sorption isotherms for dairy powders. *International dairy journal* **15**, 411-418.
- Franssen, O., Stenekes, R. J., and Hennink, W. E. (1999). Controlled release of a model protein from enzymatically degrading dextran microspheres. *Journal of controlled release* **59**, 219-228.
- Fukui, E., Miyamura, N., Yoneyama, T., and Kobayashi, M. (2001). Drug release from and mechanical properties of press-coated tablets with hydroxypropylmethylcellulose acetate succinate and plasticizers in the outer shell. *Int J Pharm* **217**, 33-43.
- Gagnaire, D., and Vignon, M. (1977). Etude par ^{13}C NMR et ^1H NMR du dextrane et ses dérivés acétylés et benzylés. *Die makromolekulare chemie* **178**, 2321-2333.
- Ganong, W., and Jobin, M. (2005a). La digestion et l'absorption. In *Physiologie médicale* (W. Ganong, and M. Jobin, Eds.), pp. 441-451. De Boeck & Larcier Bruxelles.

- Ganong, W., and Jobin, M. (2005b). La régulation de l'activité gastro-intestinal. In *Physiologie médicale* (W. Ganong, and M. Jobin, Eds.), pp. 452-484. De Boeck & Larcier Bruxelles.
- Gao, C., Huang, J., Jiao, Y., Shan, L., Liu, Y., Li, Y., and Mei, X. (2006). In vitro release and in vivo absorption in beagle dogs of meloxicam from Eudragit® FS 30 D-coated pellets. *International journal of pharmaceutics* **322**, 104-112.
- Gazzaniga, A., Edvige Sangalli, M., and Giordano, F. (1994). Chronotopic® drug delivery systems for time (delayed-pulsatile) and/or site specific release. *Proceedings of the controlled release society*, 744-745.
- Genung, L. B., and Mallatt, R. C. (1941). Analysis of cellulose derivative. Determination of total combined acyl in cellulose organic esters. *Industrial and engineering chemistry, Analytical edition* **13**, 369-374.
- Goldszal, A., and Bousquet, J. (2001). Wet agglomeration of powders: from physics toward process optimization. *Powder technology* **117**, 221-231.
- Griffin, B., and Driscoll, C. O. (2008). Models of the Small Intestine. In *Drug absorption studies in Situ, in vitro and in silico models* (C. Ehrhardt, and K. J. Kim, Eds.), pp. 34-76, New York.
- Guarner, F., and Malagelada, J. R. (2003). Gut flora in health and disease. *Lancet* **361**, 512-519.
- Guillou, M., Gosse, G., Corthier, G., and Lagadic, L. (2006). Alimentation et santé : le rôle de la microflore du tube digestif. In *La recherche d'aujourd'hui pour l'agronomie de demain*. (INRA, Ed.), pp. 27-40. INRA, paris.
- Gupta, V. K., Assmus, M. W., Beckert, T. E., and Price, J. C. (2001). A novel pH- and time-based multi-unit potential colonic drug delivery system. II. Optimization of multiple response variables. *International journal of pharmaceutics* **213**, 93-102.
- Gurruchaga, M., Goñi, I., Vazquez, B., Valero, M., and Guzman, G. M. (1992). Analysis of graft copolymers onto starch by ¹³C NMR spectroscopy. *Macromolecules* **25**, 3009-3014.
- Han, T. L., Kumar, R. N., Rozman, H. D., and Noor, M. A. M. (2003). GMA grafted Sago starch as a reactive component in ultra violet radiation curable coatings. *Carbohydrate polymers* **54**, 509-516.
- Hao, W. L., and Lee, Y. K. (2004). Microflora of the gastrointestinal tract: a review. *Methods in molecular biology* **268**, 491-502.
- Hardy, J. G., Lee, S. W., Clark, A. G., and Reynolds, J. R. (1986). Enema volume and spreading. *International Journal of Pharmaceutics* **31**, 151-155.
- Hausner, H. H. (1967). Friction conditions in mass of metal powder. *International journal of powder metallurgy* **3**, 7-13.

- Hebden, J. M., Blackshaw, P. E., Perkins, A. C., Wilson, C. G., and Spiller, R. C. (2000). Limited exposure of the healthy distal colon to orally-dosed formulation is further exaggerated in active left-sided ulcerative colitis. *Alimentary pharmacology and therapeutics* **14**, 155-161.
- Heinrich, J., and Mischnick, P. (1999). Determination of the substitution pattern in the polymer chain of Cellulose acetates. *Journal of polymer science. Part A. Polymer chemistry* **37**, 3011-3016.
- Heinze, T., Libebert, T., and Kaschella, A. (2006). *Esterification of polysaccharides*. Springer, New York.
- Hejazi, R., and Amiji, M. (2003). Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. *Journal of controlled release* **89**, 151-165.
- Hennink, W. E., Franssen, O., van Dijk-Wolthuis, W. N. E., and Talsma, H. (1997). Dextran hydrogels for the controlled release of proteins *Journal of controlled release* **48** 107-114.
- Hirata, Y., Aoki, M., Kobatake, H., and Yamamoto, H. (1999a). Insolubilization of water-soluble dextran. *Biomaterials* **20**, 303-307.
- Hirata, Y., Sano, Y., Aoki, M., Kobatake, H., Kato, S., and Yamamoto, H. (1999b). Structural Change in Dextran: Mechanism of Insolubilization by Adsorption on the Air-Liquid Interface. *Journal of colloid and interface science* **212**, 530-534.
- Holzappel, W. H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., and Huis in't Veld, J. H. J. (1998). Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology* **41**, 85-101.
- Hopkins, M. J., Sharp, R., and Macfarlane, G. T. (2002). Variation in human intestinal microbiota with age. *Digestive and liver disease* **34 Suppl 2**, S12-18.
- Hovgaard, L., and Brøndsted, H. (1995). Dextran hydrogels for colon-specific drug delivery. *Journal of controlled release* **36**, 159-166.
- Ibekwe, V. C., Fadda, H. M., McConnell, E. L., Khela, M. K., Evans, D. F., and Basit, A. W. (2008). Interplay between intestinal pH, transit time and feed status on the in vivo performance of pH responsive ileo-colonic release systems. *Pharmaceutical research* **25**, 1828-1835.
- Ibekwe, V. C., Kendall, R. A., and Basit, A. W. (2004). Drug Delivery to the Colon. In *Pharma ventures*. (P. ventures, Ed.), pp. 27-30. The drug delivery companies
- Ibekwe, V. C., Liu, F., Fadda, H. M., Khela, M. K., Evans, D. F., Parsons, G. E., and Basit, A. W. (2006). An investigation into the in vivo performance variability of pH responsive polymers for ileo-colonic drug delivery using gamma scintigraphy in humans. *Journal of pharmaceutical sciences* **95**, 2760-2766.
- Ibekwe, V. C., Parsons, G. E., and Basit, A. W. (2003). A scintigraphic study to assess the performance of pH responsive colonic drug delivery dosage forms in humans. *AAPS Pharmaceutical sciences* **5**, p. W4126 (abstract).

- Ikeda, N., Saito, Y., Shimizu, J., Ochi, A., Mizutani, J., and Watabe, J. (1994). Variations in concentrations of bacterial metabolites, enzyme activities, moisture, pH and bacterial composition between and within individuals in faeces of seven healthy adults. *The journal of applied bacteriology* **77**, 185-194.
- Illum, L. (1998). Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharmaceutical research* **15**, 1326-1331.
- Isolauri, E., Kirjavainen, P. V., and Salminen, S. (2002). Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation? *Gut* **50 (Suppl 3)**, III54-III59.
- IUPAC (1974). Commission on macromolecular nomenclature; Basic definitions of terms relating to polymers *Pure and applied chemistry* **40**, 479- 491.
- Iveson, S. M., Litser, J. D., Hapgood, K., and Ennis, B. J. (2001). Nucleation, growth and breakage phenomena in agitated wet granulation processes: a review. *Powder technology* **117**, 3-39.
- Jain, A., Gupta, Y., and Jain, S. K. (2007). Perspectives of biodegradable natural polysaccharides for site-specific drug delivery to the colon. *Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences* **10**, 86-128.
- Jayakumar, R., Prabakaran, M., Reis, R. L., and Mano, J. F. (2005). Graft copolymerized chitosan—present status and applications. *Carbohydrate polymers* **62**, 142-158.
- Jeong, Y.-I., Ohno, T., Hu, Z., Yoshikawa, Y., Shibata, N., Nagata, S., and Takada, K. (2001). Evaluation of an intestinal pressure-controlled colon delivery capsules prepared by a dipping method. *Journal of controlled release* **71**, 175-182.
- Joly, F., Coffin, B., and Messing, B. (2007). Rôle de la flore dans les pathologies digestives (maladie de Crohn, rectocolite ulcérohémorragique, cancer colorectal exclus). *Nutrition clinique et métabolisme* **21**, 89–94.
- Kamm, M. A., Sandborn, W. J., Gassull, M., Schreiber, S., Jackowski, L., Butler, T., Lyne, A., Stephenson, D., Palmen, M., and Joseph, R. E. (2007). Once-daily, high-concentration MMX mesalamine in active ulcerative colitis. *Gastroenterology* **132**, 66-75; quiz 432-433.
- Kaparissides, C., Alexandridou, S., Kotti, K., and Chaitidou, S. (2006). Recent advances in novel drug delivery systems. In *Azojono journal of nanotechnology online* pp. 1-11.
- Katsuma, M., Watanabe, S., Kawai, H., Takemura, S., Masuda, Y., and Fukui, M. (2002). Studies on lactulose formulations for colon-specific drug delivery. *International journal of pharmaceutics* **249**, 33-43.
- Kaur, K., and Kim, K. (2009). Studies of chitosan/organic acid/Eudragit RS/RL-coated system for colonic delivery. *International journal of pharmaceutics* **366**, 140-148.
- Kennedy, J. F., Griffiths, A. J., Philp, K., Stevenson, D. L., Kambanis, O., and Gray, C. J. (1989). Characteristics and distributions of ester groups in propylene glycol alginates. *Carbohydrate polymers* **11**, 1-22.

- Khalikova, E., Susi, P., and Korpela, T. (2005). Microbial dextran-hydrolyzing enzymes: fundamentals and applications. *Microbiology and molecular biology reviews* **69**, 306-325.
- Khan, M. Z., Prebeg, Z., and Kurjakovic, N. (1999). A pH-dependent colon targeted oral drug delivery system using methacrylic acid copolymers. I. Manipulation Of drug release using Eudragit L100-55 and Eudragit S100 combinations. *Journal of controlled release* **58**, 215-222.
- Kim, C. J. (2004). Polymer science. In *Advanced pharmaceuticals: physicochemical principles* pp. 409-489. CRC Press, Florida.
- Kim, I.-S., and Oh, I.-J. (2005). Drug release from the enzyme-degradable and pH-sensitive hydrogel composed of glycidyl methacrylate dextran and poly(acrylic acid). *Archives of pharmacal research* **28**, 983-987.
- Kim, S. H., Won, C. Y., and Chu, C. C. (1999). Synthesis and characterization of dextran-maleic acid based hydrogel. *Journal of biomedical materials research* **46**, 160-170.
- Kim, W. S., Jeong, Y. C., Park, J. K., Shin, C. W., and Kim, N. (2007). Diffraction efficiency behavior of photopolymer based on P(MMA-co-MAA) copolymer matrix. *Optical materials* **29**, 1736-1740.
- Kinget, R., Kalala, W., Vervoort, L., and Van Den Mooter, G. (1998). Colonic drug targeting. *Journal of drug targeting* **6**, 129-149.
- Kirsner, J. B., and Shorter, R. G. (1988). *Diseases of the Colon, Rectum, and Anal Canal*. William & Wilkins, Baltimore.
- Klein, S., Rudolph, M. W., Skalsky, B., Petereit, H. U., and Dressman, J. B. (2008). Use of the BioDis to generate a physiologically relevant IVIVC. *Journal of controlled release* **130**, 216-219.
- Kucera, S. A., Felton, L. A., and McGinity, J. W. (2008). Physical aging of polymers and Its effect on the stability of solid oral dosage forms. In *Aqueous polymeric coatings for pharmaceutical dosage forms* (J. W. McGinity, and L. A. Felton, Eds.), pp. 445-474. Informa Healthcare, New York.
- Kumar, N., Ravikumar, M. N., and Domb, A. J. (2001). Biodegradable block copolymers. *Adv Drug Deliv Rev* **53**, 23-44.
- Kumar, P., and Mishra, B. (2008). Colon targeted drug delivery systems - an overview. *Current drug delivery* **5**, 186-198.
- Kumar, R., Patil, M. B., Patil, S. R., and Paschapur, M. S. (2009). Polysaccharides based colon specific drug delivery: A review. *International journal of pharm tech research* **1**, 344-346.
- Kumbar, S. G., Soppimath, K. S., and Aminabhavi, T. M. (2003). Synthesis and characterization of polyacrylamide-grafted chitosan hydrogel microspheres for the controlled release of indomethacin. *journal of applied polymer science* **87**, 1525-1536.

- Langer, R. (2001). Drug delivery: Drugs on target. *Science* **293**, 58-59.
- Langguth, P., Bohner, V., Heizmann, J., Merkle, H. P., Wolffram, S., Amidon, G. L., and Yamashita, S. (1997). The challenge of proteolysis enzymes in intestinal peptide delivery. *Journal of controlled release* **46**, 39-57.
- Larsen, C. (1989). Dextran prodrugs - structure and stability in relation to therapeutic activity. *Advanced drug delivery reviews* **3**, 103-154.
- Le, P., Blondon, H., and Billey, C. (2004). [Right colon diverticulitis]. *J Chir (Paris)* **141**, 11-20.
- Lee, B. J. (2008). Pharmaceutical preformulation: Physicochemical properties of excipients and powders and tablet characterization. In *Pharmaceutical manufacturing handbook production and processes* (S. C. Gad, Ed.), pp. 881-931. John Wiley and Sons, Hoboken.
- Lee, V. H. L., and Mukherjee, S. K. (2007). Drug delivery - Oral, colon-specific. In *Encyclopedia of pharmaceutical technology* (J. Swarbrick, Ed.), pp. 1228-1241. Informa Healthcare, New York.
- Leipner, H., Fischer, S., Brendler, E., and Voigt, W. (2000). Structural changes of cellulose dissolved in molten salt hydrates. *Macromolecular chemistry and physics* **201**, 2041-2049.
- Lennernas, H., and Abrahamsson, B. (2005). The use of biopharmaceutic classification of drugs in drug discovery and development: current status and future extension. *The journal of pharmacy and pharmacology* **57**, 273-285.
- Leopold, C. S. (1999). Coated dosage forms for colon-specific drug delivery. *Pharmaceutical science and technology today* **2**, 197-204.
- Leunberger, H. (1982). The compressibility and compactibility of powder systems. *International journal of pharmaceutics* **12**.
- Levacher, E. (2006). *PHI 41 Pharmaco-technie industrielle* IMT Editions Tours.
- Li, J., Yang, L., Ferguson, S. M., Hudson, T. J., Watanabe, S., Katsuma, M., and Fix, J. A. (2002). In vitro evaluation of dissolution behavior for a colon-specific drug delivery system (CODES) in multi-pH media using United States Pharmacopeia apparatus II and III. *AAPS Pharmaceutical science and technology* **3**, E33.
- Li, Q., Rudolph, V., Weigl, B., and Earl, A. (2004). Interparticle van der Waals force in powder flowability and compactibility. *International journal of pharmaceutics* **280**, 77-93.
- Lichtenstein, G. R., and Kamm, M. A. (2008). Review article: 5-aminosalicylate formulations for the treatment of ulcerative colitis--methods of comparing release rates and delivery of 5-aminosalicylate to the colonic mucosa. *Alimentary pharmacology & therapeutics* **28**, 663-673.

- Lin, W. J., and Lu, C. H. (2002). Characterization and permeation of microporous poly(ϵ -caprolactone) films. *Journal of membrane science* **198**, 109-118.
- Lorenzo-Lamosa, M. L., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J. L., and Alonso, M. J. (1998). Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery. *Journal of controlled release* **52**, 109-118.
- Luangtana-Anan, M., and Fell, J. T. (1990). Bonding mechanisms in tableting. *International journal of pharmaceutics* **60**, 197-202.
- Macfarlane, G. T., and Macfarlane, S. (1997). Human colonic microbiota: ecology, physiology and metabolic potential of intestinal bacteria. *Scandinavian journal of gastroenterology. Supplement* **222**, 3-9.
- Macfarlane, S., and Macfarlane, G. T. (2003). Regulation of short-chain fatty acid production. *The proceedings of the nutrition society* **62**, 67-72.
- Macfarlane, S., and Macfarlane, G. T. (2004). Bacterial diversity in the human gut. *Advances in applied microbiology* **54**, 261-289.
- Macfarlane, S., Quigley, M. E., Hopkins, M. J., Newton, D. F., and Macfarlane, G. T. (1998). Polysaccharide degradation by human intestinal bacteria during growth under multi-substrate limiting conditions in a three-stage continuous culture system. *FEMS microbiology ecology* **26**, 231-243.
- Mackie, R. I., Sghir, A., and Gaskins, H. R. (1999). Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *The american journal of clinical nutrition* **69**, 1035S-1045S.
- Mahkam, M., Doostie, L., and Siadat, S. O. R. (2006). Synthesis and characterization of acrylic type hydrogels containing azo derivatives of 5-amino salicylic acid for colon-specific drug delivery. *Inflammopharmacology* **14**, 72-75.
- Mancuso, A. J., Brownfain, D. S., and Swern, D. (1979). Structure of the dimethyl sulfoxide-oxalyl chloride reaction product. Oxidation of heteroaromatic and diverse alcohols to carbonyl compounds. *The journal of organic chemistry* **44**, 4148-4150.
- Mangin, I., Bonnet, R., Seksik, P., Rigottier-Gois, L., Sutren, M., Bouhnik, Y., Neut, C., Collins, M. D., Colombel, J. F., Marteau, P., and Dore, J. (2004). Molecular inventory of faecal microflora in patients with Crohn's disease. *FEMS microbiology ecology* **50**, 25-36.
- Marcazzan, M., Vianello, F., Scarpa, M., and Rigo, A. (1999). An ESR assay for alpha-amylase activity toward succinylated starch, amylose and amylopectin. *Journal of biochemical and biophysical methods* **38**, 191-202.
- Marcil, V., Peretti, N., Delvin, E., and Levy, E. (2004). [Digestive and absorptive processes of lipids]. *Gastroenterologie clinique et biologique* **28**, 1257-1266.
- Maris, B., Verheyden, L., Van Reeth, K., Samyn, C., Augustijns, P., Kinget, R., and Van Den Mooter, G. (2001). Synthesis and characterisation of inulin-azo hydrogels designed for colon targeting. *International journal of pharmaceutics* **213**, 143-152.

- Marteau, P., Lepage, P., Mangin, I., Suau, A., Dore, J., Pochart, P., and Seksik, P. (2004). Review article: gut flora and inflammatory bowel disease. *Alimentary pharmacology and therapeutics* **20 Suppl 4**, 18-23.
- Mastiholimath, V. S., Dandagi, P. M., Jain, S. S., Gadad, A. P., and Kulkarni, A. R. (2007). Time and pH dependent colon specific, pulsatile delivery of theophylline for nocturnal asthma. *International journal of pharmaceutics* **328**, 49-56.
- Mayersohn, M. (2002). Principles of drug absorption. In *Modern pharmaceutics* (G. S. Banker, and C. T. Rhodes, Eds.), pp. 23- 66. Marcel Dekker, Inc., New York.
- McConnell, E. L., Fadda, H. M., and Basit, A. W. (2008a). Gut instincts: explorations in intestinal physiology and drug delivery. *International journal of pharmaceutics* **364**, 213-226.
- McConnell, E. L., Liu, F., and Basit, A. W. (2009a). Colonic treatments and targets: issues and opportunities. *Journal of drug targeting* **17**, 335-363.
- McConnell, E. L., Macfarlane, C. B., and Basit, A. W. (2009b). An observational study on the influence of solvent composition on the architecture of drug-layered pellets. *International journal of pharmaceutics* **380**, 67-71.
- McConnell, E. L., Short, M. D., and Basit, A. W. (2008b). An in vivo comparison of intestinal pH and bacteria as physiological trigger mechanisms for colonic targeting in man. *Journal of controlled release* **130**, 154-160.
- McNally, E. J., and Park, J. Y. (2007). Peptides and proteins: Oral absorption. In *Encyclopedia of pharmaceutical technology* (J. Swarbrick, Ed.), pp. 2713-2730. Informa Healthcare, New York.
- Mehvar, R. (2000). Dextrans for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents. *Journal of controlled release* **69**, 1-25.
- Meissner, Y., and Lamprecht, A. (2008). Alternative drug delivery approaches for the therapy of inflammatory bowel disease. *Journal of pharmaceutical sciences* **97**, 2878-2891.
- Meunier, P., Minaire, Y., and Lambert, R. (1988). Dégestion, sécrétion et absorption dans l'intestin grêle. In *La digestion*, pp. 88-119. SIMEP, Paris.
- Millili, G. P., Wige, R. J., and Schwartz, J. B. (1990). Autohesion in pharmaceutical solids. *Drug development and industrial pharmacy* **16**, 2383-2407.
- Milojevic, S., Newton, J. M., Cummings, J. H., Gibson, G. R., Botham, R. L., Ring, S. G., Stockham, M., and Allwood, M. C. (1996). Amylose as a coating for drug delivery to the colon: Preparation and in vitro evaluation using glucose pellets. *Journal of controlled release* **38**, 85-94.
- Milojevic, S., Newton, J. M., Cummings, J. H., Gibson, G. R., Bothman, R. L., Ring, S. G., Allwood, M. C., and Stockham, M. (1995). Amylose, the new perspective in oral drug delivery to the human large intestine. *S.T.P. Pharma sciences* **5**, 47-53.

- Minami, H., and McCallum, R. W. (1984). The physiology and pathophysiology of gastric emptying in humans. *Gastroenterology* **86**, 1592-1610.
- Mion, F. (2001). Digestion. In *Physiologie humaine* (H. Guénard, Ed.), pp. 407-444. Groupe Liaison SA, Rueil Malmaison.
- Moad, G., and Solomon, D. H. (2006). *The chemistry of radical polymerization* Elsevier, Kidington, Oxford.
- Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R. M., and Remaud-Sim!eon, M. (2001). Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *International dairy journal* **11**, 675-685.
- Mr, L., Silong, S., Yunus, W. M. Z. W., Rahman, M. Z. A., Ahmad, M., and Haron, M. J. (2000). Kinetics and mechanism of free radical grafting of methyl acrylate onto sago starch. *Journal of applied polymer science* **77**, 784-791.
- Mrsny, R. J. (1992). The colon as a site for drug delivery. *Journal of controlled release* **22**, 15-34.
- Neuchl, C., and Mersmann, A. (1995). Fractionation of polydisperse dextran using ethanol *Chemical engineering science* **50**, 951-958.
- Nugent, S. G., Kumar, D., Rampton, D. S., and Evans, D. F. (2001). Intestinal luminal pH in inflammatory bowel disease: possible determinants and implications for therapy with aminosaliclates and other drugs. *Gut* **48**, 571-577.
- Okuda, H., Ogura, K., Kato, A., Takubo, H., and Watabe, T. (1998). A possible mechanism of eighteen patient deaths caused by interactions of sorivudine, a new antiviral drug, with oral 5-fluorouracil prodrugs. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics* **287**, 791-799.
- Olsson, C., and Holmgren, S. (2001). The control of gut motility. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* **128**, 479-501.
- Otto, A. H. (1994). Critical situations at the determination of the degree of substitution for amylose compounds via their carbon content. *Starch* **46**, 257-262.
- Ozturk, A. G., Ozturk, S. S., Plasson, B. O., Wheately, T. A., and Dressman, J. B. (1990). Mechanism of release from pellets coated with an ethylcellulose-based film. *Journal of controlled release* **14**, 203-213.
- Palzer, S. (2005). The effect of glass transition on the desired and undesired agglomération of amorphous food powders. *Chemical engineering science* **60**, 3959-3968.
- Paolicelli, P., Cerreto, F., Cesa, S., Feeney, M., Corrente, F., Marianecchi, C., and Casadei, M. A. (2008). Influence of the formulation components on the properties of the system SLN-dextran hydrogel for the modified release of drugs. *Journal of microencapsulation*, 1-10.

- Park, K., Shalaby, W. S. W., and Park, H. (1993). Enzyme-catalyzed degradation In *Biodegradable hydrogels for drug delivery*, pp. 153-188. Technomic publishing company, Pennsylvania.
- Patel, M., Shah, T., and Amin, A. (2007). Therapeutic opportunities in colon-specific drug-delivery systems. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems* **24**, 147-202.
- Peydecastaing, J., Bras, J., Vaca-Garcia, C., Borredon, M. E., Iftimie, N., Giurginca, M., and Meghea, A. (2006). NIR study of chemically modified cellulosic biopolymers. *Molecular crystals and liquid crystals* **448** 115-122.
- Pharmacopée Européenne 6eme édition (2007). Direction Européenne de la qualité des médicaments, Strasbourg.
- Philippe Gérard, P., and Bernalier-Donadille, A. (2007). Les FONCTIONS fonctions majeures du microbiote intestinal *Cahiers de Nutrition et de Diététique* **42**, 28-36.
- Podczec, F., Course, N. C., Newton, J. M., and Short, M. B. (2007a). The influence of non-disintegrating tablet dimensions and density on their gastric emptying in fasted volunteers. *The Journal of pharmacy and pharmacology* **59**, 23-27.
- Podczec, F., Mitchell, C. L., Newton, J. M., Evans, D., and Short, M. B. (2007b). The gastric emptying of food as measured by gamma-scintigraphy and electrical impedance tomography (EIT) and its influence on the gastric emptying of tablets of different dimensions. *The Journal of pharmacy and pharmacology* **59**, 1527-1536.
- Purama, R. K., Goswami, P., Khan, A. T., and Goyal, A. (2009). Structural analysis and properties of dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640. *Carbohydrate polymers* **76**, 30-35.
- Randall, C. S. (1995). Particle size distribution In *Physical characterisation of pharmaceutical solids* (H. G. Brittain, Ed.), pp. 157-186. Marcel Dekker, New York.
- Rizzello, F., Gionchetti, P., D'Arienzo, A., Manguso, F., Di Matteo, G., Annese, V., Valpiani, D., Casetti, T., Adamo, S., Prada, A., Castiglione, G. N., Varoli, G., and Campieri, M. (2002). Oral beclometasone dipropionate in the treatment of active ulcerative colitis: a double-blind placebo-controlled study. *Alimentary pharmacology & therapeutics* **16**, 1109-1116.
- Robyt, J. F. (1998). *Essentials of carbohydrate chemistry*. Springer-Verlag, New York.
- Romaškevič, T., Budrienė, S., Liubertienė, A., Gerasimčik, I., Zubrienė, A., and Dienys, G. (2007). Synthesis of chitosan-graft-poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate copolymer and its application for immobilization of maltogenase. *CHEMIJA* **18**, 33-38.
- Rosen, H., and Abribat, T. (2005). The rise and rise of drug delivery. *Nature reviews drug discovery* **4**, 381-385.
- Rubinstein, A. (1990). Microbially controlled drug delivery to the colon. *Biopharmaceutics and Drug Disposition* **11**, 465-475.

- Rubinstein, A. (1995). Approaches and opportunities in colon-specific drug delivery. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems* **12**, 101-149.
- Rubinstein, A. (2005). Colonic drug delivery. *Drug Discovery Today: Technologies* **2**, 33-37.
- Rubinstein, A. (2007). Gastrointestinal anatomy, physiology and permentation pathways. In *Enhancement in Drug Delivery* (E. Touitou, and B. W. Barry, Eds.), pp. 3-35. Taylor and Fracis Group, New York.
- Rudolph, M. W., Klein, S., Beckert, T. E., Petereit, H., and Dressman, J. B. (2001). A new 5-aminosalicylic acid multi-unit dosage form for the therapy of ulcerative colitis. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* **51**, 183-190.
- Samarnayake, G., and Glasser, W. G. (1993). Cellulose derivatives with low DS. I. a novel acylation system. *Carbohydrate polymers* **22**, 1-7.
- Sandborn, W. J., Kamm, M. A., Lichtenstein, G. R., Lyne, A., Butler, T., and Joseph, R. E. (2007). MMX Multi Matrix System mesalazine for the induction of remission in patients with mild-to-moderate ulcerative colitis: a combined analysis of two randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *Alimentary pharmacology & therapeutics* **26**, 205-215.
- Sangalli, M. E., Maroni, A., Buseti, C., Zema, L., Giordano, F., and Gazzaniga, A. (1999). In vitro and in vivo evaluation of oral systems for time and site specific delivery of drugs (Chronotopic® technology). *Bollettino chimico farmaceutico* **138**, 68-73.
- Sangalli, M. E., Maroni, A., Foppoli, A., Zema, L., Giordano, F., and Gazzaniga, A. (2004). Different HPMC viscosity grades as coating agents for an oral time and/or site-controlled delivery system: A study on process parameters and in vitro performances. *European journal of pharmaceutical sciences* **22**, 469-476.
- Sastry, S. V., Nyshadham, J. R., and Fix, J. A. (2000). Recent technological advances in oral drug delivery - a review. *Pharmaceutical science and technology today* **3**, 138-145.
- Schaefer, T., Johnsen, D., and Johansen, A. (2004). Effects of powder particle size and binder viscosity on intergranular and intragranular particle size heterogeneity during high shear granulation. *European journal of pharmaceutical sciences* **21**, 525-531.
- Scheline, R. R. (1973). Metabolism of foreign compounds by gastrointestinal microorganisms. *Pharmacological reviews* **25**, 451-523.
- Schroeder, K. W., Tremaine, W. J., and Ilstrup, D. M. (1987). Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. *The new england journal of medicine* **317**, 1625-1629.
- Semde, R., Amighi, K., Devleeschouwer, M. J., and Moes, A. J. (2000). Studies of pectin HM/Eudragit RL/Eudragit NE film-coating formulations intended for colonic drug delivery. *International journal of pharmaceutics* **197**, 181-192.
- Servin, A. L. (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS microbiology reviews* **28**, 405-440.

- Shargel, L., and Yu, A. B. C. (2007). Biopharmaceutics. In *Encyclopedia of pharmaceutical technology* (J. Swarbrick, Ed.), pp. 208-227. Informa Healthcare, New York.
- Shen, W. C., and Lin, Y. J. (1994). Basic mechanisms in transepithelium transport enhancement. In *Drug permeation enhancement: Theory and applications* (D. S. Hsieh, Ed.), pp. 25-40. Dekker, New York.
- Siepmann, F., Siepmann, J., Walther, M., MacRae, R. J., and Bodmeier, R. (2008). Polymer blends for controlled release coatings. *Journal of controlled release* **125**, 1-15.
- Silva, I., Gurruchaga, M., and Goni, I. (2009). Physical blends of starch graft copolymers as matrices for colon targeting drug delivery systems. *Carbohydrate polymers* **76**, 593-601.
- Simonsen, L., Hovgaard, L., Mortensen, P. B., and Brondsted, H. (1995). Dextran hydrogels for colon-specific drug delivery. V. Degradation in human intestinal incubation models. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **3**, 329-337.
- Singh, B. N. (2007). Modified-release solid formulations for colonic delivery. *Recent patents on drug delivery and formulation* **1**, 53-63.
- Sinha, A., Ball, D. J., Connor, A. L., Nightingale, J., and Wilding, I. R. (2003). Intestinal performance of two mesalamine formulations in patients with active ulcerative colitis as assessed by gamma scintigraphy *Practical gastroenterology* **27**, 56-69.
- Sinha, V. R., and Kumria, R. (2001a). Colonic drug delivery: prodrug approach. *Pharmaceutical research* **18**, 557-564.
- Sinha, V. R., and Kumria, R. (2001b). Polysaccharides in colon-specific drug delivery. *International journal of pharmaceutics* **224**, 19-38.
- Sinha, V. R., and Kumria, R. (2003a). Coating polymers for colon specific drug delivery: A comparative in vitro evaluation. *Acta pharmaceutica* **53**, 41-47.
- Sinha, V. R., and Kumria, R. (2003b). Microbially triggered drug delivery to the colon. *European journal of pharmaceutical sciences* **18**, 3-18.
- Skalsky, B., and Petereit, H. (2008). Chemistry and application properties of polymethacrylate systems. In *Aqueous polymeric coatings for pharmaceutical dosage forms* (J. W. McGinity, and L. A. Felton, Eds.), pp. 237-277. Informa healthcare, New York.
- Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R., and Rudzinski, W. E. (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of controlled release* **70**, 1-20.
- Sousa, T., Paterson, R., Moore, V., Carlsson, A., Abrahamsson, B., and Basit, A. W. (2008). The gastrointestinal microbiota as a site for the biotransformation of drugs. *International journal of pharmaceutics* **363**, 1-25.
- Sriamornsak, P., Nunthanid, J., Wanchana, S., and Luangtana-Anan, M. (2003). Composite film-coated tablets intended for colon-specific delivery of 5-aminosalicylic acid: using deesterified pectin. *Pharmaceutical development and technology* **8**, 311-318.

- Staniforth, J. (2002). Powder flow In *Pharmaceutics : The science of dosage form design* (M. E. Aulton, Ed.), pp. 365-378. Churchill Livingstone, England.
- Steed, K. P., Hooper, G., Monti, N., Strolin Benedetti, M., Fornasini, G., and Wilding, I. R. (1997). The use of pharmacoscintigraphy to focus the development strategy for a novel 5-ASA colon targeting system ('TIME CLOCK®' system). *Journal of controlled release* **49**, 115-122.
- Stevens, H. N. E., Wilson, C. G., Welling, P. G., Bakhshae, M., Binns, J. S., Perkins, A. C., Frier, M., Blackshaw, E. P., Frame, M. W., Nichols, D. J., Humphrey, M. J., and Wicks, S. R. (2002). Evaluation of Pulsincap™ to provide regional delivery of dofetilide to the human GI tract. *International journal of pharmaceutics* **236**, 27-34.
- Stringer, L. J., and Peppas, N. A. (1996). Diffusion of small molecular weight drugs in radiation-crosslinked poly(ethylene oxide) hydrogels. *Journal of controlled release* **42**, 195-202.
- Summers, M., and Aulton, M. (2002). Granulation. In *Pharmaceutics : The science of dosage form design* (M. E. Aulton, Ed.), pp. 365-378. Churchill Livingstone, England.
- Sun, G., and Chu, C. C. (2006). Synthesis, characterization of biodegradable dextran-allyl isocyanate-ethylamine/polyethylene glycol-diacrylate hydrogels and their in vitro release of albumin. *Carbohydrate polymers* **65**, 273-287.
- Sun, X. F., Sun, R. C., and Sun, J. X. (2004). Acetylation of sugarcane bagasse using NBS as a catalyst under mild reaction conditions for the production of oil sorption-active materials. *Bioresource technology* **95**, 343-350.
- Takaya, T., Ikeda, C., Imagawa, N., Niwa, K., and Takada, K. (1995). Development of a colon delivery capsule and the pharmacological activity of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) in beagle dogs. *Journal of pharmacy and pharmacology* **47**, 474-478.
- Takaya, T., Niwa, K., Muraoka, M., Ogita, I., Nagai, N., Yano, R.-i., Kimura, G., Yoshikawa, Y., Yoshikawa, H., and Takada, K. (1998). Importance of dissolution process on systemic availability of drugs delivered by colon delivery system. *Journal of controlled release* **50**, 111-122.
- Tenou, E., and Fitzpatrick, J. J. (1999). Effect of relative humidity and temperature on food powder flowability. *Journal of food engineering* **42**, 109-116.
- Teramoto, N., and Shibata, M. (2006). Synthesis and properties of pullulan acetate. Thermal properties, biodegradability, and a semi-clear gel formation in organic solvents. *Carbohydrate polymers* **63**.
- Theeuwes, F., Guittard, G., and Wong, P. (1990). Delivery of drugs to colon by oral dosage forms. In *US Patent 4904474*.
- Thiebaud, S., and Borredon, M. E. (1995). Solvent-free wood esterification with fatty acid chlorides. *Bioresource technology* **52**, 169-173.

- Thioune, O., Fessi, H., Devissaguet, J. P., and Puisieux, F. (1997). Preparation of pseudolatex by nanoprecipitation: influence of the solvent nature on intrinsic viscosity and interaction constant. *International journal of pharmaceutics* **146**, 233-238.
- Thümmeler, K., Fischer, S., Peters, J., Liebert, T., and Heinze, T. (2010). Evaluation of molten inorganic salt hydrates as reaction medium for the esterification of cellulose *Cellulose* **17**, 161-165.
- Topping, D. L., and Clifton, P. M. (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological reviews* **81**, 1031-1064.
- Tozaki, H., Fujita, T., Yamamoto, A., Muranishi, S., Sugiyama, T., Terabe, A., Matsumoto, T., and Suzuki, T. (1996). Chitosan capsules for colon-specific drug delivery: Improvement of insulin absorption from the rat colon. *Proceedings of the controlled release society*, 551-552.
- Tozaki, H., Nishioka, J., Komoike, J., Okada, N., Fujita, T., Muranishi, S., Kim, S.-I., Terashima, H., and Yamamoto, A. (2001). Enhanced absorption of insulin and (Asu1,7)eel-calcitonin using novel azopolymer-coated pellets for colon-specific drug delivery. *Journal of pharmaceutical sciences* **90**, 89-97.
- Tozaki, H., Odoriba, T., Okada, N., Fujita, T., Terabe, A., Suzuki, T., Okabe, S., Muranishi, S., and Yamamoto, A. (2002). Chitosan capsules for colon-specific drug delivery: Enhanced localization of 5-aminosalicylic acid in the large intestine accelerates healing of TNBS-induced colitis in rats. *Journal of controlled release* **82**, 51-61.
- USP XXVIII (2005). United States pharmacopeial convention. The United States Pharmacopeial, Rockville.
- Vaca-Garcia, C., Borredon, M. E., and Gaset, A. (2001). Determination of the degree of substitution (DS) of mixed cellulose esters by elemental analysis *Cellulose* **8**, 225-231.
- Van den Dries, K., and Vromans, H. (2003). Experimental and modelistic approach to explain granulate inhomogeneity through preferential growth. *European journal of pharmaceutical sciences* **20**, 409-417.
- Van den Mooter, G. (2006). Colon drug delivery. *Expert opinion on drug delivery* **3**, 111-125.
- Van Den Mooter, G., Maris, B., Samyn, C., Augustus, P., and Kinget, R. (1997). Use of azo polymers for colon-specific drug delivery. *Journal of pharmaceutical sciences* **86**, 1321-1327.
- Van Den Mooter, G., Samyn, C., and Kinget, R. (1992). Azo polymers for colon-specific drug delivery. *International journal of pharmaceutics* **87**, 37-46.
- Van Den Mooter, G., Samyn, C., and Kinget, R. (1993). Azo polymers for colon-specific drug delivery. II: Influence of the type of azo polymer on the degradation by intestinal microflora. *International journal of pharmaceutics* **97**, 133-139.

- Van Veen, B., Maarschalk, K. V. D. V., Bolhuis, G. K., Zuurman, K., and Frijlink, H. W. (2000). Tensile strength of tablets containing two materials with a different compaction behavior. *International journal of pharmaceuticals* **203**.
- Vandamme, T. F., Lenourry, A., Charrueau, C., and Chaumeil, J.-C. (2002). The use of polysaccharides to target drugs to the colon. *Carbohydrate polymers* **48**, 219-231.
- Wang, P., and Tao, B. Y. (1994). Synthesis and characterization of long-chain fatty acid cellulose ester (FACE) *Journal of Applied polymer science* **52**, 755-761.
- Washington, N., Washington, C., and Wilson, C. G. (2001a). Drug delivery to the large intestine and rectum. In *Physiological pharmaceuticals: Barriers to drug absorption*, pp. 143-180. Taylor and Francis, London.
- Washington, N., Washington, C., and Wilson, C. G. (2001b). The stomach. In *Physiological pharmaceuticals: Barriers to drug absorption*, pp. 75-108. Taylor and Francis, London.
- Watanabe, S., Kawai, H., Katsuma, M., and Fukui, M. (1998). Colon specific drug release system. In *Free patents on line*. (U. S. Patent, Ed.), pp. 27. Yamanouchi pharmaceutical Co., Ltd. , Japan.
- Watts, P. J., and Illum, L. (1997). Colonic drug delivery. *Drug development and industrial pharmacy* **23**, 893-913.
- Wawrezynieck, A., Péan, J. M., and Wüthrich, P. (2008). Biodisponibilité et vecteurs particuliers pour la voie orale. *Médecine sciences* **24**, 659-664.
- Wei, H., Li-Fang, F., Bai, X., Chun-Lei, L., Qing, D., Yong-Zhen, C., and De-Ying, C. (2009). An investigation into the characteristics of chitosan/Kollicoat SR30D free films for colonic drug delivery. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceuticals* **72**, 266-274.
- Wei, H., Li-Fang, F., Min, B., Yong-Zhen, C., Bai, X., Qing, D., Feng, W., Min, Q., and De-Ying, C. (2010). Chitosan/Kollicoat SR 30D film-coated pellets of aminosalicylates for colonic drug delivery. *Journal of pharmaceutical sciences* **99**, 186-195.
- Wilding, I. R., Coupe, A. J., and Davis, S. S. (2001). The role of gamma-scintigraphy in oral drug delivery. *Advanced drug delivery reviews* **46**, 103-124.
- Wilding, I. R., Davis, S. S., Bakhshae, M., Stevens, H. N. E., Sparrow, R. A., and Brennan, J. (1992). Gastrointestinal transit and systemic absorption of captopril from a pulsed-release formulation. *Pharmaceutical research* **9**, 654-657.
- Wilding, I. R., Davis, S. S., Pozzi, F., Furlani, P., and Gazzaniga, A. (1994). Enteric coated timed release systems for colonic targeting. *International journal of pharmaceuticals* **111**, 99-102.
- Williams, A. C., Cooper, V. B., Thomas, L., Griffith, L. J., Petts, C. R., and Booth, S. W. (2004). Evaluation of drug physical form during granulation, tableting and storage. *International journal of pharmaceuticals* **275**, 29-39.

- Wilson, P. J., and Basit, A. W. (2005). Exploiting gastrointestinal bacteria to target drugs to the colon: an in vitro study using amylose coated tablets. *International journal of pharmaceutics* **300**, 89-94.
- Wolever, T. M., Spadafora, P., and Eshuis, H. (1991). Interaction between colonic acetate and propionate in humans. *The american journal of clinical nutrition* **53**, 681-687.
- Wong, D., Larrabee, S., Clifford, K., Tremblay, J., and Friend, D. R. (1997). USP dissolution apparatus III (reciprocating cylinder) for screening of guar-based colonic delivery formulations. *Journal of controlled release* **47**, 173-179.
- Wood, E., Wilson, C. G., and Hardy, J. G. (1985). The spreading of foam and solution enemas. *International journal of pharmaceutics* **25**, 191-197.
- Wu, M. (2007). Synthèse de nanoparticules à propriétés de surface contrôlées par polymérisation en miniémulsion pour la vectorisation de molécules actives. In *Thèse de l'Institut national polytechnique de lorraine*, pp. 161. Université de Nancy
- Wurzburg, O. B. (1964). Acetylation. In *Methods in Carbohydrate Chemistry* (R. L. Whistler, and J. N. BeMiller, Eds.), pp. 286-288. Academic Press, New York.
- www.permeagear.com/sbs.htm (2010).
- www.scopus.com/search/form.url (2010).
- Xu, S., Held, I., Kempf, B., Mayr, H., Steglich, W., and Zipse, H. (2005). The DMAP-catalyzed acetylation of alcohols-a mechanistic study. *Chemistry* **11**, 4751-4757.
- Yamamoto, A., Tozaki, H., Okada, N., and Fujita, T. (2000). Colon-specific delivery of peptide drugs and anti-inflammatory drugs using chitosan capsules. *S.T.P. Pharma sciences* **10**, 23-34.
- Yang, L. (2008). Biorelevant dissolution testing of colon-specific delivery systems activated by colonic microflora. *Journal of controlled release* **125**, 77-86.
- Yang, L., Chu, J. S., and Fix, J. A. (2002). Colon-specific drug delivery: new approaches and in vitro/in vivo evaluation. *International journal of pharmaceutics* **235**, 1-15.
- Yang, L., Watanabe, S., Li, J., Chu, J. S., Katsuma, M., Yokohama, S., and Fix, J. A. (2003). Effect of colonic lactulose availability on the timing of drug release onset in vivo from a unique colon-specific drug delivery system (CODES). *Pharmaceutical research* **20**, 429-434.
- Yang, Q. W. (2009). Systems polymérique à base de dispersion aqueuse administrées par voie orale pour la libération contrôlée du principe actif. In *Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques*, pp. 195. Université Lille nord de France, Lille.
- Yildiz, U., and Hazer, B. (2000). Dispersion redox copolymerization of methyl methacrylate with macromonomeric azoinitiator as a macrocrosslinker *Polymer* **41**, 539-544.

- Yoshimura, T., Yoshimura, R., Seki, C., and Fujioka, R. (2006). Synthesis and characterization of biodegradable hydrogels based on starch and succinic anhydride. *Carbohydrate polymers* **64**, 345-349.
- Yuasa, H. (2008). Drug absorption from the colon In situ In *Drug absorption studies in situ, in vitro and In silico models* (C. Ehrhardt, and K. J. Kim, Eds.), pp. 77-88. Springer US, New York.
- Zhang, J., Pelton, R., and Wagberg, L. (1998). Aqueous biphasic formation by mixtures of dextran and hydrophobically modified dextran. *Colloid and polymer science* **276**, 476-482.
- Zhao, H., Lin, W., Yang, G., and Chen, Q. (2005). Molecular weight effect on the complexation of poly(methacrylic acid) and poly(ethylene oxide) as studied by high-resolution solid-state ¹³C NMR spectroscopy. *European polymer journal* **41**, 2345-2359.

Chapitre 7

ANNEX (Brevet et article)

Brevet

Forme galénique orale, procédé de fabrication du polymère et utilisation

WO 2009/ 153447 A1

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
23 décembre 2009 (23.12.2009)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2009/153447 A1

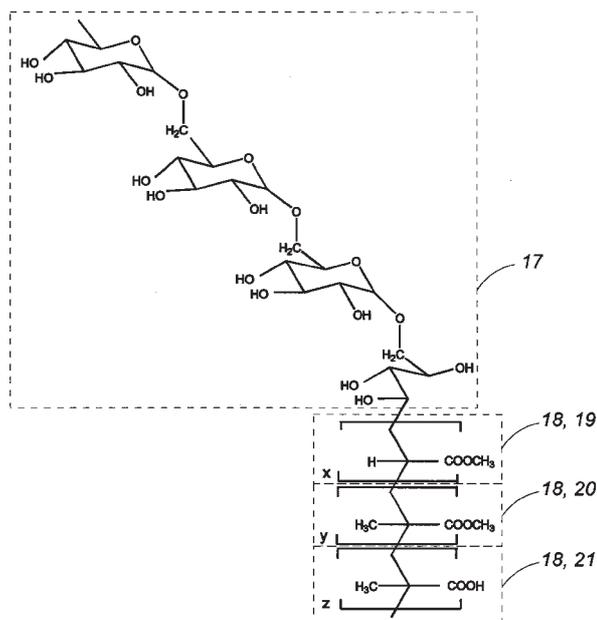
- (51) Classification internationale des brevets :
C08F 251/00 (2006.01) C08F 2/22 (2006.01)
C08F 297/02 (2006.01) A61K 47/36 (2006.01)
- (21) Numéro de la demande internationale : PCT/FR2009/000706
- (22) Date de dépôt international : 11 juin 2009 (11.06.2009)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
08/03292 12 juin 2008 (12.06.2008) FR
- (71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :
UNIVERSITE DE STRASBOURG [FR/FR]; 4, rue Blaise Pascal, 67000 Strasbourg (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE, CNRS [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75016 Paris (FR).
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :
VANDAMME, Thierry [FR/FR]; 6, rue Bastian, F-67200 Strasbourg (FR). MAJEWSKA, Paulina
- (74) Mandataire : METZ, Paul; Cabinet Metz Patni, B.P. 10063, 1A, place Boecler, F-67024 Strasbourg Cedex 01 (FR).
- (81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title : ORAL GALENIC FORM, POLYMER PRODUCTION METHOD AND USE OF SAME

(54) Titre : FORME GALÉNIQUE ORALE, PROCÉDE DE FABRICATION DU POLYMER ET UTILISATION

FIG.8



(57) Abstract : The polymers according to the invention comprise a polysaccharide block (17) and several hydrophobic polyacrylic blocks (18) enabling the polymer to remain intact until it reaches the colon. The polysaccharide block is degraded by the colonic microflora irrespective of the pH, while the polyacrylic blocks are solubilized at neutral pH. Colon-specific release of the active ingredients is thus provided in all cases. These polymers may serve as a coating in particular for tablets, gel capsules, granules or microgranules, or serve as matrix agents in the preparation of such pharmaceutical forms. This invention concerns the fields of medicine, pharmacy and dietetics.

(57) Abrégé : Les polymères selon l'invention comprennent un bloc polysaccharidique (17) et plusieurs blocs polyacryliques (18) hydrophobes permettant au polymère de rester intact jusqu'au côlon. Le bloc polysaccharidique est dégradé par la microflore colique quel que soit le pH, alors que les blocs polyacryliques se solubilisent à pH neutre. Une libération colique spécifique des principes actifs est ainsi assurée dans tous les cas. Ces polymères peuvent servir d'enrobage notamment pour des comprimés, gélules, granules ou microgranules, ou servir d'agents matriciels pour la réalisation de telles formes pharmaceutiques. Cette invention intéresse les domaines de la médecine, de la pharmacie et de la diététique.



ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues (règle 48.2.h)

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

- relative au droit du déposant de revendiquer la priorité de la demande antérieure (règle 4.17.iii))

FORME GALENIQUE ORALE, PROCEDE DE FABRICATION DU POLYMERE ET UTILISATION

La présente invention concerne une nouvelle forme galénique orale, préférentiellement pharmaceutique, à délivrance ciblée des principes actifs au niveau du côlon.

Plus particulièrement, l'invention se rapporte à de nouveaux polymères permettant une délivrance ciblée de principes actifs au niveau du côlon quel que soit son pH, du fait d'une dégradation spécifique de ces polymères par la flore colique.

Ces nouveaux polymères peuvent être utilisés pour réaliser un enrobage ou servir d'agents matriciels.

De nos jours, la voie orale est sans conteste la voie d'administration privilégiée et la plus aisée pour administrer un médicament.

Pour certains de ces médicaments, il est intéressant, voire même indispensable, que les principes actifs qu'ils contiennent soient libérés au niveau du côlon qui constitue la dernière partie du tube digestif.

C'est par exemple le cas de principes actifs destinés à soigner localement les pathologies du côlon telles que par exemple les inflammations du côlon, les colites ulcéraives, le cancer du côlon, la maladie de Crohn ou autres.

Plus généralement, le côlon constitue le site d'absorption privilégié des peptides, des protéines et de nombreux autres principes actifs ciblant des pathologies diverses localisées au niveau d'autres parties du corps et notamment l'asthme, l'angine, l'arthrite...

Pour augmenter l'efficacité de ces médicaments et éviter que leurs principes actifs ne soient libérés trop vite ou dégradés dans l'estomac avant d'arriver au niveau du côlon, il est nécessaire de trouver une solution pour que ces principes actifs soient protégés pendant leur trajet dans la première partie du tube digestif, puis soient libérés sélectivement au niveau du côlon.

On pourrait ainsi diminuer la dose de principe actif administrée en la limitant à la dose nécessaire au niveau du côlon, ce qui permettrait de réduire le coût du médicament ainsi que ses effets secondaires.

Pour aboutir à un tel résultat plusieurs voies ont été explorées dans l'art antérieur.

La première consiste à prévoir un enrobage externe protégeant le principe actif, qui résiste au milieu acide de l'estomac et aux enzymes de l'intestin pour parvenir intact au niveau du côlon. Cet enrobage doit ensuite se dégrader dans le côlon pour libérer les principes actifs contenus dans le médicament.

Le côlon présentant normalement un pH sensiblement neutre, les enrobages connus sont prévus pour résister au pH acide de l'estomac et pour se dissoudre à pH neutre, de façon à libérer le principe actif du médicament au niveau du côlon uniquement.

Cependant, dans un grand nombre de maladies présentes à ce niveau du tube digestif et dans le cas d'inflammations chroniques du côlon, telles que celles rencontrées par exemple dans la maladie de Crohn, le pH du côlon diminue et devient acide.

Les enrobages classiques sensibles au pH, prévus pour résister aux conditions acides de l'estomac, ne sont alors pas dissous dans le côlon devenu acide et les principes actifs des médicaments présentant de tels enrobages ne sont pas libérés.

Dans de telles situations, qui concernent les cas cliniques dans lesquels une libération ciblée au niveau du côlon est la plus souhaitable, les enrobages classiques sensibles au pH ne sont pas efficaces et ne permettent pas une libération sélective des principes actifs au niveau du côlon.

Afin de s'affranchir des conditions de pH du côlon, il a également été envisagé dans l'art antérieur d'utiliser des enrobages à dégradation lente permettant une libération retardée des principes actifs en fonction du temps. Ce type d'enrobage n'est cependant pas satisfaisant pour une libération au niveau du côlon, car la durée de la dégradation de l'enrobage manque de précision lorsqu'elle doit être très longue, ce qui est le cas pour une libération au niveau du côlon situé dans la dernière partie du tube digestif.

Une autre approche a consisté à prévoir des enrobages multicouches, de sorte que chaque polymère soit successivement dégradé par les différents milieux rencontrés après ingestion du médicament, et de sorte que la dernière couche se dégrade dans le côlon.

Complexe, onéreuse et peu fiable, cette solution n'a pas été mise en pratique, notamment en raison de difficultés de reproductibilité de l'application de plusieurs polymères sur une forme pharmaceutique et en raison d'une absence de garantie quant à la dissolution du dernier polymère d'enrobage quel que soit le pH du côlon.

Par ailleurs, il a été envisagé une solution basée sur la technique des hydrogels azoïques consistant à incorporer les principes actifs dans des polymères acryliques réticulés par des liaisons azoïques, les liaisons azoïques étant dégradées de manière spécifique par les bactéries coliques pour former des polymères linéaires hydrosolubles.

Cependant, cette solution ne semble pas intéressante en raison de la toxicité probable des polymères utilisés et/ou résultant de la dégradation (présence de fonctions amines) et en raison de la grande difficulté d'incorporation au départ des principes actifs dans le polymère réticulé.

Une dernière voie étudiée dans l'art antérieur consiste, non plus en une transformation galénique, mais en une modification chimique du ou des principes actifs de manière à obtenir des composés appelés prodrogues, non absorbables au niveau de l'estomac et de l'intestin grêle. Ces modifications chimiques comprennent principalement la formation de composés azoïques ou le greffage de sucres sur des stéroïdes. Lors de leur passage dans le côlon, ces composés prodrogues sont réduits par les bactéries et les enzymes coliques et redonnent ainsi les principes pharmacologiquement actifs.

Cependant, la formation de ces prodrogues n'est possible que si le principe actif initial renferme une fonction thiol ou amine. Pour la grande majorité des principes actifs, qui ne possèdent pas de telles fonctions chimiques, il est impossible d'utiliser une telle méthode.

Il existe donc un grand besoin pour un enrobage, ne présentant pas les inconvénients décrits ci-dessus et qui permette une délivrance ciblée des principes actifs au niveau du côlon quel que soit le pH de celui-ci.

Le but de l'invention est de fournir de nouveaux polymères permettant une délivrance ciblée des principes actifs au niveau du côlon. Ces polymères se dégradent spécifiquement dans le côlon et restent intacts jusqu'à ce qu'ils arrivent à ce niveau du tube digestif. A ce titre, ils ne se dégradent ni dans la bouche, ni dans l'estomac et ni dans l'intestin grêle.

En outre, ces polymères ne présentent aucune toxicité et les sous-produits issus de leur dégradation ne sont pas nocifs pour la santé.

Pour résoudre ce problème technique, la présente invention enseigne un nouveau polymère à libération colique spécifique destiné à protéger jusqu'à son arrivée au niveau du côlon, au moins un principe actif contenu dans une forme galénique orale, notamment pharmaceutique, et à le libérer spécifiquement dans le côlon. Ce polymère reste intact dans la première partie du tube digestif, à savoir la bouche, l'œsophage, l'estomac et l'intestin grêle, et se dégrade au niveau du côlon.

Ce polymère, à base de polysaccharide, subit une dégradation enzymatique au contact de la microflore colique. Une telle dégradation est indépendante du pH et est toujours possible car les bactéries et enzymes coliques sont toujours présentes en quantités suffisantes au niveau du côlon, même en cas de modification du pH.

Cependant, les polysaccharides étant hydrosolubles, ils se dissolvent

prématurément dans la bouche et l'estomac. De façon surprenante et bien que basés sur des polysaccharides hydrosolubles, les polymères selon l'invention sont suffisamment hydrophobes pour ne pas se dégrader dans la bouche et le début du tube digestif. L'invention repose pour cela sur une modification chimique des polysaccharides permettant de les rendre plus hydrophobes.

Ainsi, le nouveau polymère selon l'invention est un copolymère à blocs, comprenant un bloc polysaccharidique prévu pour être dégradé par les enzymes et les bactéries coliques quel que soit le pH du côlon, et au moins deux blocs polyacryliques hydrophobes, greffés les uns à la suite des autres sur le bloc polysaccharidique, qui permettent au polymère de rester intact jusqu'à son arrivée au niveau du côlon.

Avantageusement, les blocs polyacryliques du polymère selon l'invention se solubilisent lorsque le pH est voisin de 7, permettant une libération plus rapide des principes actifs lorsque le côlon présente des conditions normales de pH.

Les polymères selon l'invention permettent ainsi avantageusement une libération des principes actifs au niveau du côlon par deux mécanismes différents : d'une part une dégradation du bloc polysaccharidique sensible aux bactéries coliques qui se produit dans tous les cas et d'autre part une solubilisation des blocs polyacryliques à pH neutre obtenue lorsque le côlon se trouve dans des conditions normales de pH. Les polymères selon l'invention peuvent donc être utilisés « universellement » quelle que soit la situation du patient.

De préférence, les polymères selon l'invention comprennent deux ou trois blocs polyacryliques, chacun de ces blocs polyacryliques étant préférentiellement une chaîne de polyacrylate de méthyle, de polyméthacrylate de méthyle ou d'acide polyméthacrylique.

Avantageusement, les polymères à blocs de l'invention peuvent être utilisés pour réaliser un enrobage de formes galéniques orales, préférentiellement pharmaceutiques. Ils peuvent également servir d'agents matriciels pour la réalisation de telles formes galéniques orales.

L'invention fournit ainsi des formes galéniques orales, contenant au moins un principe actif devant être délivré spécifiquement au niveau du côlon et contenant au moins un polymère à libération colique spécifique selon l'invention. Ces formes galéniques orales sont par exemple des comprimés, des gélules, des granules, des microgranules ou autres.

L'invention enseigne également un procédé de fabrication d'un tel polymère à libération colique spécifique, dans lequel les blocs polyacryliques sont obtenus par l'ajout successif de différents monomères acryliques sur le bloc

polysaccharidique au cours de plusieurs étapes successives de polymérisation radicalaire en émulsion.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront à la lecture de la description détaillée qui va suivre, description faite en référence aux dessins annexés, dans lesquels :

- . la figure 1 est un schéma illustrant le trajet d'un médicament selon l'invention dans le tube digestif d'un patient, avec libération des principes actifs au niveau du côlon ;
- . la figure 2 est une vue en coupe schématique d'un comprimé revêtu d'un enrobage à base d'un polymère selon l'invention ;
- . la figure 3 est une vue en coupe schématique d'une granule revêtue d'un enrobage à base d'un polymère selon l'invention ;
- . la figure 4 est une vue en coupe schématique d'une gélule renfermant des granules revêtues chacune d'un enrobage à base d'un polymère selon l'invention ;
- . la figure 5 est une vue en coupe schématique d'une gélule dont la paroi extérieure est revêtue d'un enrobage à base d'un polymère selon l'invention ;
- . la figure 6 est une vue en coupe schématique d'un comprimé comprenant un polymère selon l'invention comme agent matriciel ;
- . la figure 7 est une vue en coupe schématique d'une gélule renfermant des granules comprenant un polymère selon l'invention comme agent matriciel ;
- . la figure 8 correspond à la formule chimique générale d'un exemple de polymère selon l'invention ;
- . la figure 9 est une représentation schématique par blocs d'un polymère selon l'invention ;
- . la figure 10 correspond au schéma réactionnel permettant de synthétiser un exemple de polymère selon l'invention ;
- . les figures 11 à 16 sont des graphiques illustrant la libération en fonction du temps d'un principe actif contenu dans trois séries de comprimés revêtus d'un enrobage à base d'un polymère selon l'invention et placés dans un milieu d'épreuve simulant in vitro le trajet dans le système digestif humain.

Le nouveau polymère pour forme galénique orale selon la présente invention va maintenant être décrit de façon détaillée en référence aux figures 1 à 16.

Le polymère selon l'invention peut être utilisé pour protéger tout principe actif d'un médicament, que celui-ci se présente sous la forme de comprimés, de gélules, de granules, de microgranules ou toute autre forme galénique orale.

Le domaine préférentiel d'application du polymère selon l'invention est

celui de la médecine et de la pharmacie. Cependant, son application n'est pas limitée à ces domaines et peut concerner notamment la phytothérapie, l'homéopathie, la diététique, la cosmétologie, l'alimentation, le domaine vétérinaire ou l'élevage.

Le polymère selon l'invention peut être utilisé dès qu'une libération ciblée de principes actifs au niveau du côlon est nécessaire, souhaitable ou intéressante quelle que soit la nature du principe actif ou sa fonction.

Il peut ainsi être utilisé par exemple pour la réalisation de médicaments, de produits de diagnostic, de compléments alimentaires, de produits à base de vitamines, de minéraux ou d'oligoéléments, ou de tout autre produit approprié imaginable par l'homme du métier.

Sur la figure 1, on a représenté schématiquement le parcours d'une forme galénique orale ou médicament 1 selon l'invention le long du tube digestif 2 d'un patient.

Après ingestion par le patient, le médicament 1 passe successivement dans la bouche 3, l'œsophage 4, l'estomac 5, l'intestin grêle 6 et finalement le colon 7 du patient. Son trajet dans le tube digestif est symbolisé par les grosses flèches noires 8.

Avantageusement, le médicament 1 selon l'invention reste intact tout au long de la première partie du tube digestif, jusqu'à son arrivée au niveau du côlon 7 où il commence à libérer le ou les principes actif(s) 9 qu'il contient.

Sur cette figure, la diffusion du principe actif 9 a été symbolisée par des petites flèches 10 en traits interrompus. Le temps de séjour du médicament 1 dans le côlon est long et normalement compris entre 24 et 72 heures, ce qui assure avantageusement que la totalité du principe actif soit libéré dans le côlon.

Selon les cas, le médicament 1 selon l'invention peut être conçu pour que le principe actif se libère rapidement et en totalité dès l'entrée dans le côlon ou pour qu'il se libère lentement et progressivement tout au long du parcours dans le côlon.

Le médicament 1 selon l'invention peut affecter différentes formes galéniques permettant une prise orale. Plusieurs exemples de formes galéniques convenables ont été représentés sur les figures 2 à 7. Bien entendu, l'homme du métier pourra en imaginer de nombreuses autres sans sortir de la portée de la présente invention.

Sur ces figures, le principe actif 9 a été symbolisé schématiquement par des petits ronds blancs.

Sur la figure 2, le médicament 1 se présente sous la forme d'un comprimé 11. Ce comprimé 11 a été réalisé de façon classique à partir d'un mélange de principe actif 9 et d'un ou plusieurs excipients 12, comprimé pour former le comprimé 11.

L'excipient ou les excipients 12 sont des composés, généralement solides et préférentiellement pulvérulents, adaptés pour la formation de comprimés. Il peut s'agir de tout excipient pharmacologiquement acceptable, présentant les propriétés appropriées pour une telle utilisation, notamment d'un ou plusieurs agents matriciels éventuellement mélangés à d'autres excipients de nature différente. De très nombreux exemples de tels excipients existent dans l'art antérieur, notamment le lactose, la cellulose microcristalline, les dérivés cellulosiques, les gommes et analogues.

Afin de protéger le principe actif 9 jusqu'à son arrivée dans le côlon, le comprimé 11 est revêtu d'un enrobage 13 formé d'une couche de polymère selon l'invention, qui recouvre complètement la surface extérieure du comprimé 11. L'épaisseur de cet enrobage 13 est de préférence comprise entre 1 μm et 1 mm, avec une valeur préférentielle comprise entre 100 μm et 200 μm .

Avantageusement, on peut obtenir une libération plus ou moins rapide du principe actif 9 dans le côlon en faisant varier l'épaisseur de l'enrobage 13. L'épaisseur de l'enrobage 13 doit cependant rester suffisante pour protéger le principe actif jusque dans le côlon en empêchant toute diffusion préalable du principe actif à travers l'enrobage 13.

Le médicament 1 peut également se présenter sous la forme d'une ou plusieurs granules 14 ou microgranules, comme représenté sur la figure 3.

Comme le comprimé 11, la granule 14 se compose d'un ou plusieurs excipients 12 servant de support au principe actif 9. L'excipient 12 est cette fois adapté à la formation de granules 14 et à la technique utilisée pour cette formation. Il peut s'agir du même composé ou du même mélange de composés que pour la réalisation des comprimés 11 ou d'un ou plusieurs composés spécifiques à cette application.

La granule 14 peut être obtenue par plusieurs procédés largement connus de l'homme du métier dont quelques exemples sont donnés ci-après. L'excipient 12 tel qu'un agent matriciel et le principe actif 9 peuvent par exemple être simplement mélangés avant mise en forme par compression. Le principe actif 9 peut également être absorbé et/ou adsorbé sur des cristaux ou des grains d'excipient 12. Selon encore une autre technique, un mélange pâteux d'excipient 12 et de principe actif 9 peut être mis en forme par extrusion, découpe et sphéronisation des morceaux obtenus.

La granule 14 est ensuite revêtue sur toute sa surface extérieure d'un enrobage 13 de polymère selon l'invention, protégeant le principe actif 9 jusque dans le côlon.

Lorsqu'elles sont de petite taille ou afin de faciliter leur prise par le patient, ces granules 14 ou microgranules peuvent être regroupées dans des gélules 15

en quantité correspondant préférentiellement à une prise unitaire de médicament 1.

Comme représenté sur les figures 4 et 5, la gélule 15 est une enveloppe 16, préférentiellement à base de gélatine, formée de deux parties emboîtables qui renferme un certain nombre de granules 14.

Selon la variante de la figure 4, ces granules 14 peuvent être revêtues, chacune individuellement, d'un enrobage 13 protecteur à base de polymère selon l'invention. Les granules 14 sont alors regroupées en gélules 15 après avoir été enrobées séparément.

Selon une autre variante représentée sur la figure 5, l'enrobage protecteur 13 à base de polymère selon l'invention peut recouvrir la surface extérieure de l'enveloppe 16 constituant la gélule 15 et non plus chaque granule 14 individuellement. Les granules 14 sont alors plus simples et ne contiennent que le principe actif 9 et l'(es) excipient(s) 12. Dans ce cas, l'enrobage est réalisé postérieurement à la mise en gélule.

Pour protéger jusqu'au côlon les principes actifs contenus dans un comprimé 11, une granule 14, une microgranule, une gélule 15 ou toute autre forme orale appropriée, l'enrobage 13 contient un ou plusieurs polymère(s) selon l'invention. Il peut également contenir d'autres composés adaptés pour la réalisation d'un tel enrobage 13, notamment un agent plastifiant, un élément de structure insoluble quel que soit le pH rencontré, par exemple un polymère commercialisé sous le nom d'« Eudragit RS » ou « Eudragit RL », servant à stabiliser les propriétés mécaniques de l'ensemble, ou une substance de charge, du talc ou du kaolin par exemple, qui permet de diminuer le prix de revient global de l'enrobage 13 et protège les principes actifs photosensibles grâce à sa coloration blanche, ou toute autre substance envisageable adaptée pour la réalisation de l'enrobage 13.

Un autre mode de réalisation représenté sur les figures 6 et 7, consiste à utiliser le polymère selon l'invention, non plus comme enrobage 13, mais comme agent matriciel.

Un polymère selon l'invention peut ainsi servir d'excipient 12 et plus précisément d'agent matriciel pour la réalisation de comprimés 11 (figure 6), de granules 14 (figure 7) ou de microgranules isolées ou regroupées en gélules 15, ou de toute autre forme galénique orale adaptée.

Pour cela, le polymère selon l'invention peut être utilisé seul ou en mélange avec d'autres agents matriciels ou excipients utilisés dans le domaine pharmaceutique. Un mélange de plusieurs polymères selon l'invention peut également être utilisé.

Le principe actif 9 étant entouré de polymère selon l'invention au cœur

de la forme galénique, un enrobage périphérique n'est plus nécessaire pour assurer sa protection. Un tel enrobage peut quand même être envisagé, qu'il soit à base de polymère selon l'invention ou de tout autre constituant.

Pour protéger le principe actif 9, l'invention enseigne un nouveau polymère qui est un copolymère à blocs, c'est-à-dire un polymère présentant plusieurs chaînes polymères différentes reliées entre elles par des liaisons covalentes.

La formule chimique d'un exemple de polymère selon l'invention a été représentée sur la figure 8. Elle a également été représentée de façon schématique sur la figure 9 pour mieux faire comprendre au lecteur la notion de blocs.

Selon l'invention, ce copolymère est constitué d'un bloc polysaccharidique 17 et de plusieurs blocs synthétiques polyacryliques 18.

Le bloc polysaccharidique 17, qui est hydrosoluble à l'état isolé, est dégradé spécifiquement par les enzymes et bactéries coliques de façon indépendante du pH.

Ce bloc 17 est réalisé à partir d'une macromolécule de polysaccharide, préférentiellement de dextran, de gomme de guar, d'amylose, d'amidon, de chitosane, de pectine ou de toute autre molécule comprenant des sucres et ayant la propriété d'être facilement et spécifiquement dégradée par les enzymes et bactéries coliques. Sur les différentes figures annexées, le bloc polysaccharidique 17 est formé à partir de dextran.

Les polysaccharides sont des macromolécules non toxiques constituées de métabolites qui se retrouvent à l'état naturel dans le côlon. Ils ne posent donc aucun problème de toxicité, que ce soit entier ou à l'état décomposé.

Le polymère selon l'invention comprend également des blocs polyacryliques 18 qui sont greffés sur le bloc polysaccharidique 17 et dont la nature hydrophobe empêche avantageusement la dissolution du bloc polysaccharidique en milieu aqueux.

Grâce à ses blocs polyacryliques 18, le polymère selon l'invention est suffisamment hydrophobe dans son ensemble pour ne pas se dissoudre trop rapidement en milieux aqueux et éviter une libération prématurée du principe actif au niveau de la bouche, de l'œsophage, de l'estomac ou des premières parties de l'intestin.

De plus, les blocs polyacryliques 18 se solubilisent à pH neutre permettant ainsi une libération plus rapide du principe actif du médicament protégé par le polymère de l'invention lorsque le côlon se trouve dans des conditions normales de pH.

Les polymères acryliques sont utilisés depuis longtemps dans le domaine pharmaceutique et sont connus pour ne pas être toxiques. Ainsi, le polymère de l'invention dans son ensemble, entier ou après décomposition, n'est absolument pas

toxique pour le patient.

Les blocs polyacryliques 18 sont préférentiellement obtenus par polymérisation radicalaire successive de monomères acryliques sur le bloc polysaccharidique 17.

Ainsi, des monomères acryliques peuvent être ajoutés successivement sur le bloc polysaccharidique par voie radicalaire, comme représenté sur la figure 10. Ces monomères acryliques sont préférentiellement choisis dans le groupe suivant : acrylate de méthyle, méthacrylate de méthyle et acide méthacrylique.

Pour aboutir au polymère selon l'invention, ces monomères doivent être ajoutés successivement et non en mélange. Un ordre relatif de ces monomères les uns par rapport aux autres doit également être respecté. Ces monomères doivent ainsi être ajoutés dans l'ordre relatif suivant : acrylate de méthyle, méthacrylate de méthyle et acide méthacrylique.

Si l'on ajoute ces trois monomères, on obtient après polymérisation, comme représenté, en partant du bloc polysaccharidique 17, un premier bloc 19 formé d'une chaîne de polyacrylate de méthyle, un deuxième bloc 20 formé d'une chaîne de polyméthacrylate de méthyle et un troisième bloc 21 formé d'une chaîne d'acide polyméthacrylique.

Le dernier bloc 21 améliore la dégradation enzymatique et bactérienne du bloc polysaccharidique. En effet, l'acide polyméthacrylique est ionisé à pH 7 et contribue à hydrater plus facilement le polymère, lui donnant une consistance d'hydrogel qui facilite la dégradation ultérieure de la partie polysaccharidique par les enzymes et les bactéries coliques.

Les inventeurs ont découvert que pour résoudre le problème technique, la partie synthétique du copolymère devait être composée de plusieurs chaînes polyacryliques différentes, préférentiellement deux ou trois. De préférence, la partie synthétique comprend trois chaînes polyacryliques formées par trois polymérisations successives de monomères acryliques différents.

Ce nombre peut varier mais s'il est trop élevé, l'encombrement stérique peut être trop important pour que les enzymes et bactéries du côlon puissent atteindre le bloc polysaccharidique pour le dégrader. A l'inverse, si ce nombre est trop faible, l'hydrophobie du copolymère résultant peut être insuffisante.

Des polymères selon l'invention à deux blocs polyacryliques 18 ont également été synthétisés. Dans ce cas, pour respecter l'ordre relatif précédemment cité, ils peuvent comporter à la suite de leur bloc polysaccharidique 17 un bloc de polyacrylate de méthyle 19 et un bloc de polyméthacrylate de méthyle 20, ou un bloc de polyacrylate

de méthyle 19 et un bloc d'acide polyméthacrylique 21, ou encore un bloc de polyméthacrylate de méthyle 20 et un bloc d'acide polyméthacrylique 21.

Pour obtenir les copolymères à blocs selon l'invention, le procédé de synthèse retenu consiste préférentiellement à ouvrir un sucre du bloc polysaccharidique et à y ajouter successivement les chaînes polyacryliques les unes à la suite des autres au moyen de plusieurs étapes successives de polymérisation radicalaire en émulsion.

En référence à la figure 10, nous allons maintenant nous intéresser à un exemple de synthèse d'un polymère préférentiel selon l'invention.

La première étape consiste à faire réagir du dextran avec de l'acrylate de méthyle en présence de cérium (IV) et d'argon, en milieu très acide (pH = 1) obtenu par ajout d'acide nitrique. Pour cela, on commence de préférence par bien dissoudre le polysaccharide dans de l'acide nitrique (préférentiellement 0,2 M) sous atmosphère d'argon et à environ 60°C, puis on y ajoute le cérium et le premier monomère.

La concentration du cérium (IV) est préférentiellement comprise entre 0,001 et 0,02 mol/l, avec une valeur préférentielle sensiblement égale à 0,016 mol/l.

Au cours de cette étape, un sucre du bloc polysaccharidique est ouvert et on y fixe une première chaîne polyacrylique de polyacrylate de méthyle 19 par polymérisation par voie radicalaire des monomères d'acrylate de méthyle.

Lors de la deuxième étape, de la même manière et dans les mêmes conditions, on fixe une nouvelle chaîne polyacrylique de polyméthacrylate de méthyle 20, qui vient se greffer à la suite de la première, en faisant réagir le composé intermédiaire obtenu à l'étape précédente avec du méthacrylate de méthyle.

Enfin lors de la troisième étape, toujours de la même manière et dans les mêmes conditions, on fixe une nouvelle chaîne polyacrylique d'acide polyméthacrylique 21, qui vient se greffer à la suite de la précédente, en faisant réagir le composé intermédiaire résultant de l'étape précédente avec de l'acide méthacrylique.

Le produit final est alors purifié, notamment afin d'en éliminer le cérium et les monomères n'ayant pas réagi. Pour cela, la solution obtenue est insérée dans une membrane de dialyse, qui permet de séparer le polymère des monomères n'ayant pas réagi. De même, le cérium en solution est éliminé au cours de cette purification.

Après séchage, le polymère résultant se présente sous la forme d'une poudre.

En utilisation, cette poudre est par exemple solubilisée ou mise en suspension dans un solvant classique pharmaceutique, par exemple du tétrahydrofurane, du méthanol ou de l'éthanol. Elle peut ensuite être pulvérisée sur le médicament 1, seule ou additionnée notamment d'un agent plastifiant tel que par

exemple le citrate d'éthyle, le phtalate de butyle ou encore d'un autre polymère, pour réaliser un enrobage 13.

Afin de mieux faire comprendre l'invention, des exemples de synthèse de plusieurs polymères selon l'invention, formés de différents polysaccharides et/ou de différentes chaînes polyacryliques, vont être détaillés ci-dessous. Ces polymères ont été obtenus par polymérisation radicalaire en émulsion réalisée selon la méthode décrite précédemment.

Exemple 1 : Synthèse d'un polymère à blocs : dextran 70 - polyacrylate de méthyle - polyméthacrylate de méthyle - acide polyméthacrylique

2,2 g de dextran 70 (PM=70000 Da) ont été dissous dans 32 ml d'acide nitrique à 0,2 M dans un ballon tricol de 250 ml muni d'un condenseur et d'un agitateur, avec barbotage d'argon, le ballon étant plongé dans un bain d'eau à 60°C.

Après 10 minutes, 32 ml d'une solution 0,08 M de nitrate cérique (IV) d'ammonium dans de l'acide nitrique 0,2 M et 9,1 ml d'acrylate de méthyle ont été ajoutés sous forte agitation.

Après 20 minutes, 12,5 ml d'une solution 0,08 M de nitrate cérique (IV) d'ammonium dans de l'acide nitrique 0,2 M et 3,5 ml de méthacrylate de méthyle ont été ajoutés sous forte agitation.

Après 20 minutes, 5 ml d'une solution 0,08 M de nitrate cérique (IV) d'ammonium dans de l'acide nitrique 0,2 M et 1,4 ml d'acide méthacrylique ont été ajoutés sous forte agitation.

Vingt minutes après la dernière addition, le barbotage d'argon a été stoppé et on a laissé la réaction se poursuivre pendant 50 minutes sous agitation douce.

Après refroidissement jusqu'à température ambiante, le produit résultant a été purifié par dialyse et a ensuite été lyophilisé afin d'obtenir le polymère selon l'invention.

Exemple 2 : Synthèse d'un polymère à blocs : dextran 11 - polyacrylate de méthyle - acide polyméthacrylique

2,2 g de dextran 11 (PM=11000 Da) ont été dissous dans 32 ml d'acide nitrique à 0,2 M dans un ballon tricol de 250 ml muni d'un condenseur et d'un agitateur, avec barbotage d'argon, le ballon étant plongé dans un bain d'eau à 60°C.

Après 10 minutes, 35 ml d'une solution 0,08 M de nitrate cérique (IV) d'ammonium dans de l'acide nitrique 0,2 M et 10 ml d'acrylate de méthyle ont été ajoutés sous forte agitation.

Après 20 minutes, 15 ml de solution de nitrate cérique (IV) d'ammonium

et 4 ml d'acide méthacrylique ont été ajoutés sous forte agitation.

Vingt minutes après la dernière addition, le barbotage d'argon a été stoppé et on a laissé la réaction se poursuivre pendant 50 minutes sous agitation douce.

Après refroidissement jusqu'à température ambiante, le produit résultant a été purifié par dialyse, puis lyophilisé pour obtenir le polymère selon l'invention.

Exemple 3 : Synthèse d'un polymère à blocs : amylose - polyacrylate de méthyle - polyméthacrylate de méthyle - acide polyméthacrylique

2,2 g d'amylose (amidon de maïs) ont été dissous dans 32 ml d'acide nitrique à 0,2 M dans un ballon tricol de 250 ml muni d'un condenseur et d'un agitateur, avec barbotage d'argon, le ballon étant plongé dans un bain d'eau à 60°C.

Après 10 minutes, 16,66 ml d'une solution 0,08 M de nitrate cérique (IV) d'ammonium dans de l'acide nitrique 0,2 M et 4,66 ml d'acrylate de méthyle ont été ajoutés sous forte agitation.

Après 20 minutes, 16,66 ml d'une solution 0,08 M de nitrate cérique (IV) d'ammonium dans de l'acide nitrique 0,2 M et 4,66 ml de méthacrylate de méthyle ont été ajoutés sous forte agitation.

Après 20 minutes, 16,66 ml d'une solution 0,08 M de nitrate cérique (IV) d'ammonium dans de l'acide nitrique 0,2 M et 4,66 ml d'acide méthacrylique ont été ajoutés sous forte agitation.

Vingt minutes après la dernière addition, le barbotage d'argon a été stoppé et on a laissé la réaction se poursuivre pendant 50 minutes sous agitation douce.

Après refroidissement jusqu'à température ambiante, le produit résultant a été purifié par dialyse, puis lyophilisé afin d'obtenir le polymère selon l'invention.

Exemple 4 : Synthèse d'un polymère à blocs : amylose - polyacrylate de méthyle - acide polyméthacrylique

2,2 g d'amylose (amidon de maïs) ont été dissous dans 32 ml d'acide nitrique à 0,2 M dans un ballon tricol de 250 ml muni d'un condenseur, à 60°C, sous agitation douce et avec barbotage d'argon.

Après 10 minutes, 45 ml d'une solution 0,08 M de nitrate cérique (IV) d'ammonium dans de l'acide nitrique 0,2 M et 12,6 ml d'acrylate de méthyle ont été ajoutés sous forte agitation.

Après 20 minutes, 5 ml d'une solution 0,08 M de nitrate cérique (IV) d'ammonium dans de l'acide nitrique 0,2 M et 1,4 ml d'acide méthacrylique ont été ajoutés sous forte agitation.

Vingt minutes après la dernière addition, le barbotage d'argon a été

stoppé et on a laissé la réaction se poursuivre pendant 50 minutes sous agitation douce.

Après refroidissement jusqu'à température ambiante, le produit résultant a été purifié par dialyse et a ensuite été lyophilisé afin d'obtenir le polymère selon l'invention.

Exemple 5 : Synthèse d'un polymère à blocs : chitosane 70 - polyméthacrylate de méthyle - acide polyméthacrylique

2,2 g de chitosane 70 ont été dissous dans 32 ml d'acide nitrique à 0,02 M dans un ballon tricol de 250 ml muni d'un condenseur et d'un agitateur, avec barbotage d'argon, le ballon étant plongé dans un bain d'eau à 60°C.

Après 10 minutes, 35 ml d'une solution 0,08 M de nitrate cérique (IV) d'ammonium dans de l'acide nitrique 0,2 M et 10 ml de méthacrylate de méthyle ont été ajoutés sous forte agitation.

Après 20 minutes, 15 ml d'une solution 0,08 M de nitrate cérique (IV) d'ammonium dans de l'acide nitrique 0,2 M et 4 ml d'acide méthacrylique ont été ajoutés sous forte agitation.

Vingt minutes après la dernière addition, le barbotage d'argon a été stoppé et on a laissé la réaction se poursuivre pendant 50 minutes sous agitation douce.

Après refroidissement jusqu'à température ambiante, le produit résultant a été purifié par dialyse, puis lyophilisé pour obtenir le polymère selon l'invention.

Exemple 6 : Synthèse d'un polymère à blocs : chitosane 70 - polyacrylate de méthyle - polyméthacrylate de méthyle

2,2 g de chitosane 70 ont été dissous dans 32 ml d'acide nitrique à 0,02 M dans un ballon tricol de 250 ml muni d'un condenseur et d'un agitateur, avec barbotage d'argon, le ballon étant plongé dans un bain d'eau à 60°C.

Après 10 minutes, 25 ml d'une solution 0,08 M de nitrate cérique (IV) d'ammonium dans de l'acide nitrique 0,2 M et 7 ml d'acrylate de méthyle ont été ajoutés sous forte agitation.

Après 20 minutes, 25 ml d'une solution 0,08 M de nitrate cérique (IV) d'ammonium dans de l'acide nitrique 0,2 M et 7 ml de méthacrylate de méthyle ont été ajoutés sous forte agitation.

Vingt minutes après la dernière addition, le barbotage d'argon a été stoppé et on a laissé la réaction se poursuivre pendant 50 minutes sous agitation douce.

Après refroidissement jusqu'à température ambiante, le produit résultant a été purifié par dialyse et a ensuite été lyophilisé afin d'obtenir le polymère selon l'invention.

Etude de la libération in vitro d'un principe actif

Afin de démontrer l'efficacité du polymère selon l'invention, une série de tests a été menée par les inventeurs et va maintenant être décrite en faisant référence aux figures 11 à 16.

Pour réaliser ces tests, les inventeurs ont préparé des comprimés contenant de la théophylline en tant que principe actif et les ont revêtus de différents copolymères à blocs selon l'invention. Ils ont ensuite étudié la libération in vitro du principe actif contenu dans les formes galéniques ainsi obtenues, tout au long du trajet dans le système digestif simulé.

Les comprimés testés ont été obtenus classiquement par granulation humide à partir de théophylline et d'un ensemble d'excipients, selon une composition détaillée dans le tableau suivant :

Composition	Quantité pour un comprimé (mg)	Pourcentage massique par rapport au poids du comprimé
Théophylline anhydre	100	26,66
Lactose	183,25	48,87
Avicel® PH101	73	19,47
Amidon de blé	15	4
Stéarate de magnésium	3,75	1
Poids total	375	100
Indice de comprimabilité	12,19%	(≤ 20%)

Le mélange a ensuite été comprimé afin d'obtenir des comprimés dont on a déterminé les caractéristiques suivantes : l'uniformité de masse, la dureté, le comportement de désagrégation, la friabilité et la teneur en théophylline. Les mesures ont été réalisées avec pour référence la Pharmacopée Européenne 6^{ème} édition, 2007. Les résultats obtenus ont été regroupés dans le tableau ci-dessous. Il s'agit de valeurs moyennes.

Uniformité de masse (mg)	Dureté (N)	Désagrégation (min)	Friabilité (% massique)	Teneur en principe actif (% massique)
380,05	115,6	<1	0,23	100

Les comprimés obtenus ont ensuite été revêtus d'un enrobage contenant un copolymère bloc selon l'invention. Afin de démontrer l'efficacité de l'ensemble des

copolymères selon l'invention, trois dispersions d'enrobage ont été préparées à partir de trois copolymères différents. La première dispersion, appelée enrobage 1, contient un copolymère de dextran 70 - polyacrylate de méthyle - polyméthacrylate de méthyle - acide polyméthacrylique ; la deuxième dispersion, appelée enrobage 2, contient un copolymère de dextran 70 - polyacrylate de méthyle - acide polyméthacrylique ; et la troisième dispersion, appelée enrobage 3, contient un copolymère de dextran 10 - polyacrylate de méthyle - polyméthacrylate de méthyle - acide polyméthacrylique. La composition de ces trois dispersions d'enrobage est détaillée dans le tableau suivant :

Composition (g)	Enrobage 1 (Dex70-MA-MMA-MAA)	Enrobage 2 (Dex70-MA-MMA)	Enrobage 3 (Dex10-MA-MMA-MAA)
Copolymère à blocs (à l'état sec)	50	50	50
Talc	15	15	15
Citrate de triéthyle	10	10	10
Emulsion de silicone	1	1	1
Eau	7,6	7,6	7,6
Teneur en résidu sec (% massique)	7,6	7,6	7,6

Les comprimés ont été enrobés avec l'une de ces trois dispersions d'enrobage, par pulvérisation au moyen d'un lit d'air fluidisé. Ils ont ensuite été séchés à l'air chaud puis par étuvage. A la fin du processus d'enrobage, les inventeurs ont obtenu trois groupes de comprimés différents selon leur enrobage. Par rapport aux comprimés non enrobés initiaux, les comprimés enrobés présentaient un gain de poids moyen égal respectivement à 10% pour les comprimés revêtus d'enrobage 1 à base de dextran 70 - polyacrylate de méthyle - polyméthacrylate de méthyle - acide polyméthacrylique, à 8,6% pour les comprimés revêtus d'enrobage 2 à base de dextran 70 - polyacrylate de méthyle - acide polyméthacrylique, et à 11% pour les comprimés revêtus d'enrobage 3 à base de dextran 10 - polyacrylate de méthyle - polyméthacrylate de méthyle - acide polyméthacrylique.

Ces trois groupes de comprimés enrobés ont été utilisés pour étudier la libération de la théophylline pendant le trajet dans le système digestif. Cette étude a été réalisée in vitro à l'aide d'un appareil de dissolution de type USP III (BIO-DIS®, RRT9, Caleva Ltd, Royaume-Uni) permettant de reproduire les changements de pH rencontrés le long du système digestif.

L'étude s'est déroulée en quatre phases consécutives, appelées phases I à IV, au cours desquelles le milieu d'épreuve simulait successivement le liquide gastrique (liquide gastrique simulé LGS), le liquide duodénal (liquide duodénal simulé LDS), le liquide intestinal (liquide intestinal simulé LIS) et le liquide colique (liquide colique simulé LCS). Pour le liquide colique (LCS), plusieurs variantes ont été testées, à savoir à pH 7,2, à pH 7,2 en présence de dextranase (15 U/ml), et à pH 5,0 en présence de dextranase (15 U/ml). L'ensemble des paramètres de cette étude ont été regroupés dans le tableau ci-dessous.

Phase	Phase I LGS	Phase II LDS	Phase III LIS	Phase IV LCS
Volume du milieu d'épreuve (ml)	250	250	250	250
pH	1,2	5,5	6,8	7,2 ou 5,0
Durée (h)	2	2	2	18
Amplitude (nombre de mouvements verticaux de bas en haut et de haut en bas /min)	20	20	20	5

Des échantillons de 5 ml ont été retirés à intervalles réguliers, sans remplacement du milieu de dissolution. Ces échantillons ont été dilués de façon appropriée et ont été analysés à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible à 272 nm afin de déterminer la quantité de théophylline libérée à chaque phase. Cette étude de libération a été répétée trois fois.

Pour chaque groupe de comprimés, la quantité moyenne de théophylline libérée en fonction du temps a été représentée sur les graphiques des figures 11 à 16. Elle est exprimée en pourcentage de théophylline libérée par rapport à la théophylline totale contenue dans les comprimés de départ.

Sur les figures 11 et 12, on a représenté la quantité moyenne de théophylline libérée en fonction du temps par les comprimés d'enrobage 1, sur les figures 13 et 14 par les comprimés d'enrobage 2 et sur les figures 15 et 16 par les comprimés d'enrobage 3.

En étudiant ces graphiques, on constate que, quel que soit l'enrobage selon l'invention utilisé, il n'y a quasiment aucune libération de théophylline au niveau de l'estomac (phase I) et du duodénum (phase II) et il n'y a qu'une très faible libération de théophylline, inférieure à 10%, dans la première partie de l'intestin (phase III). Le polymère selon l'invention permet donc de garder intact le principe actif jusqu'à son

arrivée dans le côlon.

Lorsque les comprimés arrivent au niveau du côlon (phase IV), on constate une rapide augmentation de la libération de la théophylline, qui se poursuit tout le long du trajet des comprimés dans le côlon et aboutit à des quantités très importantes de théophylline libérées au bout de 24 heures, supérieures à 70% en présence de dextranase, et même de l'ordre de 80% avec l'enrobage 2 ou 3 ou supérieures à 90% avec l'enrobage 1 en présence de dextranase et lorsque le milieu colique se trouve à un pH normal de 7,2.

La libération du principe actif se produit lorsque le pH du milieu est sensiblement neutre, ce qui correspond au pH normal du côlon, par dissolution des blocs polyacryliques même en absence d'enzyme. Cependant, cette libération est fortement améliorée en présence d'enzymes, telles que la dextranase, produites par la microflore colique, qui permettent de dissoudre également le bloc polypeptidique du polymère selon l'invention. Le polymère selon l'invention est donc plus efficace qu'un polymère à structure uniquement acrylique lorsque le côlon se trouve dans des conditions de pH normales.

Sur les figures 12, 14 et 16, on constate qu'une libération importante de théophylline se produit également en phase IV lorsque le pH du milieu est égal à 5 en présence de dextranase par dissolution du bloc polypeptidique du polymère selon l'invention. Avec un tel milieu acide, souvent rencontré dans le cas de maladie du côlon, un polymère à structure uniquement acrylique serait complètement inefficace.

Comme le démontrent ces essais, les enrobages testés à base de polymères selon l'invention remplissent parfaitement leurs fonctions : ils protègent le principe actif jusqu'au côlon et provoquent une libération quasi-totale de ce principe actif une fois arrivé dans le côlon, que le côlon se trouve à pH sensiblement neutre ou même à pH acide.

De manière évidente, l'invention ne se limite pas aux modes de réalisation préférentiels décrits précédemment et représentés sur les différentes figures, l'homme du métier pouvant y apporter de nombreuses modifications et imaginer d'autres variantes sans sortir ni de la portée, ni du cadre de l'invention définis par les revendications.

REVENDEICATIONS

1. Forme galénique orale (1), notamment pharmaceutique, contenant au moins un principe actif (9) devant être libéré spécifiquement dans le côlon (7), et contenant un polymère à libération colique spécifique destiné à protéger le principe actif (9) jusqu'à son arrivée au niveau du côlon (7) et à le libérer spécifiquement dans le côlon (7), caractérisée en ce que le polymère à libération colique spécifique est un copolymère à blocs comprenant un bloc polysaccharidique (17) qui est dégradé par la microflore colique quel que soit le pH du côlon et au moins deux blocs polyacryliques (18) hydrophobes qui permettent au polymère de rester intact jusqu'au côlon (7), ces blocs polyacryliques (18) étant greffés les uns à la suite des autres sur le bloc polysaccharidique (17) et étant solubles à pH sensiblement neutre.

2. Forme galénique orale (1) selon la revendication précédente caractérisée en ce que le bloc polysaccharidique (17) est réalisé à partir de dextran, de gomme de guar, d'amylose, d'amidon, de chitosane ou de pectine.

3. Forme galénique orale (1) selon la revendication 1 ou 2 caractérisée en ce que le polymère à libération colique spécifique comprend deux ou trois blocs polyacryliques (18).

4. Forme galénique orale (1) selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisée en ce que chaque bloc polyacrylique (18) est une chaîne de polyacrylate de méthyle (19), de polyméthacrylate de méthyle (20) ou d'acide polyméthacrylique (21).

5. Forme galénique orale (1) selon la revendication 3 et 4 caractérisée en ce que le polymère à libération colique spécifique comporte à la suite de son bloc polysaccharidique (17) :

- un bloc de polyacrylate de méthyle (19), un bloc de polyméthacrylate de méthyle (20) et un bloc d'acide polyméthacrylique (21) ; ou
- un bloc de polyacrylate de méthyle (19) et un bloc de polyméthacrylate de méthyle (20) ; ou
- un bloc de polyacrylate de méthyle (19) et un bloc d'acide polyméthacrylique (21) ; ou
- un bloc de polyméthacrylate de méthyle (20) et un bloc d'acide polyméthacrylique (21).

6. Forme galénique orale (1) selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisée en ce qu'il s'agit d'un comprimé (11), d'une gélule (15), d'une granule (14) ou d'une microgranule.

7. Procédé de fabrication du polymère à libération colique

spécifique d'une forme galénique orale (1) selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que les blocs polyacryliques (18) sont obtenus par l'ajout successif de différents monomères acryliques sur le bloc polysaccharidique (17) au cours de plusieurs étapes successives de polymérisation radicalaire en émulsion.

8. Procédé de fabrication selon la revendication précédente caractérisé en ce que les monomères acryliques sont choisis parmi le groupe suivant et dans l'ordre relatif suivant : acrylate de méthyle, méthacrylate de méthyle et acide méthacrylique.

9. Procédé de fabrication selon la revendication 7 ou 8 caractérisé en ce que les étapes successives de polymérisation radicalaire en émulsion se font en présence de cérium (IV), d'argon et d'acide nitrique, à environ 60°C.

10. Procédé de fabrication selon la revendication précédente caractérisé en ce que la concentration du cérium (IV) est comprise entre 0,001 et 0,02 mol/l.

11. Utilisation d'un polymère à libération colique spécifique pour la réalisation d'une forme galénique orale (1), notamment pharmaceutique, contenant au moins un principe actif (9) devant être libéré spécifiquement dans le côlon (7), le polymère à libération colique spécifique étant destiné à protéger le principe actif (9) jusqu'à son arrivée au niveau du côlon (7) et à le libérer spécifiquement dans le côlon (7), caractérisée en ce que le polymère à libération colique spécifique est un copolymère à blocs comprenant un bloc polysaccharidique (17) qui est dégradé par la microflore colique quel que soit le pH du côlon et au moins deux blocs polyacryliques (18) hydrophobes qui permettent au polymère de rester intact jusqu'au côlon (7), ces blocs polyacryliques (18) étant greffés les uns à la suite des autres sur le bloc polysaccharidique (17) et étant solubles à pH sensiblement neutre.

12. Utilisation selon la revendication précédente caractérisée en ce que le polymère à libération colique spécifique est utilisé pour la réalisation d'un enrobage (13).

13. Utilisation selon la revendication précédente caractérisée en ce que l'enrobage (13) présente une épaisseur comprise entre 1 µm et 1 mm.

14. Utilisation selon la revendication 12 ou 13 caractérisée en ce que l'enrobage (13) contient un agent plastifiant, un élément de structure insoluble quel que soit le pH ou une substance de charge, en plus du polymère à libération colique spécifique.

15. Utilisation selon la revendication 11 caractérisée en ce que le polymère à libération colique spécifique est utilisé comme agent matriciel.

FIG. 1

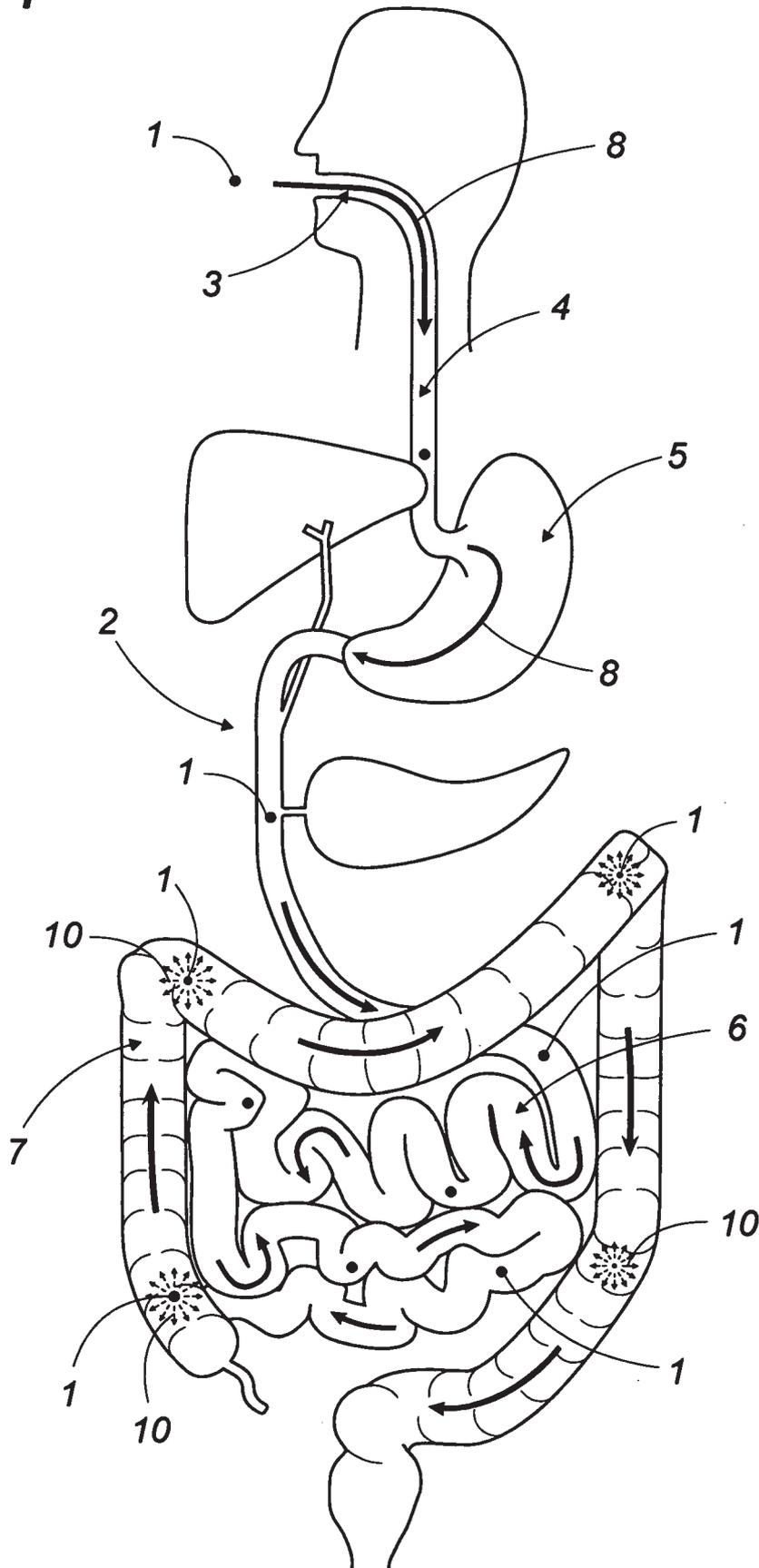


FIG.2

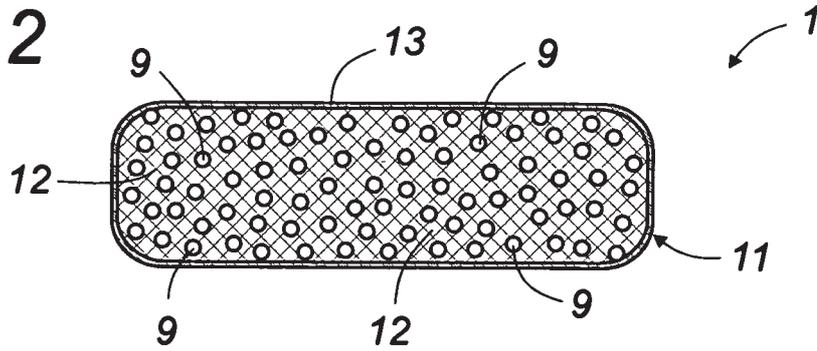


FIG.3

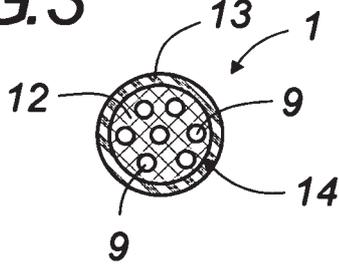


FIG.4

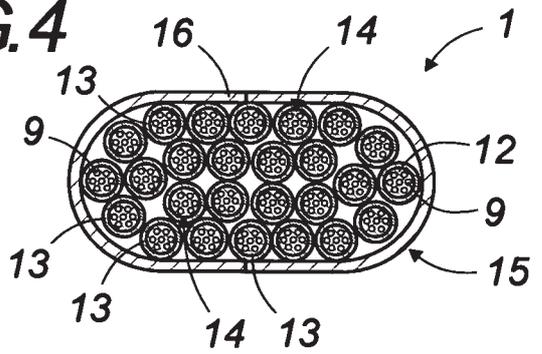


FIG.5

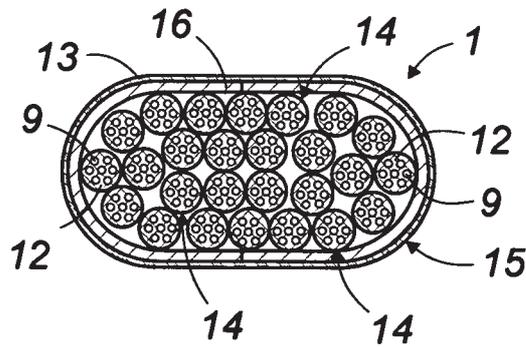


FIG.6

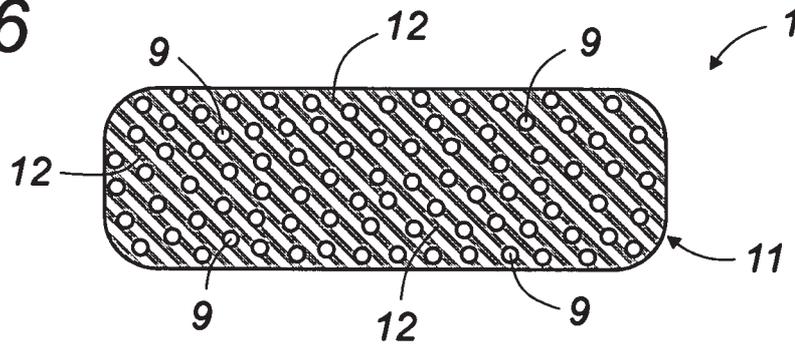


FIG.7

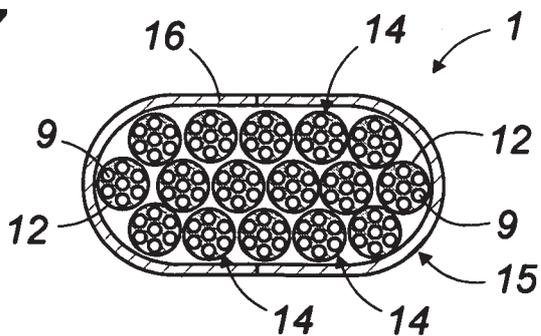


FIG.8

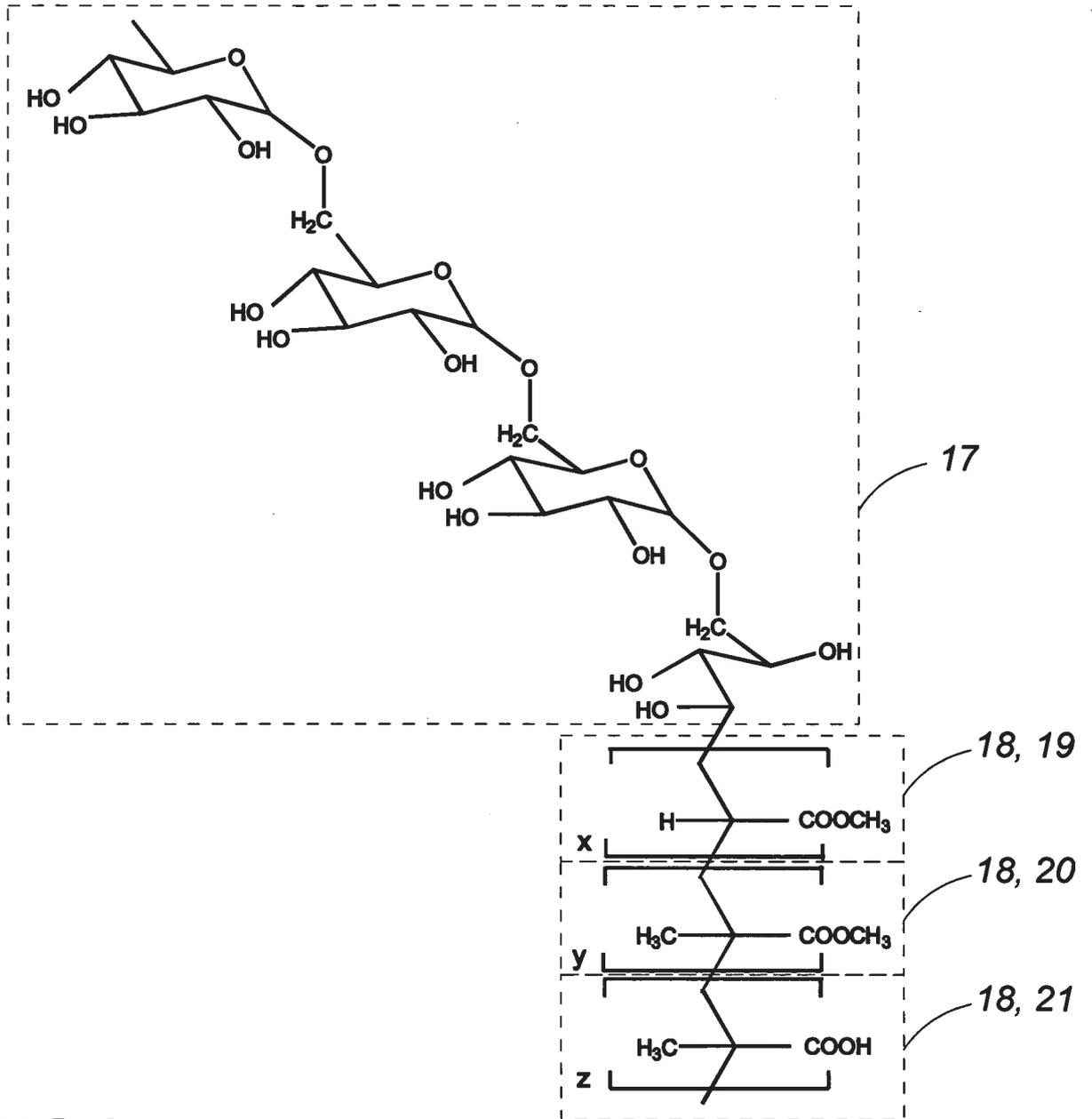


FIG.9

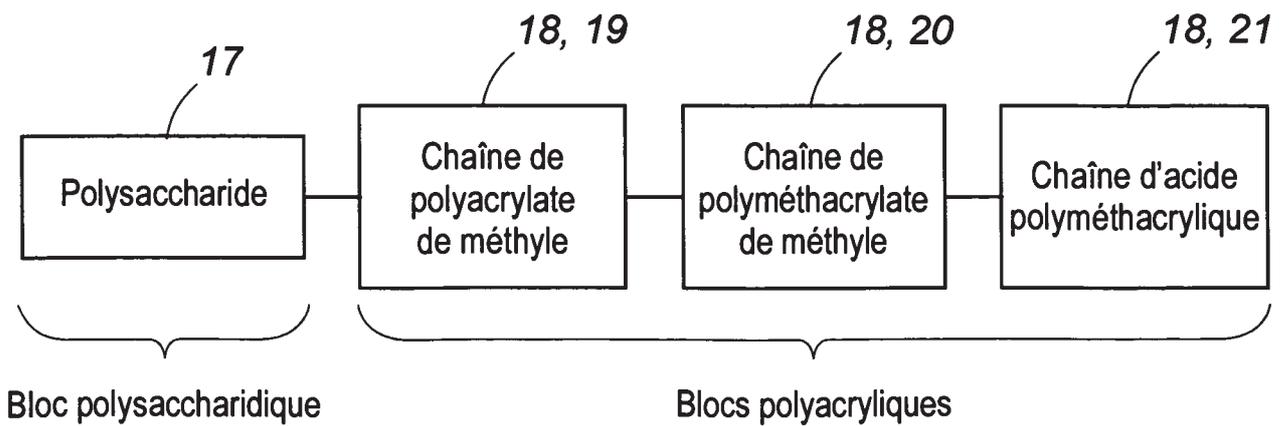


FIG. 10

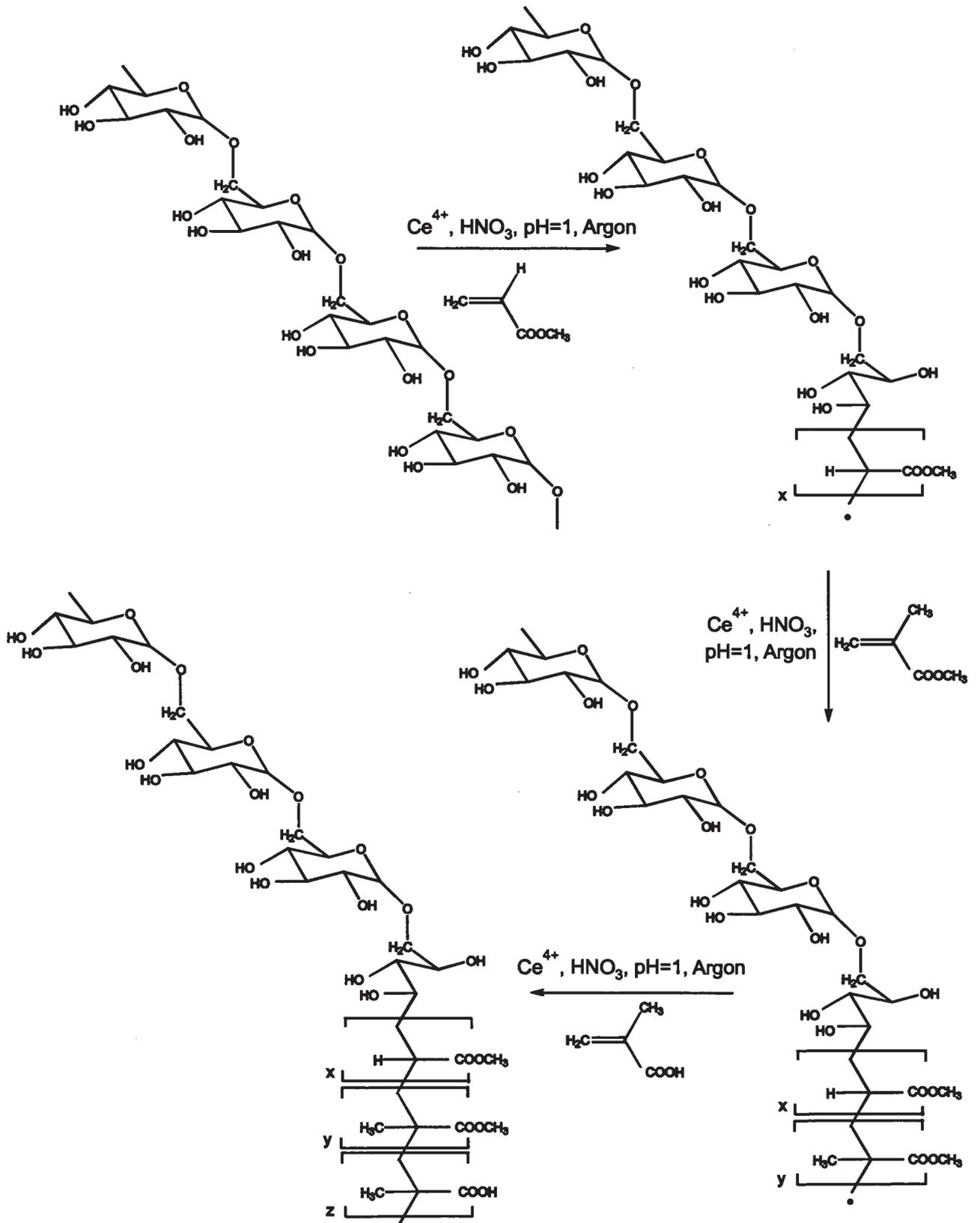


FIG. 11

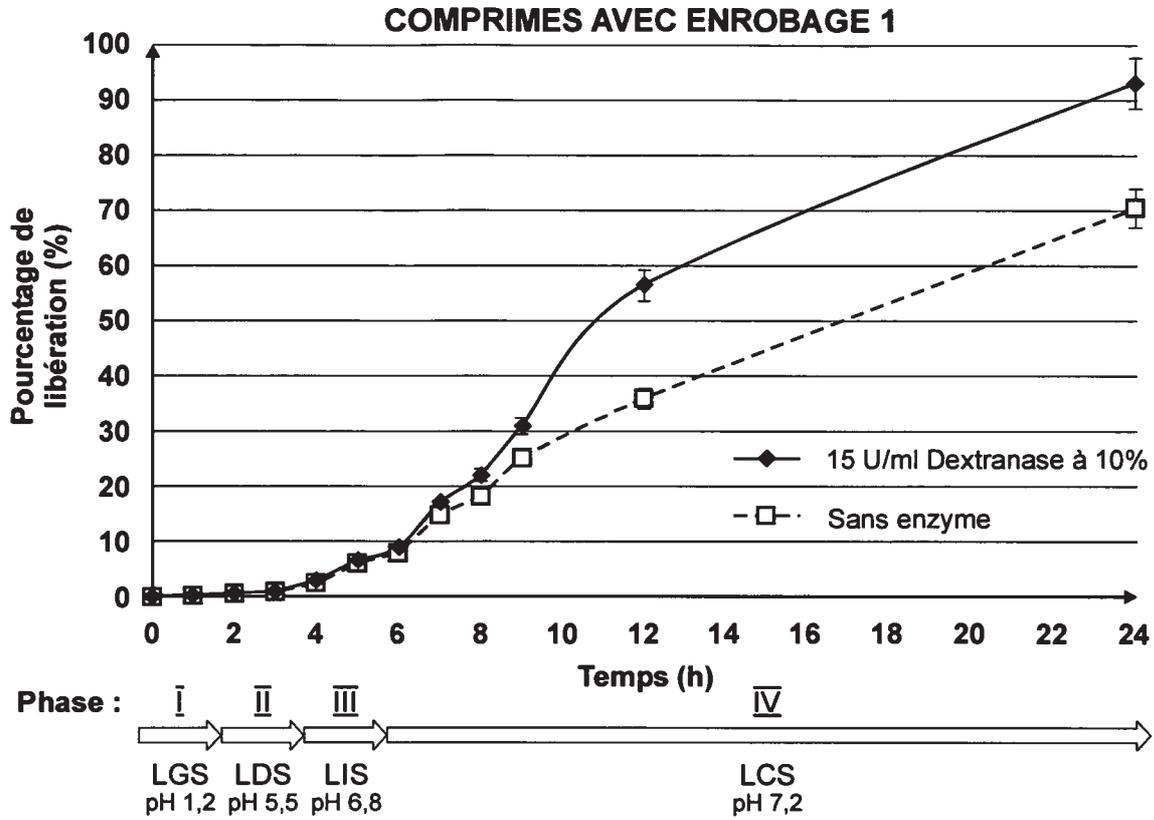


FIG. 12

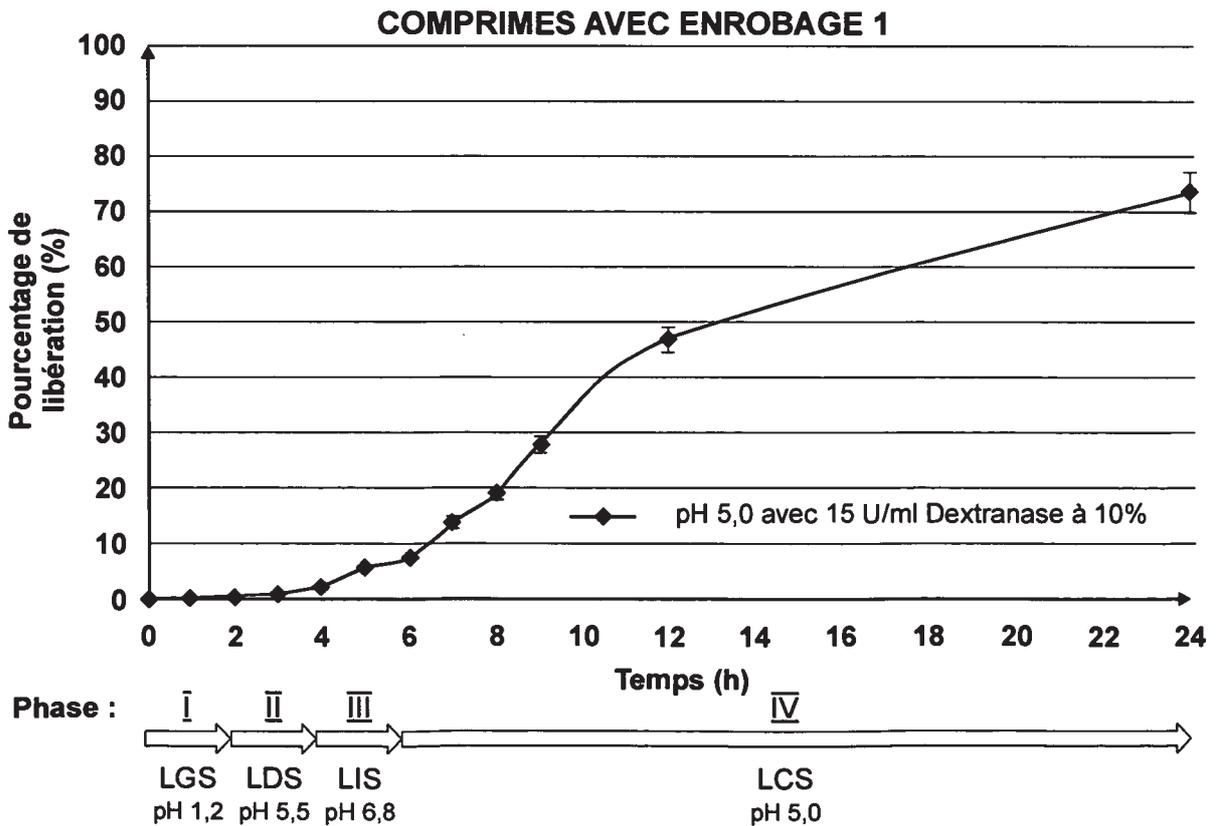


FIG.13

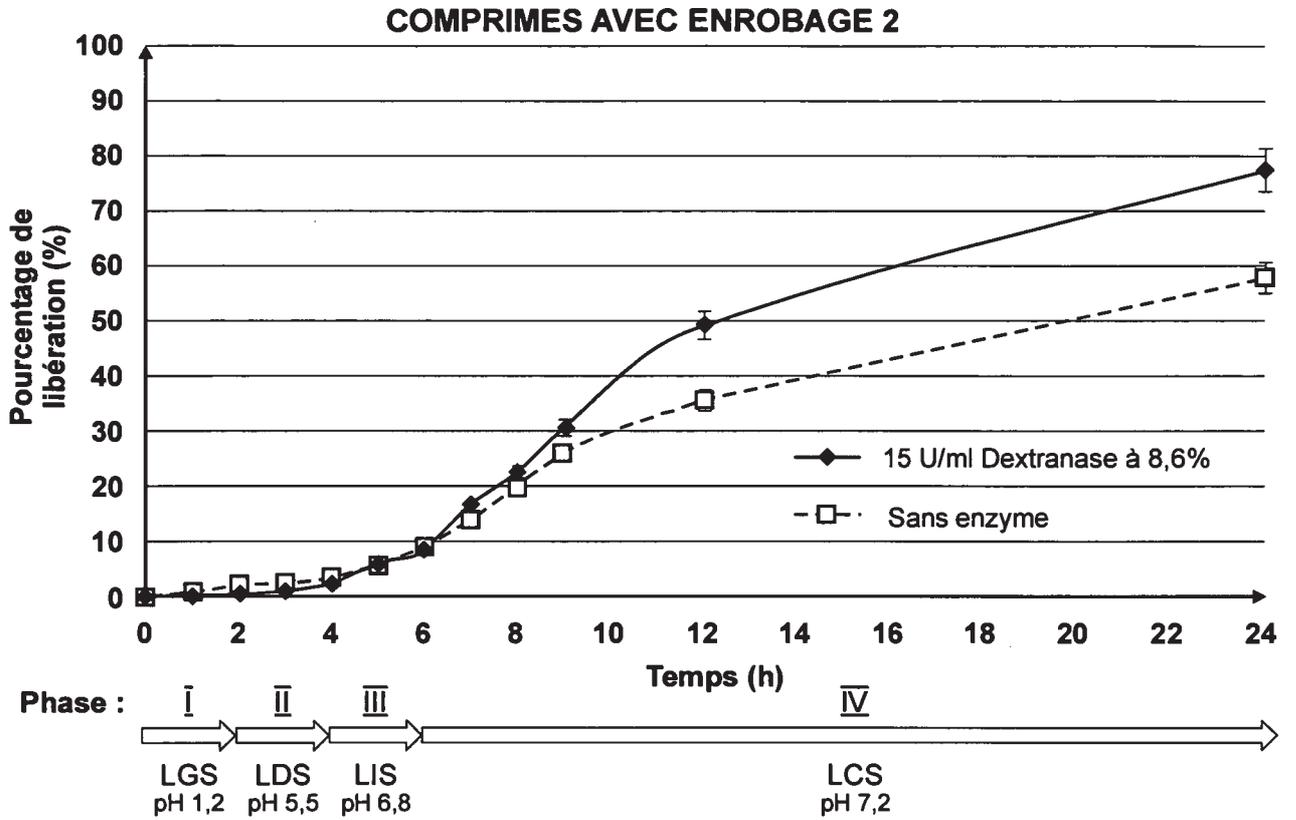


FIG.14

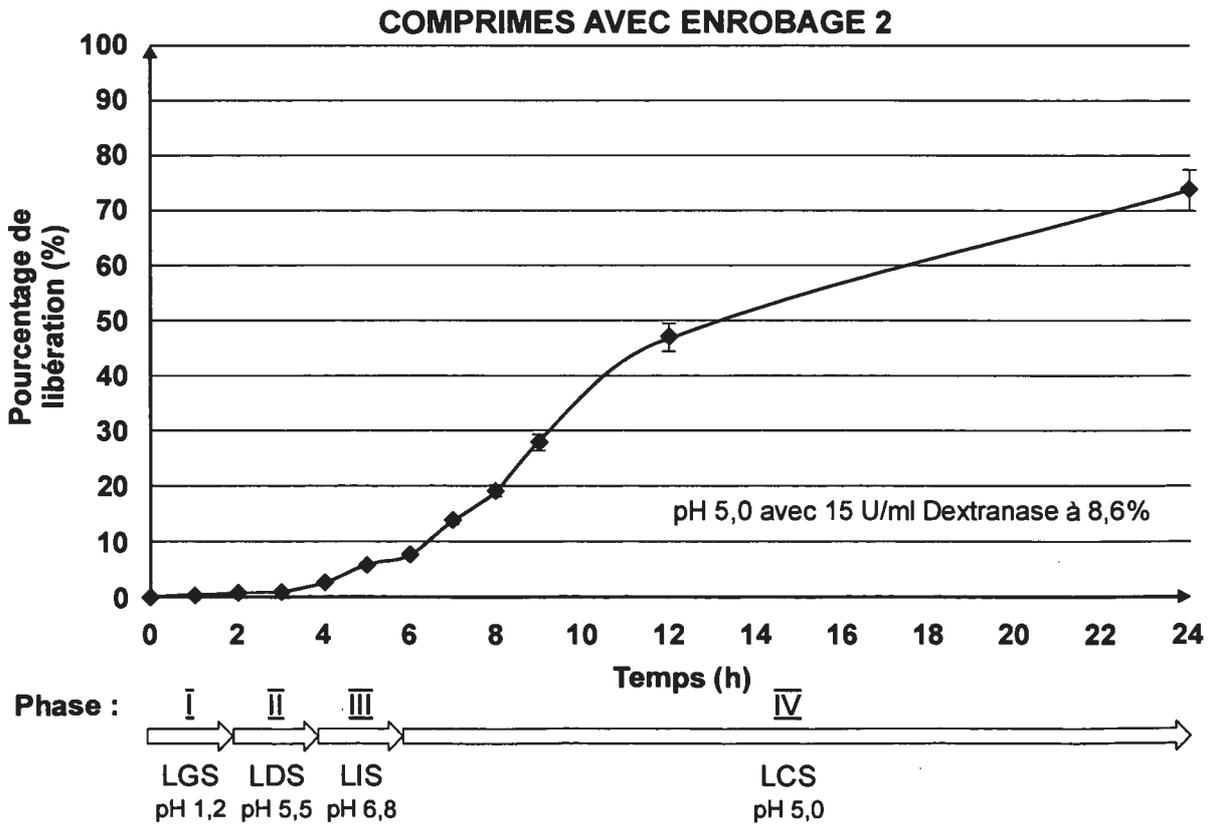


FIG. 15

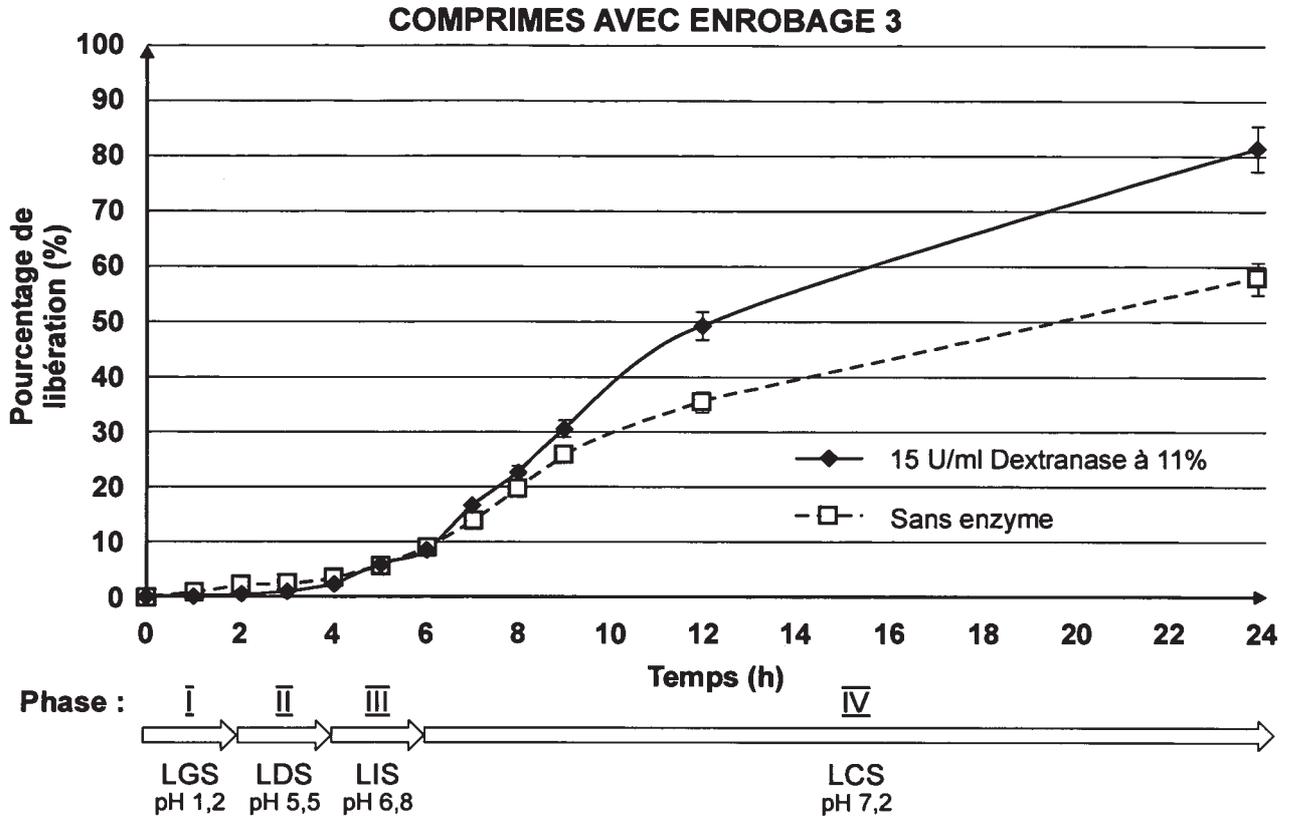
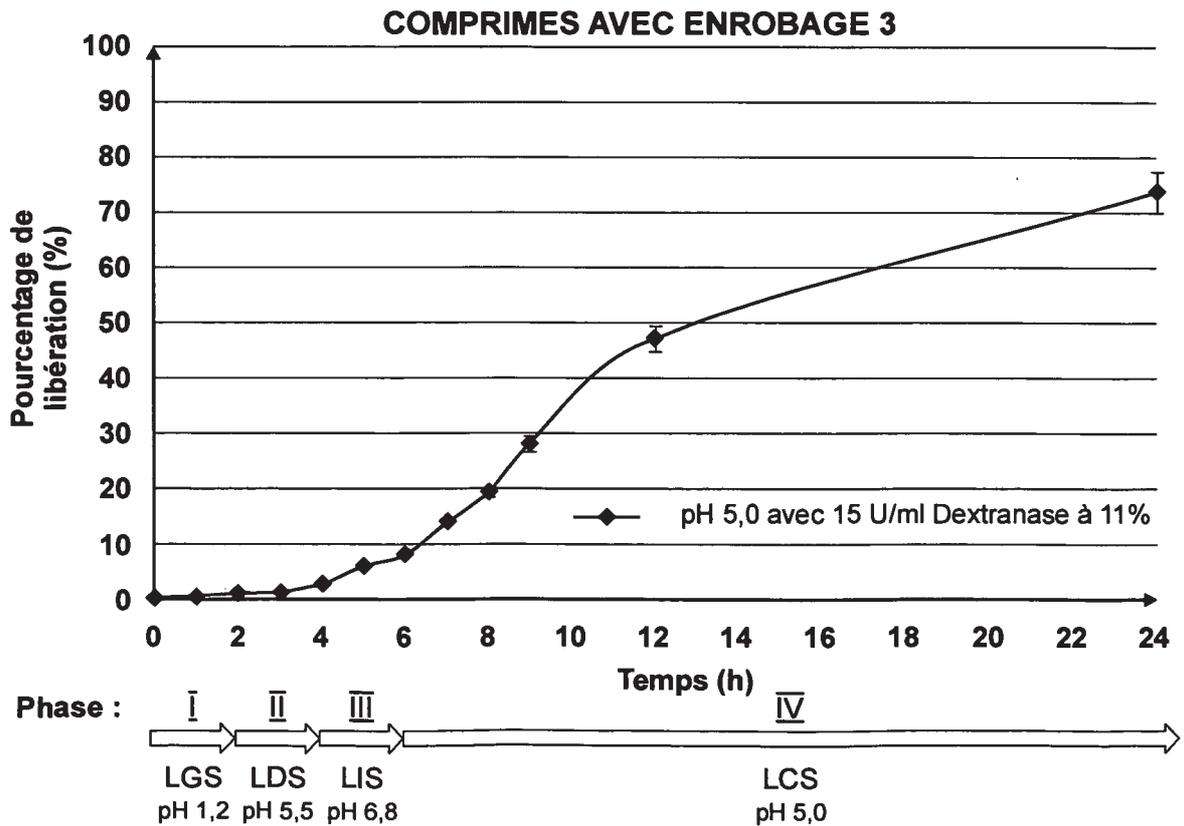


FIG. 16



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2009/000706

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C08F251/00 C08F297/02 C08F2/22 A61K47/36

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C08F A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98/01421 A (UNIV UTAH RES FOUND [US]; KOPECEK JINDRICH [US]; KOPECKOVA PAVLA [US];) 15 January 1998 (1998-01-15) claims	1-15
A	SINGH ET AL: "Synthesis, characterization and swelling studies of pH responsive psyllium and methacrylamide based hydrogels for the use in colon specific drug delivery" CARBOHYDRATE POLYMERS, APPLIED SCIENCE PUBLISHERS, LTD. BARKING, GB, vol. 69, no. 4, 23 May 2007 (2007-05-23), pages 631-643, XP022093485 ISSN: 0144-8617 page 642, left-hand column	1-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art,
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 octobre 2009

Date of mailing of the international search report

27/10/2009

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Iraegui Retolaza, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2009/000706

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SCHACHT E ET AL: "Polymers for colon specific drug delivery" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 39, no. 2, 1 May 1996 (1996-05-01), pages 327-338, XP004037338 ISSN: 0168-3659 page 336, right-hand column - page 337, left-hand column -----	1-15
A	WO 2008/035229 A (LABOPHARM INC [CA]; LABOPHARM EUROP LTD [IE]; LABOPHARM BARBADOS LTD []) 27 March 2008 (2008-03-27) claims -----	1-15
A	EP 0 441 197 A (BASF AG [DE]) 14 August 1991 (1991-08-14) examples -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/FR2009/000706

Patent document cited in search report	A	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9801421	A	15-01-1998	NONE	
WO 2008035229	A	27-03-2008	AU 2007298674 A1 EP 2081548 A2 US 2009258071 A1	27-03-2008 29-07-2009 15-10-2009
EP 0441197	A	14-08-1991	AU 628712 B2 AU 7017291 A CA 2034943 A1 DE 4003172 A1 ES 2081377 T3 JP 4356513 A US 5227446 A	17-09-1992 08-08-1991 04-08-1991 08-08-1991 01-03-1996 10-12-1992 13-07-1993

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2009/000706

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C08F251/00 C08F297/02 C08F2/22 A61K47/36		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C08F A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 98/01421 A (UNIV UTAH RES FOUND [US]; KOPECEK JINDRICH [US]; KOPECKOVA PAVLA [US];) 15 janvier 1998 (1998-01-15) revendications -----	1-15
A	SINGH ET AL: "Synthesis, characterization and swelling studies of pH responsive psyllium and methacrylamide based hydrogels for the use in colon specific drug delivery" CARBOHYDRATE POLYMERS, APPLIED SCIENCE PUBLISHERS, LTD. BARKING, GB, vol. 69, no. 4, 23 mai 2007 (2007-05-23), pages 631-643, XP022093485 ISSN: 0144-8617 page 642, colonne de gauche ----- -/--	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
<ul style="list-style-type: none"> *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets 		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 20 octobre 2009		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 27/10/2009
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Iraegui Retolaza, E

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>SCHACHT E ET AL: "Polymers for colon specific drug delivery" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 39, no. 2, 1 mai 1996 (1996-05-01), pages 327-338, XP004037338 ISSN: 0168-3659 page 336, colonne de droite - page 337, colonne de gauche</p>	1-15
A	<p>WO 2008/035229 A (LABOPHARM INC [CA]; LABOPHARM EUROP LTD [IE]; LABOPHARM BARBADOS LTD []) 27 mars 2008 (2008-03-27) revendications</p>	1-15
A	<p>EP 0 441 197 A (BASF AG [DE]) 14 août 1991 (1991-08-14) exemples</p>	1-15

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

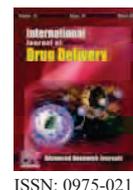
PCT/FR2009/000706

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9801421	A	15-01-1998	AUCUN	
WO 2008035229	A	27-03-2008	AU 2007298674 A1 EP 2081548 A2 US 2009258071 A1	27-03-2008 29-07-2009 15-10-2009
EP 0441197	A	14-08-1991	AU 628712 B2 AU 7017291 A CA 2034943 A1 DE 4003172 A1 ES 2081377 T3 JP 4356513 A US 5227446 A	17-09-1992 08-08-1991 04-08-1991 08-08-1991 01-03-1996 10-12-1992 13-07-1993

Article

Synthesis and characterization of dextran esters as coating or matrix systems for oral delivery of drugs targeted to the colon

International Journal of Drug Delivery 2 (2010) 22-31



Synthesis and characterization of dextran esters as coating or matrix systems for oral delivery of drugs targeted to the colon

Beesh M.¹, Majewska P.¹, Vandamme Th. F.^{1*}

*Corresponding author:

Vandamme Th.F.

¹Universite de Strasbourg,
Faculté de Pharmacie,
Laboratoire de Conception et
Application de Molecules
Bioactives, Equipe de
Pharmacie biogalenique, 74,
Route du Rhin- BP 60024,
67401 Illkirch cedex,
France.

Tel: +33 3 68.85.41.06

Fax: +33 3 68.85.43.25

E-mail:

vandamme@unistra.fr

Abstract:

Different dextran esters with various degrees of substitution (1, 2 and 3) were synthesized by esterification reaction, with three acid anhydrides: acetic anhydride, propionic anhydride, and butyric anhydride, separately. These modified polysaccharides were characterized by FT-IR, ¹H NMR and ¹³C NMR spectroscopies. Enzymatic degradation of biopolymers by dextranase was also studied. The polymers showing the best degradation profiles were chosen to design blended free films in combination with a polymethacrylate (Eudragit® RS 30D) as a sustained release system for targeting to the colon. These free films were evaluated by permeability of theophylline used as tracer in different *in vitro* media of the gastro intestinal tract, in presence or in absence of dextranase. From these studies, it was concluded that dextran esters having the lower degree of substitution and constituted of short carbohydrate chains showed the best and significant enzymatic degradation and could be used as a promising carrier for specific colon drug delivery system.

Keywords: Colon-Specific Drug Delivery; Polysaccharides; Dextran; Dextranase; Dextran esters; Enzymatic Degradation; Eudragit® RS 30D; Sid-by-side diffusion cell

Introduction

The oral route is the most common and convenient of the existing administration methods for systemic drug delivery. It affords high patient acceptability, compliance, and ease of administration. Moreover, the cost of oral therapy is generally much lower than that of parenteral therapy [1,2]. Research interest in the area of colonic drug delivery has been fuelled by the need to better treat pathologies of the colon that range in seriousness from constipation and diarrhoea to debilitating inflammatory bowel diseases, ulcerative

colitis and Crohn's disease, through to colon carcinoma. Targeted oral drug delivery to the colon would therefore ensure a direct treatment at the disease site, lower dosing and a reduction of systemic side effects. Aside from local treatment, the colon can also be utilised as a portal for the entry of drugs into the bloodstream for the purpose of systemic therapy. For example, molecules that are degraded and/or poorly absorbed in the upper gut, such as peptides and proteins, may be better absorbed from the more benign

environment of the colon. In addition, systemic absorption from the colon can also be used as a means of achieving chronotherapy for diseases that are sensitive to circadian rhythms such as asthma, angina, and arthritis [3,4].

Amongst the different strategies to reach the colon described in the literature [5], the simplest and less costly strategy consists using polyacrylate derivatives or polysaccharide-polyacrylate derivatives such as ammonio methacrylate copolymer. They can be a good choice for people suffering of colon disease for which any variability of pH into the colon occurs. Besides these synthetic polymers, the use of polysaccharides degradable by enzymes and/or bacteria present into the colon can also be a good strategy. Furthermore, polysaccharides are found in abundance, have wide availability, are inexpensive and available in a variety of structures with a variety of properties. They can be easily modified chemically and biochemically and are highly stable, safe, nontoxic, hydrophilic and gel forming and in addition biodegradable, which suggests their use in targeted drug delivery systems [6]. Furthermore, many of the polysaccharide-based delivery systems shield the drug from the hostile environments of the upper GIT [7,8].

Dextran is a class of polysaccharides consisting of α -1, 3 and α -1, 6 glycosidic linkages and having unique properties, such as biodegradability at specific body sites, e.g. the colon. Dextranases are the enzymes which hydrolyse these glycosidic linkages. Dextranase activities on the colon are shown by anaerobic gram-negative intestinal bacteria especially the Bacteroides. The Bacteroides are the numerically predominant anaerobes in the colonic region of humans. They number about 10^{11} per gram of intestinal contents and constitute approximately 30% of total cultivable gut flora. The majority of strictly anaerobic bacteria in the colon are saccharolytic. The bacteria derive their energy from the fermentation of carbohydrates, which results in the production of short chain fatty acids [9]. Dextranase activity in human caecostomy effluent samples was reported to be 650 DU/ml, equivalent to 30 U/ml measured in conventional enzyme units, and 15 DU/g equivalent to 0.69 U/g in human fecal samples [10]. Due to its degradability in the colon, dextran is an ideal candidate for oral drug delivery systems. However, dextran itself cannot be used as drug carrier due to its high water solubility and therefore the first need is to make it more hydrophobic [11].

The aims of this study were to synthesize and characterize new dextran esters such as dextran acetate (Dex.Ace), dextran propionate (Dex.Pro) and dextran butyrate (Dex.But) with three degrees of substitution by esterification reaction, to be used as coatings or as a matrix systems for solid oral drug dosage forms (tablets, capsules and mini granules) in both cases as carriers for site specific drug delivery to the colon. Preparation of biodegradable matrix films consisted of dextran esters, as biodegradable modified polysaccharides into the colon, and Eudragit RL 30 D as a sustained-release polymer [12]. The permeability of those free films mixtures into different media mimicking the gastrointestinal tract was also realized.

Materials and methods

Materials

Dextran (Dex) of MW 67500 was purchased from Pharmacosmos (Holbaek, Denmark). Dextran was dried in a vacuum oven for 24 h at 50 °C before use. All chemicals were used without further purification. Acetic anhydride, butyric anhydride, propionic anhydride, dextranase (EC 3.2.1.11) from Penicillium, ammonium acetate, sodium azide, sodium potassium tartrate, phenol, 3,5-dinitrosalicylic acid, sodium sulfite, dimethyl sulfoxide (DMSO), ethyl acetate, chloroform, ethanol, methanol, tetrahydrofuran, acetone, 2-propanol, dichloromethane, 4-(dimethylamino) pyridine (DMAP) and triethyl citrate were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Company (Saint Quentin Fallavier, France). Theophylline monohydrate was obtained from Cooper Rhone (Melun, France). Eudragit® RS 30D was obtained from SPCI (St-Denis La Plaine, France).

Synthesis of different dextran esters

The general synthesis of dextran esters is shown in Figure.1. 10 g of dry dextran and 4-Dimethylamino pyridine (DMAP) 10% w/w were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), in a 500 ml two-neck round-bottomed flask equipped with a stirrer, a condenser and a drying tube, and heated to 80 °C. The mixture was stirred until it was completely dissolved. Then, the required amount of anhydrides acid are slowly added drop by drop, and the mixture was stirred for a determined period as shown in Table 1, then cooled down at room temperature. The obtained dextran esters were precipitated in 1000 ml of distilled water and filtrated. Then, the precipitate was dissolved into 300

ml ethyl acetate, washed three times with distilled water, two times with a saturated solution of sodium bicarbonate, two times with a saturated solution of sodium chloride, and finally two times with distilled water, respectively. Then, after evaporation of the

solvent, the residue was dissolved in a small amount of methanol. Finally, the product was isolated by precipitation into 1000 ml of distilled water and filtrated. The precipitated polymer was dried at 50 °C under vacuum during 24 hours.

Table 1: The degree of substitution (DS), the esterification conditions, and the yields of dextran esters

Dextran esters	DS th	DS ^{Cal}	Volume of		Time of reaction (h)	Yield (%)
			anhydride acid (ml)	DMSO (ml)		
Dextran butyrate	3	3.02	30.2	80	4	94.43
	2	1.98	20.1	80	4	92.16
	1	0.98	10.07	80	4	90.12
	3	2.97	24.1	80	4	93.54
Dextran propionate	2	1.92	16.1	80	4	92.23
	1	0.97	8.03	80	4	90.01
	3	2.93	17.9	200 ⁽¹⁾	12 ⁽²⁾	92.13
Dextran acetate	2	1.91	11.9	200 ⁽¹⁾	12 ⁽²⁾	91.83
	1	0.96	5.97	200 ⁽¹⁾	12 ⁽²⁾	55.05

Characterization and solubility

The chemical structure of dextran and the different dextran esters were all characterized by FT-IR (Nicolet 380- Thermo electron, USA), and ¹H NMR, ¹³C NMR (Burker Avance PDX300 MHz spectrometer, Karlsruhe, Germany). For FT-IR characterization all samples were dried into a vacuum oven for at least 24 h before analysis. For ¹H NMR and ¹³C NMR the samples were dissolved in deuterated DMSO-d₆ or CDCl₃ (both were obtained from Euriso-top, Gif-sur-Yvette, France). Chemical shifts (δ) are reported in parts per million. For central lines of internal references, DMSO-d₆ (δ = 2.50) and CDCl₃ (δ = 7.24) were used. The degree of substitution (DS) was estimated from the ¹H NMR spectras [13,14].

The solubilities of the different dextran esters were determined by immersing 20 mg of each sample into a solvent for 24 h [15] followed by a filtration and a drying of the non soluble fraction.

Enzymatic degradation of different Dextran esters

30 mg of different dextran esters were incubated in 30 ml of ammonium acetate buffer (5 mM, pH 5.5)

containing 0.02% (w/v) of sodium azide, with three concentrations of dextranase (0.5, 5 and 10 U/ml) respectively, at 37 °C. The enzyme solution was prepared just before use. Periodically, samples of 2 ml were taken at different times (2, 6, 24 and 48 h), and heated at 95 °C for 10 min to inactivate the enzyme.

The concentration of reducing oligosaccharides was determined as described by Franssen *et al.* [16,17]. Typically, 200 µl of sodium sulfite solution (30 mg/ml) and 3 ml of Sumner reagent (0.2 g/ml of sodium potassium tartrate, 10 mg/ml of dinitrosalicylic acid, 10 mg/ml of sodium hydroxide and 2 mg/ml of phenol) were added to a sample of 2 ml and were incubated for 15 min at 95 °C. After cooling to room temperature, the absorbance was measured at 620 nm and the concentration of reducing oligosaccharides was calculated using glucose solutions as references. Each experiment was performed in triplicate and the results were in agreement within ±3% standard error.

Preparation of free films

A 10% (w/v) solution of Eudragit® RS 30 D (ERL) was prepared in distilled water, and then a fixed amount of triethyl citrate (20% to the total polymer

content) was added as plasticizer. Required amount of dextran acetate (DS1) powder was dissolved in distilled water. Dextran acetate solution was gently added to Eudragit® RS 30 D solution with continuous stirring. The ratios of dextran acetate to Eudragit® RS 30 D content were 0, 10, 20 and 30% (w/w) [18]. Identical volumes from the resulted suspension were transferred to Teflon plates and dried into a ventilated hood at temperature ambient for 48 h for complete drying. The integrity of the films was checked visually and the film thickness was measured at five different places by using a micrometer (Käfer, Germany). Free films were stored in a desiccator with 50% RH obtained by a saturated solution of magnesium nitrate hexahydrate at room temperature until use.

Permeability test

Isolated films of the polymers were mounted between the donor and the acceptor compartments of a side-by-side diffusion cell (Grown Glass Co., Inc., Somerville, New Jersey, USA) having a diffusion area of 3.46 cm². The temperature of the cells was kept at 37 ± 0.5 °C throughout the experiments by continuous circulating of water and each compartment was stirred continuously with a magnetic stirrer. Different experimental conditions were set up to examine the permeability of drugs through the polymer films. For theophylline, used as a hydrophilic model drug, the initial concentration of these one in the donor compartment was 3.0 mg/ml. To achieve the sink conditions for permeability experiments, nearly saturated concentration of theophylline was poured into the donor compartment. The donor and acceptor compartments were both composed of simulated gastric fluid (SGF) without pepsin, simulated intestinal fluid (SIF) without pancreatin with pH 6.8 (USP XXVIII, 2005) and simulated colonic fluid (SCF, 0.05 M phosphate buffer, pH 6.4) added with 0.5 U/ml of dextranase respectively. All of the permeability experiments were carried out for 3 h. At predetermined time intervals, samples of 10 ml were taken from the receptor cells and replaced with fresh medium. The contents of the acceptor cells were assayed spectrophotometrically for theophylline at 272 nm. Each permeation experiment was repeated three times and the cumulative amount of drug permeated and corrected for the acceptor sample replacement was plotted against time.

Applying Fick's first law of diffusion in sink conditions, the permeation rate of drug was defined as:

$$\frac{d_M}{d_t} = \frac{DSKC_d}{h} = PSC_d \quad (1)$$

Where M, was the amount of drug diffused (mg) at time t; D, the diffusion coefficient; S, the effective diffusion area (cm²); C_d, the concentration of drug in the donor cell; h, the thickness of membrane; and P, was the permeability (cm/s). Then, the permeability was obtained by the following equation:

$$P = \frac{\text{Slope}}{SC_d} \quad (2)$$

Where the slope was obtained from the plot of the amount of drug permeated versus time [19].

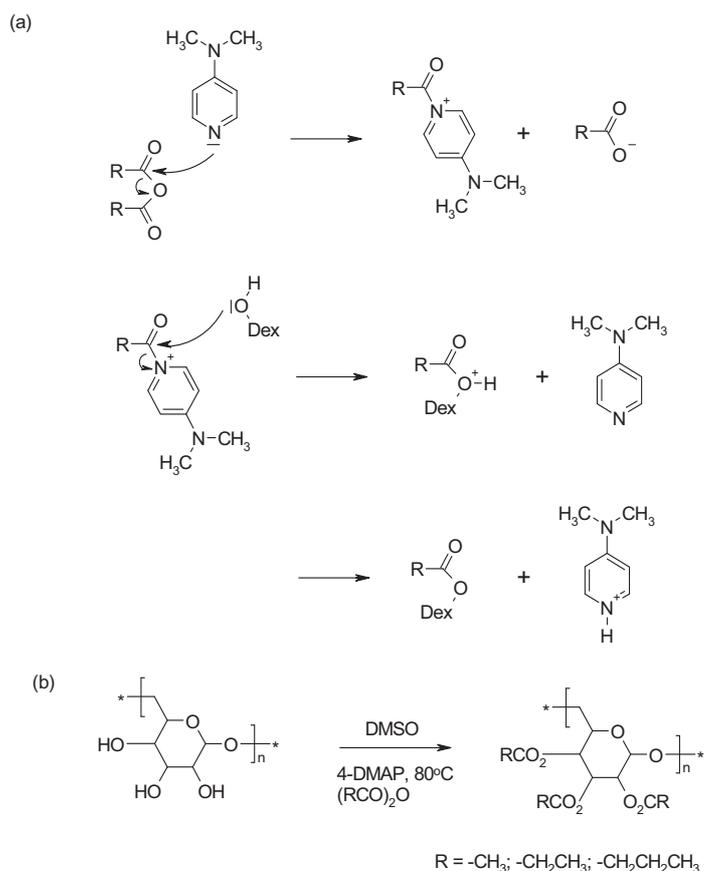
Results and discussion

Synthesis and characterization of different dextran esters

A series of different dextran esters, acetate, propionate and butyrate, with various degrees of substitution (DS: 1.0, 2.0 and 3.0) were synthesized by esterification under anhydrous conditions (Fang *et al.*, 1999).

Figure 1 gives the general scheme of the esterification reaction, and the mechanism of reaction [20]. Dextran reacted with acid anhydride in DMSO in presence of 4-DMAP used as catalyst at 80 °C [21-23]. All or some of the hydroxyl groups of dextran were replaced by carboxylic groups to give dextran esters (acetate, propionate and butyrate).

The structure of the different dextran esters were confirmed by FT-IR, ¹H NMR and ¹³C NMR spectroscopies. Figure 2 shows the FTIR spectras of the dextran and the different dextran esters. By comparing the different FTIR spectras of dextran butyrate, we can show a decrease in the O-H band (3340 cm⁻¹) and an increase in the three major ester bands [the C=O band (1740 cm⁻¹), the C-O band (1250 cm⁻¹), and the C-CH₃ band (1350 cm⁻¹)], providing evidence of esterification as reported by Sun *et al.* [24]. Same results were observed for dextran propionate and dextran acetate.



(R= CH₃ dextran acetate, CH₂CH₃ dextran propionate and CH₂CH₂CH₃ dextran butyrate)

Figure 1. General scheme of the synthesis dextran esters (a) Mechanism of esterification reaction (b) General reaction.

The chemical structures of the different dextran esters were also examined by ¹H NMR spectroscopy. The characteristic resonance peaks corresponding to the protons in methylene groups and other five methanol groups of dextran can be observed at 3.4- 4 ppm and 4.9 ppm. In addition, the signals of protons in dextran butyrate appear in the spectrum at 0.92 ppm (-CH₂-CH₂-CH₃), 1.6 ppm (-CH₂-CH₂-CH₃), and 2.3 ppm (-CH₂-CH₂-CH₃), the signals of protons in dextran propionate appear at 1.08 ppm (-CH₂-CH₃), and 2.23 ppm (-CH₂-CH₃) and the signals of protons in dextran acetate appear at 1.9 ppm (-CH₃). For the ¹³C NMR spectra, the resonance peaks of the six carbons in dextran can be observed at 65.6- 97.7 ppm, the resonance peaks corresponding to dextran butyrate

appear at 13.5 ppm (-CH₂-CH₂-CH₃), 18.8 ppm (-CH₂-CH₂-CH₃), 35.8 ppm (-CH₂-CH₂-CH₃) and 172.2 ppm (carbonyl groups C=O), for dextran propionate appear at 9.0 ppm (-CH₂-CH₃), 27.3 (-CH₂-CH₃) and 173.3 ppm (carbonyl groups C=O), and for dextran acetate appear at 20.9 ppm (-CH₃) and 169.8 ppm (carbonyl groups C=O) as reported by Wang *et al.* [25].

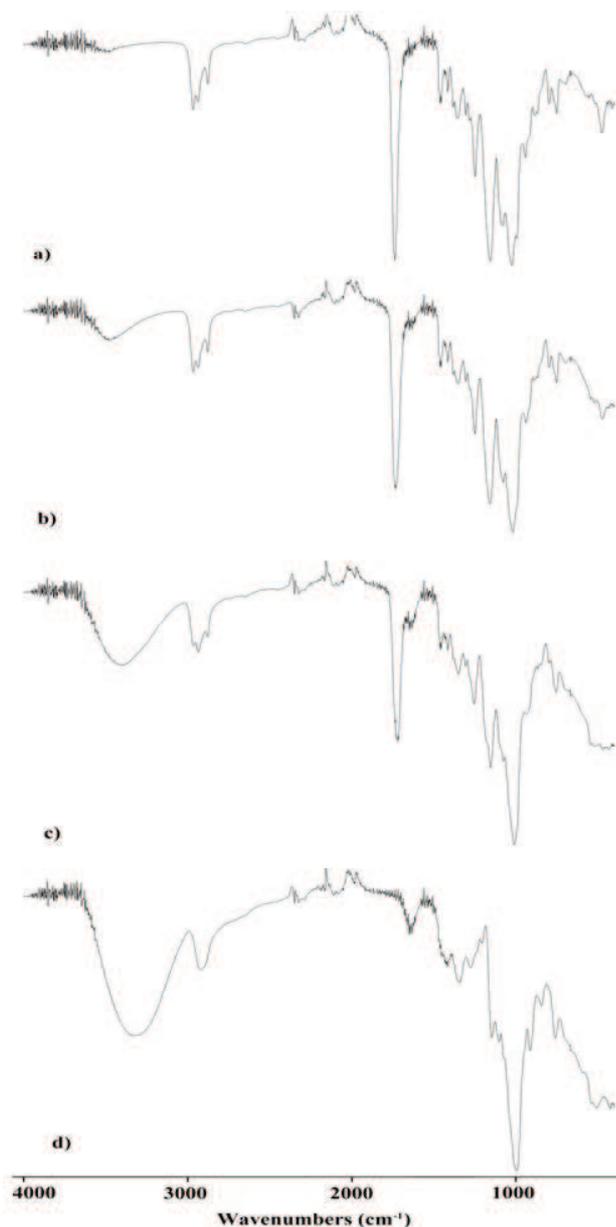


Figure 2. FTIR spectra of dextran butyrate DS.3 (a), dextran butyrate DS.2 (b), dextran butyrate DS.1 (c) and dextran (d).

The DS of each dextran esters was calculated as the following equation:

$$DS = \frac{7x}{ny} \quad (3)$$

Where x corresponds to the integrated areas of all the protons from the ester group, y corresponds to the integrated areas of all dextran protons and n corresponds to the number of hydrogen atoms in each ester group.

The solubilities of the different dextran esters into several organic solvents were examined and the results are reported in Table 2. As shown in Table 2, the solubilities of the different dextran esters in organic solvents are strongly dependent on the degree of substitution (DS) and on the type of the groups which are attached. By increasing the substitution degree and the length of the chains attached onto the dextran unit, the solubility of dextran esters can be improved into non polar solvents while the solubility into water is greatly reduced.

Table 2: Solubilities of the different dextran esters in various solvents

Polymer	Water	Chloroform	THF	Ethyl acetate	Acetone	2-Propanol	Methanol	DCM
Dextran Butyrate DS.3	I	S	S	S	S	PS	I	S
Dextran Butyrate DS.2	I	S	S	S	S	S	S	S
Dextran Butyrate DS.1	I	I	S	I	I	I	S	I
Dextran Propionate DS.3	I	S	S	S	S	I	PS	S
Dextran Propionate DS.2	I	S	S	S	S	S	S	S
Dextran Propionate DS.1	PS	S	S	I	I	I	S	I
Dextran Acetate DS.3	I	PS	PS	I	I	I	PS	S
Dextran Acetate DS.2	I	PS	I	I	I	I	S	PS
Dextran Acetate DS.1	S	I	I	I	I	I	S	I

S (soluble), I (insoluble). PS (particularly soluble), THF: Tetrahydrofuran; DCM: dichloromethane

The behavior of the two highly esterified dextran having a DS 2 and 3 differs strongly from esterified dextran having a DS1, allowing to conclude that the solubilities of dextran esters with a DS equal to 2 or 3 are strongly different than the dextran slightly substituted.

more and more important by increasing the

(a)

Enzymatic degradation of different dextran esters

The *in vitro* enzymatic degradation of different dextran esters was evaluated onto three concentrations of dextranase (Figure 3 a, b, c). As well described by several authors, the degradability of dextran derivatives by dextranase is significantly affected by the type and the extent of chemical modification [26,27] and the degree of substitution DS of dextran molecules [28].

Furthermore, the dextran esters slightly substituted (DS=1) by small chain of fatty acids, i.e. an acetate group, are degradable by the dextranase, this fact being

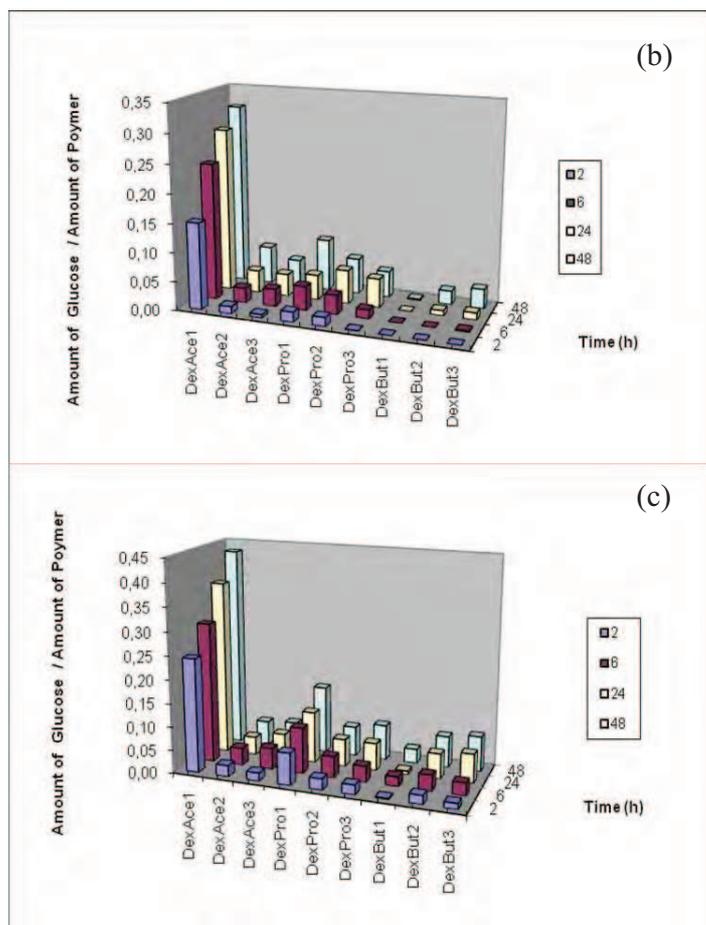


Figure 3. Enzymatic degradation of different dextran esters into different concentrations of dextranase, (a) 0.5 U/ml, (b) 5 U/ml and (c) 10 U/ml.

The study of the enzymatic degradation of the different dextran esters allowed us to conclude that the esterified dextrans degraded more rapidly as the degree of dextran substitution decreased, as the length of the attached group decreased and as the dextranase concentration increased. This enzymatic degradation study allowed us also to show that a too high substitution degree of dextran reached to a modified polysaccharide which didn't show any degradability in the concentration of dextranase used.

This fact can be explained by considering the attacking mechanism of dextranase, which needs four successive α -1,6- linked glucose units to allow the degradation of the dextran backbone as suggested by Bauer & Kesselhut [29].

Permeability test

For the reasons explained above in the section 3.2., we prepared films constituted of dextran acetate DS.1, in combination with Eudragit® RS 30D as sustained release matrix from aqueous suspension. The obtained data of the permeability studies of theophylline in different media are shown in Figure 4 and table 3. As it can be seen, the permeability of the drug through the different free films increased with an increase of the ratio of the dextran acetate DS.1 in the film. In addition, these films showed a high permeability in SCF medium for all of the formulations compared to the results obtained from films constituted only of Eudragit® RS 30D.

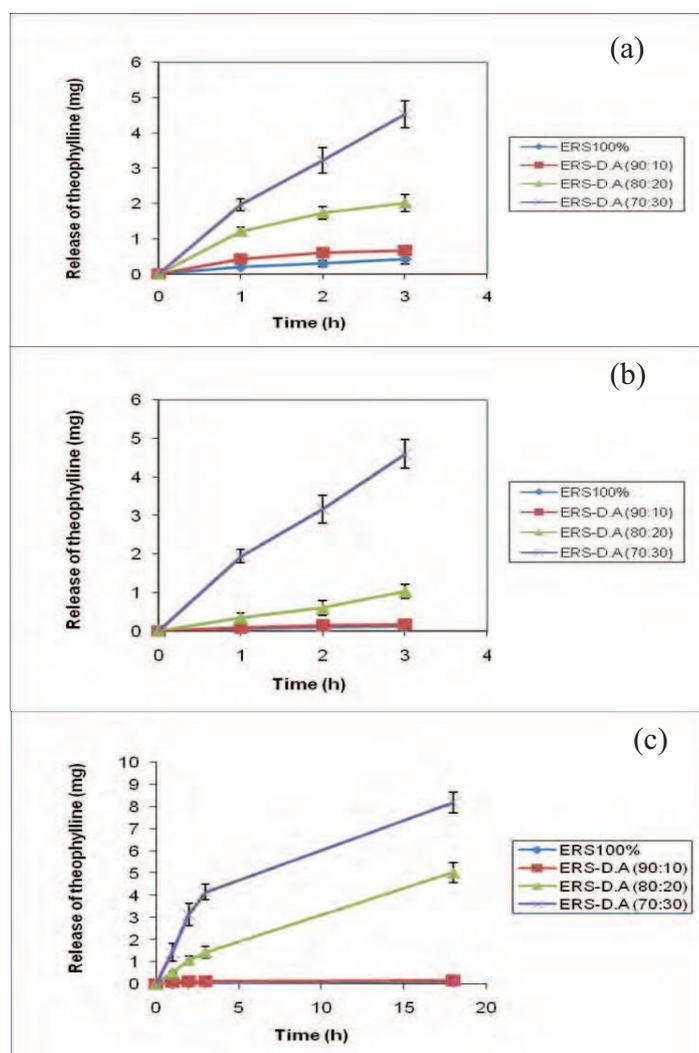


Figure 4. Permeability profiles of theophylline through free films constituted of Eudragit RS 30D - Dextran acetate (DS.1), (a) in SGF, (b) in SIF, and (c) in SCF. Error bars indicate S.D. (n = 3).

Table 3: Permeabilities of theophylline through different free films (date represent mean \pm S.D.; n =3)

Formulation	$P_{\text{Theo}} (\times 10^{-5} \text{ cm/s})$			
	LGS	LIS	LCS	LCS + Dextranase 0.5 U/ml
ERS 100%	1.266 \pm 0.145	0.3753 \pm 0.024	0.310 \pm 0.034	-
ERS: Dex.Acet (DS.1) (90:10)	1.990 \pm 0.045	0.510 \pm 0.270	0.552 \pm 0.047	0.546 \pm 0.046
ERS: Dex.Acet (DS.1) (80:20)	6.006 \pm 0.238	3.048 \pm 0.179	14.954 \pm 0.260	14.411 \pm 0.416
ERS: Dex.Acet (DS.1) (70:30)	13.442 \pm 0.378	13.656 \pm 0.401	24.320 \pm 0.332	21.566 \pm 0.406

Also, as shown in Figure 5, we found little difference for the permeability of theophylline in SCF in presence or in absence of dextranase. These results can be explained by two reasons. The first one could be attributed to the too low concentration of dextranase to observe a difference between the two experiments and the second one could be attributable to the difficulty of the dextranase to reach the dextran acetate due to the presence of the non degradable, non swollen and undissolved Eudragit® RS 30D.

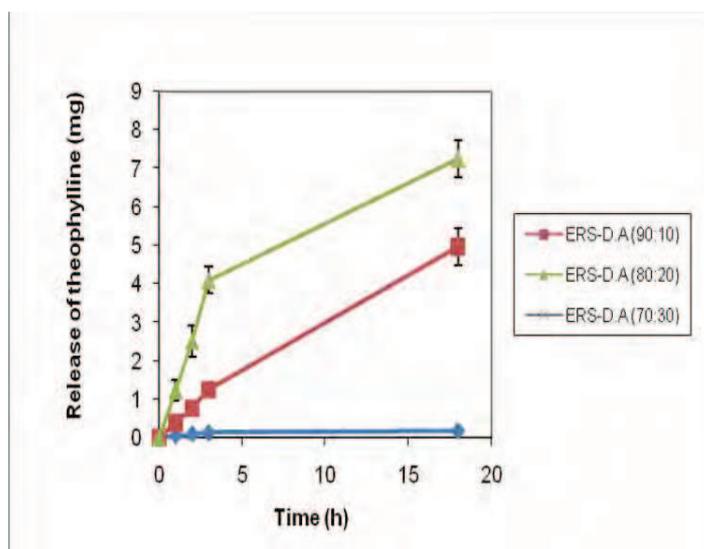


Figure 5. Permeability profiles of theophylline through free films constituted of Eudragit RS 30D - Dextran acetate (DS.1) in SCF with 0.5 U/ml of dextranase. Error bars indicate S.D. (n = 3).

The use, in the future, of polymers like cellulose derivatives which are able to swell instead of Eudragit RS 30D should allow the enzymes to degrade the dextran and then to increase the release of the drug. Formulations containing Eudragit® RS 30D and dextran acetate, showed a higher permeability in SGF than in SIF that may be explained by the difference between the solubility of theophylline in acidic and in neutral pH which is a little lower in the latter pH. Such results should lead also, in the future, in adding an external additional enteric coating to the dosage forms (powders, tablets, capsules) in order to avoid any premature release of drug into the stomach.

Conclusion

In his study, we showed that new modified polysaccharides consisting of esterified dextrans with acid anhydrides (acetic anhydride, propionic anhydride, butyric anhydride) with three degrees of substitution can be considered as promising carriers for site specific drug delivery to the colon.

The results of this study indicate that some dextran esters i.e. dextran acetate can be enzymatically degraded whereas others more highly substituted with longer lateral chains didn't show any enzymatic degradability. The degradable modified dextrans should be promising materials for coatings or as matrix system to formulate oral drug dosage forms (tablets, capsules, powders and mini granules) as carriers for site specific drug delivery to the colon.

Moreover, the combination of these dextran esters with polymethacrylate could be suitable to protect a drug

from higher regions of the gastro intestinal tract and to ensure drug release into the colon.

References

1. Lee V.H.L., Yang J.J. Oral Drug Delivery *in* Drug Delivery and Targeting, 2001; 145-183. A. M. Hillery, A. W. Lloyd, and J. Swarbrick (eds.). Taylor and Francis, London.
2. Rosen H., Abribat, T. The rise and rise of drug delivery. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 1-5.
3. Ibekwe V.C., Kendall R.A., Basit, A.W. Drug Delivery to the Colon. *Pharma Ventures Ltd* 2004; 27-30.
4. Basit A., Bloor J. Perspectives on Colonic Drug Delivery. *Business Briefing: Pharmat Ech* 2003; 185-190.
5. Patel M., Shah T., Amin A. Therapeutic opportunities in colon specific drug- delivery systems. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2007; 24: 147-202.
6. Sinha V.R., Kumria B. Polysaccharides in colon-specific drug delivery. *Int J Pharm* 2001; 224: 19–38.
7. Vandamme T.F., Lenoury A., Charrueau C., Chaumeil J.C. The use of polysaccharides to target drugs to the colon. *Carbohydr Polym* 2002; 48: 219-231.
8. Sinha V.R., Kumria R. Microbially triggered drug delivery to the colon. *Eur J Pharm Sci* 2003; 18: 3–18.
9. Simonsen L., Hovgaard L., Mortensen P.B., Brondsted H. Dextran hydrogels for colon-specific drug delivery. V. Degradation in human intestinal incubation models. *Eur J Pharm Sci* 1995; 3: 329-337.
10. Hirsch S., Binder V., Schehlmann V., Kolter K., Bauer K.H. Lauroyldextran and crosslinked galactomannan as coating materials for site-specific drug delivery to the colon. *Eur J Pharm Biopharm* 1999; 47: 61–71.
11. Jeong Y.I., Choi K.C., Song C.E. Doxorubicin Release from Core-Shell Type Nanoparticles of Poly(DL-lactide-co-glycolide)-Grafted Dextran. *Arch Pharm Res* 2006; 29: 712-719.
12. Sriamornsak S., Nunthanid J., Wanchana S., Luangtana-Ana M. Composite film-coated tablets intended for colon-specific delivery of 5-aminosalicylic acid using deesterified pectin. *Pharm Dev Technol* 2003; 8: 311-318.
13. Won C.Y., Chu C.C. Dextran-estrone conjugate: synthesis and in vitro release study. *Carbohydr Polym* 1998; 36: 327–334.
14. Sun G., Chu C.C. Synthesis, characterization of biodegradable dextran–allyl isocyanate–ethylamine/polyethylene glycol–diacrylate hydrogels and their in vitro release of albumin. *Carbohydr Polym* 2006; 65: 273–287.
15. Teramoto N., Shibata M. Synthesis and properties of pullulan acetate. Thermal properties, biodegradability, and a semi-clear gel formation in organic solvents. *Carbohydr Polym* 2006; 63: 476–481.
16. Franssen O., Vos O.P., Hennink W.E. Delayed release of a model protein from enzymatically-degrading dextran hydrogels. *J Control Rel* 1997; 44: 237-245.
17. Franssen O., Stenekes R., Hennink W. Controlled release of a model protein from enzymatically degrading dextran microspheres. *J Control Rel* 1999; 59: 219–228.
18. Akhgari A., Farahmand F., Afrasiabi Garekani H., Sadeghi F., Vandamme T.F. Permeability and swelling studies on free films containing inulin in combination with different polymethacrylates aimed for colonic drug delivery. *Eur J Pharm Sci* 2006; 28: 307–314.
19. Lin W.J., Lu C.H. Characterization and permeation of microporous poly(ϵ -caprolactone) films. *J Membrane Sci* 2002; 198: 109–118.
20. Fang J.M., Sun R.C., Tomkinson J., Fowler P. Acetylation of wheat straw hemicellulose B in a new non-aqueous swelling system. *Carbohydr Polym* 2000; 41: 379–387.
21. Ferreira L., Gil M.H., Dordick J.S. Enzymatic synthesis of dextran-containing hydrogels. *Biomaterials* 2002; 23: 3957–3967.
22. Liebert T., Hornig S., Hesse S., Heinze T. Nanoparticles on the Basis of Highly Functionalized Dextrans. *J Am Chem Soc* 2005; 127: 10484-10485.
23. Hornig S., Heinze T. Nanoscale structures of dextran esters. *Carbohydr Polym* 2007; 68: 280–286.
24. Sun X.F., Sun R.C., Zhao L., Sun J.X. Acetylation of sugarcane bagasse hemicelluloses under mild

- reaction conditions by using NBS as a catalyst. *J Appl Polym Sci* 2004; 92: 53–61.
25. Wang L.Q., Tu K., Li Y., Zhang J., Jiang L., Zhang Z. Synthesis and characterization of temperature responsive graft copolymers of dextran with poly(N-isopropylacrylamide). *React Funct Polym* 2002; 53: 19–27.
26. Chiu H.C., Wu A.T., Lin Y.F. Synthesis and characterization of acrylic acid-containing dextran hydrogels. *Polymer* 2001; 42: 1471–1479.
27. Mehvar R. Dextran for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents. *J Control Rel* 2000; 69: 1–25.
28. Park K., Shalaby W.S.W., Park H. Enzyme-catalyzed degradation *in* Biodegradable Hydrogels for Drug Delivery, 1993; 153-187. Park K., Shalaby W.S.W., Park H. (eds.). Technomic Publishing Company, Lancaster U.S.A.
29. Bauer K.H., Kesselhut J.F. Novel pharmaceutical excipients for colon targeting. *S.T.P. Pharma Sciences* 1995; 5: 54-59.

Mise au point de nouvelles formulations pharmaceutiques orales à délivrance ciblée de principes actifs au niveau du côlon

Résumé

Les travaux décrits dans ce mémoire sont consacrés à la synthèse, à la caractérisation physico-chimique et à la dégradation enzymatique de nouveaux excipients à base d'un polysaccharide d'origine naturelle, le dextran. Ces excipients peuvent servir d'enrobage ou d'agent matriciels pour la réalisation des formes pharmaceutiques orales à libération colique spécifique des principes actifs. A cette fin, deux stratégies principales de synthèses ont été réalisées sur le dextran pour le rendre hydrophobe.

La première est fondée sur l'esterification des fonctions hydroxyles du dextran pour préparer trois familles des esters de dextran (acétates, propionates ou butyrates) avec trois degrés de substitutions (1, 2 et 3). La seconde voie de synthèse permet d'obtenir trois familles de dextran copolymères à blocs (di, tri et tétra blocs copolymères) par polymérisation radicalaire en émulsion d'un ou plusieurs monomères acryliques sur le bloc du dextran.

Les résultats avantageux des études *in vitro* de la libération de théophylline à partir de comprimés enrobés individuellement avec différents types de dextran copolymères à blocs permettent de constater les potentielles utilisations de ces dextran copolymères à blocs pour délivrer des formes pharmaceutiques orales dans le côlon.

Mots Clés : polysaccharides, dextran, RMN, esterification, esters de dextran, polymérisation, copolymères à blocs, acrylates, dégradation enzymatique, *in vitro*, tube digestif, libération colique spécifique.

Development of new oral dosage forms for colon-specific drug delivery system

Abstract

The work described in this manuscript deals with the synthesis, the enzymatic degradation and the physical-chemistry characterization of new excipients based on a natural polysaccharide, dextran. These excipients can serve coating or agent matrix for the realization of oral pharmaceutical forms at colon-specific release of the active ingredients. To this end, two main strategies for syntheses were performed on dextran to make it hydrophobic.

The first is based on the esterification of hydroxyl groups of dextran to prepare three families of dextran esters (acetate, propionate and butyrate) with three Degree of substitution (1, 2 and 3). The second strategy allows to obtain three types of dextran block copolymers (di, tri and tetra-block copolymers) by free-radical emulsion polymerization of one or more acrylic monomers (MA, MMA and MAA) on the block of dextran.

The beneficial results of *in vitro* release of theophyllin from tablets coated individually with different types of dextran block copolymers were allowed to determine the potential uses of dextran block copolymers to deliver oral dosage forms in the colon.

Keywords: polysaccharides, dextran, NMR, esterification, dextran esters, polymerization, block copolymer, acrylic, enzymatic degradation, *in vitro*, digestive tract, colon-specific release.

Discipline

Pharmacochimie

Intitulé et adresse du laboratoire :

Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives (UMR 7199), Faculté de Pharmacie, 74 Route de Rhain, 67400 Illkirch Cedex.



**Mise au point de nouvelles formulations
pharmaceutiques orales à délivrance ciblée
de principes actifs au niveau du côlon**



**Thèse de doctorant présentée par
Mustafa BEESH**



Mardi 29 Juin 2010

Directeur de thèse: Pr. Thierry F. VANDAMME

UMR 7199

Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives

- 1. Introduction générale**
- 2. Synthèse et caractérisation des différents esters de dextran**
- 3. Synthèse et caractérisation des différents copolymères à blocs à base de dextran**
- 4. Etude de la libération *in vitro* d'un principe actif (Théophylline) à partir de comprimés enrobés**
- 5. Conclusion générale et perspectives**



Pourquoi la voie orale?

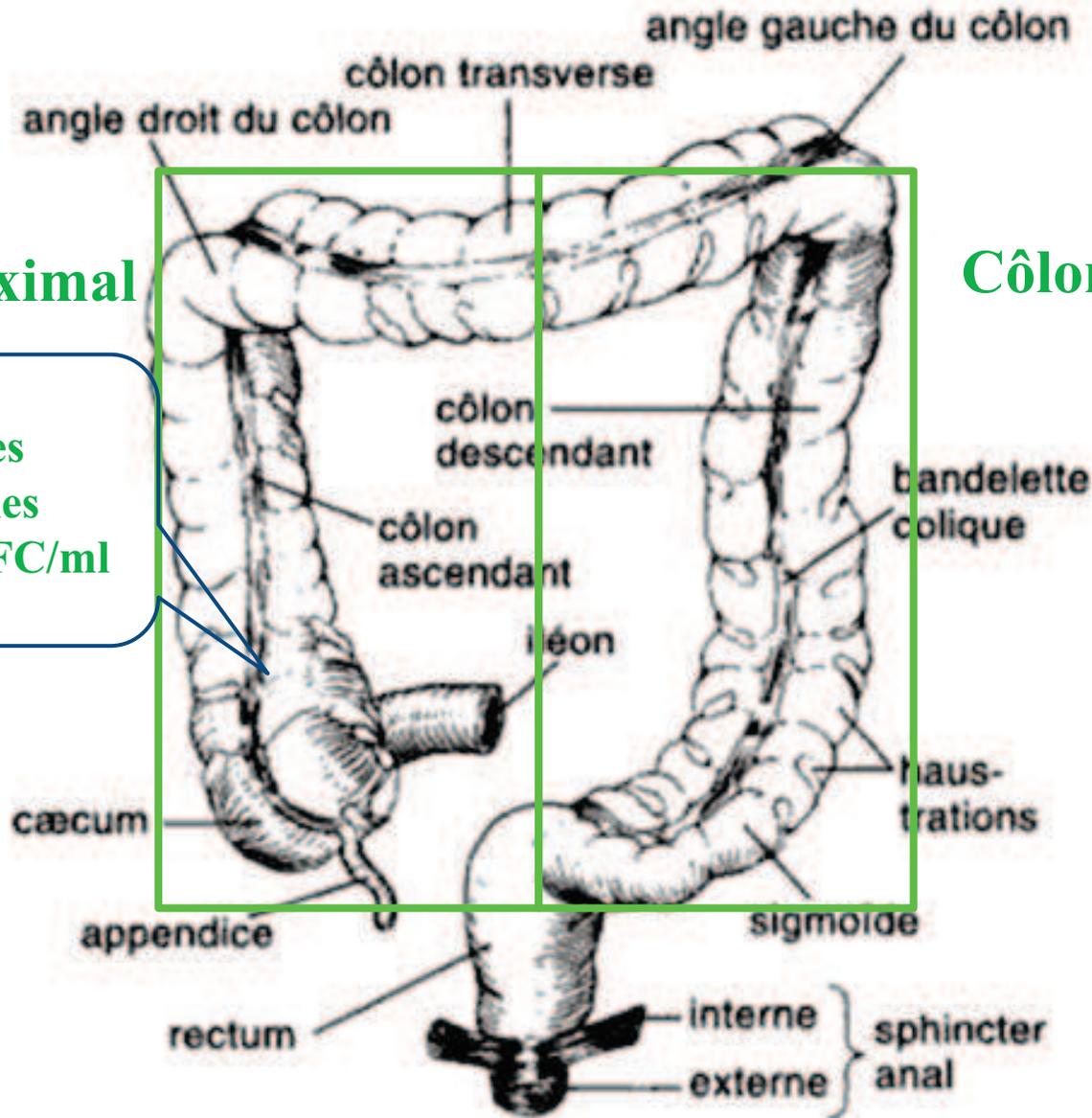
Pourquoi une libération ciblée?

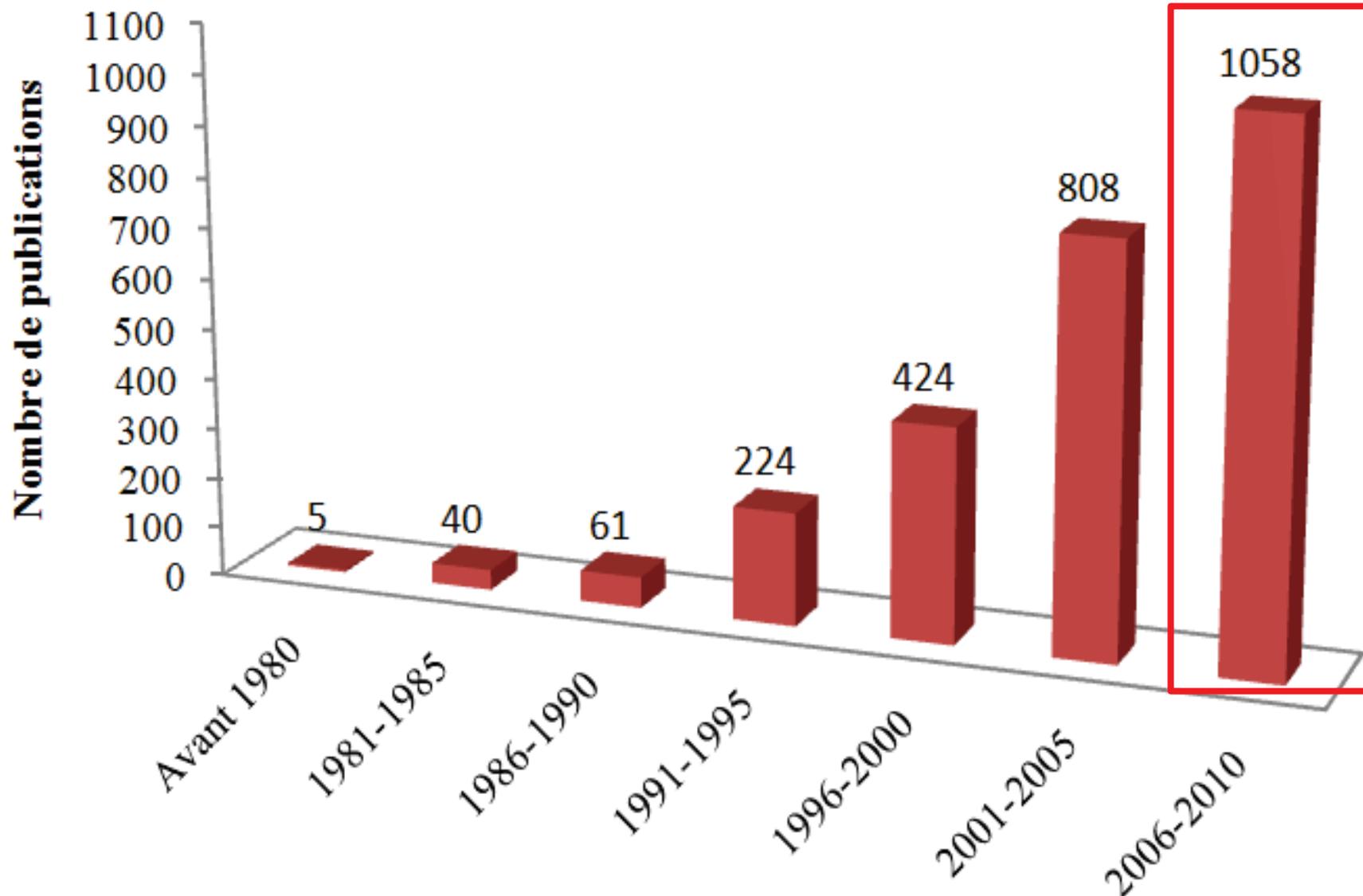
Pourquoi le côlon?

Côlon proximal

Côlon distal

Bactéries
anaérobies
 10^{11} - 10^{12} UFC/ml





* Scopus Web

Systèmes de la délivrance ciblée du principe actif (PA) au niveau du côlon sont reconnus pour:

1. Traitement local des pathologies du côlon

(Maladie de crohn, colites ulcéreuses , cancer colorectal , etc.)

2. Utilisation du côlon comme un site d'absorption;

a. Chronothérapie pour les affections telles que

l'asthme, l'hypertension, l'arthrite, l'arythmie cardiaque ou l'inflammation

b. Substances actives instables dans la première partie du tube digestif comme les protéines ou les peptides (ex. analgésique, contraceptifs, insuline, etc.)

c. Amélioration de la biodisponibilité de certains principes actifs mal absorbés dans l'estomac ou l'intestin grêle (ex. les vaccins)

Délivrance ciblée d'un PA au niveau du côlon

Avantages:

1. Réduire les effets secondaires
2. Diminuer la dose administrée du principe actif
3. Peu/pas d'enzymes digestives
4. Importance du temps de résidence du PA

Inconvénients

1. Surface d'absorption moins importante que celle de l'intestin grêle
2. Viscosité des contenus qui signifie la diminution des liquides
3. Microbiote colique peut influencer sur la stabilité du principe actif par dégradation métabolique

Forme orale à
libération colique

Enzymes GI

Pepsine

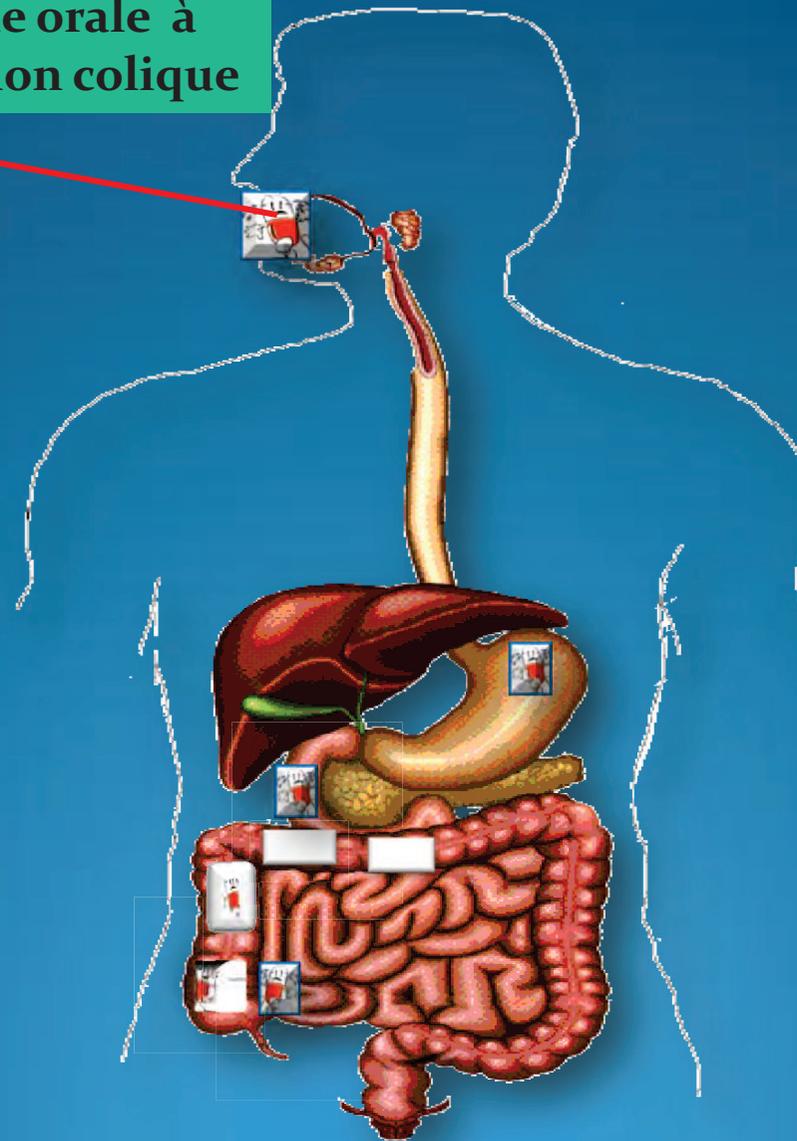
Amylase

Trypsine

Maltase

Aminopeptidases

Dipeptidase

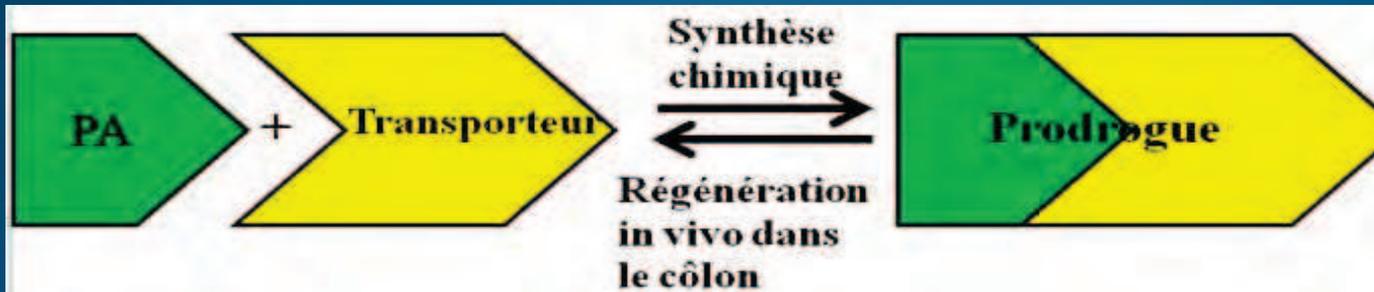


- Durée du transit
5-7 h
- pH (1,2 - 7,5)
- Longueur (6-7 m)

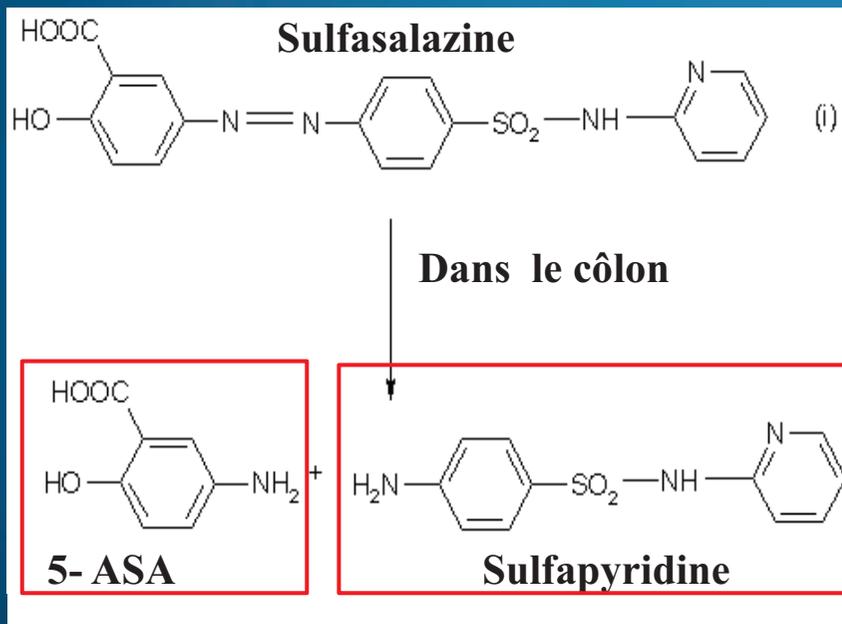
Voies utilisées pour délivrer les médicaments dans le côlon:

1. Voie rectale: les suppositoires, les mousses ou les lavements
2. Voie orale : différentes approches :
 - a. Modification chimique de principes actifs: prodrogues,
 - b. Modification galénique des formes pharmaceutiques; différents systèmes:
 - i. Variations de pH du TGI,
 - ii. Durées du transit,
 - iii. Activité microbienne du côlon,

a) Prodrogues:



Enzymes colique: Azoréductases, nitroréductase, glycosidase, dextranase, estérase, etc.

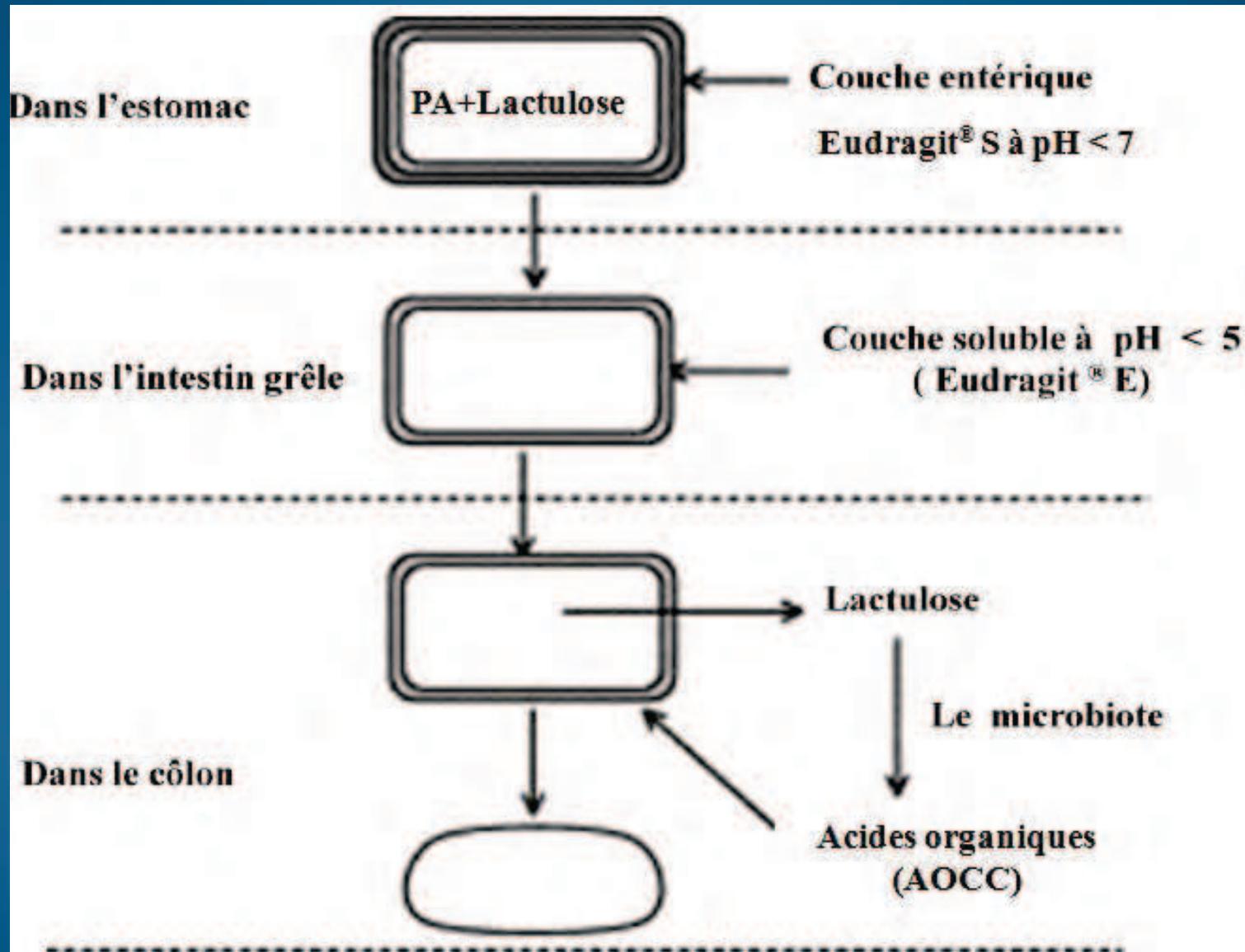
Transporteurs:

- Azoïque
- Acide aminé
- Saccharide
- Polymère
- Dextran
- Cyclodextrine

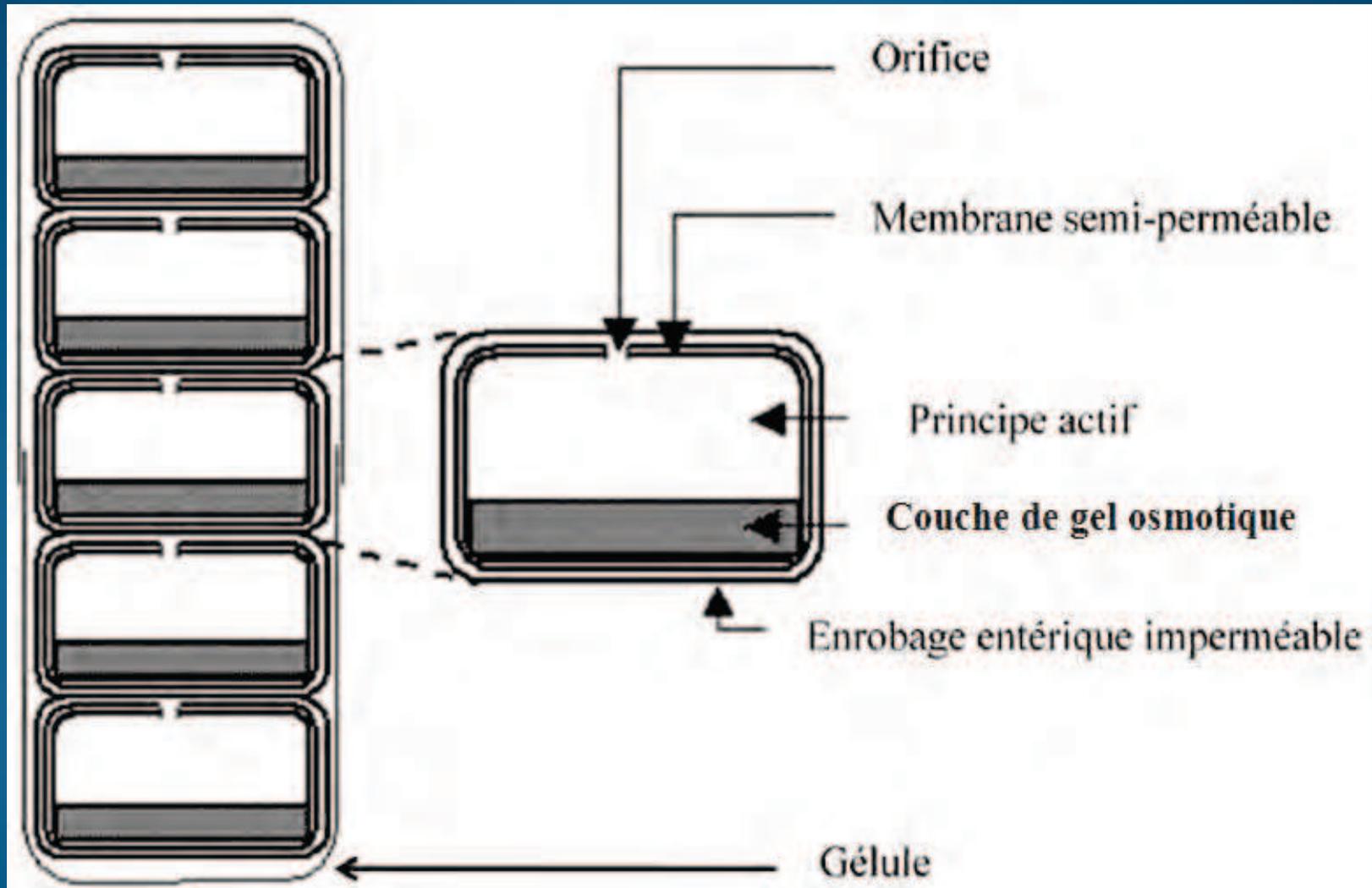
b) Modification galénique des formes pharmaceutiques

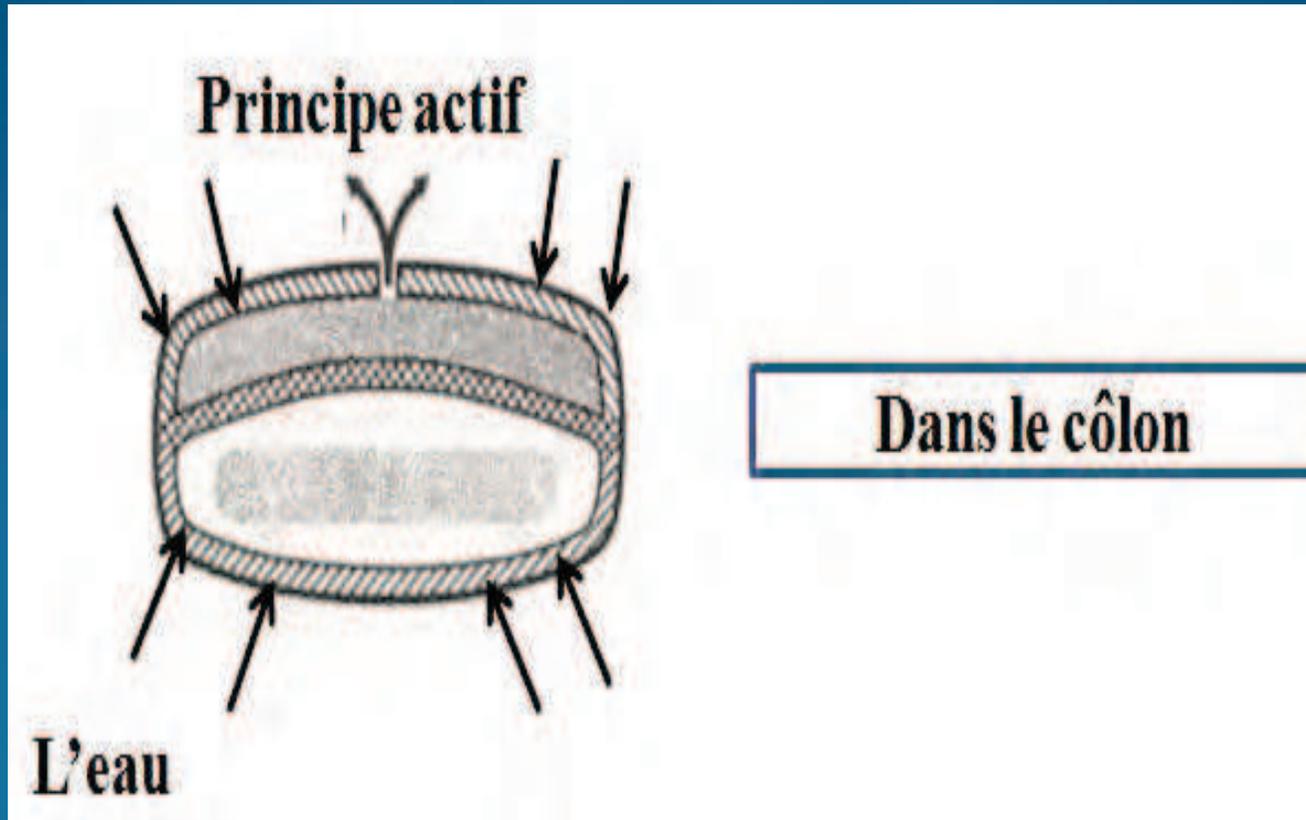
Systemes	Exemple	Inconvénients
Polymères solubles pH-dépendants	Eudragit [®] L (pH= 6) Eudragit [®] S (pH= 7) Eudragit [®] FS (pH= 7) HPMCP (pH= 4,5)	- pH à l'extrémité finale de l'intestin grêle et du côlon est similaire, - Inter/ intra-variations de pH au sein du TGI,
Polymère pH- indépendant (dépendance du temps)	Eudragit [®] RL Eudragit [®] NE Eudragit [®] RS	- Durée du séjour gastrique est très variable et influencée par différents paramètres, - Transit dans le côlon est plus rapide en cas de maladie comparé à un état sain,
Polymères dégradables dans le microbiote colique	Amylose Chitosan Dextran Pectine	- Jeûne et les maladies peuvent influencer la composition du microbiote colique, - Enzymes de dégradation peuvent être en concentrations plus faibles, - Effet préjudiciable des bactéries sur certains médicaments,

System s CODES™



Systeme OROS-CT





Inconvénients de ces systèmes :

- Complexes, onéreux et peu fiables,
- Difficulté de reproductibilité de l'application de plusieurs polymères sur une forme pharmaceutique,
- absence de garantie quant à la dissolution du dernier polymère d'enrobage quel que soit le pH du côlon,

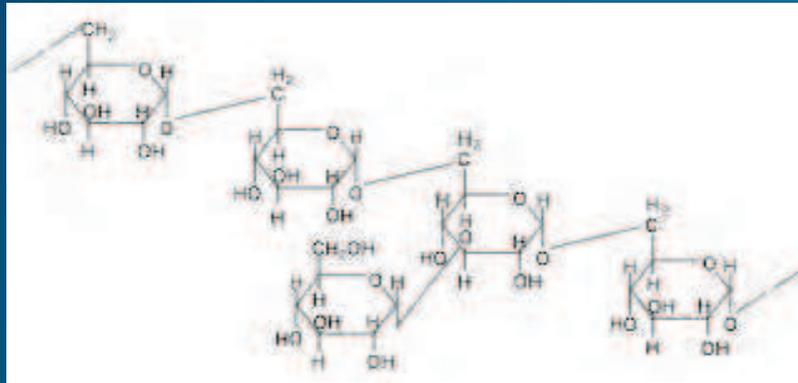


Concorde; 20 Exemplaires



Boeing 747 ; 1300 Exemplaires

Objectifs et stratégie



Dextran

Objectifs et stratégie

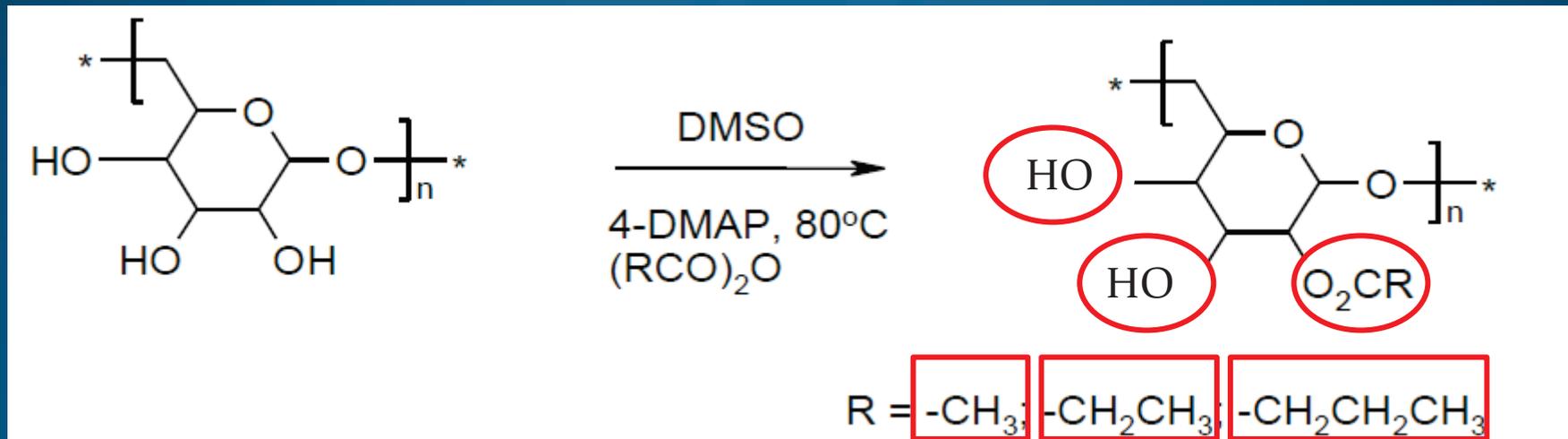
Deux approches ont été envisagées:

1^{ère}. modifier chimiquement le dextran par estérification
(acétate, propionate ou butyrate)

2^{ème}. synthétiser un copolymère à blocs à base de dextran à
savoir un polymère constitué d'un bloc « dextran » et
d'un second bloc « polyacryliques »



2^{ème}. Synthèse et caractérisation de trois familles d'esters de dextran



1^{ère} . Acétate de dextran (DexAct)

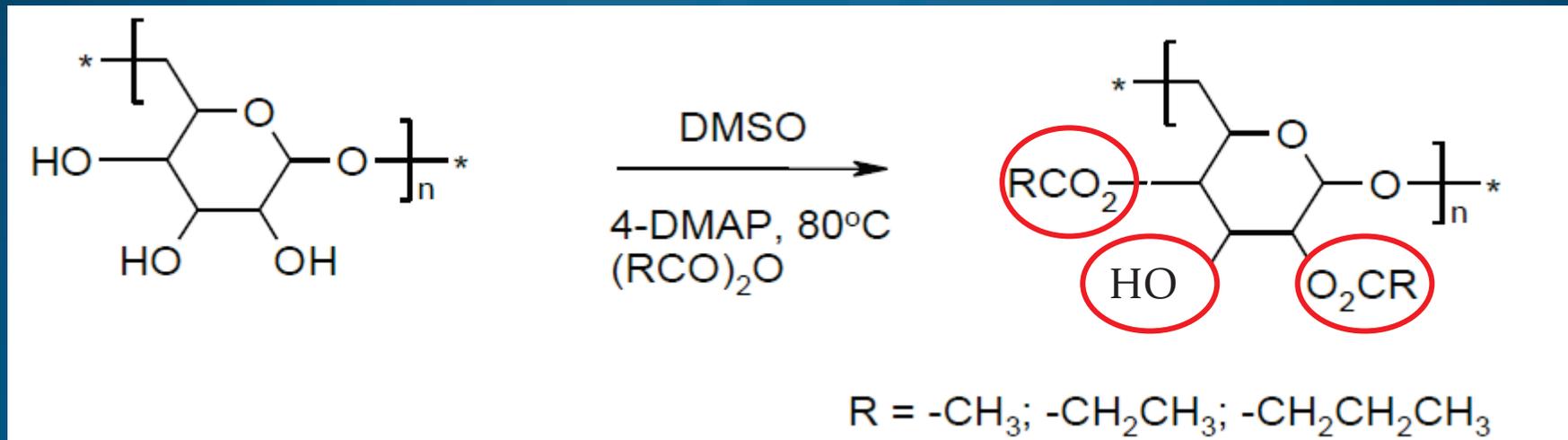
2^{ème} . Propionate de dextran (DexPro)

3^{ème} . Butyrate de dextran (DexBut)

Degré de substitution

(DS) = $\boxed{1}$

Synthèse et caractérisation de trois familles d'esters de dextran



1^{ère} . Acétate de dextran (DexAct)

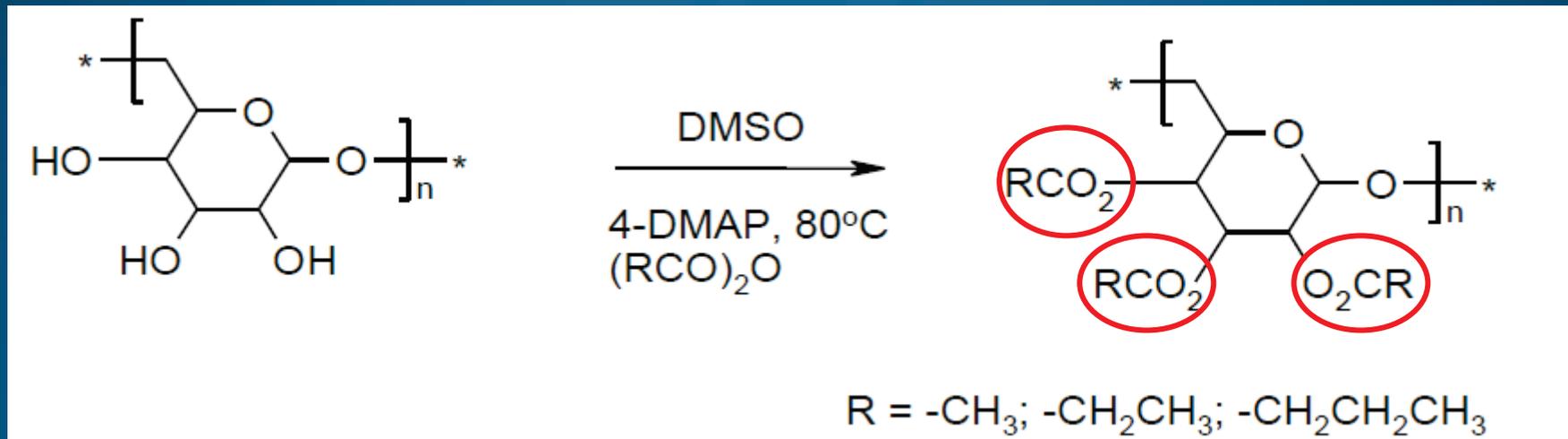
2^{ème} . Propionate de dextran (DexPro)

3^{ème} . Butyrate de dextran (DexBut)

Degré de substitution

(DS) = 1; 2

Synthèse et caractérisation de trois familles d'esters de dextran



1^{ère} . Acétate de dextran (DexAct)

2^{ème} . Propionate de dextran (DexPro)

3^{ème} . Butyrate de dextran (DexBut)

Degré de substitution

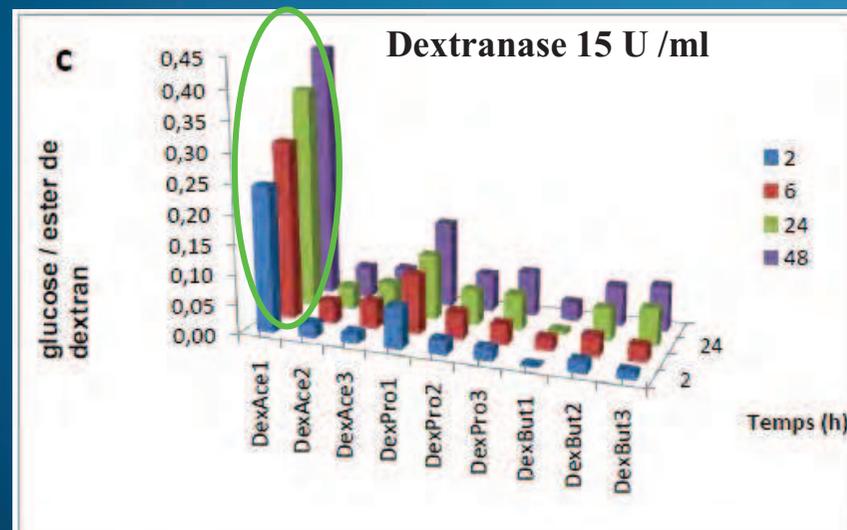
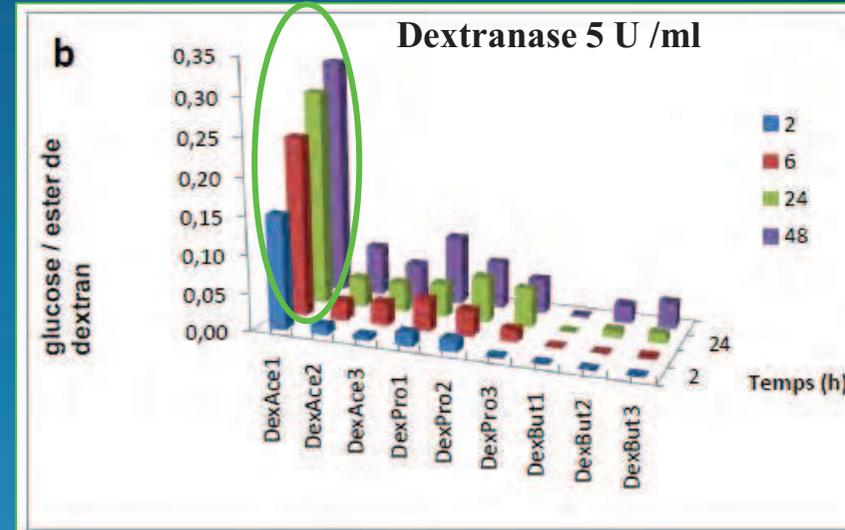
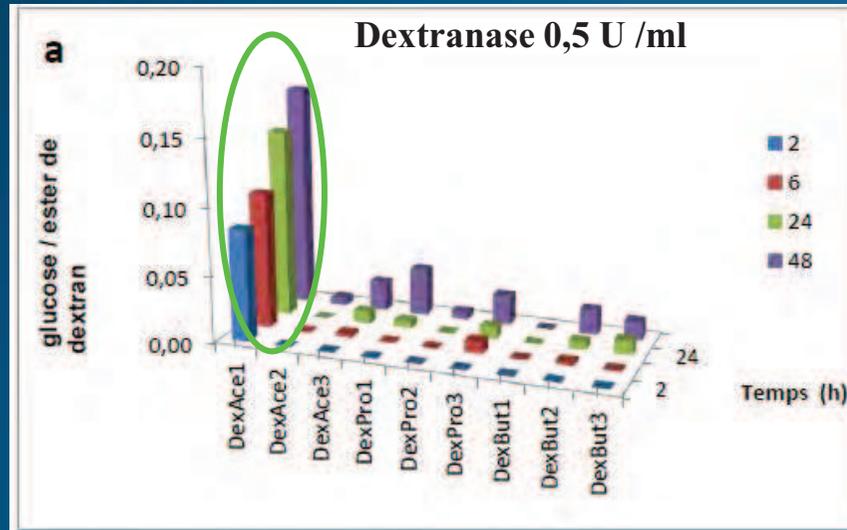
(DS) = 1; 2 et **3**

La solubilité des différents esters de dextran

Esters de dextran	Eau	Chloroforme	THF	AcOEt	Acétone	Isopropanol
Butyrates de dextran DS= 3	I	S	S	S	S	PS
Butyrates de dextran DS= 2	I	S	S	S	S	S
Butyrates de dextran DS= 1	I	I	S	I	I	I
Propionates de dextran DS= 3	I	S	S	S	S	I
Propionates de dextran DS= 2	I	S	S	S	S	S
Propionates de dextran DS= 1	PS	S	S	I	I	I
Acétates de dextran DS= 3	I	PS	PS	I	I	I
Acétates de dextran DS= 2	I	PS	I	I	I	I
Acétates de dextran DS= 1	S	I	I	I	I	I

I= insoluble ; S= soluble; PS= partiellement soluble

Etude de la dégradation enzymatique *in vitro*



DS ++ } Dégradation --
Chaine greffée ++ }

1. Cristallinité et l'abondance des substituants .
2. Dégradation enzymatique réclame 4 unités successives de glucose.

3^{ème}. Synthèse et caractérisation des di, tri et tétra blocs polymères à base de dextran

Trois types de monomères acryliques ont été mis en œuvre :

1- Acrylate de méthyle (MA)

2- Méthacrylate de méthyle (MMA)

3- Acide méthacrylique (MAA)

Copolymère diblocs

Dextran

PMA

Copolymère triblocs

Dextran

PMA

PMAA

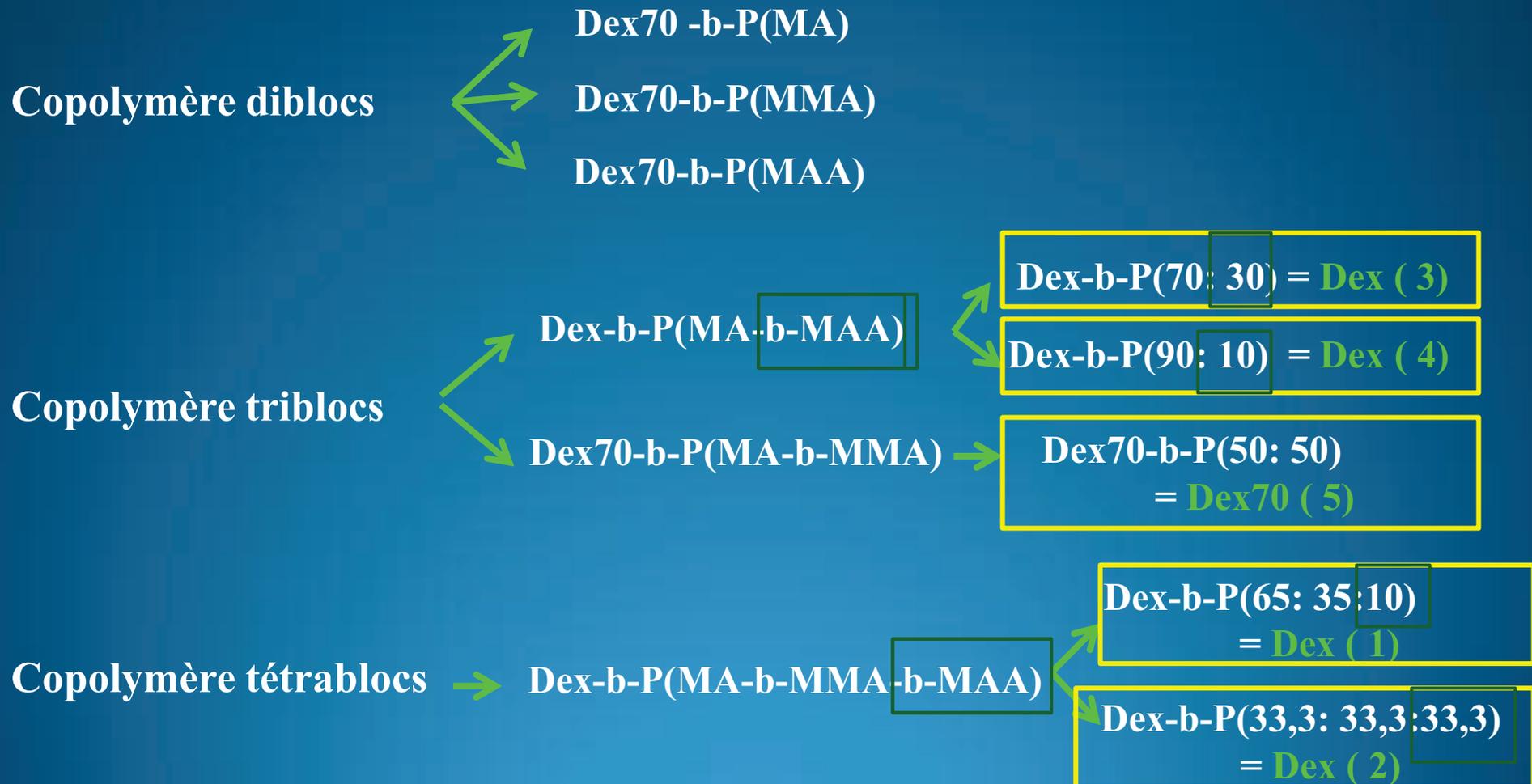
Copolymère tétrablocs

Dextran

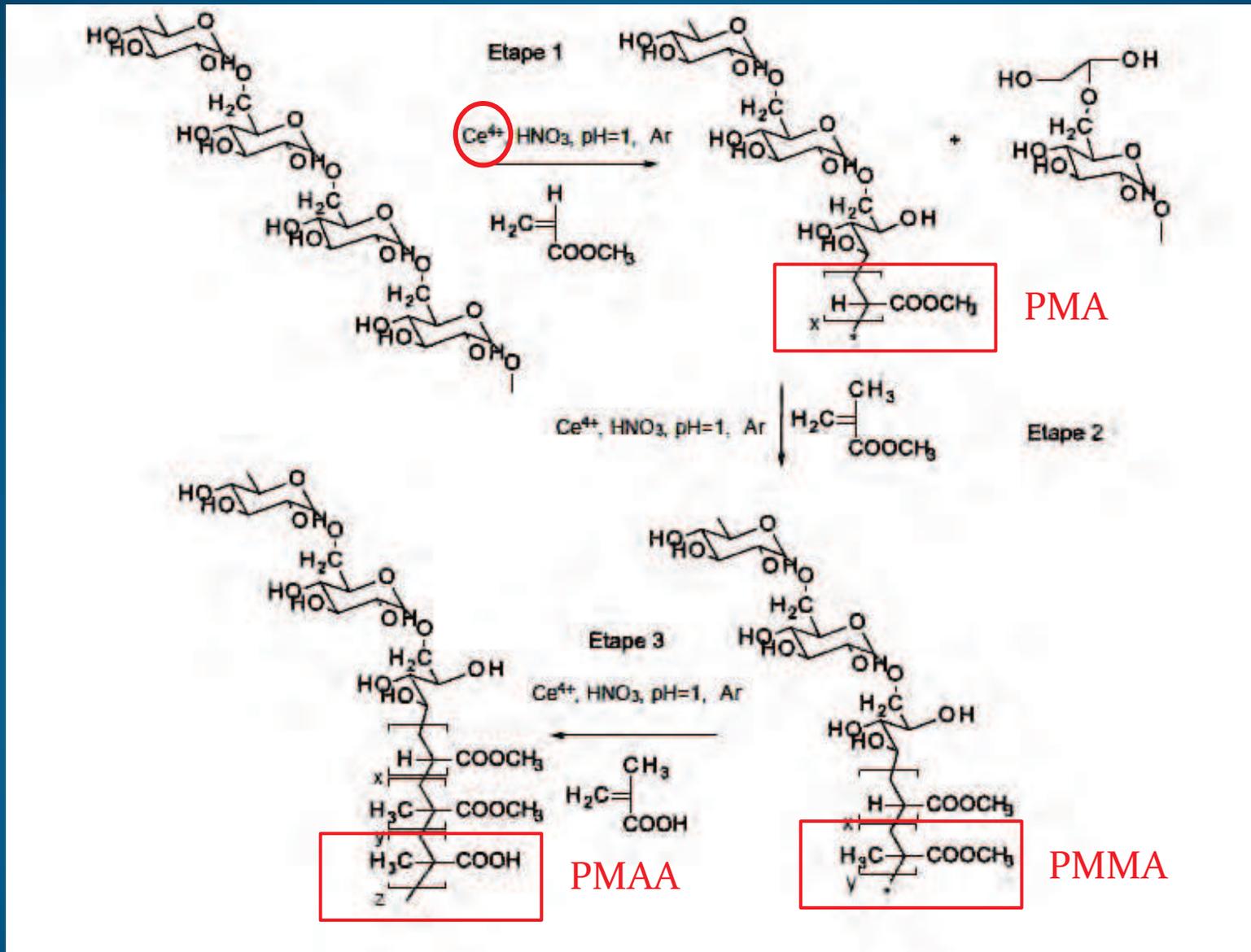
PMA

PMMA

PMAA



4 types de dextrans (70; 45; 10 et 1,5 kDa) ont été mis en œuvre pour préparer les **Dex(1); Dex(2); Dex(3) et Dex(4)**



Paramètres caractéristiques des copolymères à blocs:

1. Efficacité de greffage GE%:

$$GE\% = \frac{\text{Copolymère à blocs purs (g)}}{\text{Copolymère à blocs bruts (g)}} \times 100$$

2. Taux de greffage G%:

$$G\% = \frac{\text{Copolymères à blocs acryliques (g)}}{\text{Bloc de dextran (g)}} \times 100$$

3. Conversion totale TC%:

$$TC\% = \frac{\text{Copolymères à blocs acryliques (g)}}{\text{Monomères initiaux (g)}} \times 100$$

4. Taux des homopolymères
libres FP%:

$$FP\% = \frac{\text{Homopolymères acryliques (g)}}{\text{Copolymères à blocs bruts (g)}} \times 100$$

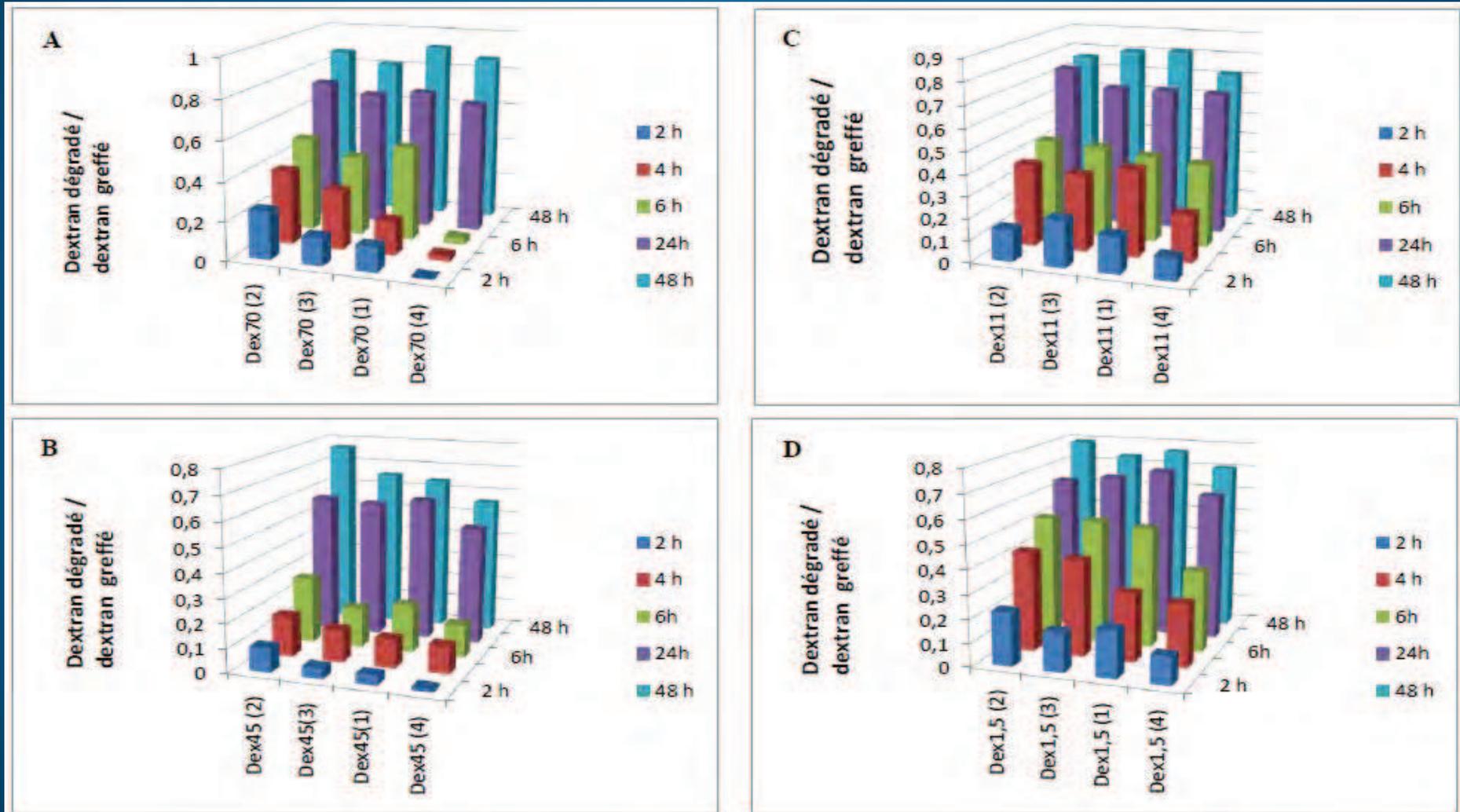
5. Taux de dextran libre FD%:

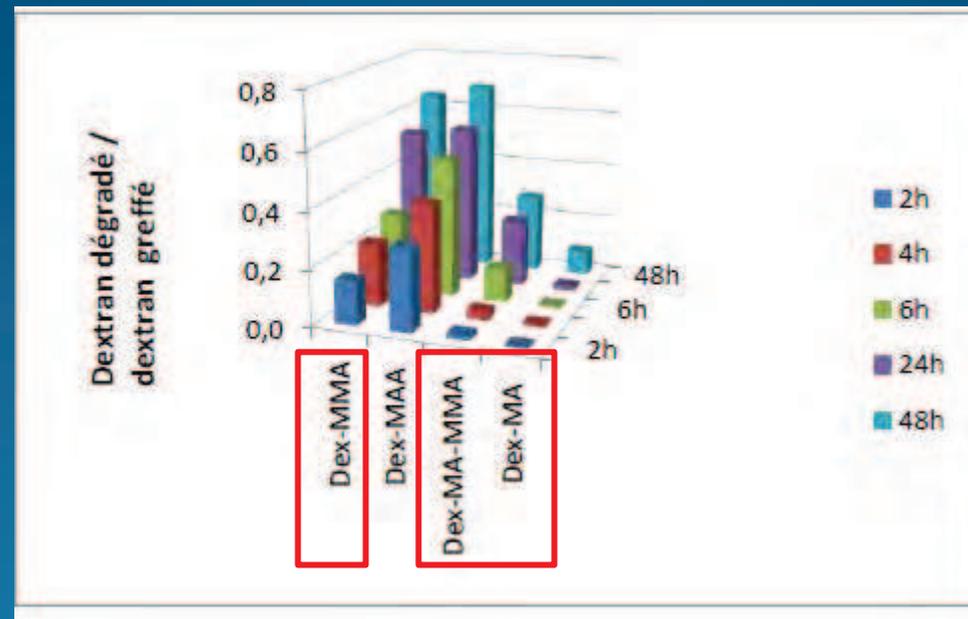
$$FD\% = \frac{\text{Dextran libre (g)}}{\text{Copolymères à blocs bruts (g)}} \times 100$$

6. Rapport entre les différents blocs dans chaque copolymère à blocs (à partir des spectres RMN ^1H)

Copolymères à blocs à base de dextrans	GE%	G%	TC%	FP%	FD%	Rapport entre les blocs polyacryliques (RMN ¹ H)	Rapport du Dextran : blocs polyacryliques
Dex70-b-PMA	69	1333	54	15	17	-	(17: 83)
Dex70-b-PMMA	50	322	28	26	15	-	(21: 79)
Dex70-b-PMAA	31	106	17	29	23	-	(30: 70)
Dex70-b-P(MA-b-MMA) (50 :50)	75	674	74	13	12	(59 : 41)	(15 :50 :35)
Dex70-b-P(MA-b-MMA-b-MAA (65 :25 :10)	70	1255	70	13	14	(70: 23: 6)	(12: 62: 20: 6)
Dex70-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (1 :1 :1)	73	950	58	14	12	(48: 28: 24)	(9: 43: 26: 22)
Dex70-b-P(MA-b-MAA) (70 :30)	77	936	66	12	11	(83: 17)	(8: 77: 15)
Dex70-b-P(M-b-MAA) (90 :10)	69	1125	77	19	12	(94: 6)	(9: 86: 5)
Dex45-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (65 :25 :10)	69	1031	74	18	13	(71: 22: 6)	(11: 63: 21: 5)
Dex45-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (1 :1 :1)	76	957	59	14	10	(47: 29: 24)	(9: 42: 27: 22)
Dex45-b-P(MA-b-MAA) (70 :30)	71	826	62	16	13	(81: 19)	(10: 74: 16)
Dex45-b-P(MA-b-MAA) (90 :10)	71	1133	60	17	12	(94: 6)	(9: 86: 5)
Dex10-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (65 :25 :10)	68	1008	76	19	13	(70: 23: 7)	(7: 65: 21: 7)
Dex10-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (1 :1 :1)	66	957	66	20	14	(47 :34 :19)	(12 :41 :30 :16)
Dex10-b-P(MA-b-MAA) (70 :30)	71	929	77	15	14	(86: 14)	(10: 77: 13)
Dex10-b-P(MA-b-MAA) (90 :10)	70	914	82	18	12	(94: 6)	(10: 86: 4)
Dex1.5-b-P(MA-b-MMA-b-MAA)(65 :25 :10)	87 ⁽¹⁾	1088	71	- ⁽²⁾	13	(72: 23: 5)	(12: 63: 20: 5)
Dex1.5-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (1 :1 :1)	86 ⁽¹⁾	957	62	- ⁽²⁾	14	(46: 29: 26)	(9: 41: 27: 23)
Dex1.5-b-P(MA-b-MAA) (70 :30)	67 ⁽¹⁾	950	70	- ⁽²⁾	13	(84: 16)	(8: 78: 14)
Dex1.5-b-P(MA-b-MAA) (90 :10)	87 ⁽¹⁾	1008	72	- ⁽²⁾	13	(94: 6)	(9: 86: 5)

Etude *in vitro* de la dégradation enzymatique des copolymères à blocs:



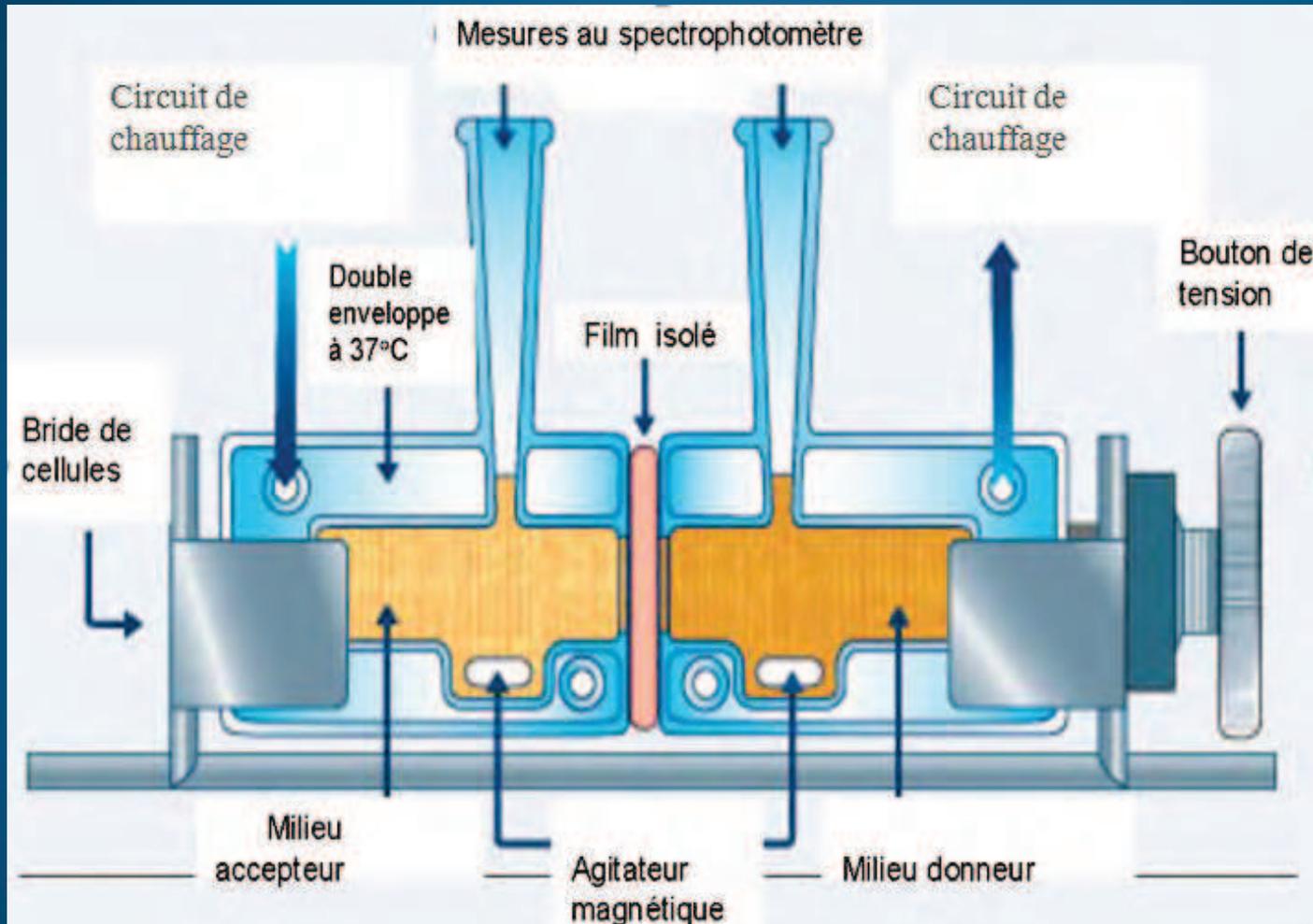


1. Le taux du bloc PMAA dans le copolymère à blocs:
PMAA% ++ \longrightarrow Dégradation enzymatique ++

2. Le taux de greffage G%

G% ++ \longrightarrow Dégradation enzymatique --

Etude de la perméabilité de films isolés à la théophylline



- LGS: pH= 1,2;
3 heures
- LIS: pH= 6,8;
3 heures
- LCS: pH = 7,2;
18 heures

Cellules de diffusion (Grown Glass Co.)

Copolymères à blocs	Perméabilité P x 10 ⁻⁵ (cm/s)			
	LGS	LIS	LCS	
Dex70-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (70 :23 :6)	0,493 ± 0,032	2,436 ± 0,168	5,599 ± 0,232	Dex 70 (1)
Dex70-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (48 :28 :24)	1,469 ± 0,045	2,292 ± 0,103	6,615 ± 0,142	Dex 70 (2)
Dex70-b-P(MA-b-MAA) (83 :17)	1,055 ± 0,211	Film cassé	-	Dex 70 (3)
Dex70-b-P(MA-b-MAA) (94 :6)	0,425 ± 0,022	3,531 ± 0,108	4,523 ± 0,187	Dex 70 (4)
Dex45-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (71 :22 :6)	0,205 ± 0,095	1,148 ± 0,135	1,436 ± 0,108	Dex 45 (1)
Dex45-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (47 :29 :24)	1,821 ± 0,114	5,652 ± 0,162	Film cassé	Dex 45 (2)
Dex45-b-P(MA-b-MAA) (81 :19)	2,235 ± 0,204	Film cassé	-	Dex 45 (3)
Dex45-b-P(MA-b-MAA) (94 :6)	3,94 ± 0,161	21,49 ± 0,355	24,49 ± 0,381	Dex 45 (4)
Dex10-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (70 :23 :7)	0,037 ± 0,033	0,071 ± 0,115	0,094 ± 0,213	Dex 10 (1)
Dex10-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (47 :34 :19)	1,021 ± 0,099	5,98 ± 0,201	Film cassé	Dex 10 (2)
Dex ₁₀ -b-P(MA-b-MAA) (86 :14)	2,872 ± 0,258	Film cassé	-	Dex 10 (3)
Dex ₁₀ -b-P(MA-b-MAA) (94 :6)	0,212 ± 0,019	1,312 ± 0,155	3,672 ± 0,174	Dex 10 (4)
Dex1,5-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (72 :23 :5)	0,508 ± 0,032	1,303 ± 0,101	8,129 ± 0,189	Dex 1,5 (1)
Dex1,5-b-P(MA-b-MMA-b-MAA) (46 :29 :26)	0,899 ± 0,045	Film cassé	-	Dex 1,5 (2)
Dex1,5-b-P(MA-b-MAA) (84 :16)	1,893 ± 0,199	Film cassé	-	Dex 1,5 (3)
Dex1,5-b-P(MA-b-MAA) (94 :6)	0,134 ± 0,022	0,147 ± 0,068	1,567 ± 0,101	Dex 1,5 (4)
Dex70-b-P(MA-b-MMA) (59 :41)	0,051 ± 0,014	0,055 ± 0,011	0,057 ± 0,013	Dex 70 (5)

4^{ème} . Préparation de comprimés enrobés:

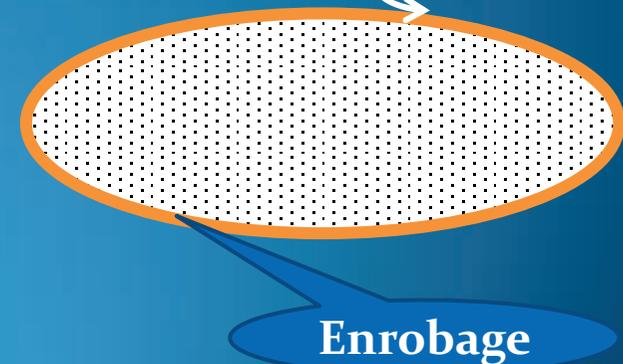
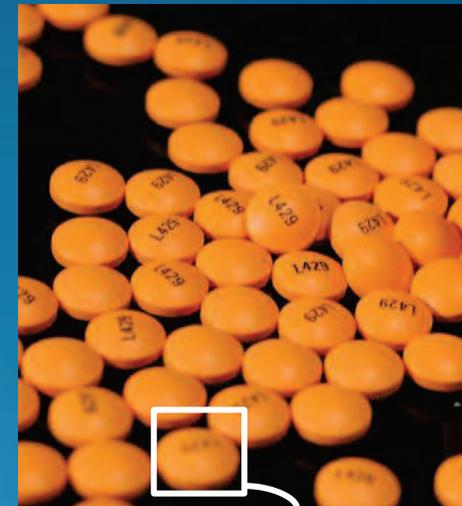


Comprimés de théophylline nus



Ventilus 1/ 1,5 (INNOJET®)

Comprimés enrobés



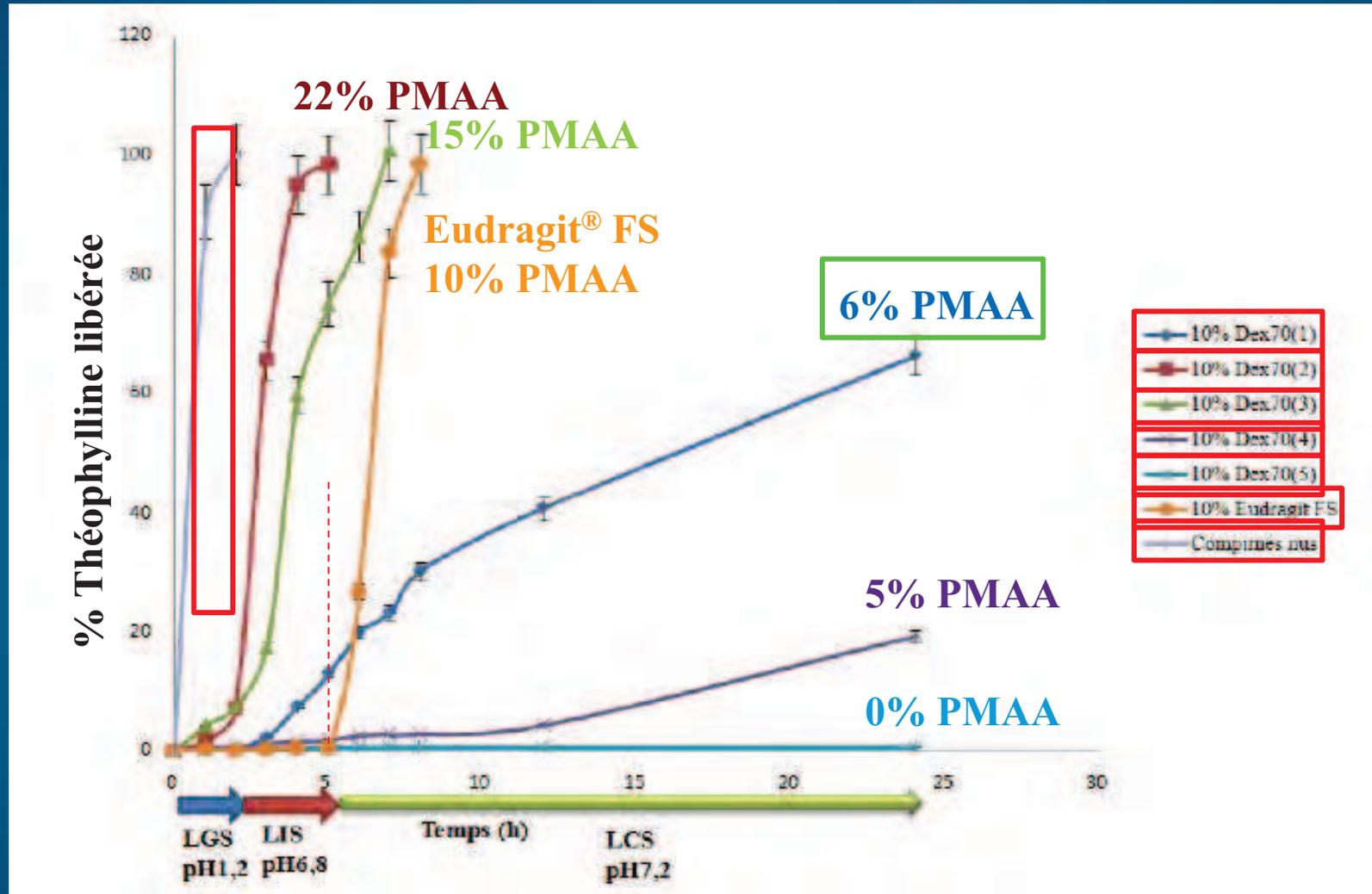
Enrobage

Etude de la libération *in vitro* de la théophylline à partir de comprimés enrobés

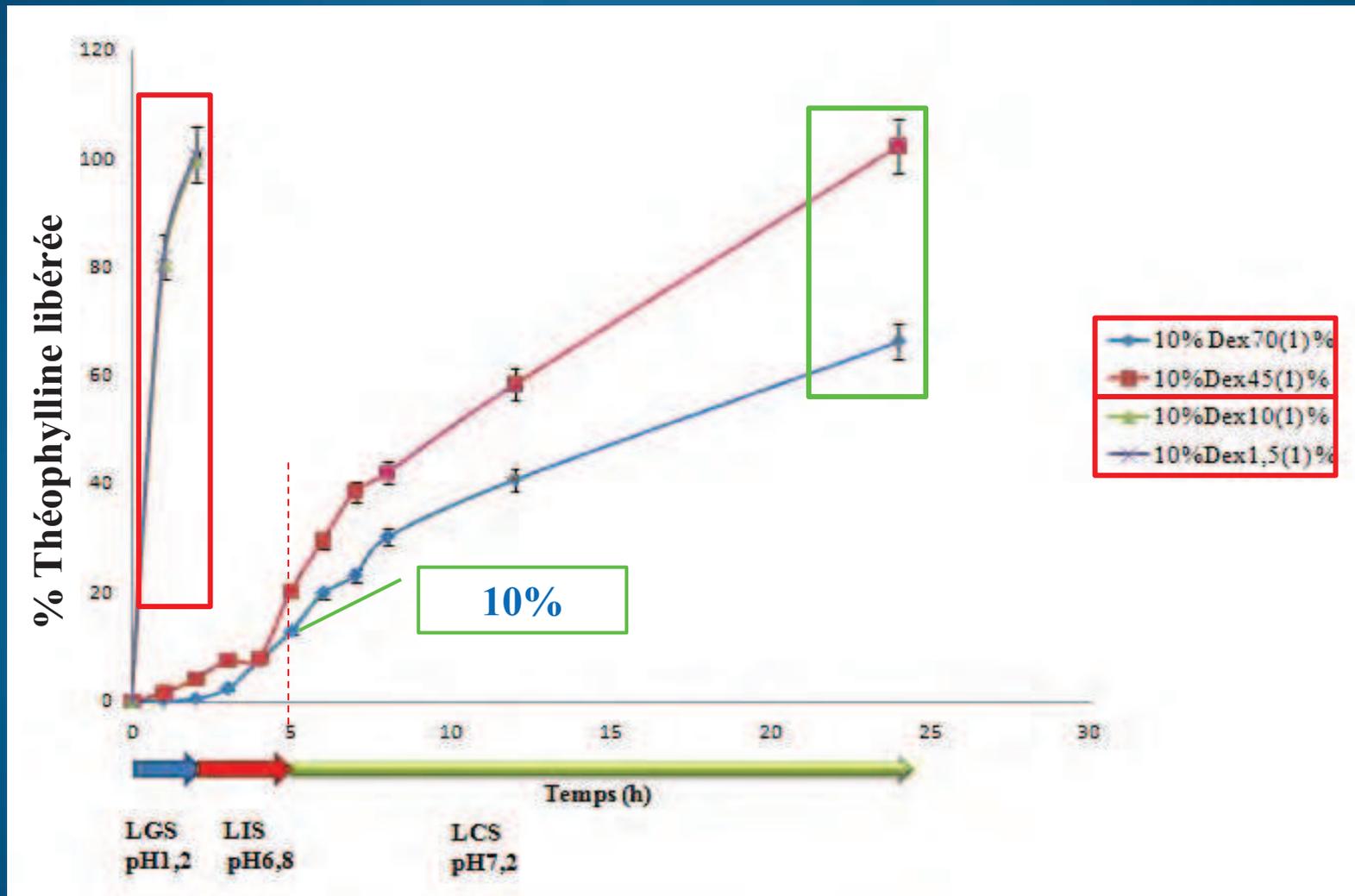


BIO-DIS, RRT9 (Celeva Ltd.)

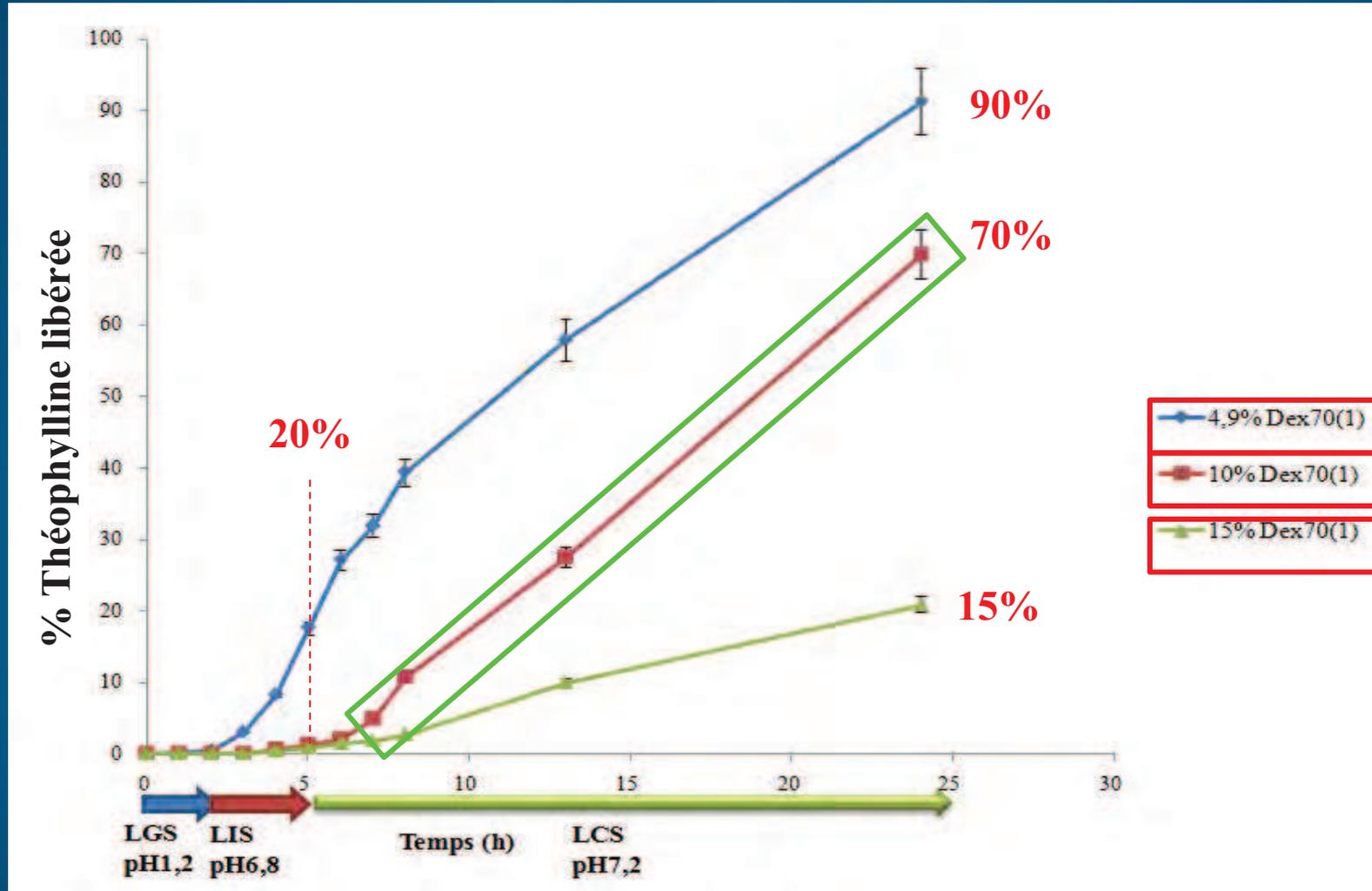
1. Influence de la composition des blocs polyacryliques?



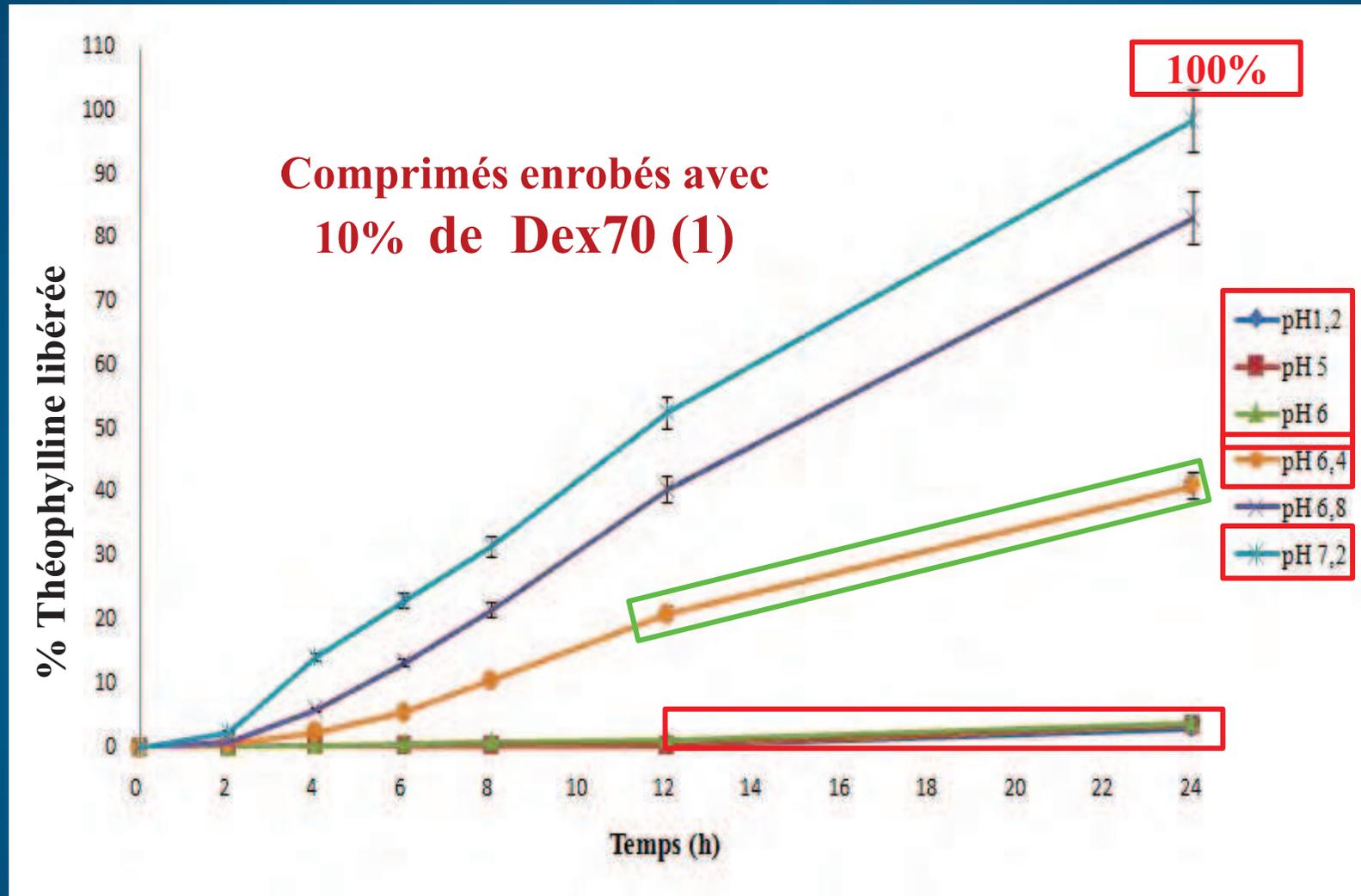
2. Influence du poids moléculaire du bloc de dextran?



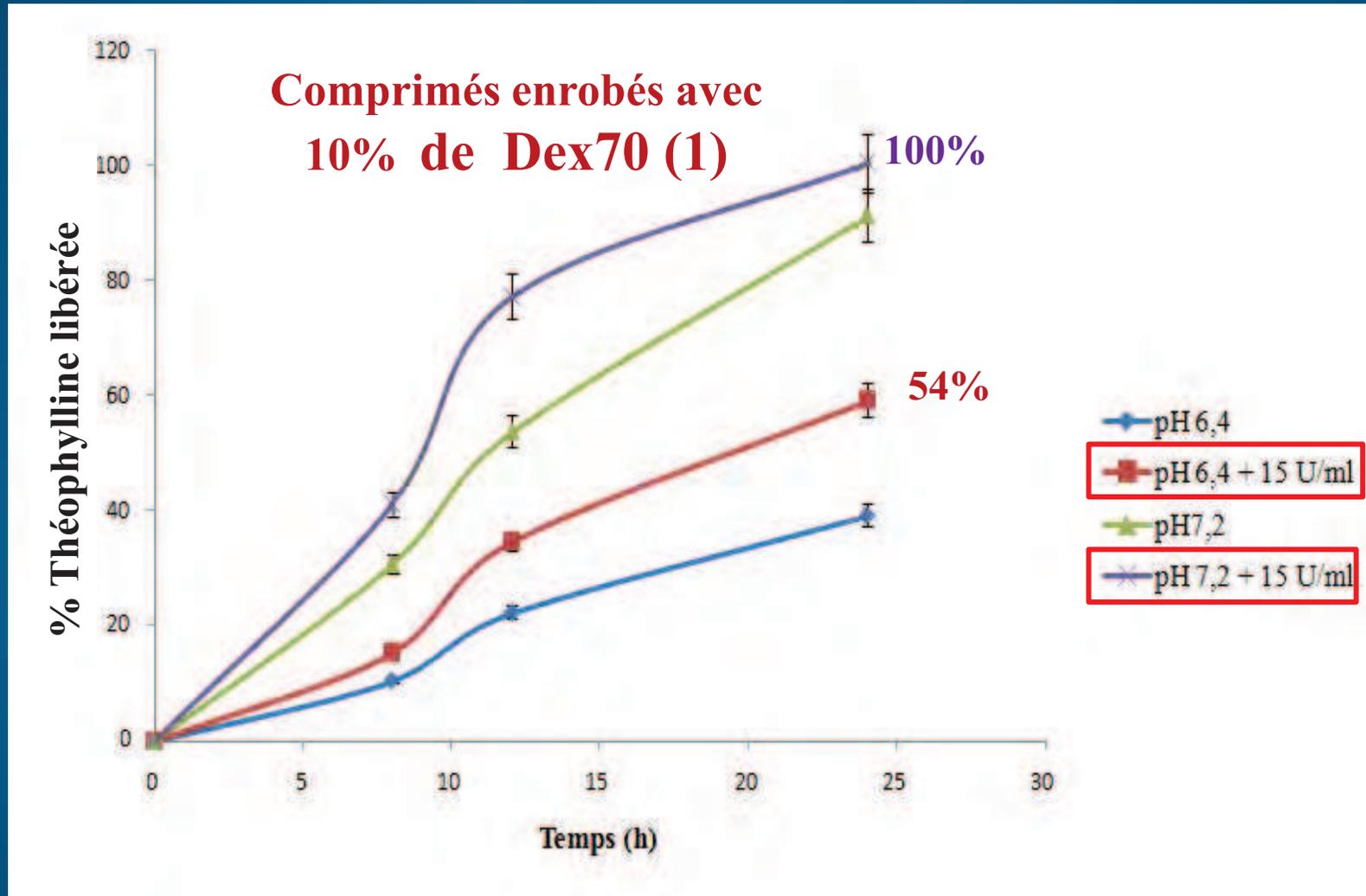
3. Influence du pourcentage d'enrobage?



4. Influence du pH?



5. Influence de la dextranase?



Résultats:

1. **copolymères à blocs à base de dextran 70 ou 45 qui se composent de moins de 10% de PMAA sont les meilleurs candidats**
2. **ces copolymères à blocs sont sensibles au pH**
3. **augmentation significative de la libération a été observée en présence de dextranase**
4. **taux d'enrobage compris entre 5 et 10% est suffisant pour délivrer une forme orale au niveau du côlon**

Conclusion générale

1. Esters de dextran ne permettent pas de préparer une forme pharmaceutique à libération colique :
 - a) plupart d'entre eux ne sont pas dégradés par la dextranase;
 - b) ceux qui sont dégradés sont trop hydrosolubles dans le milieu gastro-intestinal.
2. L'ensemble des études *in vitro* réalisées sur les copolymères à blocs à base de dextrans ont démontré le potentiel de ceux-ci à délivrer une forme pharmaceutique orale au niveau du côlon .

Perspectives

- 1- Etude *in vivo* chez l'animal pour corrélérer les résultats *in vitro*.
- 2- Synthèse de copolymères à blocs à base de dextrans poids moléculaire plus élevées (dextran 100 ou 200 kDa).
- 3- Etude de l'effet de différents types de plastifiants (hydrophobe ou hydrophile) sur la cinétique de la libération.



Merci de votre attention