

**UNIVERSITE LIBRE DE BRUXELLES**

**INSTITUT DE PHARMACIE**

**Laboratoire de Pharmacie Galénique et Biopharmacie**

**Professeur A. J. MOËS, Promoteur**

**Laboratoire de Microbiologie et Hygiène**

**Professeur M. DEVLEESCHOUWER, Copromoteur**

**Etude des pectines en vue de leur utilisation pour la  
délivrance spécifique des médicaments dans  
le côlon après administration orale**

par

**RASMANE SEMDE**

**Pharmacien**

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences

Pharmaceutiques

Bruxelles, juin 1999

## Remerciements

Je tiens ici à remercier tout d'abord le Professeur André J. Moës, directeur du Laboratoire de Pharmacie Galénique et de Biopharmacie, qui m'a accueilli dans son laboratoire et qui, grâce à ses conseils avisés, son esprit critique, ses compétences et sa gentillesse, m'a permis de réaliser ce travail dans des délais acceptables.

Je tiens aussi à exprimer ma gratitude au professeur Michel Devleeschouwer, directeur du Laboratoire de Microbiologie et Hygiène, pour avoir accepté être le copromoteur de cette thèse. Merci également à tous les membres de son laboratoire, pour leur aide et leurs conseils.

Je voudrais aussi remercier Karim Amighi qui, grâce à son expérience et aux discussions de tous les jours, a énormément contribué à la réalisation de ce travail.

Merci également à tous les autres membres du Laboratoire de Pharmacie Galénique et de Biopharmacie, notamment Marcelle De Wachter et Philippe Deleuze qui, chacun à sa manière, m'ont considérablement aidé, surtout pendant les périodes difficiles et délicates.

Je voudrais également remercier Pierre David, du service de Chimie macromoléculaire (Directeur: G. Geuskens), avec qui j'ai eu une des collaborations scientifiques et amicales les plus fructueuses.

Je ne saurais terminer ces remerciements sans avouer ma reconnaissance au Professeur Michel Hanocq, de même qu'au service de la coopération de l'Université Libre de Bruxelles (ULB), qui m'ont permis de bénéficier d'une bourse sans laquelle ce travail ne pouvait pas avoir lieu.

Enfin, merci aux nombreuses personnes qui, de près ou de loin, m'ont soutenu pendant la période de travail consacrée à la préparation de cette thèse de doctorat.

Je voudrais dédier ce travail à mes parents qui, malgré qu'ils ignorent sa portée, ont eu l'idée et le mérite de m'inscrire à l'école quand j'avais sept ans, alors que les conditions sociales et culturelles dans lesquelles ils vivaient n'étaient pas favorables à ce genre d'instruction.

---

## SOMMAIRE

<b>Introduction générale</b>	<b>2</b>
<b>Chapitre I : Etude des enrobages mixtes Pectine HM / Ethylcellulose obtenus par compression des mélanges de poudres (dry coating)</b>	<b>61</b>
<b>Chapitre II : Etude de l'influence des enzymes pectinolytiques sur les cinétiques d'absorption d'eau et de libération de la pectine à partir des films mixtes obtenus à l'aide des dispersions aqueuses de polymères d'enrobage insolubles contenant de la pectine HM ou des pectinates de calcium</b>	<b>88</b>
<b>Chapitre III : Etude de l'influence de quelques paramètres de formulation et des enzymes pectinolytiques sur la libération de la théophylline à partir de pellets enrobés à l'aide des dispersions aqueuses de polymères insolubles contenant de la pectine HM ou des pectinates de calcium</b>	<b>109</b>
<b>Chapitre IV : Etude des enrobages mixtes d'Eudragit® NE 30D renfermant des complexes Eudragit® RL - Pectine HM en vue de leur utilisation pour la délivrance spécifique des médicaments dans le côlon</b>	<b>137</b>
<b>Chapitre V : Synthèse, caractérisation, dégradation enzymatique et évaluation du potentiel colonique des pectines réticulées par l'épichlorohydrine</b>	<b>163</b>
<b>Conclusions générales et perspectives</b>	<b>187</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>192</b>

# Introduction générale

<b>1. Introduction</b>	4
<b>2. Applications des formes coloniques</b>	4
<b>3. Anatomie et physiologie du tractus gastro-intestinal et du côlon</b>	7
<b>3.1. Structure du côlon</b>	7
<b>3.2. Rôle physiologique du côlon</b>	11
<b>3.3. Rôle du côlon dans la résorption des médicaments</b>	15
<i>2.3.1. Résorption des principes actifs de faible poids moléculaire</i>	15
<i>2.3.2. Résorption des peptides et des protéines</i>	16
<b>3.4. Le pH du tractus gastro-intestinal</b>	19
<b>3.5. Le transit des formes pharmaceutiques dans le tractus gastro-intestinal</b>	21
<b>3.6. Le potentiel redox du tractus gastro-intestinal</b>	23
<b>3.7. La flore intestinale</b>	24
<i>3.7.1. Distribution de la flore microbienne dans le tractus gastro-intestinal</i>	24
<i>3.7.2. Importance physiologique de la flore intestinale</i>	27
<i>3.7.3. Facteurs de contrôle de la flore intestinale</i>	28
<i>3.7.4. Rôle de la flore intestinale dans le métabolisme intra-luminal du côlon</i>	29
3.7.4.1. Métabolisme des résidus alimentaires	29
3.7.4.2. Métabolisme des médicaments	31

<b>4. Méthodes de délivrance spécifique des médicaments dans le côlon</b>	<b>33</b>
<b>4.1. Formes rectales</b>	<b>33</b>
<b>4.2. Approches basées sur l'utilisation des variations du pH</b>	<b>33</b>
<b>4.3. Approches basées sur l'utilisation des durées du transit</b>	<b>35</b>
<b>4.4. Approches basées sur l'utilisation du potentiel redox</b>	<b>39</b>
<b>4.5. Approches basées sur l'utilisation de l'activité enzymatique de la flore intestinale</b>	<b>39</b>
<i>4.5.1. Approches basées sur l'utilisation de l'activité des azo réductases</i>	<i>40</i>
4.5.1.1. Les prodrogues azoïques	40
4.5.1.2. Les polymères azoïques ou azo polymères	42
<i>4.5.2. Approches basées sur l'utilisation de l'activité des glycosidases et des glucuronidases</i>	<i>44</i>
4.5.2.1. Les prodrogues glycosidiques	44
4.5.2.2. Les matrices et les enrobages à base de polysaccharides	45
<b>5. Les pectines</b>	<b>48</b>
<b>5.1. Origine et production des pectines</b>	<b>48</b>
<b>5.2. Structure chimique, caractérisation, dégradation chimique et enzymatique des pectines</b>	<b>48</b>
<i>5.2.1. Structure chimique des pectines</i>	<i>48</i>
<i>5.2.2. Caractérisation des pectines</i>	<i>50</i>
<i>5.2.3. Dégradation chimique et enzymatique des pectines</i>	<i>52</i>
<b>5.3. Propriétés et usages des pectines</b>	<b>53</b>
<b>5.4. Utilisation des pectines dans les systèmes à libération prolongée</b>	<b>55</b>
<b>5.5. Utilisation des pectines dans la délivrance colonique des médicaments</b>	<b>56</b>
<b>6. Buts et organisation du travail expérimental</b>	<b>59</b>

## 1. Introduction

Les "formes coloniques", appellation dérivant de l'expression anglaise "oral colonic dosage forms", sont des formulations orales spécialement conçues pour délivrer de manière sélective, voire exclusive, le ou les principes actifs qu'elles renferment dans le côlon. Elles doivent donc être capables d'assurer la protection des principes actifs qu'elles renferment pendant les transits à travers la cavité buccale, l'œsophage, l'estomac et l'intestin grêle. D'autre part, elles doivent aussi trouver dans le côlon, un mécanisme, de préférence spécifique, qui y déclenchera le largage du principe actif.

Depuis deux décennies, les formes coloniques ont fait l'objet d'intenses recherches car elles présentent de nombreuses et importantes applications pharmaceutiques et médicales. Mais avant d'aborder leurs intérêts particuliers, il nous paraît intéressant de rappeler ici, les avantages des systèmes de délivrance ciblée de principes actifs à un organe (Targeted drug delivery systems) en général.

Les formes à libération ciblée, parfois qualifiées de formes intelligentes, permettent avant tout de maximiser l'activité thérapeutique en déchargeant de manière sélective le principe actif au niveau de l'organe malade ou du site d'absorption, ce qui permet également de réduire les effets secondaires résultant de l'action du médicament sur les autres parties de l'organisme (Rubinstein, 1990). La sélectivité des formes à libération ciblée permet également de limiter les pertes en principes actifs par dilution dans l'organisme, de telle sorte que la dose administrée peut être diminuée sans compromettre l'efficacité thérapeutique, tout en réalisant des économies en substances actives qui, dans certains cas, peuvent avoir des répercussions financières très avantageuses pour le patient.

## 2. Applications des formes coloniques

Comparées aux formulations qui empruntent les autres voies d'administration (cutanée, rectale, nasale, parentérale, ...), les formes orales constituent le moyen le plus naturel, le plus pratique et le plus confortable pour administrer des médicaments. Malheureusement, la voie orale ne convient pas toujours, surtout pour l'administration des substances instables en milieu gastrique et/ou intestinal et des principes actifs exerçant une

action locale au niveau du côlon. Dans certaines de ces situations cependant, les formes coloniques peuvent offrir une alternative beaucoup plus intéressante.

Le côlon est souvent le siège d'un certain nombre de pathologies locales comprenant les troubles du transit colique (la constipation, les diarrhées, le syndrome du côlon irritable), les maladies inflammatoires (colites, maladie de Crohn), les maladies infectieuses d'origine microbienne ou parasitaire et les maladies cancéreuses. Etant donné que toutes ces maladies sont bien localisées, le meilleur traitement serait sans aucun doute une décharge locale et ciblée de l'agent thérapeutique. Malheureusement, l'administration rectale, en plus de son inconfort pour le patient, ne permet pas d'accéder facilement à l'entièreté du côlon. Par contre, les formes coloniques, capables de protéger et donc d'éviter la destruction et/ou la résorption prématurée des principes actifs dans l'estomac et dans l'intestin grêle, permettent de saturer le côlon traumatisé en principes actifs tout en limitant au maximum les effets secondaires systémiques. Elles pourront donc garantir à la fois une meilleure efficacité et une plus grande sécurité (Wikberg et coll., 1997). De même, les agents de diagnostic de la fonction colique, administrés oralement, seront mieux tolérés.

Les formes coloniques offrent aussi une opportunité intéressante dans la maîtrise d'un certain nombre de maladies affectées par les rythmes circadiens comme par exemple l'asthme, les arthrites et bien d'autres maladies inflammatoires. En effet, les crises d'asthme par exemple sont plus fréquentes et plus exacerbées la nuit, dans les environs de 2 à 4 heures du matin, période pendant laquelle le cortisol, qui est l'anti-inflammatoire physiologique, est à son niveau sanguin le plus bas. En administrant un médicament antiasthmatique à libération colonique le soir avant d'aller au lit, on peut s'attendre à ce que celui-ci libère son principe actif après un temps de latence de 4 à 7 heures, qui correspond à la durée de transit bouche-caecum, c'est-à-dire au moment de l'apparition des crises.

Avec les formes coloniques, il serait aussi possible de prolonger l'activité des médicaments qui sont moins rapidement résorbés dans le côlon (faible surface de résorption) que dans l'intestin grêle. Elles pourraient, en effet, permettre d'effectuer une dernière décharge massive du principe actif après la jonction iléo-caecale.

Lorsqu'un principe actif est très faiblement résorbé dans le côlon, il convient de concevoir la formulation des formes entériques et des formes à libération prolongée avec

beaucoup de précautions. Par exemple, l'érythromycine, formulée sous forme entérique (désagrégation au dessus de pH 6.5), a une biodisponibilité très faible et s'avère inefficace sur le plan thérapeutique parce que son principal site d'absorption est l'intestin grêle. L'oxprénolol, par contre, est très bien résorbé au niveau du côlon. Une forme à libération prolongée est donc aisément concevable avec ce principe actif. En effet, sa biodisponibilité, après administration orale sous forme de pompe osmotique à des sujets présentant un transit colique normal (27.5 heures), est de 54 %. Cependant, chez les sujets présentant un transit colique anormalement court (2.5 heures), la biodisponibilité atteint seulement 13.8 % de la dose administrée (Watts et Illum, 1997). Ces deux exemples montrent clairement l'importance de l'absorption colique des principes actifs dans la conception des formes entériques et des systèmes à libération prolongée.

Une autre perspective d'application importante des formes coloniques est l'administration orale des médicaments macromoléculaires, en particulier les peptides et les protéines qui occupent une place de plus en plus importante dans l'arsenal thérapeutique avec l'avènement et les progrès de la biotechnologie. Malheureusement, la taille, l'hydrophilie, l'instabilité et la complexité structurale de ces substances limitent leur résorption au niveau des muqueuses (la biodisponibilité orale est généralement inférieure à 2 %). C'est la raison pour laquelle ils sont tous, à quelques rares exceptions près, administrés sous forme parentérale. Face aux limitations liées à l'administration parentérale, surtout dans les maladies chroniques comme le diabète qui nécessite généralement un traitement à vie, on cherche tous azimuts d'autres voies d'administration plus appropriées à un usage quotidien par le patient. Même si la voie orale, plus confortable et naturelle, présente une très faible biodisponibilité, il semblerait que la protection des peptides et des protéines actifs jusqu'au côlon grâce à l'usage des formes coloniques permet, dans certains cas du moins, d'obtenir une résorption satisfaisante (Mackay et Tomlinson, 1993; Rubinstein et coll., 1997).

En effet, l'activité des protéases dans le côlon est plus faible que celle qui prévaut dans l'intestin grêle parce que d'une part, la sécrétion des enzymes protéolytiques par la muqueuse colique est relativement plus faible que celle de la muqueuse intestinale, et parce que d'autre part, les protéases déversées dans le côlon par l'iléon sont en partie dégradées par les enzymes bactériennes de la flore intestinale. Outre la faible activité protéolytique qui caractérise le contenu colique, il faut ajouter la durée particulièrement élevée du séjour des formes

pharmaceutiques dans le côlon (36 heures en moyenne). L'ensemble de ces facteurs favorables à l'absorption colique des macromolécules fait apparaître le côlon comme étant le site privilégié du tractus gastro-intestinal pour l'administration des peptides. D'ores et déjà, un certain nombre de macromolécules (insuline, vasopressine, calcitonine, r-tpA, érythropoétine, hormone de croissance (GH), héparine, interférons, interleukines, ...) sont considérées comme étant des candidats potentiels à l'administration colonique (Mackay et Tomlinson, 1993).

Etant donné les nombreuses et intéressantes perspectives d'utilisation, un effort de recherche considérable, visant à exploiter les principales caractéristiques anatomiques et physiologiques du tractus gastro-intestinal, a été consenti durant ces deux dernières décennies afin d'élaborer les formes coloniques.

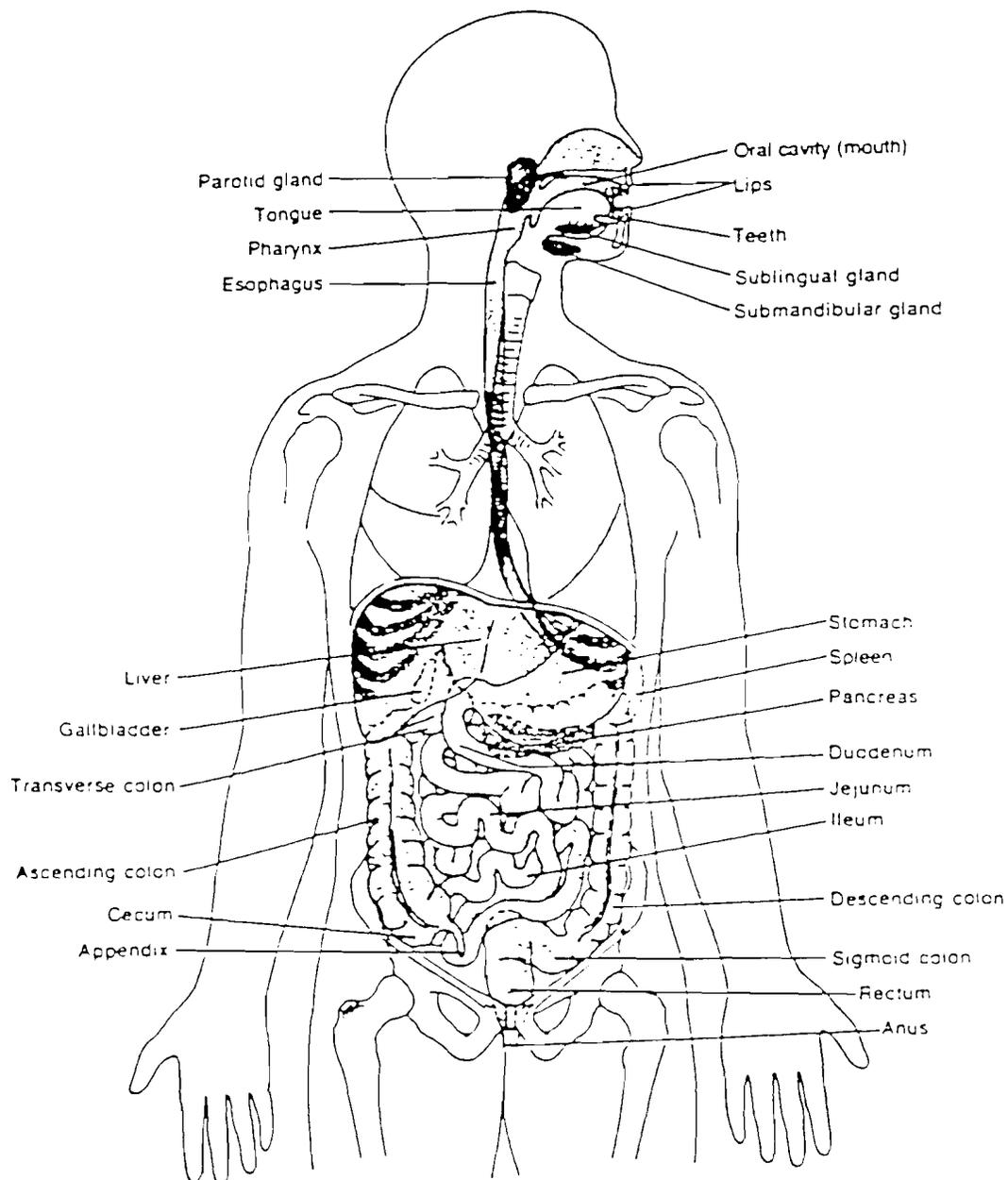
### **3. Anatomie et physiologie du tractus gastro-intestinal et du côlon**

La figure 1 représente une vue schématique générale des différentes parties du tractus gastro-intestinal de l'homme et la figure 2 résume les principaux paramètres physiologiques (longueurs, durées du transit, valeurs du pH, potentiels redox, populations bactériennes) de ces différentes parties.

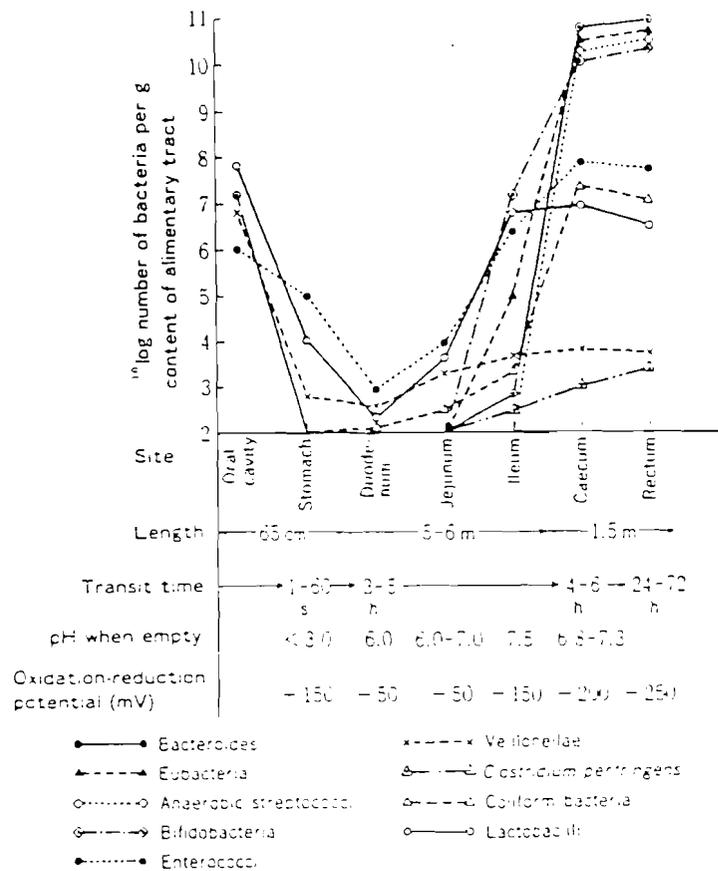
#### **3.1. Structure du côlon**

Le côlon s'étend de la jonction iléo-caecale au rectum et possède une longueur comprise entre 1.5 et 1.8 m. Près de 90 % de sa longueur totale est localisée dans la cavité abdominale. Il est successivement composé du caecum, du côlon ascendant, de l'anse hépatique, du côlon transverse, de l'anse splénique, du côlon descendant et du côlon sigmoïde (figures 1 et 3). Le caecum est une poche d'une longueur d'environ 6 cm et est prolongé par l'appendice *epiploicae*. Le côlon ascendant, d'une longueur de 12 à 20 cm, se caractérise par une circonférence plus importante que celle des autres parties du côlon. Il s'étend de la valve iléo-caecale à l'anse hépatique. Après l'anse hépatique, le côlon tourne à gauche pour donner naissance au côlon transverse (approximativement 50 cm de longueur) puis, descend après l'anse splénique pour former le côlon descendant. Ce dernier, d'une longueur d'environ 20 cm, est prolongé par le côlon sigmoïde qui mesure à peu près 40 cm de long. Le côlon se

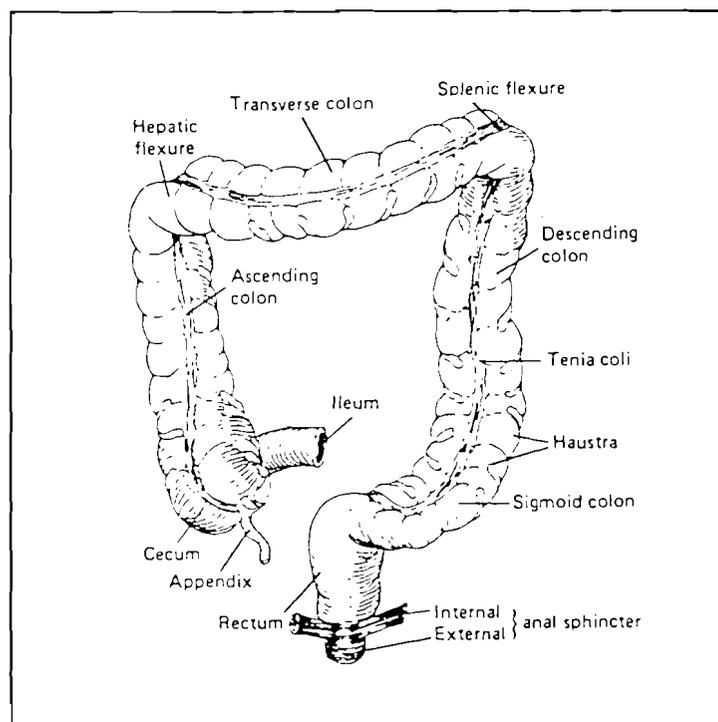
termine par l'ampoule rectale et le canal anal qui, respectivement, s'étalent sur des longueurs de 12 à 15 cm et de 2.5 à 3 cm (Hamilton, 1984).



**Figure 1 :** Représentation schématique des différentes parties du tractus gastro-intestinal de l'homme (Friend, 1991a).



**Figure 2 :** Paramètres physiologiques (longueurs, durées de transit, valeurs du pH, potentiels redox et populations bactériennes) des différentes parties du tractus gastro-intestinal de l'homme (Friend, 1991a).



**Figure 3 :** Représentation schématique du côlon (Van den Mooter, 1994a).

Le côlon droit ou proximal (caecum et côlon ascendant) et le côlon moyen (transverse) sont irrigués par la circulation sanguine via l'artère mésentérique supérieure alors que le côlon gauche ou distal (descendant et sigmoïde) est irrigué par l'intermédiaire de l'artère mésentérique inférieure. L'artère marginale, recevant le sang des artères susmentionnées, alimente toute la paroi du côlon. Par la suite, le sang est conduit par les veines mésentériques supérieure et inférieure vers le système portal, d'où l'impossibilité d'éviter le premier passage hépatique pour les substances résorbées au niveau du côlon. On rencontre généralement des vaisseaux lymphatiques qui accompagnent les vaisseaux sanguins mais aussi, des terminaisons de fibres parasympathiques, sympathiques et sensitives dans la paroi colique. Sur le plan anatomique, la paroi colique est composée de l'extérieur vers l'intérieur, de la séreuse (un ensemble de tissus mous), de la *muscularis propria* (les couches musculaires longitudinale et circulaire), de la sous-muqueuse et enfin de la muqueuse. Les trois dernières couches sont innervées et vascularisées (Hamilton, 1984).

La couche musculaire longitudinale externe est constituée de trois bandes longitudinales appelées *taeniae*. Arrivés au niveau du sigmoïde, les *taeniae* se rassemblent pour former la couche musculaire externe du rectum. La couche musculaire circulaire interne quant à elle, se contracte régulièrement en *haustra* et donne un aspect "sacculaire" au côlon (figure 3). Les deux couches musculaires, longitudinale et circulaire, assurent respectivement les fonctions de propulsion et de brassage du contenu colique.

La muqueuse est subdivisée en *muscularis mucosa*, *lamina propria* et épithélium. La *muscularis mucosa*, présente sur toute la longueur du côlon et séparant la muqueuse de la sous-muqueuse, est constituée d'une mince couche de muscles lisses supportant la *lamina propria*, riche en vaisseaux sanguins et lymphatiques d'une part, et d'autre part, des lymphocytes T et des cellules productrices d'immunoglobulines (IgA, IgM, IgG). L'épithélium est recouvert de mucus et consiste en une couche unicellulaire présentant des cryptes. On y distingue trois types de cellules provenant de la différenciation d'un même souche de cellules mères : les cellules d'absorption ou en "colonnes" qui sont riches en *microvilli*, les cellules endocrines et les cellules en forme de "gobelet". La proportion relative de chaque type de cellules varie d'une région à l'autre du côlon. Par exemple, plus on progresse vers le rectum, plus la proportion des cellules d'absorption et des cellules en "gobelet" diminue alors que celle des cellules endocrines augmente. Les cellules en "gobelet",

localisées dans les cryptes, sont responsables de la production du mucus, lubrifiant naturel de la surface des muqueuses. Le mucus est en fait constitué d'environ 95 % d'eau et de mucopolysaccharides (mucines) qui sont des chaînes protéiques portant latéralement des oligosaccharides sulfatés (Hamilton, 1984).

Contrairement à l'intestin grêle, le côlon ne possède pas de *villi* qui, en plus des *microvilli*, permettent d'augmenter considérablement la surface de résorption. Comparé 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. La surface de résorption totale du côlon varie, en effet, de 0.5 à 1 m<sup>2</sup> alors que celle de l'intestin grêle dépasse 100 m<sup>2</sup>.

Il faut également noter que sur le plan anatomique, la structure du côlon peut être différente d'un animal à l'autre. Les tailles relatives du caecum et du côlon, qui varient respectivement de 3 à 16 % et de 8 à 35 % par rapport à celle de l'entièreté du tractus gastro-intestinal, sont généralement plus importantes chez les herbivores. En effet, chez le cheval, les rongeurs et le lapin par exemple, le côlon droit est particulièrement bien développé et très complexe. Il assure essentiellement un rôle de métabolisation et de digestion des aliments. Par contre, chez les carnivores et les omnivores, le côlon est assez étroit et joue seulement un rôle de stockage relativement limité des déchets alimentaires (Phillips, 1984).

### **3.2. Rôle physiologique du côlon**

A l'inverse de l'intestin grêle dont le rôle principal est de digérer les aliments et d'absorber les nutriments grâce à sa très grande surface d'absorption, le côlon intervient généralement très peu dans l'absorption des nutriments. Ses principales fonctions sont la consolidation des effluents de l'iléon en faeces par l'absorption simultanée d'eau et des électrolytes, le stockage des résidus alimentaires et le contrôle des périodes de la défécation (Phillips, 1984).

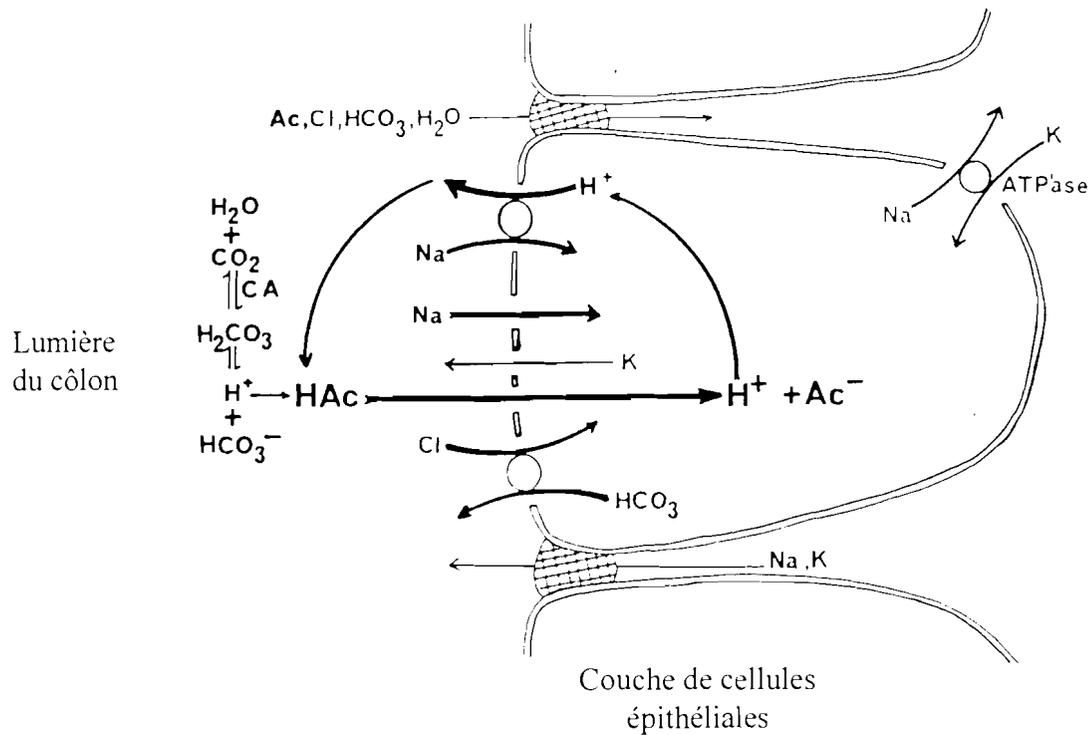
La capacité d'absorption d'eau et d'électrolytes du côlon est très élevée (tableau 1) dans la mesure où plus de 90 % des quantités d'eau et de sodium iléaux (1500 ml d'eau et 200

millimoles de sodium) arrivant à la jonction iléo-caecale y sont quotidiennement résorbées. Chez un individu en bonne santé, la muqueuse colique peut résorber 5 à 6 l d'eau et 800 à 1000 mEq de sodium et de chlorures par jour. De plus, le côlon excrète en moyenne environ 45 mEq de potassium par jour mais également des carbonates. Il assure donc un rôle de protection de l'organisme contre les pertes excessives de fluides, mais la majeure partie de la régulation de la balance hydrique et électrolytique a lieu dans le côlon droit (Phillips, 1984; Cummings, 1984).

**Tableau 1** : Balance quotidienne des différents solutés dans le côlon (Cummings, 1984).

<b>Nature du soluté</b>	Arrivant de l'iléon	Provenant du métabolisme microbien	Perte due à la défécation	Bilan quotidien
<b>Sodium (mmol)</b>	210		2	+208
<b>Potassium (mmol)</b>	7		15	-8
<b>Ammonium (mmol)</b>	Traces	260	2	+258
<b>Urée (mmol)</b>	130		0	+130
<b>Chlorures (mmol)</b>	120		2	+118
<b>Bicarbonates (mmol)</b>	75		5	+70
<b>Acides organiques (mmol)</b>	5	310	10	+305
<b>Eau (ml)</b>	1500		110	+1390

De nombreux mécanismes sont impliqués dans le transport des différents ions minéraux à travers la muqueuse colique (figure 4). En effet, la résorption du sodium est principalement due à une pompe  $\text{Na}^+ \text{K}^+ - \text{ATPase}$ , très sensible (stimulation) aux minéralo- et aux glucocorticoïdes. L'absorption des chlorures, qui semble aussi être sous le contrôle d'un mécanisme de transport actif, est doublement couplée, avec l'absorption du sodium d'une part, et avec l'excrétion des carbonates d'autre part. Par ailleurs, l'excrétion des carbonates vers la lumière colique est favorisée par l'anhydrase carbonique de la muqueuse colique. Par contre, le principal mécanisme responsable du transport du potassium à travers la muqueuse colique semble, au contraire, être la diffusion passive (Phillips, 1984; Cummings, 1984).



**Figure 4 :** Schéma des différents mécanismes de transport des principaux électrolytes à travers la muqueuse colique (Cummings, 1984).

Le stockage des résidus alimentaires est l'une des fonctions majeures du gros intestin. En effet, le temps de résidence des nutriments dans le côlon est très élevé, de 18 à 144 heures en moyenne (Edwards, 1993). Tous les segments du côlon participent à cette fonction de stockage qui, dans certains cas, peut contribuer de manière significative à la digestion intraluminaire des aliments et à la résorption de l'effluent iléal. Le côlon droit (caecum et côlon ascendant), qui contient à lui seul la moitié du contenu colique total, apparaît comme étant la région principale de stockage du côlon. La progression des fluides dans cette partie du côlon est effectivement très lente ( $\pm 1$  cm / h) à cause d'une part, de la présence des mouvements antipéristaltiques et d'autre part, de celle des anses hépatique et splénique qui constituent des zones anatomiques de freinage (Phillips, 1984). Enfin, la valve iléo-caecale contribue également et de façon appréciable au stockage des aliments dans le côlon, en empêchant le reflux du contenu colique vers l'iléon et en assurant le contrôle de l'arrivée du chyme iléal dans le caecum (Phillips et coll., 1988). Sans faire une discrimination entre les formes liquides et les formes solides (Hammer et coll., 1993), la jonction iléo-caecale permet le regroupement et la stagnation des aliments et des formes pharmaceutiques dans le côlon droit et permet leur passage en bolus et de façon périodique dans le caecum (Phillips, 1984).

La régulation de la balance hydrique et électrolytique et le stockage des résidus alimentaires dans le côlon sont grandement facilités par les mouvements segmentaires qui assurent continuellement le brassage du contenu colique. Ces mouvements sont gouvernés par la couche musculaire circulaire de la *muscularis propria*. La couche musculaire longitudinale dirige quant à elle, l'activité propulsive du côlon qui a lieu 3 à 4 fois par jour, généralement en relation avec la défécation. Notons aussi l'existence des mouvements rétrogrades destinés à augmenter la rétention de la matière dans le caecum et dans le côlon ascendant. Dans le côlon transverse, la progression du contenu colique vers le rectum est assurée par les mouvements segmentaires, alors que dans le côlon descendant et sigmoïde, cette progression est surtout assurée par les mouvements propulsifs lents et de faible intensité. Les propulsions, stimulées à la fois par la quantité et le contenu calorique des aliments, sont assurées par des contractions simultanées de plusieurs *haustra* (Phillips, 1984).

L'absorption progressive de l'eau par la lumière colique a pour conséquence la condensation progressive du chyme colique en masse semi-solide, voire solide. En effet, les contenus du caecum et du côlon ascendant sont respectivement fluides et semi-solides alors que ceux du côlon descendant et sigmoïde sont déjà dans un état "solide". La quantité de matière stockée par le côlon humain est curieusement très faible puisqu'en moyenne, la totalité du contenu colique, dont la grande partie est constituée par les bactéries de la flore intestinale, pèse environ 220 g à l'état humide soit 35 g à l'état sec (Watts et Illum, 1997).

Plus de 300 millimoles d'acides organiques sont aussi produits chaque jour suite à la dégradation bactérienne des polysaccharides (environ 30 à 60 g par jour) qui ont échappé à la digestion intestinale. Ces acides organiques (Ac), dont plus de 90 % sont des acétates, des propionates et des butyrates, sont rapidement et presque totalement résorbés (tableau I) (Phillips, 1984; Cummings, 1984). Leur résorption, qui se fait essentiellement de manière passive (figure 4), entraîne une accumulation des carbonates dans la lumière colique qui, en retour, stimule le transport du sodium et de l'eau à travers la muqueuse. La quantité quotidienne d'acides organiques produite dans le côlon semble être plus élevée que celle des ions minéraux ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ) transportée, indiquant que la contribution des acides organiques dans le transport des divers solutés est probablement très importante (Cummings, 1984).

### 3.3. Rôle du côlon dans la résorption des médicaments

Comparée à celle de l'intestin grêle, la capacité d'absorption des substances actives conventionnelles (non peptidiques) au niveau du côlon est relativement très faible suite à l'intervention de plusieurs facteurs d'ordres physiologiques. D'abord, la surface colique disponible pour la résorption est beaucoup plus faible. De plus, le flux sanguin et donc la vitesse de perfusion sanguine de la muqueuse colique, paramètre important dans le drainage des molécules résorbées au niveau des muqueuses vers la circulation générale, est aussi plus réduit. D'autre part, l'accumulation des résidus alimentaires échappant à la digestion intestinale augmente fortement la viscosité du contenu colique. Enfin, d'autres événements tels que la séquestration de certaines molécules par les constituants de la lumière colique, leur dégradation par les enzymes de la flore intestinale et/ou de la muqueuse, peuvent participer à la constitution d'une barrière s'opposant au passage des médicaments à travers la muqueuse colique (Mrsny, 1992).

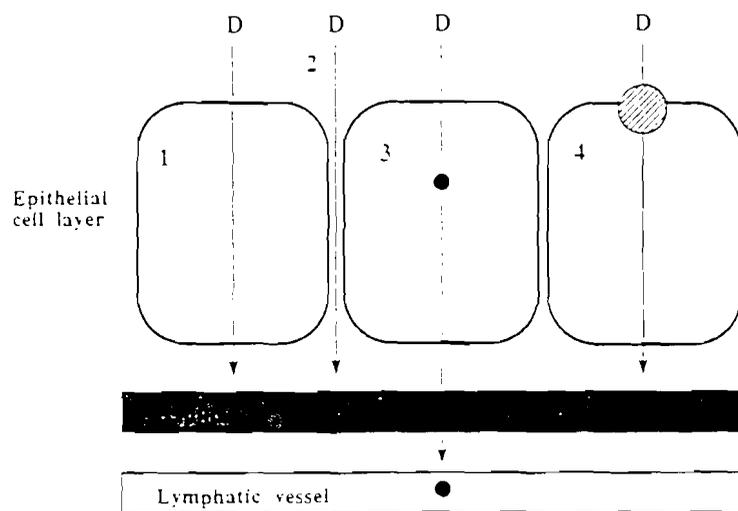
Malgré ces conditions défavorables, un certain nombre de substances médicamenteuses présentent des caractéristiques physico-chimiques suffisamment favorables (pKa, pKp, stabilité, solubilité) pour y être résorbées de manière significative. Par exemple, la résorption de certains peptides semble être meilleure dans le côlon que dans l'intestin grêle. Elle peut également être améliorée par l'usage concomitant des promoteurs d'absorption et/ou des inhibiteurs de protéases, même si l'innocuité de ces substances (perturbation de l'intégrité de la muqueuse) n'est pas encore totalement prouvée et qu'on recommande une certaine prudence quant à leur utilisation chez l'homme (Mrsny, 1992).

#### 3.3.1. Résorption des principes actifs de faible poids moléculaire

Plusieurs mécanismes, de même que plusieurs voies de passage à travers la muqueuse, sont responsables de l'absorption des principes actifs de faible poids moléculaire dans le côlon (figure 5). Généralement, les médicaments sont absorbés par diffusion passive, de manière trans- ou para-cellulaire. La diffusion transcellulaire, qui est surtout impliquée dans l'absorption des substances lipophiles est la voie d'absorption prédominante dans le côlon. La diffusion para-cellulaire, qui est surtout impliquée dans l'absorption des substances hydrophiles, est présente de manière équivalente dans l'intestin grêle et dans le gros intestin.

Elle ne joue qu'un rôle minime dans l'absorption des médicaments dans le côlon à cause de l'existence de nombreuses jonctions intercellulaires serrées appelées "tight-junctions" (Watts et Illum,1997).

Dès lors, les substances qui sont essentiellement absorbées par voie paracellulaire seront très faiblement résorbées au niveau du côlon. C'est le cas par exemple de l'aténolol, du buflomédil, de la cimétidine, de la ciprofloxacine, de la furosémide, de l'hydrochlorthiazide du lithium, de la nicardipine et de la pirétanide. Celles qui sont absorbées par voie transcellulaire par contre, seront bien résorbées au niveau du côlon. A titre d'exemple, citons la glibenclamide, le diclofénac, la théophylline, l'ibuprofène, le métoprolol, la nisoldipine et l'oxprénolol (Watts et Illum,1997; Antonin, 1993).



**Figure 5 :** Les principales voies d'absorption des médicaments dans le tube digestif : (1) Absorption transcellulaire (2) Absorption paracellulaire (3) Absorption transcellulaire suivie de l'incorporation des substances absorbées dans les chylomicrons et de leur transport vers le système lymphatique (4) Transport actif (Watts et Illum,1997).

### 3.3.2. Résorption des peptides et des protéines

Les molécules peptidiques sont généralement mal résorbées dans le tractus gastro-intestinal. Cette mauvaise résorption est attribuée à leur destruction par l'acidité gastrique, à leur dégradation enzymatique dans l'intestin grêle et dans le côlon, à leur faible perméabilité au niveau des muqueuses (taille et hydrophilie), à la rapidité du transit intestinal et à l'effet du

premier passage relativement important (TenHoor et Dressman, 1992; Mackay et Tomlinson, 1993).

Pourtant, l'un des objectifs majeurs que vise les formulations coloniques, est l'administration orale des peptides, des protéines et d'autres macromolécules médicamenteuses (Rubinstein et coll., 1997). Le côlon apparaît en effet comme étant un meilleur site d'absorption des peptides et des protéines que l'intestin grêle car, en plus du fait que le séjour des formes pharmaceutiques dans le côlon est long, l'activité des peptidases y est relativement faible (Bai, 1994a,b).

A titre d'exemple, la dégradation de la metképhamide (un pentapeptide), de même que celle de certains peptides immuno-actifs, est relativement plus faible dans les fluides coliques que dans ceux de l'intestin grêle (Langguth et coll., 1994; Langguth et coll., 1997). La calcitonine humaine, qui est aussi plus stable dans les milieux coliques (Lu et coll., 1998), est l'un des polypeptides les plus étudiés en vue d'une administration orale. Sa biodisponibilité, mesurée après instillation directe dans le côlon, est supérieure à celle obtenue après introduction dans les autres parties du tractus gastro-intestinal. De plus, le meilleur site d'absorption de la calcitonine est situé dans la partie distale du côlon. En effet, l'administration directe de 10 mg de calcitonine humaine dans le côlon descendant et transverse donne une biodisponibilité de  $0.22 \pm 0.06$  %, nettement supérieure à celle obtenue après instillation directe dans le côlon ascendant ( $0.08 \pm 0.03$  %) (Antonin et coll., 1996; Hastewell et coll., 1995).

La biodisponibilité de ces substances au niveau du côlon peut être améliorée par l'administration concomitante de promoteurs d'absorption. De nombreuses substances, dont les principales sont reprises dans le tableau 2, permettent en effet, grâce à des mécanismes divers (relâchement des "tight-junctions", augmentation de la taille des pores membranaires, amélioration de la solubilité et de la stabilité des principes actifs), d'améliorer la perméabilité de la muqueuse colique aux médicaments (Mrsny, 1992; Aungst et coll., 1996).

C'est ainsi que l'administration concomitante d'un mélange de monooléine et de taurocholate de sodium (40 mM chacun) à des rats a permis à Hastewell et coll. (1994) de multiplier par 9 l'absorption de la calcitonine ainsi que celle de la peroxydase et du polyéthylène glycol 4000 (PEG 4000). Les émulsifs tels que le dodécyl sulfate (1 %) et le

dodécyl maltoside (6.6 %) ont également permis non seulement de préparer des formulations très stables de calcitonine (2 %) mais aussi, d'obtenir une biodisponibilité supérieure à 10 % après administration intra-colique à des rats (l'administration intra-duodénale n'a donné qu'une biodisponibilité de moins de 2 %) (Baudys et coll., 1996). L'usage des promoteurs d'absorption a également permis d'augmenter l'absorption de l'insuline, de la calcitonine et de l'héparine chez le porc. Des formulations entériques renfermant des promoteurs d'absorption et destinées à l'administration orale des peptides, sont par ailleurs en étude clinique en phase I chez l'homme (Watts et Illum, 1997).

**Tableau 2 :** Les différentes classes importantes des promoteurs d'absorption colique avec des exemples représentatifs (Mrsny, 1992; Aungst et coll., 1996).

Classe	Exemples
Anti-inflammatoires non stéroïdiens	Indométhacine, Salicylates
Séquestrants calciques	Ethylènediamine tétraacétate de sodium (EDTA), Citrates
Surfactants	Polyoxyéthylène lauryl éther, Polysorbates, Saponines
Glycérines	Phospholipides, polyoxyéthylène glycéryl esters, glycérides d'acides gras à chaînes courtes et moyennes
Sels biliaires	Taurocholate, Glycocholate, Cholate et déoxycholate de sodium.
Acides gras	Caprate, Caprylate, Laurate, Oléate de sodium
Micelles mixtes	Taurocholate de monooléine ou d'acide oléique, Glycocholate d'acide oléique
Polymères	Amidon, Polycarbophil, Chitosans
Autres	Acylcarnitine, Azone (1-dodécylazacycloheptane-2-one), acides dicarboxyliques, phénothiazines

Grâce à leur action inhibitrice des enzymes protéolytiques, les inhibiteurs des protéases peuvent aussi contribuer à améliorer la résorption colique des peptides et des protéines (Bernkop-Schürch, 1998). Par exemple, la présence des inhibiteurs de la trypsine et

de la chymotrypsine, de même que celle de la caséine, a permis une amélioration importante de la stabilité des IGF-I dans le tractus gastro-intestinal (Anderlé et coll., 1998). L'administration intra-colique à des rats, de formulations d'insuline renfermant de la bacitracine, de l'aprotinine, du mésilate de camostat ou des inhibiteurs de la trypsine, a également permis d'obtenir une baisse significative de la glycémie (Yamamoto et coll., 1994). Langguth et coll. (1997) ont aussi montré que la biodisponibilité de la metképhamide après implantation intra-iléale chez le rat est quasi nulle, alors qu'elle atteint plus de 25 % en présence de la puromycine, un autre inhibiteur des protéases.

### 3.4. Le pH du tractus gastro-intestinal

Le pH est un paramètre très important à prendre en considération lors de la conception des formes orales à libération contrôlée ou modifiée car, la stabilité, la dissolution et la résorption des principes actifs dépendent le plus souvent des valeurs du pH des liquides physiologiques.

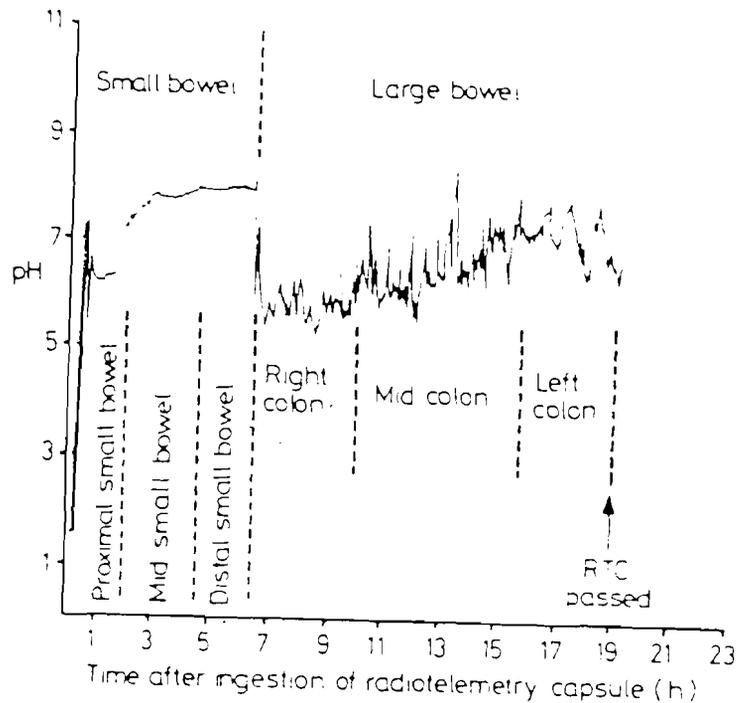
Les valeurs du pH sont très basses en milieu gastrique (1 à 2.5) mais s'élèvent progressivement lorsqu'on s'éloigne de l'estomac. Les valeurs les plus élevées sont rencontrées dans la partie terminale de l'iléon ( $7.5 \pm 0.5$ ). Cependant, à l'entrée du côlon ou plus exactement au niveau du caecum, le pH chute brutalement d'une unité ( $6.4 \pm 0.6$ ) à cause de la présence des acides organiques produits par le catabolisme bactérien des polysaccharides et des glycérides. Après le caecum, il remonte progressivement et atteint une valeur moyenne de  $7.04 \pm 0.67$  dans le côlon descendant. Le profil du pH du tractus gastro-intestinal humain, établi à partir de mesures directes (Remote Control Systems, London = capsule radio-téléométrique sensible au pH) effectuées sur 66 volontaires sains (à jeun), est représenté dans le tableau 3 et la figure 6 (Evans et coll., 1988).

Un certain nombre de facteurs comme les médicaments saccharidiques, l'alimentation et certaines maladies, peuvent entraîner des variations intra- et inter-sujets du pH du côlon. Le lactulose, dissaccharide utilisé dans le traitement de la constipation, échappe à la digestion intestinale et se retrouve dans le côlon. A ce niveau, il est transformé en acide lactique par la microflore et peut faire chuter le pH jusqu'à 5.0. Il en va de même lors de l'administration de la gomme guar et de l'ispaghul (Tomlin et Read, 1988) ou après une alimentation trop riche

en fibres alimentaires. La colite ulcéreuse peut aussi entraîner une chute drastique du pH dans le côlon proximal ( $4.7 \pm 0.7$ ) (Watts et Illum, 1997).

**Tableau 3 :** Valeurs du pH des différentes parties du tractus gastro-intestinal chez les sujets normaux (à jeun) (Evans et coll., 1988).

Site	Nombre de sujets	Valeur du pH ( $m \pm SD$ )
Jéjunum	55	$6.63 \pm 0.53$
Milieu de l'intestin grêle	52	$7.41 \pm 0.36$
Iléon	58	$7.49 \pm 0.46$
Côlon droit	66	$6.37 \pm 0.58$
Côlon moyen	51	$6.61 \pm 0.83$
Côlon gauche	50	$7.04 \pm 0.67$
Entièreté de l'intestin grêle	51	$7.30 \pm 0.34$
Entièreté du côlon	48	$6.63 \pm 0.67$



**Figure 6 :** Profil du pH du tractus gastro-intestinal chez un sujet normal (à jeun) (Evans et coll., 1988).

### 3.5. Le transit des formes pharmaceutiques dans le tractus gastro-intestinal

A l'instar du pH, les temps de transit des formes pharmaceutiques à travers le tractus gastro-intestinal ont une importance considérable dans la conception des formes orales à libération modifiée et particulièrement, dans celle des formes coloriques.

La durée du séjour gastrique des formes pharmaceutiques varie en fonction de leur taille, de leur densité, de l'état nutritionnel du sujet (à jeun ou non), de la charge calorique des aliments ingérés etc.... (Davis et coll., 1986; Abrahamsson et coll., 1996). Tandis que la vidange gastrique des liquides et des particules solides de petite taille (ex.: microbilles ou pellets, 0.5 à 1.5 mm de diamètre) s'effectue assez rapidement et de manière prévisible, quel que soit l'état nutritionnel du patient (temps de demi vidange gastrique ( $t_{50\%}$ )  $\approx$  80 minutes après un repas), la durée du transit gastrique des formes monolithiques (unitaires) de diamètre supérieur ou égal à 5 mm [(diamètre moyen du pylore ouvert =  $12.8 \pm 7.0$  mm (Munk et coll., 1978)] est variable et tout à fait imprévisible. Ces formes peuvent séjourner de 15 à 200 minutes lorsqu'elles sont administrées à jeun, et jusqu'à 10 heures, voire plus ( $> 12$  heures), lorsqu'elles sont administrées après un repas consistant (Davis et coll., 1984a,b; Khosla et coll., 1989a; Wilson et coll., 1989). En effet, les formes monolithiques de taille importante ne peuvent être vidangées de l'estomac qu'en période inter-digestive, sous l'impulsion des vagues de la phase 3 de l'IMMC (inter-digestive migrating motor complex), contractions puissantes d'une durée de 5 à 15 minutes, destinées à évacuer les particules solides non digestibles de l'estomac. Wilson et coll. (1989) ont montré que la durée moyenne du séjour gastrique de comprimés marqués, déterminée par scintigraphie gamma sur des volontaires sains, est de  $1.6 \pm 0.4$  heures,  $2.0 \pm 0.9$  heures et  $8.8 \pm 5.9$  heures, respectivement à jeun, après un repas léger (646 kJ de charge calorique) et après un repas consistant (3327 kJ de charge calorique).

La durée de transit des formes pharmaceutiques dans l'intestin grêle est par contre, et de manière surprenante, remarquablement constante ( $3 \pm 1$  heures) et indépendante du type de la forme administrée, de sa taille ainsi que de l'état nutritionnel du sujet (Davis et coll., 1986; Wilson et coll., 1989; Yuen et coll., 1993; Abrahamsson et coll., 1996).

Dès lors, après administration orale, une forme pharmaceutique mettrait entre 4 et 20 heures pour atteindre le côlon. A ce niveau, les différentes techniques utilisées pour mesurer

les durées du transit total et segmentaire, ont mis en évidence un transit très lent des aliments et des formes pharmaceutiques. L'utilisation d'un marqueur radio - opaque a en effet permis de montrer, sur un grand nombre de sujets sains (73 volontaires), que le transit total bouche à anus dure en moyenne 53.3 heures, que le temps moyen de transit des formes dans le côlon est de 35 heures et que, comparées aux hommes, les femmes présentent un transit colique plus lent, d'une durée moyenne de 47 heures. Les durées de transit à travers le côlon droit, gauche et recto-sigmoïde sont de 11.3, 11.4 et 12.4 heures, respectivement (Metcalf et coll., 1987). Dans une autre étude, Chaussade et coll. (1986) ont obtenu pour les mêmes segments du côlon, des durées moyennes de transit de 6.9, 9.1 et 18.4 heures, respectivement.

La scintigraphie gamma a aussi été largement utilisée pour déterminer la durée du transit colique. Dans une étude utilisant des mini-comprimés marqués (5 mm de diamètre), Khosla et Davis (1989b) ont montré que les durées de transit bouche à anus et bouche à caecum varient entre 18 à 72 heures et entre 2 à plus de 11 heures, respectivement. De plus, ces auteurs ont observé que les mini-comprimés se regroupent à l'entrée du caecum. En utilisant la même technique, Proano et coll. (1991) n'ont pas observé de différences significatives entre les temps de transit colique des liquides et des pellets. Dans une autre étude, aucune différence statistiquement significative n'a pu être observée entre des pellets (0.58 – 1.8 mm de diamètre) et des mini-comprimés ayant un diamètre inférieur à 6 mm (Proano et coll., 1990). Watts et coll. (1992) ont comparé la durée du transit à travers le côlon ascendant des particules de 0.2 mm de diamètre à celle de mini-comprimés de 5 et de 8.4 mm de diamètre. Ils n'ont observé aucune différence significative entre les durées de transit des différentes formes: les temps de transit étant très similaires, de  $11.0 \pm 4.0$  heures en moyenne. La densité et la taille des formes pharmaceutiques ne semblent pas non plus trop affecter le transit colique (Parker et coll., 1988), bien que dans d'autres études (Hardy et coll., 1985; Adkin et coll., 1993; Abrahamsson et coll., 1996), les pellets et les mini-comprimés semblent se déplacer plus lentement dans le côlon que les formes monolithiques de grande taille.

Les fibres alimentaires peuvent affecter la durée du transit des formes pharmaceutiques dans le côlon, en augmentant la rétention hydrique et donc, la masse du contenu colique. En effet, les végétariens présentent un temps de transit plus court que les omnivores. Les fibres alimentaires normalisent le transit colique en augmentant les temps de transit anormalement bas d'une part, et en diminuant les temps de transit anormalement élevés, d'autre part (Price et

coll., 1991). Notons également, qu'en réponse à l'ingestion de nourriture, les mouvements coliques peuvent s'accélérer et entraîner une accélération du transit des formes présentes dans le côlon (Bazzocchi et coll., 1990), même si Price et coll. (1993) n'ont pas pu mesurer un effet significatif (positif ou négatif) de la prise de nourriture et de la composition des aliments sur le transit colique des mini-comprimés de 6 mm de diamètre.

Un certain nombre de pathologies (diarrhée, constipation, colites ulcéreuses, maladie de Crohn, syndrome du côlon irritable ....) peuvent également modifier la durée du transit colique, et avoir de ce fait un impact sur l'efficacité de l'administration colonique des médicaments. Les colites ulcéreuses ne semblent pas trop affecter le transit gastro-intestinal de mini-comprimés (Hardy et coll., 1988). La diarrhée par contre, peut entraîner une diminution considérable du temps de séjour des formes dans le côlon ascendant (de  $12.9 \pm 3.7$  heures à  $7.0 \pm 2.5$  heures) (Barrow et coll., 1992). Watts et coll. (1992) ont aussi observé que les temps moyens de résidence des particules de 0.2 mm de diamètre et des comprimés de 5 mm de diamètre à travers le côlon ascendant sont fortement réduits ( $5.3 \pm 2.5$  heures et  $4.7 \pm 3.4$  heures, respectivement) chez les patients souffrant de diarrhée.

Comme on le voit, en plus des variations inter-individus, le transit colique est caractérisé par une très grande variabilité intra-sujets qui est due à des facteurs comme la taille des particules, le stress, le régime alimentaire, certaines affections pathologiques, mais aussi à d'autres facteurs comme l'état d'éveil ou de somnolence du sujet, les médicaments, etc.. Pour éviter que ces variations compromettent les performances des formes coloniques, il faudrait que celles-ci soit en mesure de libérer le plus rapidement possible les principes actifs dès leur arrivée dans le caecum afin de bénéficier de la meilleure capacité d'absorption du côlon droit.

### **3.6. Le potentiel redox du tractus gastro-intestinal**

Le potentiel redox du tractus gastro-intestinal varie d'une région à l'autre car il est le reflet des conditions aérobies et anaérobies mais aussi, de l'activité métabolique de la flore intestinale. Les valeurs du potentiel redox des différentes parties du canal alimentaire, représentées dans le tableau 4, ont été directement mesurées à l'aide d'une capsule radio-

téléométrique sensible au potentiel redox. Le potentiel redox du côlon est statistiquement plus négatif que celui de l'intestin grêle (Stirrup et coll., 1994).

**Tableau 4:** Valeurs du potentiel redox des différentes parties du tractus gastro-intestinal chez les sujets normaux (n = 15) (Stirrup et coll., 1994).

Région	E (mV)	SD (mV)
Partie proximale de l'intestin grêle	-65.6	-89.7
Partie distale de l'intestin grêle	-196.5	-96.8
Côlon droit	-415	-72
Côlon gauche	-380	-110

### 3.7. La flore intestinale

#### 3.7.1. Distribution de la flore microbienne dans le tractus gastro-intestinal

Le tractus gastro-intestinal héberge une importante population microbienne essentiellement concentrée dans ses deux parties extrêmes, la cavité buccale d'une part et le côlon d'autre part (figure 2). Bien que les germes rencontrés peuvent varier d'un individu à un autre et cela en fonction des méthodes de prélèvement, d'identification et de quantification, il y a une certaine constance dans la nature, les proportions et les quantités absolues des différentes populations microbiennes rencontrées dans chaque partie du tube digestif (tableau 5).

La cavité buccale est colonisée par un grand nombre d'espèces essentiellement anaérobies. La flore buccale, qu'on peut retrouver dans la salive, provient des aliments, des cavités des gencives, de la surface des dents, etc.. Elle est constituée majoritairement de *Streptococcus*, de *Veillonella* et de *Fusobacterium*, bien que d'autres espèces, en quantité relativement plus faible, peuvent être rencontrées (*Bacteroides*, *Lactobacillus*, spirochètes) (Drasar et Hill, 1974).

En dehors des périodes prospandiales et de certaines situations pathologiques telle que l'achloridie où la concentration microbienne peut atteindre  $10^5$  à  $10^7$  germes / ml du contenu gastrique, l'estomac est habituellement presque stérile, du fait de l'acidité gastrique. Les quelques rares espèces énumérées sont des bactéries Gram (+) (coques, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, Bactéroïdes et *Fusobacterium*) provenant de la salive (Drasar et Hill, 1974; Gorbach, 1971; Gustafsson, 1982).

**Tableau 5 :** Distribution qualitative et quantitative de la flore microbienne du tractus gastro-intestinal. Les quantités sont exprimées en nombre de germes / ml de contenu (Simon et Gorbach, 1984).

	Estomac	Jéjunum	Iléon	Fèces
<b>Total des bactéries énumérées</b>	0- $10^3$	0- $10^5$	$10^3$ - $10^7$	$10^{10}$ - $10^{12}$
<b>Bactéries aérobies ou anaérobies facultatives</b>				
Entérobactéries	0- $10^2$	0- $10^3$	$10^2$ - $10^6$	$10^4$ - $10^{10}$
Streptocoques	0- $10^3$	0- $10^4$	$10^2$ - $10^6$	$10^5$ - $10^{10}$
Staphylocoques	0- $10^2$	0- $10^3$	$10^2$ - $10^5$	$10^4$ - $10^7$
Lactobacilles	0- $10^3$	0- $10^4$	$10^2$ - $10^3$	$10^6$ - $10^{10}$
<b>Champignons</b>	0- $10^2$	0- $10^2$	$10^2$ - $10^3$	$10^2$ - $10^6$
<b>Bactéries anaérobies</b>				
Bactéroïdes	Rare	0- $10^2$	$10^3$ - $10^7$	$10^{10}$ - $10^{12}$
Bifidobactéries	Rare	0- $10^3$	$10^2$ - $10^5$	$10^8$ - $10^{12}$
Coques à Gram (+)	Rare	0- $10^3$	$10^2$ - $10^5$	$10^8$ - $10^{11}$
Clostridies	Rare	Rare	$10^2$ - $10^4$	$10^6$ - $10^{11}$
Eubactéries	Rare	Rare	Rare	$10^9$ - $10^{12}$

Après le milieu gastrique, la population microbienne devient de plus en plus dense et de plus en plus anaérobie au fur et à mesure que l'on descend dans l'intestin grêle. Elle augmente donc avec l'augmentation du pH. On rencontre habituellement dans l'intestin proximal (duodénum et jéjunum) une densité microbienne d'environ  $10^4$  germes / ml, constituée essentiellement de bactéries à Gram (+), aérobies et anaérobies facultatives. Les streptocoques, les lactobacilles aérobies, les diphtéroïdes et les champignons sont les composants majeurs de la flore de l'intestin proximal. Il s'agit d'une population microbienne

partiellement transitoire, constituée de germes ayant résisté à l'acidité gastrique (Gorbach et coll., 1967; Gorbach, 1971; Gustafsson, 1982). Au niveau de l'iléon et plus particulièrement dans l'iléon terminal, on dénombre  $10^5$  à  $10^8$  germes / ml, surtout des streptocoques, des lactobacilles mais aussi des bactéroïdes et des entérobactéries. L'iléon terminal, dont la flore est qualitativement similaire à celle du côlon est en fait une zone de transition entre l'intestin grêle et le côlon (Drasar et Hill, 1974; Gustafsson, 1982; Gorbach et coll., 1967).

Le contenu colique est caractérisé par une teneur en oxygène pratiquement nulle, un potentiel redox très bas, un pH proche de la neutralité (6 à 8), une accumulation des résidus alimentaires et un transit relativement lent. Il présente dès lors des conditions très favorables à la croissance des germes anaérobies. En effet, on y dénombre plus de  $10^{10}$  à  $10^{12}$  germes / ml du contenu colique, appartenant à plus de 400 espèces différentes. Les familles les plus représentatives sont les *Bacteroidaceae* (constituent environ 30 % de la flore fécale), les *Lactobacillaceae*, les *Propionobacteriaceae*, les *Bacillaceae* et les *cocci* à Gram négatif (Croucher et coll., 1983; Gorbach, 1971; Drasar et Hill, 1974). Il s'agit presque uniquement de bactéries anaérobies strictes ou facultatives puisque le rapport entre les anaérobies strictes ou facultatives d'une part, et les aérobies d'autre part, est de l'ordre de  $10^4$  à 1. En d'autres termes, plus de 99 % de la population microbienne du gros intestin sont constitués de bactéries anaérobies strictes ou facultatives, dont la majeure partie vit sous la couche de mucus recouvrant la muqueuse colique (Croucher et coll., 1983).

La flore colique donne naissance à la flore fécale 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. Etant donné que l'accès de la lumière colique est extrêmement difficile, les matières fécales et, dans certains cas, des germes isolés, sont souvent utilisés pour étudier l'activité métabolique de la flore intestinale. Lors des études *in vitro*, l'anaérobiose des milieux de culture peut être maintenue grâce à l'élimination de l'oxygène dissous par barbotage d'un gaz inerte (gaz carbonique, azote) et/ou par l'utilisation de milieux de culture préréduits (Semdé et coll., 1998a). D'autre part, les milieux microbiens utilisés pour tester l'activité métabolique de la flore intestinale sont soit des bouillons de culture, soit des suspensions tampons de germes isolés ou de matière fécale, soit enfin, des systèmes de fermentation à flux semi-continu ou continu (Miller et Wolin, 1981; Mallett et coll., 1983; 1986; Molly et coll., 1993; Daniel et coll., 1997; Runney et Rowland, 1992). Ces derniers

systemes permettent de travailler dans des conditions proches de celles qui prévalent dans le côlon.

### 3.7.2. Importance physiologique de la flore intestinale

Chez les animaux axéniques comme chez l'homme ayant suivi une antibiothérapie à large spectre, on rencontre fréquemment un certain nombre de pathologies absentes dans les conditions de vie normales. On pense que physiologiquement, la flore intestinale a une importance comparable à celle de n'importe quel autre organe de l'organisme, dans la mesure où plus de 90 % du nombre total du contenu cellulaire d'un mammifère (estimé à plus de  $10^{14}$  cellules chez l'homme) sont constitués de micro-organismes (Gustafsson, 1982).

La microflore assure un rôle de défense immunitaire en protégeant l'organisme contre toute invasion massive de micro-organismes étrangers. En effet, les rats et les souris axéniques exposés à l'atmosphère ambiante, sont très vite contaminés par le *Clostridium difficile*. Ils contractent très rapidement une diarrhée sévère, une perte de poids et finissent par mourir. Un autre effet observé chez les animaux axéniques est l'élargissement démesuré du caecum (chez le rat, la taille du caecum est augmentée de cinq fois par rapport à la normale), accompagné d'un dédoublement du contenu caecal, d'une augmentation de plus de 30 fois de la quantité de mucines et d'une réduction de la sensibilité des muscles striés à l'acétylcholine et à la sérotonine. Les études sur animaux ont également montré qu'un certain nombre de pathologies (digestives ou non) peuvent provenir essentiellement d'un déséquilibre qualitatif de la flore intestinale. Il semblerait, en effet, que la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse sont souvent accompagnées de l'absence de certaines espèces bactériennes de la flore normale (Gustafsson, 1982).

Le déséquilibre de la flore peut également entraîner l'apparition des désordres physiologiques pouvant avoir des répercussions plus ou moins sévères sur la santé. Il s'agit par exemple de la malabsorption de la vitamine B<sub>12</sub>, des graisses et des sucres (glucose, galactose, fructose), de la perturbation de l'équilibre hydrique et électrolytique, mais aussi de l'implantation de micro-organismes inhabituels et/ou pathogènes (Gorbach, 1971).

### 3.7.3. Facteurs de contrôle de la flore intestinale

Indépendamment du régime alimentaire des parents, la flore intestinale est constituée dès les premiers jours de la vie suivant un mécanisme caractéristique. La colonisation commence par l'apparition des germes du genre *Bifidobacterium* et atteint, dans les cinq premiers jours après la naissance,  $10^9$  à  $10^{10}$  germes / ml. Après, apparaissent les *Lactobacillus*, les coques anaérobies et les clostridies. Le nombre des clostridies, contrairement à celui des autres espèces qui continuent à proliférer, chute de manière drastique après les deux premières semaines de la vie (Gustafsson, 1982).

Cependant, après la phase de colonisation, la flore intestinale devient pratiquement stable. En effet, alors que la division microbienne dans les milieux de culture *in vitro* a lieu toutes les 20 à 30 minutes, la fréquence de la division bactérienne dans le tractus gastro-intestinal est extrêmement faible (0.5 à 1.4 divisions par jour chez les hamsters et les cobayes), mais suffisante pour assurer le remplacement continu de l'énorme masse de bactéries éliminée quotidiennement par l'intermédiaire de la défécation (Gorbach, 1971).

La stabilité de la flore intestinale est assurée par une régulation quantitative et qualitative, effectuée grâce à l'intervention de nombreux facteurs exogènes et endogènes. L'acidité gastrique, la rapidité du transit intestinal, la présence des sels biliaires (certains ont une activité bactériostatique) et des acides organiques, l'espace vital limité, de même que la motilité intestinale sont les principaux facteurs responsables du contrôle de la croissance des bactéries dans le tube digestif (Gorbach, 1971). Le potentiel redox (Eh) et surtout l'anaérobiose sont également des facteurs de régulation de la microflore. La variation du potentiel redox (Eh), de -50 mV à +300 mV, a une influence relativement très faible sur la croissance de *Bacteroides fragilis*, une des bactéries abondamment présentes dans le côlon, alors que l'augmentation de la teneur du milieu de culture en oxygène provoque une chute drastique des mêmes populations (Onderdonk et coll., 1976).

Malgré cette régulation biologique, on peut trouver, même chez les individus en bonne santé, des variations dans la composition quantitative et qualitative de la flore intestinale. En effet, une étude des matières fécales fraîchement récoltées chez 7 volontaires et cela 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 coll., 1994). Il existe également des situations pour lesquelles la flore peut subir des modifications plus ou moins importantes. Par exemple, la composition de la flore peut être différente d'une région géographique à une autre (Gustafsson, 1982). Elle peut aussi être affectée par le type d'alimentation, la durée du transit colique, certains facteurs d'origine génétique, et surtout par les antibiotiques à large spectre (Phillips, 1984).

#### 3.7.4. Rôle de la flore intestinale dans le métabolisme intra-luminal du côlon

La flore intestinale, contrairement aux cellules hépatiques qui réalisent principalement des réactions de conjugaison et d'oxydation, effectue essentiellement des réactions d'hydrolyse et de réduction, contrôlées par des enzymes. Les activités des cinq principales enzymes de la microflore, exprimées en nombre de micromoles de substrat dégradé par heure et par  $10^{11}$  bactéries ( $\mu\text{mol} / \text{h} / 10^{11}$  bactéries), sont représentées dans le tableau 6.

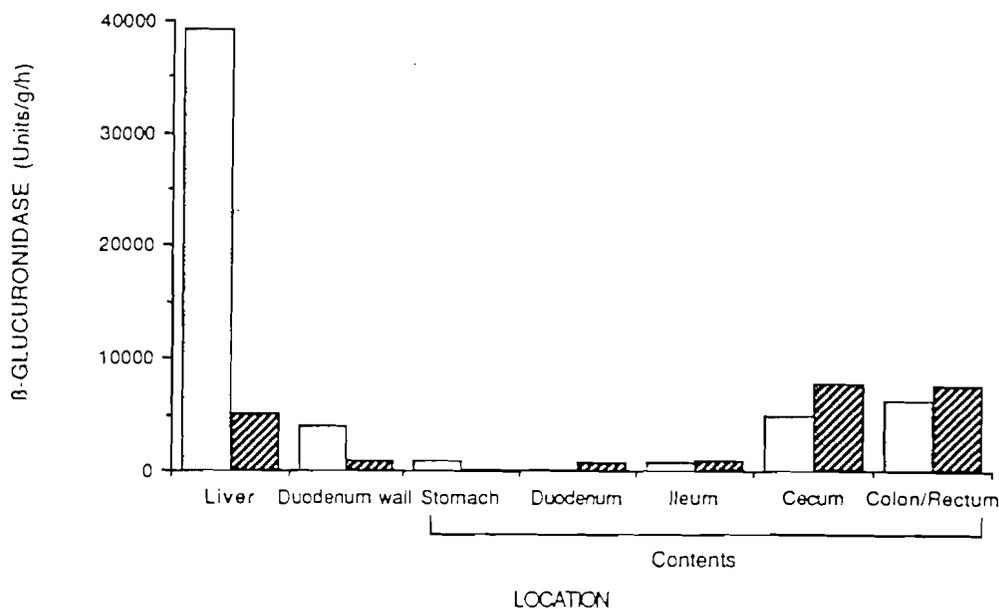
**Tableau 6 :** Activités des cinq principales enzymes de la flore intestinale ( $\mu\text{mol} / \text{h} / 10^{11}$  bactéries), déterminées à partir des matières fécales humaines fraîchement recueillies (Rumney et Rowland, 1992).

Enzymes	Exemple de Substrat	Activité ( $m \pm SD$ )
$\beta$ - glucosidase	p-Nitrophényl- $\beta$ -glucopyranoside	$18.3 \pm 9.6$
$\beta$ -glucuronidase	p-Nitrophényl- $\beta$ -glucuronide	$13.7 \pm 7.6$
Azo réductase	Amarante	$1.3 \pm 1.0$
Nitrate réductase	Nitrate	$5.1 \pm 4.9$
Nitroréductase	p-Nitrophénol	$0.5 \pm 0.4$

##### 3.7.4.1. Métabolisme des résidus alimentaires

Les bactéries tirent principalement leur source d'énergie de la dégradation des oligo- et des polysaccharides (ou carbohydrates) qui commence toujours par l'intervention des  $\beta$ -

glycosidases (glucosidase, galactosidase) et des  $\beta$ -glucuronidases (glucuronidase), enzymes clivant les liens  $\beta$ -osidiques. Comme on peut le voir sur la figure 7, les fluides de l'intestin grêle, contrairement à ceux du côlon, ne renferment pas des quantités suffisantes de  $\beta$ -glycosidases ni de  $\beta$ -glucuronidases. La majorité des polysaccharides et des mucopolysaccharides échappent donc à la digestion intestinale et arrivent intacts dans le côlon. A cet endroit, un certain nombre d'entre eux sont hydrolysés par les glycosidases de la flore intestinale et fermentés finalement en acides organiques, en dioxyde de carbone, en hydrogène, en méthane et en sulfure d'hydrogène. C'est le cas par exemple de l'amylose, de l'amylopectine, des arabinogalactans, du sulfate de chondroïtine, des chitosans, des dextrans, des gommés guar, locuste et adragante, de l'héparine, des hyaluronates, de la laminarine, des mucines, des pectines, des polygalacturonates, des xylans (Salyers et coll., 1977), de l'amidon, des arabinoxylans, des polydextroses et de l'inuline (Wang et Gibson, 1993).

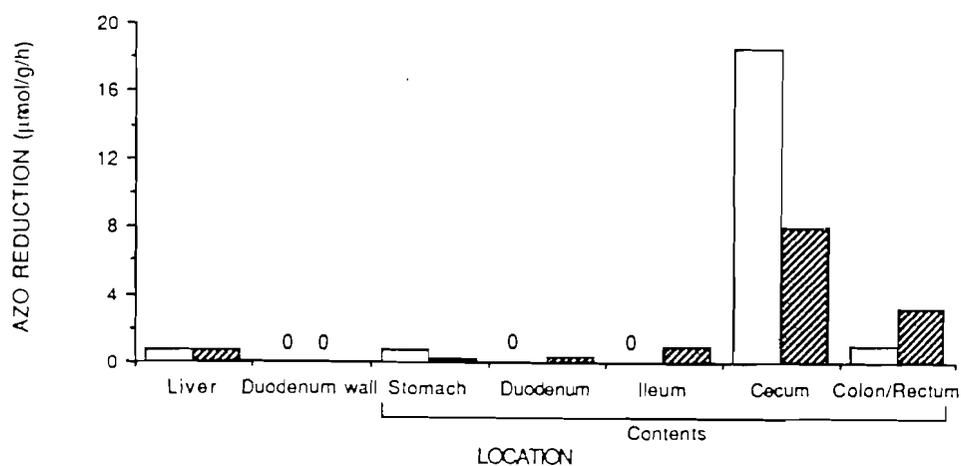


**Figure 7 :** Activités ( $\mu\text{mol} / \text{g} / \text{h}$ ) de la  $\beta$ -glucuronidase dans les différentes parties du tractus gastro-intestinal du rat (▨) et du lapin (■). Les résultats sont exprimés en nombre de micromoles ( $\mu\text{mol}$ ) de substrat (phénolphthaléine  $\beta$ -D-glucuronide) hydrolysé par gramme (g) de contenu et par heure (h) (Friend, 1991a).

La digestion des protéines (environ 12 g par jour), d'origine alimentaire ou endogène, constitue aussi une source importante d'énergie et de nutriments pour la microflore. Par ailleurs, la dégradation microbienne des protéases gastriques, intestinales et pancréatiques

comme la trypsine, la chymotrypsine et l'élastase, explique la meilleure stabilité des peptides et des protéines dans le côlon. De plus, la flore intestinale intervient énormément dans la métabolisation des bilirubines, des acides biliaires, du cholestérol, des hormones stéroïdiennes et des acides gras (Gustafsson, 1982).

Un certain nombre de dérivés azoïques ont été utilisés comme colorants dans l'industrie alimentaire. Ils sont très stables en milieu stomacal et intestinal mais subissent une métabolisation intensive dans le côlon en amines aromatiques primaires, incriminées dans la toxicité des colorants azoïques. Cela est dû au fait que les azo réductases, enzymes dégradant les dérivés azoïques, sont uniquement présentes dans la lumière colique (figure 8), dans la mesure où elles sont seulement sécrétées par certaines bactéries de la flore intestinale.



**Figure 8 :** Activités ( $\mu\text{mol} / \text{g} / \text{h}$ ) de l'azo réductase dans les différentes parties du tractus gastro-intestinal du rat (▨) et du lapin (■). 0 = non détecté. Les résultats sont exprimés en nombre de micromoles ( $\mu\text{mol}$ ) de substrat (1,2 diméthyl-4-(4-carboxyphénylazo)-5-hydroxibenzène) réduit par gramme (g) de contenu et par heure (h) (Friend, 1991a).

#### 3.7.4.2. Métabolisme des médicaments

La flore intestinale peut intervenir dans le métabolisme de certains médicaments (tableau 7) et déterminer ainsi leur biodisponibilité et leur activité pharmacologique. Par exemple, la métabolisation de la digoxine, de la L-Dopa, du dinitrate d'isosorbide, du

métronidazole, de la sulphinpyrazone et de la flucytosine par la flore intestinale se traduit généralement par la diminution de leur biodisponibilité et la perte de leur activité. Par contre, l'hydrolyse des hétérosides cardiotoniques et des laxatifs du séné par les  $\beta$ -glycosidases d'une part, et la réduction de la salazopyrine par l'azo réductase d'autre part, permet la libération des métabolites actifs (Shamat, 1993).

**Tableau 7 :** Quelques exemples de réactions métaboliques de la flore intestinale et leur substrat médicamenteux (Shamat, 1993).

Type de réactions	Substrat	Exemples
<b>Réductions</b>	Dérivés nitroso	Clonazépan
	Sulfoxides	Sulindac
	21-Hydroxycorticoïdes	Aldostérone
	Double liaisons	Digoxine
	Dérivés azoïques	Prontosil
<b>Hydrolyses</b>	Esters de nitrates	Glycéril trinitrate
	Esters Sulfatés	Picosulfate de sodium
	Esters de succinates	Carbénoxolone
	Amides	Méthotrexate
	Glucuronides	Morphine Glucuronide
	Glucosides	Sénosides
<b>Retraits de groupes fonctionnels</b>	N – Déalkylation	Méthamphétamine
	Déamination	Flucytosine
<b>Autres réactions</b>	Ruptures des liens hétérocycliques	Lévamisole
	Clivages des chaînes latérales	Stéroïdes

## 4. Méthodes de délivrance des médicaments dans le côlon

### 4.1. Formes rectales

L'administration rectale a été la première méthode utilisée pour délivrer directement les médicaments dans le côlon. Malheureusement, en plus de l'inconfort ressenti par les patients, les solutions rectales ne permettent pas de réaliser une perfusion satisfaisante du côlon. En effet, l'administration de 50 ml d'Enema (solutions pour micro-lavements) à des volontaires sains a seulement permis de perfuser le rectum et le côlon sigmoïde et même, celle de 200 ml n'a pas permis d'effectuer une perfusion au delà du côlon transverse (Hardy et coll., 1986).

Les limitations de l'administration rectale ont fait apparaître très vite la nécessité de développer des systèmes per os capables de libérer spécifiquement leurs principes actifs dans le côlon. Les différentes approches visant à formuler de tels systèmes sont toutes basées sur l'utilisation des principales caractéristiques physiologiques du tractus gastro-intestinal telles que le pH, les durées de transit, le potentiel redox et la flore intestinale (Friend, 1991; Duchêne et Ponchel, 1993; Wikberg et coll., 1997; Watts et Illum, 1997).

### 4.2. Approches basées sur l'utilisation des variations du pH

Dans le paragraphe 3.4, nous avons vu que les valeurs du pH de l'iléon terminal ( $7.5 \pm 0.5$ ) sont supérieures à celles des autres parties du tractus gastro-intestinal. Les enrobages entériques, qui sont imperméables en milieu acide d'une part, et qui se désintègrent aux valeurs du pH de l'intestin grêle d'autre part, devraient donc permettre de délivrer leur principe actif dans le côlon sous certaines conditions. Les enrobages entériques peuvent être préparés à partir de polymères filmogènes contenant des groupements carboxyliques ionisables aux valeurs du pH intestinal.

Il existe sur le marché plusieurs types de polymères entériques, mais les plus étudiés pour la délivrance colonique des médicaments sont les dérivés acryliques, vendus sous le nom d'Eudragits® par la firme Röhm GmbH, Pharma Polymers (Darmstadt, Allemagne). Il s'agit des Eudragits® L100-55, L100 et S100. L'Eudragit® L100-55 ou le poly(MA-EA) 1:1 (type A), qui est aussi vendu sous forme de dispersion aqueuse à 30 % m/m (Eudragit L30D), est un

copolymère d'acides méthacryliques (MA) et d'éthacrylate (EA) dont le pH de dissolution est de 5.5. Les Eudragits® L100 et S100 sont des copolymères d'acide méthacrylique (MA) et de méthylméthacrylate (MMA). Le pH de solubilité de l'Eudragit® L100 ou le poly(MA-MMA) 1:1 (type B) est de 6.0 et celui de l'Eudragit® S100 ou le poly(MA-MMA) 1:2 (type C) est de 7.0 (Lehmann, 1989; 1997). Les dénominations type A, B et C font référence à celles de l'USP XXIII / NF XVIII (1995).

Steed et coll. (1994) ont étudié par scintigraphie gamma sur 8 volontaires sains, le site de libération et de désagrégation des comprimés de dipropionate de béclo méthasone enrobés avec l'Eudragit® L 100 -55. Après administration à jeun, la désagrégation des comprimés et la libération des traceurs, qui commencent toujours dans l'intestin grêle, se terminent soit dans l'iléon terminal, soit dans le côlon proximal. Après avoir administré à 5 volontaires sains, à jeun, des microsphères d'Eudragit® RS - Sulphapyridine marquées à l'aide du <sup>99m</sup>Tc et enrobés avec l'Eudragit® S, Watts et coll. (1994) ont également observé que les endroits de désagrégation se situent essentiellement au niveau du caecum et du côlon ascendant. Des comprimés de nisine (un peptide antimicrobien), enrobés à l'aide de l'Eudragit® L30D ont aussi été administrés par voie orale à des volontaires. Le site de désagrégation des comprimés, qui est essentiellement le côlon, dépend fortement de l'épaisseur de l'enrobage. Les comprimés faiblement enrobés (0.381 mm d'épaisseur) se sont désagrégés dans le côlon ascendant alors que ceux qui ont été enrobés avec des couches plus épaisses (0.956 et 1.313 mm épaisseur) ont été expulsés du tractus gastro-intestinal avant le début de leur désagrégation (Habib et Sakr, 1998).

Les performances coloniques de comprimés d'acide salicylique enrobés à l'aide de l'Eudragit® S ont aussi été étudiées par Ashford et coll. (1993a,b). En imitant, *in vitro*, le profil du pH gastro-intestinal, ces auteurs ont pu montrer que le temps de latence (début de la libération) ainsi que la vitesse de dissolution de l'acide salicylique dépendent à la fois de l'épaisseur de l'enrobage, de la valeur du pH et de la composition du milieu de dissolution. Les études de scintigraphie gamma ont démontré que, bien que le côlon ait été le site de désagrégation des comprimés enrobés avec l'Eudragit® S, le temps et surtout l'endroit du délitage sont extrêmement variables, allant de la jonction iléo-caecale à l'anse splénique. Les auteurs de cette étude estimèrent qu'un tel manque de contrôle du site de désagrégation, dû aux variations inter- et intra-individuelles des valeurs du pH et, particulièrement, à la chute

brutale de celles-ci au niveau du caecum, compromet l'usage des polymères entériques pour la délivrance spécifiques des médicaments dans le côlon.

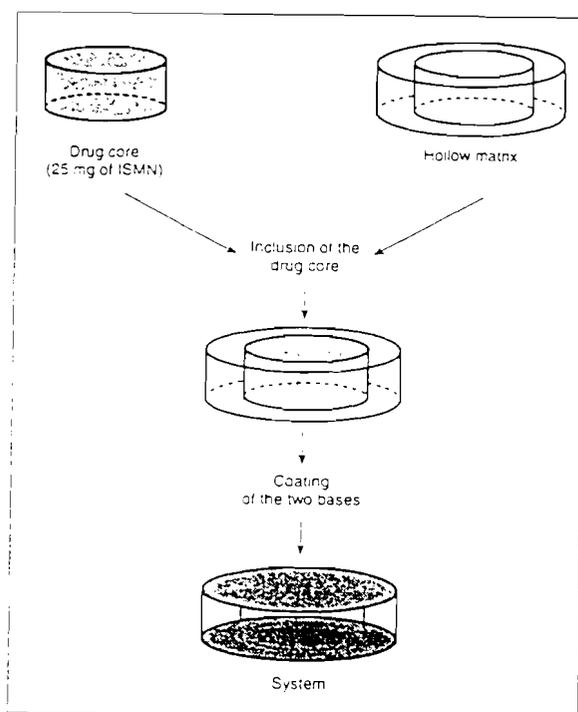
Récemment, Leopold et Eikeler (1998a,b) ont eu l'idée d'exploiter la chute du pH dans le caecum pour déclencher la libération des médicaments à ce niveau, grâce à l'utilisation de l'Eudragit® E, un polymère acrylique qui se dissout à des valeurs de pH inférieures à 5. Des mini-comprimés de dexaméthasone ont été successivement enrobés, de l'intérieur vers l'extérieur, avec de l'Eudragit® E, de l'hydroxypropylcellulose (HPC) et d'un polymère entérique (acétosuccinate d'hydroxypropylméthylcellulose, HPMC-AS) qui assure la protection des comprimés pendant leur séjour gastrique. Ainsi, dans l'intestin grêle, l'enrobage entérique va se dissoudre, de même que la couche hydrosoluble d'HPC, mettant à nu la couche d'Eudragit® E qui va assurer la protection des noyaux jusqu'au caecum. Le pH étant très bas à ce niveau, surtout en cas de maladies coliques où il peut descendre jusqu'à des valeurs de 2.3 à 4.7, la couche d'Eudragit® E va se dissoudre et permettre la libération du principe actif. Les études *in vitro*, effectuées sur ces comprimés enrobés, ont effectivement montré, qu'en fonction de l'épaisseur des enrobages, la libération des principes actifs commence après un temps de latence extrêmement élevé (de 0 à 70 heures) à pH 6.8, mais très court (de 0 à 1 heure) à pH inférieur à 5.0. Il faut cependant reconnaître que la dissolution du film d'Eudragit® E dans le caecum risque d'être compromise car le pH qui prévaut normalement à ce niveau est de l'ordre de 6 (conf. paragraphe 3.4).

#### **4.3. Approches basées sur l'utilisation des durées du transit**

Les temps de transit des formes pharmaceutiques à travers l'estomac et le côlon sont très variables et fortement influencés par de nombreux facteurs exogènes et endogènes alors que la durée du transit dans l'intestin grêle est assez constante, de 3 à 4 heures en moyenne (paragraphe 3.5). Dès lors, en protégeant efficacement les noyaux lors du séjour gastrique par un enrobage entérique adéquat, une forme programmée pour libérer son contenu 3 à 4 heures après qu'elle ait quitté l'estomac, devrait libérer le principe actif à l'entrée du côlon. En effet, après avoir administré oralement à des rats, des granules préparés à partir du 5-fluorouracil et du HPMC (Methocel K100M), enrobés avec de l'Eudragit® S, Ciftci et Groves (1996) ont

constaté que l'apparition du principe actif dans les tissus correspondait à l'arrivée des granules dans le caecum (6 à 8 heures après administration).

Vandelli et coll. (1996) ont élaboré un système d'enrobage particulier consistant en un cylindre creux obtenu par compression d'une poudre d'hydroxypropylcellulose (HPC) de haute viscosité, dans lesquels ils ont judicieusement inséré des comprimés de 5-nitrate d'isosorbide. Les surfaces inférieures et supérieures ont été ensuite enrobées avec une couche imperméable d'acétate de polyvinyl (figure 9). Le système ainsi conçu a permis de libérer le principe actif après un temps de latence contrôlable par ajustement de l'épaisseur du cylindre de HPC. Le temps de latence correspond en fait au temps nécessaire à la solvataion et à l'érosion de la couche de HPC.



**Figure 9 :** Préparation du système de Vandelli et coll. (1996).

Un système semblable a été développé par Gazzaniga et coll. (1994). Il s'agit des comprimés de kétoprofène enrobés avec 3 couches : une couche extérieure entérique (Eudragit® L) qui assure la protection des comprimés dans l'estomac, une couche intermédiaire de HPMC qui gonfle et s'érode lentement pour fournir un temps de latence de 3 à 4 heures et enfin, une couche intérieure entérique (Eudragit® S) qui fournit une garantie

supplémentaire au cas où, par accident, les deux couches extérieures se désagrègeraient prématurément dans l'estomac. Etant donné que la technique de fabrication des formes de Gazzaniga est plus difficile à automatiser, Sangalli et coll. (1998) et Maroni et coll. (1998) ont utilisé la technique du lit d'air fluidisé pour déposer la couche de HPMC et celles des polymères entériques. L'évaluation *in vitro* et *in vivo* de ces formulations, appelées systèmes Chronotropic<sup>®</sup>, a montré que la libération du traceur a lieu après un temps de latence fortement dépendant de l'épaisseur de la couche de HPMC (Sangalli et coll., 1998).

Des mini-gélules (Minicaps<sup>®</sup>) renfermant de la vasopressine ont été successivement enrobées avec de l'acétophthalate de cellulose (enrobage entérique) et des mélanges d'Eudragit<sup>®</sup> NE et S. La forme ainsi obtenue permettait la libération de la vasopressine après un temps de latence préprogrammé et suivant une cinétique contrôlable. L'évaluation *in vivo* de ces gélules chez le rat a permis de montrer que l'excrétion urinaire de la vasopressine augmentait progressivement pour atteindre un plateau après la 6<sup>ème</sup> heure d'administration, durée correspondant au temps de transit bouche à caecum (Rao et Ritschel, 1992).

Le système Time Clock<sup>®</sup>, renfermant de l'acide 5-amino-salicylique (5-ASA), a été aussi développé et étudié par "pharmaco-scintigraphie" chez l'homme. Il s'agit de comprimés enrobés avec un mélange de matériaux hydrophobes (cire de carnauba), de surfactifs (monooléate de sorbitane polyoxyéthyléné) et de polymères hydrosolubles (HPMC), le tout étant finalement pelliculé à l'aide d'un polymère entérique. Après administration orale et dissolution de l'enrobage entérique externe dans l'intestin grêle, le système commence à libérer la 5-ASA après un temps de latence préprogrammé. Les résultats pharmacocinétiques de la 5-ASA ont montré aussi que le site principal de libération est le côlon (Wilding et coll., 1994; Steed et coll., 1997).

Ishibashi et coll. (1998) ont enrobé successivement, des gélules renfermant de la théophylline et des acides organiques (acide maléique, tartrique, citrique, succinique ou fumarique), avec de l'Eudragit<sup>®</sup> E 100 (soluble à pH inférieur à 5), du HPMC et du HPMC-AS (enrobage entérique). Dans l'intestin grêle, l'enrobage entérique et la couche de HPMC se dissolvent rapidement et le liquide intestinal peut pénétrer par diffusion dans la gélule. La dissolution des acides organiques va créer un micro - environnement acide qui va entraîner la dissolution de la couche d'Eudragit<sup>®</sup> E, permettant ainsi la libération du traceur après un

temps de latence programmé et imposé par l'épaisseur des différentes couches d'enrobage, mais aussi par la nature et la quantité d'acide organique présent dans la gélule.

Le système TES (time-controlled explosion system) est une autre formulation caractérisée par une libération rapide du médicament après un temps de latence préprogrammé. Il est constitué d'un noyau neutre enrobé successivement avec la couche de principe actif, une couche gélifiante d'hydroxypropylcellulose (HPC) et enfin, une pellicule d'éthylcellulose. Dans le milieu gastro-intestinal, l'eau peut pénétrer par diffusion jusqu'à la couche gélifiante. Celle-ci va gonfler et créer une pression qui va provoquer la rupture de la membrane externe d'éthylcellulose et, de ce fait, la libération du principe actif. Le temps de latence de la libération, imposé par l'épaisseur de la membrane d'éthylcellulose, permet de contrôler *in vivo* le site du largage du principe actif (Murata et coll., 1998).

Takaya et coll. (1995) ont enrobé les faces intérieures des gélules de gélatine avec des couches d'éthylcellulose, d'épaisseurs variables. Les gélules ont ensuite été remplies avec le principe actif (recombinat human granulocyte colony-stimulating factor, rhG-CSF) et le traceur (fluorescéine), préalablement solubilisés dans du propylène glycol. Après administration orale à des chiens, l'apparition du traceur et du principe actif dans la circulation sanguine était en accord avec la durée du transit bouche à caecum. Muraoka et coll. (1998), en utilisant un système semblable, ont pu obtenir une libération plus sélective de la caféine dans le côlon de volontaires sains. Ils ont suggéré que la pression intra-luminale du côlon, qui est plus élevée que celle des autres parties du tube digestif, était responsable de l'éclatement des gélules dans le gros intestin.

Le système Pulsincap<sup>®</sup>, mentionné dans la revue de Watts et Illum (1997), est constitué d'une gélule dont le corps est imperméable à l'eau. Après remplissage du médicament, le corps de la gélule est fermé avec un "bouchon" constitué d'un polymère hydrophile présentant un certain pouvoir gélifiant. La gélule est ensuite enrobée entièrement à l'aide d'un polymère entérique afin d'éviter la libération prématurée du principe actif chez les sujets présentant un transit gastrique anormalement lent. Après administration orale et dissolution de l'enrobage entérique dans l'intestin grêle, le bouchon peut absorber progressivement de l'eau, gonfler et lorsque le gonflement aura atteint un point critique (temps de latence), il sera expulsé du corps de la gélule qui pourra ainsi libérer son contenu dans le côlon.

Enfin, certaines pompes osmotiques (OROS-CT, OSMET-CT), enrobées avec un polymère entérique, peuvent délivrer plus sélectivement leurs principes actifs dans le côlon. Un gel neutre, ne contenant pas de substance active, est généralement placé de manière adjacente à l'orifice de sortie, juste avant la couche du principe actif. Après la dissolution de l'enrobage entérique dans l'intestin grêle, 3 à 4 heures seront nécessaires pour expulser le gel neutre. Ensuite, le système commencera à libérer le principe actif dans le côlon à vitesse constante (Theeuwes et coll., 1993).

#### **4.4. Approches basées sur l'utilisation du potentiel redox**

Etant donné que le potentiel redox du côlon est beaucoup plus négatif que celui rencontré dans les autres parties du tube digestif (paragraphe 3.6), différents auteurs ont évalué le potentiel colonique de certains polymères contenant des ponts disulfures (-S-S-) (Watts et Illum, 1997). Il s'agit essentiellement de polymères obtenus par copolymérisation du propionate du 3,3'-dithiodisuccinimidyl avec l'oxyde d' $\alpha,\omega$ -bisaminopropyl polytétraméthylène et du diamine de tétraéthylèneglycol. Les comprimés enrobés avec ces polymères présentent la propriété de se désagréger rapidement lorsqu'ils sont incubés dans les systèmes de fermentation simulant l'environnement anaérobie et réducteur du côlon. Ces polymères, qui ne présentent pas de toxicité aiguë chez le rat sont donc prometteurs, même si les études de scintigraphie gamma réalisées chez l'homme ont montré que le site de désagrégation des comprimés enrobés était très erratique: certains se sont délités dans le côlon ascendant ou transverse, alors que d'autres ont été expulsés avant que débute la désagrégation.

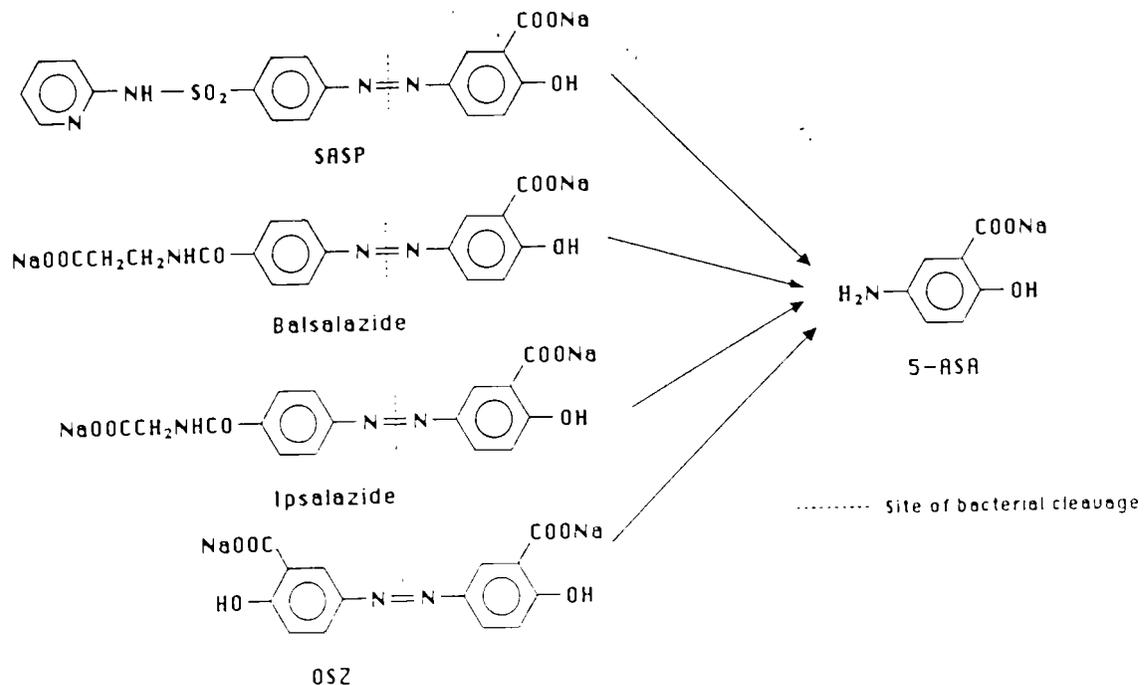
#### **4.5. Approches basées sur l'utilisation de l'activité enzymatique de la flore intestinale**

La dernière caractéristique, distinguant fondamentalement le côlon des autres parties du tube digestif, est la présence de la flore microbienne anaérobie et ses enzymes hydrolytiques et réductrices (paragraphe 3.7). Les enzymes les plus représentatives sont d'une part, les azo réductases qui réduisent les dérivés azoïques en amines aromatiques primaires et d'autre part, les polysaccharidases (glycosidases et les glycuronidases) qui hydrolysent les liens osidiques des carbohydrates. En se basant sur les différentes enzymes de la flore

intestinale, il serait donc possible de déclencher la libération des principes actifs dans le côlon, soit à partir de prodrogues, soit à partir de formes matricielles ou enrobées.

#### 4.5.1. Approches basées sur l'utilisation de l'activité des azo réductases

##### 4.5.1.1. Les prodrogues azoïques



**Figure 10** : Les structures chimiques 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 de l'acide 5-aminosalicylique (5-ASA) (Friend, 1991).

La prodrogue azoïque la mieux connue et la plus ancienne est la sulfasalazine ou salazopyrine, médicament initialement développé pour le traitement des arthrites rhumatoïdes et qui s'est avéré très efficace dans le traitement des maladies inflammatoires du côlon. Après administration orale, la majeure partie de la sulfasalazine échappe à l'absorption intestinale et se retrouve dans le côlon, où elle est réduite par la flore anaérobie en ses deux composants, la sulfapyridine et l'acide 5-aminosalicylique (5-ASA) (figure 10). La 5-ASA est la partie active de la molécule mais malheureusement, la sulfapyridine, l'autre métabolite, est résorbée par la muqueuse colique et est responsable des nombreux effets secondaires systémiques de la sulfasalazine.

Dès lors, une nouvelle génération de prodrogues de la 5-ASA, présentant moins d'effets adverses que la sulfasalazine, a été développée. Il s'agit de l'olsalazide, un dimère de la 5-ASA, de l'ipsalazide et de la balsalazide (figure 10). Dans ces deux dernières molécules, la 5-ASA est respectivement liée à la 4-aminobenzoylglycine et à la p-aminohippurate par un pont azoïque. Les études cliniques ont montré que l'olsalazide est aussi efficace que la sulfasalazine dans le traitement de la colite ulcéreuse (Sandberg-Gertzén et coll., 1988; Willoughby, 1988). D'autre part, cette substance présente plus d'avantages sur le plan toxicologique et pharmacologique lors des traitements à long terme (Campbell et Berlingdh, 1988).

La 5-ASA a été aussi reliée à des transporteurs polymériques via des ponts azoïques. Cependant, sa libération à partir des dérivés polymériques incubés dans les systèmes de fermentation *in vitro*, était généralement plus lente que celle obtenue avec la sulfasalazine et dépendait fortement de la structure du polymère (Schacht et coll., 1996). Afin d'améliorer les performances coloniques des prodrogues polymériques de la 5-ASA, Kopecek et coll. (1992) et Kopeckova et coll. (1994) ont élaboré des copolymères bioadhésifs de la N-(2-hydroxypropyl) méthacrylamide. La bioadhésion, due à la présence des groupements fucosylamines accrochés latéralement à la chaîne polymérique, a en effet permis d'augmenter le temps de rétention de la prodrogue dans le côlon du cobaye.

Bien que les prodrogues peuvent permettre une délivrance colonique des médicaments, il faut cependant reconnaître que, comparées aux formes matricielles ou enrobées qui ont la faculté de véhiculer tous les principes actifs vers le côlon, elles présentent deux inconvénients majeurs : celui d'apparaître comme une entité chimique entièrement nouvelle avec des difficultés supplémentaires engendrées lors de la demande de l'autorisation de mise sur le marché, et celui d'exiger, pour chaque principe actif, la mise au point d'un nouveau procédé de synthèse.

#### 4.5.1.2. Les polymères azoïques ou azo polymères

En 1986, des azo polymères de polystyrène et d'hydroxyéthyl méthacrylate, réticulés avec du divinyl azobenzène, ont été synthétisés et utilisés pour enrober des gélules et des pellets d'insuline et de vasopressine. Saffran et coll. (1986) ont observé un retard de la

libération et de l'absorption des polypeptides après leur administration orale chez le rat. De plus, les gélules d'insuline ont également permis d'abaisser significativement la glycémie chez les chiens diabétiques (Saffran et coll., 1990; 1991). Par la suite, les études de scintigraphie gamma, réalisées toujours sur des chiens, ont montré que les gélules enrobées traversaient intactes l'estomac et l'intestin grêle et s'ouvraient dans le côlon pour y déverser leur contenu (Saffran et coll., 1997). Ces résultats ont conduit les auteurs à conclure que la libération des polypeptides dans le côlon était due à la dégradation bactérienne des enrobages constitués par les azo polymères.

Cependant, Saffran et ses collaborateurs n'ont pas démontré de manière irréfutable que la dégradation bactérienne était l'activateur de la libération des principes actifs dans le côlon. La libération pouvait notamment résulter d'un mécanisme dépendant du temps (Lloyd et coll., 1994). Afin de permettre une conception plus rationnelle des azo polymères destinés à la délivrance colonique des médicaments, l'azo réduction bactérienne et les principaux facteurs susceptibles de l'influencer ont été récemment étudiés par différents auteurs (Bragger et coll., 1997; Pierre et Semdé, 1997; Semdé et coll., 1996; 1998a). D'autre part, de nombreux azo polymères ont été synthétisés et leurs propriétés physiques (gonflement dans l'eau, perméabilité des films à l'eau ou aux substances actives) ainsi que leur dégradation bactérienne, de même que la libération des traceurs à partir de formes enrobées, ont été étudiées (Van den Mooter et coll., 1997).

Des copolymères du 2-hydroxyéthyl méthacrylate (HEMA) et du méthyl méthacrylate (MMA) et des terpolymères de HEMA, de MMA et de MA (acide méthacrylique), faiblement réticulés avec des azobenzènes ont été évalués par Van den Mooter et coll. (1992, 1994a,b,c). Ces auteurs ont démontré que la perméabilité des films obtenus à partir de ces copolymères, de même que leur dégradation bactérienne (décoloration, perte de poids, augmentation de la perméabilité), étaient plus importantes avec l'augmentation de la teneur en monomères hydrosolubles (HEMA). De plus, les terpolymères formaient des films imperméables dans les milieux simulant les fluides gastriques et duodénaux ( $\text{pH} < 6$ ), mais suffisamment accessibles aux azo réductases dans le côlon ( $\text{pH} > 6$ ), suite à l'ionisation des MA. Enfin, la libération de l'ibuprofène à partir des gélules enrobées avec certains de ces azo polymères était beaucoup plus rapide en présence des constituants du caecum du rat (98.7 % après 19 heures d'incubation contre 26.2 % dans le milieu contrôle). La libération de la théophylline à partir

des gélules enrobées et implantées dans le caecum du rat était également plus rapide que celle enregistrée après l'implantation des mêmes gélules enrobées dans l'intestin grêle.

Récemment, Kakoulides et coll. (1998a,b) ont synthétisé des polymères bioadhésifs d'acides acryliques réticulés avec du 4,4'-divinylazobenzène. Ils ont aussi démontré leur biodégradation par la flore bactérienne, mais également leur gonflement pH dépendant.

Des azo polymères linéaires, dans lesquels la fonction azoïque a été incorporée dans la chaîne principale de poly(éther-esters), ont également été étudiés (Van den Mooter 1994a; Kalala et coll., 1996). La synthèse de ce type de polymère, contrairement aux dérivés réticulés, permet l'incorporation de forte quantité de groupements azoïques sans compromettre les caractéristiques filmogènes des polymères résultants. Malheureusement, même si la libération de l'ibuprofène à partir des gélules enrobées était statistiquement plus rapide en présence du contenu caecal du rat, les différents azo poly(éther-esters) synthétisés étaient très hydrophobes et se dégradèrent très lentement.

Schacht et ses collaborateurs (1996) ont observé, après incubation de différents azo polyamides linéaires dans des systèmes de fermentation *in vitro*, que la dégradation des polymères hydrosolubles libérait des amines aromatiques primaires alors que celle des dérivés hydrophobes s'arrêtait au stade de la formation d'hydrazines. La réduction partielle des dérivés azoïques en hydrazines a par ailleurs été observée lors de l'incubation de certains composés hydrophobes non polymériques (Ueda et coll., 1996). Cependant, même si la réduction des azo polyamides hydrophobes en hydrazines n'entraîne pas leur dépolymérisation, elle peut provoquer des modifications physiques suffisamment importantes pour déclencher ou améliorer la libération des principes actifs enrobés dans l'environnement colique (Kimura et coll., 1992).

Finalement, des hydrogels basés sur la N,N-diméthylacrylamide, la t-terbutyl-acrylamide et l'acide acrylique, réticulés avec des dérivés azoïques ont aussi été évalués (Brondsted et Kopecek, 1991; 1992; Kopecek et coll., 1992; Yeh et coll., 1995). Il a été notamment démontré que le gonflement de ces hydrogels était faible en milieu acide, mais suffisamment important aux valeurs du pH du côlon pour faciliter la pénétration des azo réductases. Mais, malgré cette optimisation, la dégradation bactérienne des hydrogels, qui

L'essence de menthe (menthol), utilisée comme spasmolytique dans le traitement du côlon irritable, a aussi été liée au  $\beta$ -D-glucuronide (Nolen et Friend, 1994). La prodrogue ainsi préparée est très stable dans le milieu stomacal et intestinal du rat et subit une hydrolyse importante dans le caecum ( $6.26 \pm 2.88$  nmol / min / mg) et dans le côlon ( $2.34 \pm 1.22$  nmol / min / mg). Bien que cette hydrolyse est relativement plus faible en présence de la flore fécale humaine ( $0.52 \pm 0.46$  nmol / min / mg), les auteurs estiment que son utilisation dans le traitement du côlon irritable peut être sérieusement envisagée.

Une autre substance anti-inflammatoire, l'acide biphénylacétique, a été conjuguée aux groupes hydroxyles primaires des  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$ -cyclodextrines via des liens esters ou amides (Hirayama et coll., 1998; Minami et coll., 1998). Après administration orale à des rats de laboratoire, les prodrogues polymériques obtenues étaient stables dans l'estomac et l'intestin grêle mais s'hydrolysaient dans le côlon. Certaines des prodrogues ont manifesté une très bonne efficacité pour le traitement du syndrome du côlon irritable, efficacité très supérieure à celle de l'acide biphénylacétique libre.

#### 4.5.2.2. Les matrices et les enrobages à base de polysaccharides

Un certain nombre de polysaccharides, dégradés par la flore intestinale ont été évalués quant à leur aptitude à délivrer spécifiquement les médicaments dans le côlon. L'avantage majeur de ces matériaux réside dans le fait qu'ils sont déjà utilisés comme excipients pharmaceutiques. Malheureusement, les polysaccharides sont généralement très 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. Pour contrecarrer ce problème d'hydrosolubilité, divers artifices, comprenant leur incorporation dans des polymères insolubles, leur modification physique ou chimique, ont été envisagés.

Par exemple, l'amylose, préalablement complexée avec du butane-1-ol, a été mélangée avec de l'éthylcellulose avant d'être utilisée pour enrober des pellets renfermant de l'acide 5-aminosalicylique (5-ASA) ou du glucose (Milojevic et coll., 1996a,b). Les enrobages mixtes, constitués du mélange Amylose / Ethylcellulose (1:4, m/m), ont permis de protéger les traceurs incorporés dans les milieux de dissolution simulant l'estomac et l'intestin grêle. D'autre part, une accélération importante de la libération des traceurs a été constatée lorsque

les pellets étaient incubés dans des systèmes de fermentation *in vitro*. De plus, il a été démontré que l'apparition du  $^{13}\text{CO}_2$  dans la respiration des volontaires ayant reçu oralement des microsphères du  $^{13}\text{C}$ -glucose enrobés avec le même mélange Amylose / Ethylcellulose correspondait parfaitement à l'arrivée des pellets dans le caecum (Cummings et coll., 1996). Les résultats semblent indiquer cependant que la dégradation de l'enrobage est plus lente *in vivo* qu'*in vitro*.

La gomme guar, un poly- $\beta$ -1,4-D-mannose linéaire portant latéralement des unités D-galactose, a été utilisée pour préparer des comprimés matriciels contenant des corticoïdes (dexaméthasone ou budésonide) ou de l'indométhacine. Comparée à la libération des principes actifs observée dans les milieux de contrôle, celle obtenue en présence des galactomannanases ou de contenu caecal de rat était significativement plus rapide (Wong et coll., 1997; Prasad et coll., 1998). Récemment, Gliko-Kabir et coll. (1998) ont préparé des dérivés moins hydrosolubles et biodégradables de la gomme guar par réticulation chimique avec de la glutaraldéhyde. Formulés sous formes matricielles, ces dérivés réticulés permettent de protéger pendant plus de 10 heures les principes actifs peu hydrosolubles (indométhacine, budésonide) alors que les substances extrêmement solubles comme le salicylate de sodium sont totalement libérées endéans les deux premières heures du test de dissolution. L'addition des enzymes dégradant la gomme guar (galactomannanases et  $\alpha$ -galactosidases) aux milieux de dissolution a permis d'accélérer considérablement la libération des traceurs à partir de ces formes.

L'incorporation de l'indométhacine dans des matrices de sulfate de chondroïtine réticulé avec des quantités croissantes de diaminododécane a permis à Rubinstein et coll. (1992a,b) de montrer que la vitesse de libération de l'indométhacine, qui diminue avec l'augmentation du degré de réticulation, est beaucoup plus importante en présence du contenu du caecum du rat.

De nombreux hydrogels biodégradables, obtenus par réticulation chimique des dextrans à l'aide des diisocyanates (Brondsted et coll., 1995; Simonsen et coll., 1995; Hovgaard et Brondsted, 1995), de la glutaraldéhyde (Hovgaard et coll., 1997; Brondsted et coll., 1998) ou du glycidyl méthacrylate (Hennink et coll., 1997) ont également été préparés. Leurs propriétés physiques (gonflement dans l'eau, résistance mécanique), de même que leur dégradation par les dextranases et par la flore intestinale, peuvent être contrôlées non

seulement par le choix de l'agent réticulant et le poids moléculaire du dextran mais aussi, par le degré de réticulation. Il a aussi été démontré que les traceurs (hydrocortisone, IgG) incorporés dans ces hydrogels sont plus rapidement libérés en présence des dextranases. Récemment, Brondsted et coll. (1998) sont parvenus à préparer des gélules imperméables, dont la paroi est constituée uniquement de dextrans réticulés avec la glutaraldéhyde. La libération de l'hydrocortisone à partir de ces gélules est presque instantanée en présence des dextranases.

L'inuline est un autre polysaccharide naturel qui a également été évalué pour son aptitude à délivrer spécifiquement les médicaments dans le côlon. Etant très hydrosoluble, il a été d'abord dispersé dans l'Eudragit® RS. Vervoort et Kinget (1995, 1996) ont ainsi pu mettre en évidence que sa dégradation *in vitro* par la flore fécale entraîne une augmentation de la perméabilité des films mixtes Inuline / Eudragit® RS. Par la suite, la réticulation de l'inuline avec le glycidyl méthacrylate a permis de préparer de nouveaux hydrogels susceptibles d'être dégradés par l'inuline, enzyme hydrolytique de l'inuline produite par la flore intestinale (Vervoort et coll., 1997; 1998a,b).

Les chitosans constituent un autre groupe de polysaccharides naturels très attractifs pour l'administration colonique des médicaments car, en plus de leur dégradation par la flore intestinale, ils possèdent des propriétés bioadhésives. Tozaki et coll. (1997) les ont utilisés pour préparer des gélules qu'ils ont ensuite enrobées avec une couche de phthalate d'hydroxypropylméthylcellulose (HPMCP). La libération *in vitro* de la 5 (6)-carboxyfluorescéine à partir de ces gélules était fortement accélérée par le contenu caecal du rat. D'autre part, après administration orale aux rats, surtout en présence du sodium glycocholate (promoteur d'absorption), l'apparition des effets hypoglycémiques coïncidait avec l'arrivée des gélules d'insuline dans le côlon. Des microsphères de chitosans, encapsulées dans de l'Eudragit® L et S, ont également été récemment développées par Lorenzo-Lamosa et coll. (1998) pour délivrer le diclofénac dans le côlon.

Enfin, les pectines, qui ont été l'objet de notre travail expérimental, constituent incontestablement le groupe de polysaccharides naturels le plus largement étudié en vue de la délivrance spécifique des substances actives dans le côlon.

## 5. Les pectines

### 5.1. Origine et production des pectines

Constituants majeurs de la paroi des cellules végétales, les pectines sont très abondantes dans la nature du fait qu'elles sont élaborées par tous les végétaux pour jouer le rôle de ciment intercellulaire et de maintien de la rigidité de la paroi cellulaire. Elles sont produites industriellement, essentiellement à partir de la pomme et des fruits des agrumes (citron, orange, pamplemousse), préalablement pressés. Leur extraction se fait à chaud, après traitement avec des solutions d'acides minéraux ( $\text{pH} \approx 2$ ). Elles sont ensuite clarifiées par filtration et par passage sur du carbone actif (élimination des colorants végétaux), précipitées par de l'alcool (isopropanol, éthanol, méthanol) ou de l'hydroxyde d'aluminium colloïdal, et finalement séchées et broyées. Les pectines ainsi obtenues ont un degré de méthylation élevé, d'environ 70 % m/m. Les dérivés de faible degré de méthylation peuvent être préparés par hydrolyse acide ou alcaline, soit avant, soit pendant la procédure d'extraction. Le traitement avec de l'ammoniaque permet la production des "pectines amidatées" et de faible degré de méthylation (May, 1990).

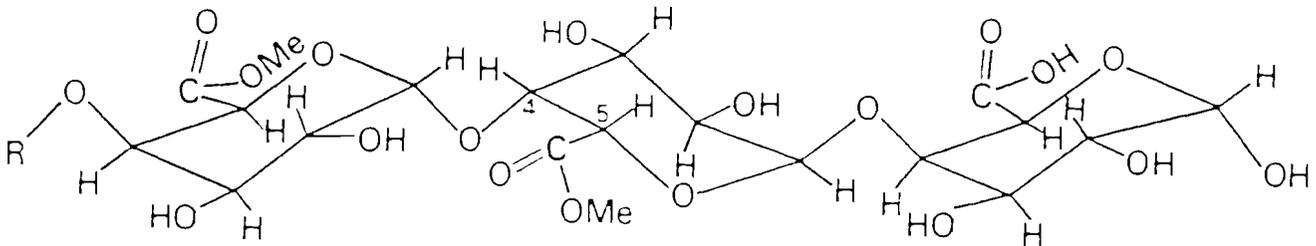
Selon l'origine végétale, la méthode d'extraction et les traitements ultérieurs, on peut aboutir à des produits présentant des propriétés physiques très différentes. Cependant, en mélangeant les produits obtenus à partir de différents lots de production et/ou en y ajoutant des sucres, les fabricants parviennent à standardiser les pectines mises sur le marché.

### 5.2. Structure chimique, caractérisation, dégradation chimique et enzymatique des pectines

#### 5.2.1. Structure chimique des pectines

Les pectines sont des polysaccharides linéaires, caractérisés par un pourcentage élevé d'acides galacturoniques (minimum, 65 % de la poudre desséchée), partiellement méthoxylés (figure 11). Il s'agit donc d'unités d'acides  $\alpha$  1-4 poly -D- galactopyranosyluroniques, partiellement estérifiés par du méthanol. Les hydroxyles en position  $C_2$  et  $C_3$  des unités d'acides galacturoniques, ainsi que la fonction carboxylique sont en position équatoriale alors que les hydroxyles en  $C_1$  et  $C_4$  sont en position axiale (Thibault, 1980). Les séquences d'acides galacturoniques sont souvent interrompues par des unités L-rhamnopyranosyl (liaison  $\alpha$  1-2),

appelées “coudes pectiques” du fait qu’à ce niveau, la molécule subit une déviation de  $90^\circ$  par rapport à son axe principal (Rees et Wight, 1971). Sur le plan conformationnel, les études de diffraction aux rayons X ont permis de proposer une structure en triple hélice pour le pectate de sodium (Palmer et Hartzog, 1945).



**Figure 11** : Structure chimique des pectines.

On rencontre aussi dans la structure moléculaire des pectines, d’autres sucres neutres (D-Galactose, D-glucose, L-arabinose, D-xylose et L-fucose), de même que des groupements O-acétyles, liés latéralement à la chaîne principale via les hydroxyles en C<sub>2</sub> et C<sub>3</sub> des acides galacturoniques. Lorsque plusieurs de ces sucres sont attachés à des unités galacturoniques contiguës, on parle de “régions chevelues” ou de la “chevelure” de la pectine. (Thibault, 1980; May, 1990).

Selon que le degré de méthylation (DM), exprimé en pourcentage molaire de groupements méthoxyles par rapport à la quantité totale d’acides galacturoniques, est inférieur ou supérieur à 50 %, on parle de pectines faiblement méthoxylées (pectines FM) ou de pectines hautement méthoxylées (pectines HM). La manière dont les groupements méthoxyles sont disposés sur la chaîne principale des molécules de pectines peut varier d’une source à l’autre, de même qu’en fonction du traitement subi. Dans les pectines naturelles, la distribution des groupements méthoxyles est généralement régulière, suivant la séquence “cinq esters, un acide libre, cinq esters, un acide libre, etc..”. Par contre, cette distribution

devient totalement aléatoire dans les pectines qui ont subi une estérification ou une hydrolyse chimique (May, 1990).

En réalité, un échantillon de pectines est généralement constitué d'un ensemble hétérogène de macromolécules dont la teneur en acides galacturoniques, en sucres neutres, de même que le degré de polymérisation (30 à 200 unités), le DM (0 à 80 %), la distribution des groupements méthoxyles ainsi que la masse moléculaire (20 000 à 400 000 Da) varient dans des limites extrêmement larges. Ces variations dépendent de l'origine du matériel végétal, des méthodes d'extraction, des traitements chimiques et physiques mais aussi, des méthodes d'analyse (Thibault, 1980).

### 5.2.2. *Caractérisation des pectines*

De nombreuses méthodes permettent de déterminer les teneurs en acides galacturoniques, en sucres neutres, en groupements acétyles, méthoxyles et en sucres réducteurs terminaux ainsi que la masse moléculaire des pectines.

Le pourcentage (m/m) d'acides galacturoniques des pectines peut être déterminé, soit par titration acido-basique en milieu aqueux (USP 23, 1995), soit à l'aide de réactions chimiques colorées. En effet, en milieu acide concentré, les pectines sont dépolymérisées et l'acide galacturonique libéré est transformé en son acide 5-formyl-furoïque qui peut ensuite réagir avec les dérivés phénoliques pour donner des complexes colorés, dosables par spectrophotométrie visible. L'orcinol, le naphtorésorcinol, le méthahydroxydiphényle et surtout le carbazole (Bitter et Muir 1962; Taylor et Buchanan-Smith, 1992), sont les composés phénoliques les plus utilisés pour effectuer le dosage colorimétrique des acides galacturoniques et des pectines.

La détermination du degré de méthylation quant à elle, peut être effectuée par titration acido-basique en milieu aqueux (USP 23, 1995), à l'aide de réactions chimiques colorées, de réactions enzymatiques, mais aussi par la chromatographie gazeuse (GLC). Maness et coll. (1990) ont réduit, avant et après hydrolyse alcaline de la pectine, les acides galacturoniques libres en galactose. Les déterminations des teneurs en galactose (par GLC) ou en acides galacturoniques (par réaction colorée), effectuées avant et après l'hydrolyse alcaline, ont permis de déterminer le degré de méthylation. Siragusa et coll. (1988) ont pu

déterminer directement par GLC, la quantité de méthanol libérée par les pectines estérases de *Erwinia carotovora*. Par ailleurs, le méthanol libéré à partir des pectines après hydrolyse chimique ou enzymatique, peut être oxydé par l'alcool oxydase en formaldéhyde et en peroxyde d'hydrogène. La formaldéhyde, préalablement conjuguée avec le 4-amino-3-penten-2-one, peut être dosée par fluorométrie (Wojciechowski et Fall, 1996) et le peroxyde d'hydrogène peut être quantifié par spectrophotométrie visible, en présence de la peroxydase et du chromogène 2,2'-azino-bis (acide 3-éthylbenzthiazoline-6-sulfonique) (Mangos et Haas, 1997).

Les molécules de pectines possèdent des sucres réducteurs aldéhydiques terminaux dont la teneur augmente lors de leur dégradation par les pectines lyases et les polygalacturonases (rupture des liaisons  $\alpha$  1-4). Le dosage de ces sucres réducteurs peut donc permettre les déterminations de la masse moléculaire des pectines et l'activité de certaines enzymes pectinolytiques. Une des méthodes de quantification des sucres réducteurs de la pectine est celle décrite par Nelson en 1944. Elle consiste à oxyder à chaud les sucres réducteurs avec des ions cuivriques ( $\text{Cu}^{2+}$ ) et ensuite, à faire réagir le cuivre réduit avec le réactif arsénomolybdate (mélange de molybdates et d'arséniates) pour former un complexe bleu, dosable par spectrophotométrie visible (520 nm). Une autre méthode de dosage est celle de Bach et Schollmeyer (1992), dans laquelle les sucres réducteurs libérés réagissent avec une solution du 2-cyanoacétamide pour former un produit dosable en UV (270 nm).

La détermination de la teneur en groupements acétyles de la pectine peut être effectuée par la méthode décrite par McComb et McCready en 1957. En milieu basique, les groupements acétyles libérés de la pectine forment, en présence de l'hydroxylamine, des acides hydroxamiques. L'addition d'une solution ferrique entraîne l'apparition de complexes insolubles de pectine - acide hydroxamique et de complexes solubles d'acides acétohydroxamiques quantifiables par spectrophotométrie visible.

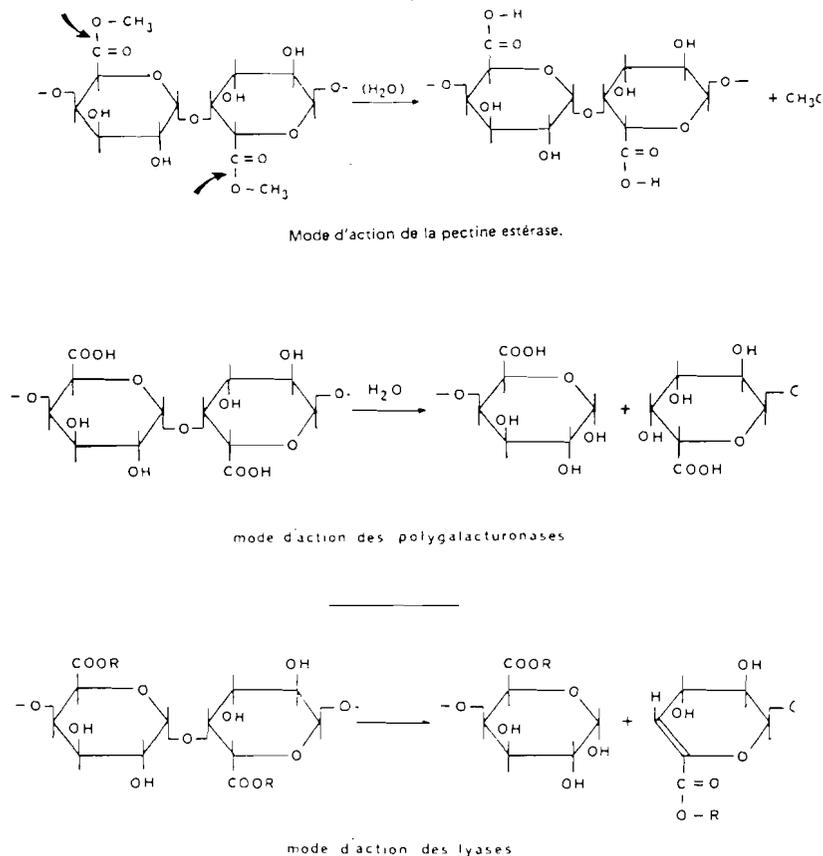
Une autre méthode d'analyse des pectines, très récente et assez révolutionnaire, est l'utilisation de la technique  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR (MAS = *Magic Angle Spinning*) qui permet d'établir, directement sur la poudre, le spectre RMN dont l'interprétation peut aider à déterminer en même temps les teneurs en acides galacturoniques, en groupements acétyles et le degré de méthylation (Sinitsya et coll., 1998).

Enfin, la masse moléculaire, qui influence considérablement les propriétés physiques (solubilité, viscosité,...) et les applications des pectines, peut être déterminée à l'aide de méthodes chimiques (dosage des sucres réducteurs terminaux), d'études rhéologiques (Owens et coll., 1946) et d'analyses chromatographiques. Hoagland et coll. (1993) ont étudié la masse moléculaire ainsi que d'autres caractéristiques de plusieurs polysaccharides, dont la pectine, en utilisant la chromatographie par exclusion de taille. La même technique a permis à Fishman et ses collaborateurs (1989) de montrer que la distribution des masses moléculaires est extrêmement large dans un même échantillon de pectine.

### 5.2.3. Dégradation chimique et enzymatique des pectines

Les pectines, qui sont des substances assez fragiles, peuvent subir une dégradation (hydrolyse des esters méthoxyles, rupture des liaisons glycosidiques  $\alpha$  1-4) plus ou moins rapide dans les milieux acides et basiques. La vitesse de dégradation augmente avec la température mais aussi avec le degré de méthylation. En effet, les acides pectiques ayant un degré de méthylation proche de zéro sont les dérivés les plus stables (Albersheim et coll., 1960).

Dans le tractus gastro-intestinal, les pectines résistent à l'activité des enzymes gastriques et intestinales et arrivent intactes dans le côlon où elles sont totalement hydrolysées puis fermentées en acides organiques par la flore intestinale. La dégradation est tellement intense que même après une supplémentation quotidienne de 36 grammes, la quantité de pectines retrouvée dans les matières fécales reste faible et proche de celle rencontrée dans les conditions alimentaires normales (Cummings et coll., 1979). La dégradation des pectines par la flore intestinale est assurée par trois groupes d'enzymes hydrolytiques différentes (figure 12): les pectines estérases qui hydrolysent les esters méthoxyles, les polygalacturonases qui clivent les liaisons osidiques  $\alpha$  1-4 et enfin les pectines lyases qui clivent aussi les liens osidiques  $\alpha$  1-4 mais avec formation d'une double liaison entre les carbones C<sub>4</sub> et C<sub>5</sub> (Thibault, 1980).



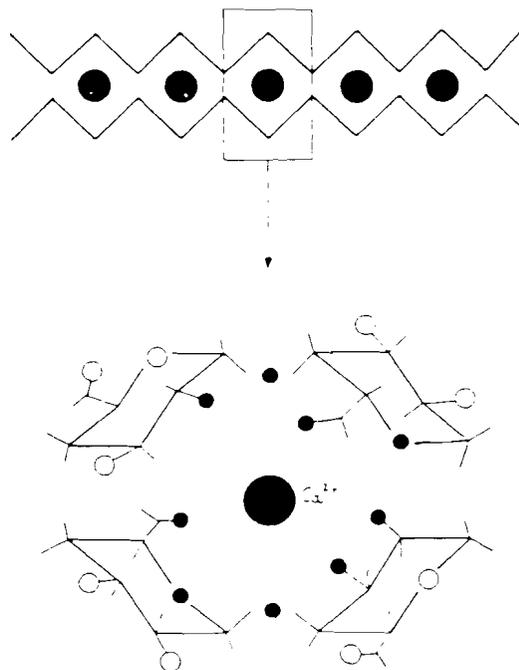
**Figure 12 :** Mode d'action des enzymes pectinolytiques de la flore intestinale (pectines estérases, polygalacturonases et pectines lyases).

### 5.3. Propriétés et usages des pectines

La propriété la mieux connue et la plus exploitée des pectines est leur capacité à former des gels aqueux, soit seules, soit en présence des acides organiques ou des sucres. La gélification des pectines dans l'eau est pH dépendante. Aux valeurs de pH élevées, les molécules de pectine sont chargées négativement et la répulsion électrostatique empêche toute formation de gel. La diminution progressive du pH, qui va réduire l'hydratation des molécules et la répulsion électrostatique, va entraîner la formation progressive d'un gel dont la viscosité atteindra son maximum vers pH 3, au voisinage de la valeur du pKa des pectines (3 à 4). En dessous de pH 3, la pectine entre dans une phase de floculation, totalement réversible par simple élévation du pH. La floculation des gels de pectines peut aussi apparaître lors de l'augmentation de la température (la température de floculation est d'environ 100°C) mais dans ce cas, elle n'est plus complètement réversible (May, 1990).

Comparées aux pectines hautement méthoxylées (HM) qui forment des gels de consistance relativement élevée, les pectines faiblement méthoxylées (FM) et les pectines amidatées forment des gels très liquides. Cependant, le pouvoir gélifiant des pectines FM et amidatées peut être fortement amélioré par addition de substances déshydratantes comme les sucres neutres (fructose, glucose, saccharose, sorbitol) d'une part, et par réticulation ionique avec le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) d'autre part. En effet, en présence du calcium, les molécules de pectines sont maintenues ensemble grâce aux interactions ioniques entre les ions calciques et les groupements carboxyliques libres, selon un mécanisme appelé "egg box" ou "boîte à œufs" (figure 13).

La viscosité des gels de pectinates de calcium atteint son maximum lorsque le rapport  $\text{Ca}^{2+}$  / Pectine FM est d'environ 30 mg / g. En dessous de ce rapport, les gels sont assez liquides alors qu'au delà, la structure devient trop serrée et fait apparaître un phénomène de synérèse (May, 1990). Afin d'éviter l'apparition de précipité lors de la préparation des gels de pectinates de calcium, on préconise d'ajouter, très lentement et sous agitation, une solution d'ions calciques aux solutions de pectines FM, maintenues à une température d'environ 80°C (Thibault, 1980).



**Figure 13 :** Mécanisme de gélification des pectines FM en présence du calcium. Structure des pectinates de calcium: configuration "boîte à œufs".

Etant un produit naturellement présent dans les fruits, les pectines sont des agents de gélification de choix pour épaissir les jus, les confitures, les marmelades, les yogourts fruités et autres produits alimentaires. Bien que toutes les pectines (pectines FM, HM, amidatées et pectinates de calcium) soient utilisables, les pectines FM offrent plus de flexibilité dans l'ajustement de la viscosité et cela dans une zone de pH très étendue. Généralement, une concentration de 0.2 à 0.4 % m/m de pectines FM est suffisante pour donner une consistance appropriée aux confitures. Les pectines, en particulier les dérivés HM, empêchent la floculation de la caséine lors des traitements thermiques des laits, d'où leur utilisation dans la stabilisation des yogourts ainsi que dans celle des mélanges de lait et de jus de fruits. Enfin, elles sont utilisées pour améliorer la texture des crèmes glacées, de certaines sauces commerciales et de certains desserts (May, 1990).

Dans le domaine pharmaceutique, les pectines sont surtout utilisées pour leurs propriétés pharmacologiques (anti-diarrhéique, anti-constipante), nutritionnelles (fibres alimentaires), gélifiantes et épaississantes (pour les sirops par exemple). Actuellement, elles sont intensivement étudiées comme excipients des formes à libération prolongée et colonique. En effet, en plus de leur capacité à former des gels aqueux, elles possèdent de bonnes propriétés filmogènes, surtout en présence de plastifiant (Coffin et Fishman, 1993, 1994). Rubinstein et coll. (1992c) ont d'autre part mis en évidence l'adhésion de certaines bactéries (*Escherichia coli*) aux films préparés à partir des pectines FM.

#### **5.4. Utilisation des pectines dans les systèmes à libération prolongée**

Malgré leur hydrosolubilité, les pectines ont été utilisées pour préparer des systèmes matriciels ou enrobés destinés à prolonger la libération de certains principes actifs. Naggar et coll. (1992) ont étudié des comprimés matriciels à libération prolongée, constitués de pectines et de principes actifs hydrosolubles (sulfate de quinidine, chlorhydrate de métoclopramide, maléate de chlorphéniramine et diclofénac de sodium). Ils ont montré que le ralentissement de la libération des principes actifs, qui s'accroît avec l'augmentation de la teneur en pectine, est aussi fortement dépendant de la méthode de préparation des comprimés. Les comprimés étaient en effet obtenus par compression directe soit à partir de mélanges physiques de

poudres, soit à partir de systèmes obtenus par granulation humide, par déposition de solvant ou par co-précipitation.

Kim et Fassihi ont étudié des comprimés matriciels préparés par compression directe à partir de mélanges binaires Pectine HM / HPMC (hydroxypropyl méthylcellulose) d'une part (1997a,b), et de mélanges ternaires Pectines HM / HPMC / Gélatine d'autre part (1997c). Les images photographiques ont permis de constater que le gonflement et l'érosion progressive de la matrice polymérique contribuaient grandement au processus de la libération des principes actifs. La libération, qui pouvait être prolongée pendant une période supérieure à 20 heures, était linéaire. De plus, elle était également influencée par la solubilité et la teneur des principes actifs (nifédipine, prednisolone, théophylline, chlorhydrate de diltiazem), le poids moléculaire des polymères, le rapport Pectine / HPMC, la force de compression appliquée et la vitesse d'agitation des bains de dissolution. Notons que les pectines utilisées seules et sans agent liant (cellulose microcristalline par exemple), sont rigides, dures et difficilement compressibles (Kim et coll., 1998).

Des microbilles matricielles de pectinates de calcium (0.88 à 1.85 mm de diamètre), contenant des pourcentages variés en substances actives (piroxicam et aténolol), ont été préparées, par introduction (goutte à goutte) de solutions de pectines contenant les substances actives dans une solution de chlorure de calcium (Aydin et Akbuga, 1996). En fonction de la méthode de séchage des microbilles et du type de traceur, la libération était plus ou moins fortement ralentie. Afin d'obtenir des systèmes enrobés à libération prolongée, Sriamornsak et coll. (1997a,b) ont préparé des pellets de théophylline enrobés avec du pectinate de calcium. Les pellets, qui contenaient de l'acétate de calcium en plus de la théophylline, étaient préparés par extrusion-phéronisation et finalement enrobés avec la pectine par un processus de complexation interfaciale : les ions calciques localisés à la surface des pellets se complexent avec la pectine ajoutée sous forme de gel pour former un enrobage uniforme constitué de pectinates de calcium.

### **5.5. Utilisation des pectines dans la délivrance colonique des médicaments**

Le dépôt de couches épaisses d'enrobages, constituées de pectines HM et obtenues par compression (dry coating), a permis de retarder considérablement la libération des traceurs

(fluorescéine, naphthol vert B) dans les milieux de dissolution à partir de comprimés. D'autre part, la libération des traceurs à partir de ces comprimés est fortement accélérée en présence des enzymes pectinolytiques du commerce (Pectinex<sup>®</sup> ultra SP-L) (Ashford et coll., 1993c) ou des cultures de *Bacteroides ovatus* (Wakerly et coll., 1996a). De plus, après administration orale des comprimés enrobés avec 700 mg de pectines HM à 6 volontaires, les études de scintigraphie gamma ont montré que le côlon était bel et bien le site de désagrégation (Ashford et coll., 1993c). Les pectines HM constituent donc un matériau potentiellement utilisable pour véhiculer les principes actifs jusqu'au côlon.

Les études de dissolution *in vitro*, effectuées avec des comprimés matriciels préparés à partir des pectines de degrés de méthylation différents, ont montré que les pectines FM offrent une moindre protection du traceur que les pectines HM. Cependant, en mélangeant les pectines FM avec du calcium (Ca<sup>2+</sup>), la protection des principes actifs peut être fortement améliorée. La réticulation ionique avec le calcium permet en effet aux pectines de former une couche gélifiante suffisamment dense pour limiter la pénétration de l'eau dans les comprimés et ralentir ainsi la diffusion des traceurs hors de la matrice polymérique (Ashford et coll., 1994). La libération de l'indométhacine à partir des formulations matricielles de pectinate de calcium est fortement accélérée en présence des enzymes pectinolytiques (89 ± 20 % contre 16 ± 2 % dans le milieu contrôle après la 6<sup>ème</sup> heure du test) ou du contenu caecal du rat (61 ± 16 % vs 4.9 ± 1.1 % après la 24<sup>ème</sup> heure du test) (Rubinstein et coll., 1993). La libération de l'albumine à partir des pellets matriciels de pectinates de calcium est également très rapide en présence des enzymes pectinolytiques alors que dans les milieux contrôles, la protéine n'est pas détectable après 12 heures de test de dissolution (Sriamornsak, 1998).

Les formulations matricielles de pectinates de calcium ont également été évaluées *in vivo*. Adkin et coll. (1997) ont préparé des comprimés renfermant un marqueur radioactif (<sup>152</sup>Sm) à partir de mélanges de pectinate de calcium / pectine d'une part, et de mélanges de pectinate de calcium / gomme guar d'autre part. Les comprimés ont été ensuite enrobés avec une couche d'Eudragit<sup>®</sup> L (enrobage entérique) afin de prévenir toute désagrégation prématurée dans l'estomac. Les études de scintigraphie gamma, effectuées sur 10 volontaires, ont montré que la désagrégation de tous les comprimés commençait dans l'iléon terminal et se terminait dans le côlon. Cependant, dans une étude antérieure, effectuée sur des rats de laboratoire, Rubinstein et Radai (1995) ont montré que la délivrance colonique des principes

actifs très hydrosolubles (insuline), contrairement aux substances peu solubles dans l'eau (indométhacine), ne pouvait pas être réalisée à partir des comprimés matriciels de pectinates de calcium.

Semdé et coll. (1998b) ont obtenus, *in vitro*, des résultats similaires à partir des comprimés matriciels préparés à l'aide de différentes pectines réticulées par l'épichlorohydrine. Ils ont en effet montré que la théophylline, qui est plus hydrosoluble que l'indométhacine à pH 6.0, est plus rapidement libérée dans les bains de dissolution ne contenant pas d'enzymes pectinolytiques. D'autre part, ils ont observé que la vitesse de libération de l'indométhacine, qui varie en fonction du degré de réticulation de la pectine, est fortement accélérée en présence des enzymes pectinolytiques.

Les pectines amidatées, réticulées ou non avec le calcium, ont aussi été utilisées pour préparer des comprimés matriciels de paracétamol dont la libération peut être significativement retardée (Wakerly et coll., 1997a). D'autre part, des microbilles constituées de pectines amidatées et de traceurs (indométhacine ou sulfaméthoxazole) ont été enrobées par un processus de complexation interfaciale avec du calcium ou de chitosans (polycations). Dans les milieux de dissolution simulant les conditions gastriques et intestinales, la libération des traceurs est fortement retardée mais, en présence des enzymes pectinolytiques, les microbilles libèrent beaucoup plus rapidement leurs principes actifs, prouvant ainsi le potentiel colonique des pectines amidatées. La présence des chitosans dans l'enrobage a permis d'améliorer la protection des principes actifs en l'absence des enzymes pectinolytiques (Munjeri et coll., 1997). Dans le même ordre d'idées, Fernandez-Hervas et Fell (1998) ont montré que, comparés aux enrobages de pectines HM appliqués par compression directe, ceux de pectine HM / chitosans (10/1), tout en étant encore dégradés par les enzymes pectinolytiques, assurent une meilleure protection des principes actifs dans les milieux *in vitro* simulant les fluides gastriques et intestinaux.

Afin de pallier les insuffisances liées à l'utilisation des systèmes matriciels (restriction de la teneur en principe actif) et de la technique d'enrobage par compression de poudre (fortes quantités de pectines, application industrielle plus difficile), les techniques d'enrobage par pulvérisation de solutions ou de dispersions (turbine, lit d'air fluidisé) ont été envisagées pour appliquer des enrobages à base de pectines. Etant donné leur hydrosolubilité, les pectines sont incapables d'assurer une protection satisfaisante des noyaux lors du transit gastrique et

intestinal. Dès lors, certains auteurs ont eu l'idée de les incorporer dans les polymères insolubles comme l'éthylcellulose et les copolymères d'esters méthacryliques, d'autant plus que cette incorporation ne semble pas trop affecter les propriétés mécaniques des films d'éthylcellulose (Wakerly et coll., 1996b; 1997b; Macleod et coll., 1997; Semdé et coll., 1998c,d).

Les pectines HM ont été mélangées aux dispersions commerciales d'éthylcellulose (Surelease<sup>®</sup>) et utilisées pour enrober des comprimés (500 mg de poids) contenant 4.54 % de paracétamol. Les essais de dissolution (pH 7.4), effectués sur ces comprimés enrobés, ont montré que le pourcentage de paracétamol libéré après 6 heures d'épreuve est relativement faible et varie entre 4.0 et 27.2 %, en fonction de la quantité de film déposé (20 à 32 mg) et de la teneur en pectine dans l'enrobage (5 à 10.7 % m/m, par rapport à celle de l'éthylcellulose). D'autre part, l'addition des enzymes pectinolytiques au milieu de dissolution (pH 6.0) a provoqué une accélération significative de la libération du paracétamol (Wakerly et coll., 1996b). Le mécanisme de la libération du principe actif semble très complexe et dépend non seulement de la nature et des caractéristiques du film d'enrobage, mais aussi de la composition du milieu de dissolution. Les auteurs ont postulé que la formation de pores aqueux à travers le film d'enrobage, accentuée par la présence des enzymes pectinolytiques dans le milieu de dissolution, serait le mécanisme principal de la libération du principe actif (Wakerly et coll., 1997b).

## **6. Buts et organisation du travail expérimental**

L'objectif de cette thèse consiste à rechercher les conditions d'utilisation des pectines, polysaccharides non toxiques et intensément dégradés par la flore intestinale, dans le but de délivrer de manière plus sélective les principes actifs dans le côlon après administration orale. Etant donné leur hydrosolubilité, les pectines utilisées telles quelles ne sont pas capables d'assurer la protection des principes actifs lors du transit gastrique et intestinal (grêle). Nous avons alors envisagé deux stratégies totalement différentes afin de masquer l'hydrosolubilité des pectines sans pour autant empêcher leur dégradation par les enzymes pectinolytiques.

Nous avons d'abord étudié les enrobages constitués de Pectine HM / Ethylcellulose, appliqués par compression directe sur des noyaux de comprimés de théophylline (Chapitre I).

Ensuite, des films d'enrobage, préparés à partir des dispersions aqueuses d'éthylcellulose (Aquacoat<sup>®</sup> ECD 30, Surelease<sup>®</sup> clear) ou de copolymères d'esters méthacryliques (Eudragits<sup>®</sup> RS, RL, NE), contenant des pectines HM ou des pectinates de calcium ont été évalués soit sous forme de films isolés (Chapitre II), soit sous forme de films d'enrobage obtenus lors du pelliculage de pellets de théophylline enrobés par la technique du lit d'air fluidisé (Chapitres III et IV).

D'autre part, de nouveaux dérivés, obtenus par réticulation chimique de la pectine avec des quantités croissantes d'épichlorohydrine, ont été préparés, caractérisés et soumis aux tests de dégradation enzymatique. Le potentiel colonique des pectines réticulées a finalement été évalué *in vitro*, sur des comprimés matriciels incorporant des substances actives (Chapitre V).

## **Chapitre I : Etude des enrobages mixtes Pectine HM / Ethylcellulose obtenus par compression des mélanges de poudres (dry coating)**

<b>1.</b>	<b>Introduction</b>	62
<b>2.</b>	<b>Matériels et méthodes</b>	62
2.1.	Matériels	62
2.2.	Méthodes	63
2.2.1.	<i>Caractérisation de la pectine HM</i>	63
2.2.1.1.	Détermination du pourcentage d'acides galacturoniques et du degré de méthylation de la pectine selon l'USP XXIII	63
2.2.1.2.	Détermination du pourcentage d'acides galacturoniques de la pectine par la méthode au carbazole	64
2.2.1.3.	Etude du comportement rhéologique d'une solution aqueuse à 2.5 % m/m de pectine HM	65
2.2.1.4.	Etude de la dégradation de la pectine HM par les enzymes de Pectinex® Ultra SP-L	66
2.2.2.	<i>Préparation et étude des comprimés nus (noyaux)</i>	68
2.2.3.	<i>Enrobage des comprimés</i>	69
2.2.4.	<i>Essais de dissolution</i>	70
2.2.5.	<i>Analyses statistiques</i>	71
<b>3.</b>	<b>Résultats et discussion</b>	71
3.1.	<b>Pourcentage d'acides galacturoniques et degré de méthylation de la pectine HM</b>	71
3.2.	<b>Etude du comportement rhéologique d'une solution aqueuse à 2.5 % m/m de pectine HM</b>	73
3.3.	<b>Etude de la dégradation enzymatique de la pectine HM par les enzymes de Pectinex® Ultra SP-L</b>	74
3.4.	<b>Essais de dissolution</b>	77
<b>4.</b>	<b>Conclusion</b>	86

## 1. Introduction

Le travail décrit dans ce chapitre a pour but de diminuer l'hydrosolubilité des enrobages de pectine HM par addition d'éthylcellulose (polymère insoluble dans l'eau). Cette approche, qui ne devrait pas compromettre totalement la dégradation des enrobages par la flore bactérienne du côlon, vise à améliorer la capacité de protection des principes actifs lors du transit gastrique et intestinal (grêle). Pour ce faire, des quantités croissantes d'éthylcellulose (Ethocel® STD 45) ont été mélangées à la pectine HM et les mélanges de poudres ainsi obtenus ont ensuite été utilisés pour enrober par compression, à l'état sec (dry coating), des comprimés de théophylline à libération immédiate. Par la suite, les comprimés enrobés ont été soumis aux tests de dissolution, à 37°C, dans le tampon acétate – phosphate 0.05 M de pH 6.0. L'influence de la teneur des enrobages en éthylcellulose, de même que celle des enzymes pectinolytiques sur les profils de libération de la théophylline ont été finalement évaluées.

Auparavant, la pectine HM utilisée a été caractérisée par sa teneur en acides galacturoniques, son degré de méthylation (DM), son comportement rhéologique, ainsi que sa dégradation par des enzymes pectinolytiques du commerce (Pectinex® Ultra SP-L).

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Matériels (Tableau I.1)

**Tableau I.1** : Les différentes substances chimiques utilisées et leurs fournisseurs.

Produits	Fournisseurs
Pectine de pomme ou pectine HM, Molybdate ammonique tétrahydraté ( $H_2Mo_7N_6O_{24} \cdot 4H_2O$ ), Hydrogéo-arsénate de sodium heptahydraté ( $AsHNa_2O_7 \cdot H_2O$ )	Fluka, Buchs, Suisse
Acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) 99-100 % m/m, Sulfate de Cuivre pentahydraté ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ), Tartrate sodico-potassique (sel de Rochelle), Sulfate de sodium anhydre ( $Na_2SO_4$ ), Acide chlorhydrique concentré (HCl, 37 % m/m), Solutions d'acide chlorhydrique (HCl) 1 N et d'hydroxyde de sodium (NaOH) 1 N	UCB, Leuven, Belgique

**Tableau I.1** : Les différentes substances chimiques utilisées et leurs fournisseurs (Suite).

Produits	Fournisseurs
Disodium Tétraborate décahydraté ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ), Bicarbonate de sodium anhydre ( $\text{Na}_2\text{HCO}_3$ ), Dihydrogénophosphate de sodium monohydraté ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), Acide acétique concentré (98-100 % m/m), Pastilles d'hydroxyde de sodium (NaOH), Stéarate de Magnésium	Merck, Darmstadt, Allemagne
Théophylline anhydre	Certa, Belgique
Carbonate de sodium anhydre ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	Carlo Erba, Italie
Avicel® PH 101	FMC Corporation, Philadelphie, USA
Ethocel® STD 45 (Ethylcellulose 45 cp)	Dow Chemical Company, Michigan, USA
Pectinex® Ultra SP-L	Novo Ferment, Dittengen, Suisse
Carbazole (98 %), Acide galacturonique monohydraté (98-100 %)	Aldrich - chemical Co Ltd, Gillingham, GB
Acide benzoïque	Fédéra, Belgique
Polysorbate (Tween) 80	Ets. Welfhar, Bruxelles
Lactose DC11 ou Pharmatose DCL11	DMV International, Hollande

## 2.2. Méthodes

### 2.2.1. Caractérisation de la pectine HM

2.2.1.1. Détermination du pourcentage d'acides galacturoniques et du degré de méthylation de la pectine par la méthode USP XXIII, 1995.

Les pectines reçues ont été d'abord analysées suivant la monographie de la Pharmacopée américaine (USP XXIII, 1995). Les deux principales caractéristiques des pectines, décrites dans cette monographie, sont la teneur en acides galacturoniques et le degré de méthylation (DM). Leur détermination se fait par titrimétrie acido-basique en milieu aqueux, de la manière décrite ci-après.

La pectine a été préalablement agitée avec le mélange Eau/Ethanol/HCl concentré (60/40/5 v/v), puis lavée plusieurs fois avec le mélange Eau/Ethanol (60/40, v/v) et finalement avec de l'éthanol avant d'être séchée à l'étuve à 100°C. Ce traitement préalable a pour but d'éliminer les sucres et les acides organiques, souvent ajoutés aux pectines dans le but de standardiser leurs propriétés physiques. Une prise d'essai d'environ 500 mg de la pectine ainsi purifiée est humectée avec 2 ml d'éthanol et ensuite dissoute dans 100 ml d'eau désionisée par simple agitation à l'aide d'un agitateur magnétique. La solution obtenue est ensuite titrée avec une solution de NaOH 0.5 N en présence de quelques gouttes de phénolphaléine, utilisée comme indicateur acido-basique. Puis, 20 ml de la solution de NaOH 0.5 N sont ajoutés sous agitation dans le but de provoquer la saponification complète de la pectine. Après un repos de 15 minutes, 20 ml d'une solution de HCl 0.5 N sont ajoutés, et l'excès d'acide est finalement titré avec la solution de NaOH 0.5 N (dosage en retour).

#### 2.2.1.2. Détermination du pourcentage d'acides galacturoniques de la pectine par la méthode au carbazole

La méthode de Bitter et Muir (1962) a également été utilisée pour doser l'acide galacturonique en solution (sous forme monomérique, oligomérique ou polymérique). Elle s'effectue comme suit : des volumes de 3 ml d'acide sulfurique concentré contenant 0.025 M de disodium tétraborate décahydraté sont répartis dans des tubes à essai. Après avoir refroidi les tubes dans de la glace, des volumes de 0.5 ml d'échantillon ou de solution standard (pectine ou acide galacturonique dissoute dans une solution aqueuse saturée en acide benzoïque) sont superposés. Les tubes sont ensuite portés à 100°C dans un bain marie bouillant pendant 10 minutes. Après refroidissement sous eau courante, des volumes de 100 µl d'une solution éthanolique de carbazole (0.125 % m/v) sont ajoutés et les mélanges réactionnels ainsi obtenus sont à nouveau portés à 100°C dans le bain marie bouillant pendant 15 minutes. Après refroidissement complet, les absorbances des mélanges réactionnels (coloration violette) sont mesurées à 530 nm contre un blanc réactif (Hitachi UV-Spectrophotometer, model 100-60). Les concentrations en acide galacturonique sont ensuite déterminées à partir d'une droite d'étalonnage préétablie en mesurant les absorbances de plusieurs solutions de concentration connue en acide galacturonique, traitées de manière identique.

### 2.2.1.3. Etude de la viscosité d'une solution aqueuse de pectine HM à 2.5 % m/m

La capacité des pectines à gélifier les milieux aqueux a fait de ces matériaux des agents de choix pour l'épaississement des denrées alimentaires fluides. Elle est aussi, comme on le verra plus loin, à la base de l'utilisation des pectines comme véhicule des médicaments vers le côlon. De ce fait, nous avons entrepris l'étude rhéologique d'une solution aqueuse de pectine HM afin d'établir non seulement le type d'écoulement des gels de pectine HM (newtonien, pseudoplastique, plastique ou thixotrope), mais aussi l'importance de l'augmentation de la viscosité du milieu par la pectine HM.

Pour ce faire, les rhéogrammes d'une solution aqueuse à 2.5 % m/m de pectine HM (cette concentration a été arbitrairement choisie) ont été déterminés à l'aide du viscosimètre rotatif Rhéomat® T15 (Suisse). Il s'agit d'un viscosimètre rotatif à cylindres coaxiaux, comprenant un cylindre interne mobile et un cylindre externe immobile. Les surfaces de ces cylindres constituent respectivement les deux plans parallèles entre lesquels l'échantillon à tester est contraint.

Lorsque le cylindre interne se met en mouvement, la couche adjacente de l'échantillon est entraînée avec une vitesse angulaire ( $\omega$ ). Les couches concentriques plus éloignées possèdent des vitesses angulaires plus faibles, de telle manière que la couche de l'échantillon qui adhère au cylindre externe n'a pas bougé. Dans un viscosimètre rotatif, la force tangentielle et la vitesse de déplacement  $V$  deviennent respectivement le moment de rotation  $M$  et la vitesse angulaire  $\omega$ . Celle-ci est égale à  $2\pi n / 60$  où  $n$  est le nombre de révolutions par minute.

Dans la plupart des viscosimètres rotatifs, la vitesse angulaire est déterminée par un moteur synchrone et  $M$ , le moment de rotation, est mesuré. Dans la plupart des cas,  $\omega$  et  $M$  sont appliqués au cylindre interne. La contrainte exercée sur la couche de l'échantillon adhérent au cylindre interne ( $\tau_i$ ) est calculée par la relation :  $\tau_i = M / (2\pi h R_i^2) = \text{Pa (N/m}^2\text{)}$ . Celle exercée sur la couche de l'échantillon adhérent au cylindre externe ( $\tau_e$ ) est calculée par la relation :  $\tau_e = M / (2\pi h R_e^2) = \text{Pa (N/m}^2\text{)}$  ( $h$  représente la hauteur de la substance à tester,  $R_i$  et  $R_e$  représentent respectivement les rayons des cylindres interne et externe).

Puisque  $Re > Ri$ ,  $\tau_e < \tau_i$ . Ce fait constitue une différence avec un dispositif à plans parallèles pour lequel la contrainte est la même en tous points. Cette différence provient de la courbure des plans parallèles dans un dispositif à cylindres coaxiaux. Cependant, pour un petit espace annulaire, c'est-à-dire pour  $Ri / Re$  proche de 1, la contrainte peut être considérée comme égale en tous points. Pour la même raison, la vitesse de cisaillement n'est pas constante dans l'espace compris entre les deux cylindres car la vitesse angulaire dépend de l'espacement. La vitesse de cisaillement ( $D$ ) est calculée par la formule :  $D = 2\omega / (1 - Ri^2 / Re^2)$  ( $s^{-1}$ ).

Les différentes vitesses angulaires sont obtenues grâce à un moteur synchrone possédant plusieurs rapports de vitesse différents. Les moments de rotation correspondants sont mesurés grâce à un ressort de torsion de précision. Connaissant les constantes géométriques des cylindres employés, les différentes vitesses de rotation appliquées et les moments de rotation correspondants, on peut calculer les différentes vitesses de cisaillement et les forces de cisaillement correspondantes et tracer la courbe d'écoulement (rhéogramme) de l'échantillon testé. Ces tracés permettent finalement le calcul de la viscosité pour les différents niveaux de cisaillement.

En pratique, la solution aqueuse de pectine HM à 2.5 % m/m est préparée par simple agitation (500 t/min, agitateur à hélice, Ika Werk, Allemagne), à la température du laboratoire. Après dissolution complète de la pectine, le gel obtenu est conservé au frigo pendant une nuit dans le but de permettre son mûrissement et son repos complet avant d'effectuer les mesures rhéologiques. Celles-ci ont été déterminées à la température de  $20.0 \pm 0.5$  °C. Elles nous ont permis de tracer les courbes d'écoulement (rhéogrammes), ascendante et descendante ( $\tau$  en fonction de  $D$ ), en respectant un repos de 15 minutes entre chaque tracé et une durée d'application des contraintes de 2 minutes pour chaque vitesse de cisaillement.

#### 2.2.1.4. Etude de la dégradation de la pectine par les enzymes de Pectinex®Ultra S-PL

L'étude de la dégradation enzymatique de la pectine a été effectuée à pH 4.5 (pH d'activité optimale de Pectinex®Ultra SP-L) et à pH 6.0 (compromis entre le pH d'activité optimale de Pectinex®Ultra SP-L et le pH de la lumière caecale). En pratique, 50 g d'une solution à 0.5 % m/m de pectine HM dans le tampon acétate - phosphate 0.05 M (tableau I.6)

ont été préparés à l'aide d'un agitateur magnétique. Le pH a été ajusté à la valeur désirée (pH 4.5 ou pH 6.0) avec une solution de HCl 1 N ou de NaOH 1 N. 100 µl de Pectinex®Ultra SP-L sont ajoutés à la solution thermostatée à 37°C et agitée (100 secousses par minute) dans un bain à oscillations horizontales (GFL 1087, Vel, Belgique). A des moments prédéterminés, on prélève 1 ml de la solution que l'on dilue rapidement avec le tampon.

On détermine ensuite la concentration en sucres réducteurs apparus suite à l'action des enzymes pectinolytiques de la manière suivante (Nelson, 1944) : des volumes de 1 ml d'échantillon ou de solution standard sont répartis dans des tubes gradués de 25 ml. Ensuite, après addition de 1 ml du mélange réactif A / réactif B (25 : 1 v/v, tableau I.2), les tubes sont portés à 100°C, dans un bain marie bouillant, pendant 20 minutes. Après refroidissement sous eau courante, on ajoute 1 ml du réactif C (tableau I.2) au contenu de chaque tube et on ajuste le volume final à 25 ml avec de l'eau désionisée. L'absorbance des solutions est mesurée au spectrophotomètre, à 520 nm, contre un blanc réactif (Hitachi UV-Vis Spectrophotometer, model 100-60). Les concentrations en sucres réducteurs sont déterminées à partir d'une droite d'étalonnage préétablie en mesurant les absorbances de plusieurs solutions de concentration connue en acide galacturonique (substance de référence), préalablement traitées de la même manière. L'utilisation de l'acide galacturonique comme substance de référence est justifiée par le fait que l'hydrolyse enzymatique de la pectine libère essentiellement cet acide uronique (environ 80 % m/m).

**Tableau I.2 :** Composition des différents réactifs (A, B, C) utilisés dans le dosage des sucres réducteurs.

Réactif A	Réactif B	Réactif C
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> : 2.5 g	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O : 15 g	H <sub>24</sub> Mo <sub>7</sub> N <sub>6</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O : 5 g
NaKC <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>6</sub> (sel de Rochelle) : 2.5 g	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> conc. : 2 gouttes	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> conc. : 4.2 ml
NaHCO <sub>3</sub> : 2.0 g	Eau ad. 100 ml	AsHNa <sub>2</sub> O <sub>7</sub> .H <sub>2</sub> O : 0.6 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : 20 g		Eau ad. 100 ml
Eau ad. 100 ml		

### 2.2.2. Préparation et évaluation des comprimés nus (noyaux)

Les comprimés nus de théophylline ou noyaux, dont la composition est reprise dans le tableau I.3, ont été obtenus par compression directe à l'aide d'une comprimeuse alternative (Korsch, Berlin, Allemagne). La comprimeuse est reliée à un dispositif à quartz piézo-électrique qui permet la mesure de la force reçue par le poinçon inférieur lors de la compression. Les poudres, à l'exception du stéarate de magnésium, sont mélangées pendant 15 minutes à l'aide d'un mélangeur Turbula T2 C (W.A. Bachofen, Bale, Suisse). Le stéarate de magnésium, utilisé comme lubrifiant, est finalement ajouté au mélange de poudres et l'opération est poursuivie pendant 1 minute. Ce mélange est ensuite comprimé à l'aide de poinçons plats de 7 mm de diamètre. La force maximale de compression reçue est égale à  $16000 \pm 1000$  N (n = 20).

**Tableau I.3 :** Composition des comprimés nus (noyaux).

Composition	Quantité pour un comprimé (mg)	% m/m par rapport au poids du comprimé
Théophylline anhydre	33	27.5
Lactose <sup>®</sup> DC11	61.8	51.5
Avicel <sup>®</sup> PH 101	24	20
Stéarate de Magnésium	1.2	1
Poids total	120	100

**Tableau I.4 :** Caractéristiques des comprimés nus (noyaux).

	Epaisseur (mm)	Poids moyen (mg)	Teneur en PA (mg)	Dureté radiale (N)	Temps de délitage (min)	Perte à l'effritement (% m/m)
<b>Moyenne</b>	2.4	118.2	32.0	40.9	< 1	0.13
<b>SD</b>	0.1	1.3	2.0	1.2		
<b>n</b>	10	20	3	10	6	20

NB: PA = Principe actif (théophylline).

Les différentes caractéristiques des comprimés sont ensuite mesurées: l'épaisseur, la dureté radiale (Computest, Kraemer Elektronik GmbH, Darmstadt, Allemagne), le poids moyen, la teneur en théophylline (Spectrophométrie UV, 272 nm), la perte à l'effritement et le temps de délitage dans l'eau (Pharmacopée Européenne, 3<sup>ème</sup> édition, 1995). Les résultats de ces mesures sont rassemblés dans le tableau I.4.

### 2.2.3. Enrobage des comprimés

L'enrobage des comprimés a été réalisé par compression à l'aide d'une presse hydraulique (Perkin Elmer Corporation, USA). Les différents mélanges de poudres utilisés pour la réalisation des enrobages ont été préparés au mortier. Leur composition est reprise dans le tableau I.5. Pour chaque mélange, la moitié de la quantité nécessaire est introduite dans la matrice de la presse hydraulique. Le noyau est ensuite déposé sur ce lit de poudre de la manière la plus centrée possible, puis recouvert par l'autre moitié de la poudre d'enrobage. L'enrobage manteau est réalisé par simple compression à l'aide d'un poinçon plat de 13 mm de diamètre. La force utilisée pour appliquer ces enrobages est approximativement égale à 5.5 tonnes (5500 kgf), soit à environ 54000 N. L'épaisseur de ces enrobages à sec est égale à  $1.38 \pm 0.07$  mm ( $n = 15$ ). Elle est calculée comme suite :  $[\text{Épaisseur du comprimé enrobé} - \text{Épaisseur du noyau}] / 2$ .

**Tableau I.5 :** Composition des enrobages mixtes (manteaux) Pectine HM / Ethocel<sup>®</sup> STD 45.

<b>Formulation</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
Pectine HM (mg)	700	525	350	175	87.5	33,3	0
Ethocel <sup>®</sup> STD 45 (mg)	0	175	350	525	612.5	666.7	700
Stéarate de magnésium (mg)	7	7	7	7	7	7	7
<b>% m/m de pectine</b>	<b>1 0</b>	<b>75</b>	<b>50</b>	<b>25</b>	<b>12.5</b>	<b>5</b>	<b>0</b>
<b>% m/m d'éthylcellulose</b>	<b>0</b>	<b>25</b>	<b>50</b>	<b>75</b>	<b>87.5</b>	<b>95</b>	<b>100</b>

#### 2.2.4. Essais de dissolution

Les essais de dissolution ont été effectués selon la méthode à la pale tournante de la Pharmacopée Européenne (3<sup>ème</sup> édition, 1995). Le milieu de dissolution, dont la composition est indiquée dans le tableau I.6, est un tampon acétate - phosphate 0.05 M de pH 6.0. Cette valeur du pH est un compromis entre la valeur du pH qui prévaut dans le caecum et celle de l'activité optimale des enzymes pectinolytiques de Pectinex® Ultra SP-L (pH = 4.5). Pendant toute la durée des tests, le volume (900 ml), la température (37°C) et la vitesse d'agitation (50 tours/min) des milieux de dissolution ont tous été maintenus constants.

**Tableau I.6 :** Composition du milieu de dissolution (tampon acétate - phosphate 0.05 M).

Constituants	Quantité (g)	Concentration (mmol/l)
Dihydrogénéno - phosphate de sodium ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ):	6.9	50
Acide acétique (98-100 % m/m) : $\text{CH}_3\text{COOH}$	3	50
Acide Chlorhydrique (37 % m/m) : $\text{HCl}$	8.4	85
Pastille d'hydroxyde de sodium : $\text{NaOH}$	5.4	135
Tween 80	0.5	-
Eau distillée ad.	1000	

**N.B:** L'acide chlorhydrique et l'hydroxyde de sodium ont été ajoutés dans le but d'obtenir des concentrations en ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  proches de celles du contenu colique. Les concentrations en ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  du contenu colique sont de 208 mmol/l et 118 mmol/l, respectivement (tableau I de la partie Introduction générale).

Toutes les heures, 5 ml du liquide d'épreuve ont été prélevés pour déterminer la quantité de théophylline libérée à partir des comprimés. Les volumes prélevés sont remplacés par un égal volume de tampon. Le dosage de la théophylline a été effectué en mesurant l'absorbance des différentes solutions prélevées, diluées si nécessaire, à 272 nm (Hitachi UV-Vis Spectrophotometer, model 100-60), en utilisant des cellules en quartz de 1 cm de trajet optique. Les concentrations de théophylline, calculées à partir de la droite d'étalonnage préétablie (figure I.5), permettent de déterminer les pourcentages (% m/m) de théophylline libérés au cours du temps.

L'influence des enzymes pectinolytiques sur la libération de la théophylline à partir des comprimés enrobés a été étudiée de la même manière, mais après addition de 2 ml de Pectinex® Ultra SP-L au milieu de dissolution, tout juste avant le début des tests.

### 2.2.5. Analyses statistiques

Les tests utilisés pour effectuer l'analyse statistique de tous nos résultats expérimentaux sont, selon la situation, soit la régression linéaire, le test F de Fisher, le test t de Student ou l'analyse des variances à simple entrée (ANOVA). Leur description détaillée peut être trouvée ailleurs (Bolton, 1997).

Rappelons simplement que les équations des différentes droites de régression, souvent mentionnées dans certaines figures, sont obtenues par la méthode des moindres carrés. que le test de Student (t) est utilisé pour les comparaisons entre deux valeurs moyennes et que lorsqu'il y a plus de deux valeurs moyennes à comparer, l'analyse des variances à simple entrée (ANOVA) est utilisée. De plus, dans toutes les analyses statistiques, le seuil de probabilité choisi (p) pour décider de la signification d'un test ou d'un résultat est de 0.05 ( $p < 5\%$ ). Enfin, lorsque la lisibilité des graphiques le permet, des barres d'erreurs, représentant les valeurs de la déviation standard par rapport à la valeur moyenne ( $SD = \text{écart type}$ ), encadrent les points expérimentaux.

## 3. Résultats et discussion

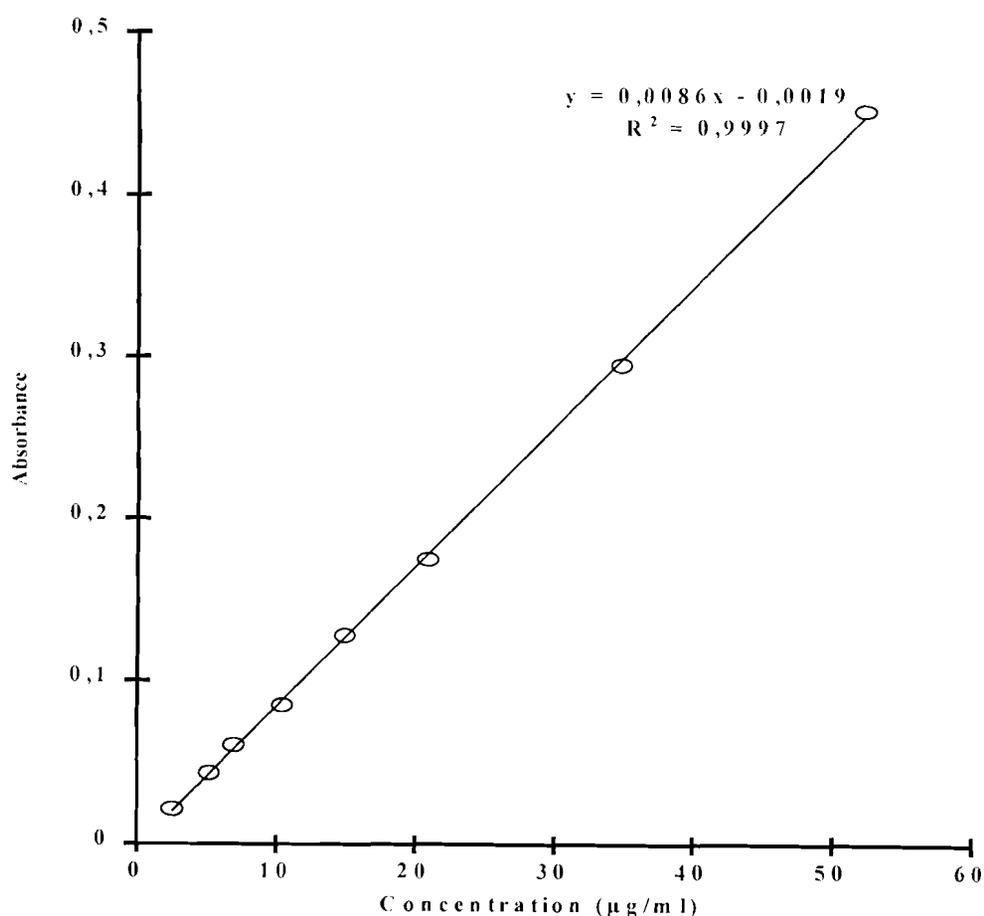
### 3.1. Pourcentage d'acides galacturoniques et degré de méthylation de la pectine HM

Les pectines utilisées sont conformes aux spécifications de la monographie de l'USP XXIII (1995). La teneur en acides galacturoniques, exprimée en pourcentage (% m/m) par rapport à la poudre desséchée, et le degré de méthylation (DM), qui est le pourcentage molaire (% mole/mole) d'acides galacturoniques estérifiés par le méthanol, sont donnés dans le tableau I.7. Le degré de méthylation étant supérieur à 50 %, il s'agit bien de pectines hautement méthoxylées (HM).

La teneur en acides galacturoniques de la pectine, déterminée par la méthode au carbazole (Bitter et Muir, 1962), est également reprise dans le tableau I.7. Elle n'est pas statistiquement différente de celle obtenue avec la méthode USP XXIII, 1995 (test t,  $p < 0.05$ ).

**Tableau I.7:** Teneur en acides galacturoniques et degré de méthylation de la pectine.

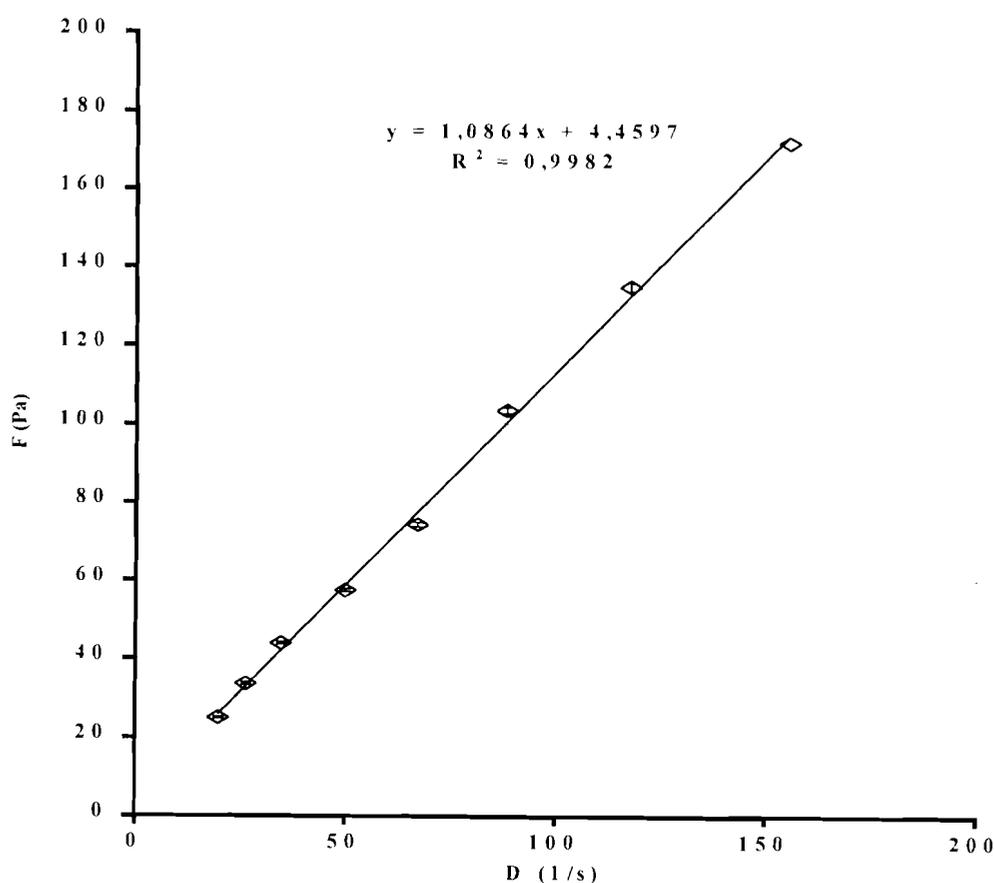
<b>% m/m d'acides galacturoniques</b> (Méthode USP XXIII)	$81.8 \pm 0.9$ (n = 4)
<b>% m/m d'acides galacturoniques</b> (Méthode au carbazole)	$79.8 \pm 1.5$ (n = 4)
<b>Degré de méthylation (DM, % m/m)</b> (Méthode USP XXIII)	$59.9 \pm 0.6$ (n = 4)



**Figure I.1 :** Droite d'étalonnage utilisée pour la détermination (n =3) du pourcentage en acides galacturoniques de la pectine par la méthode au carbazole. L'acide galacturonique monohydraté (98-100 %) a été utilisé comme substance de référence.

La méthode de Bitter et Muir, qui sera très utilisée dans les chapitres suivants pour effectuer les dosages de la pectine en solution, consiste à convertir dans l'acide sulfurique concentré et à chaud, l'acide galacturonique en son dérivé furfurique correspondant (acide 5-formyl-furoïque). Ce dernier est condensé par la suite avec le carbazole (un dérivé phénolique) pour donner un complexe coloré dont l'absorbance à 530 nm est proportionnelle à la concentration en acides galacturoniques présents. La sensibilité de la réaction, qui est fortement améliorée par la présence des anions borates, permet de descendre jusqu'à des concentrations de 4 µg/ml en acides galacturoniques. D'autre part, la droite d'étalonnage (figure I.1) montre l'existence d'une relation linéaire entre l'absorbance et la concentration en acides galacturoniques pour des concentrations comprises entre 4 à 60 µg/ml.

### 3.2. Etude du comportement rhéologique d'un gel aqueux à 2.5 % m/m de pectine HM



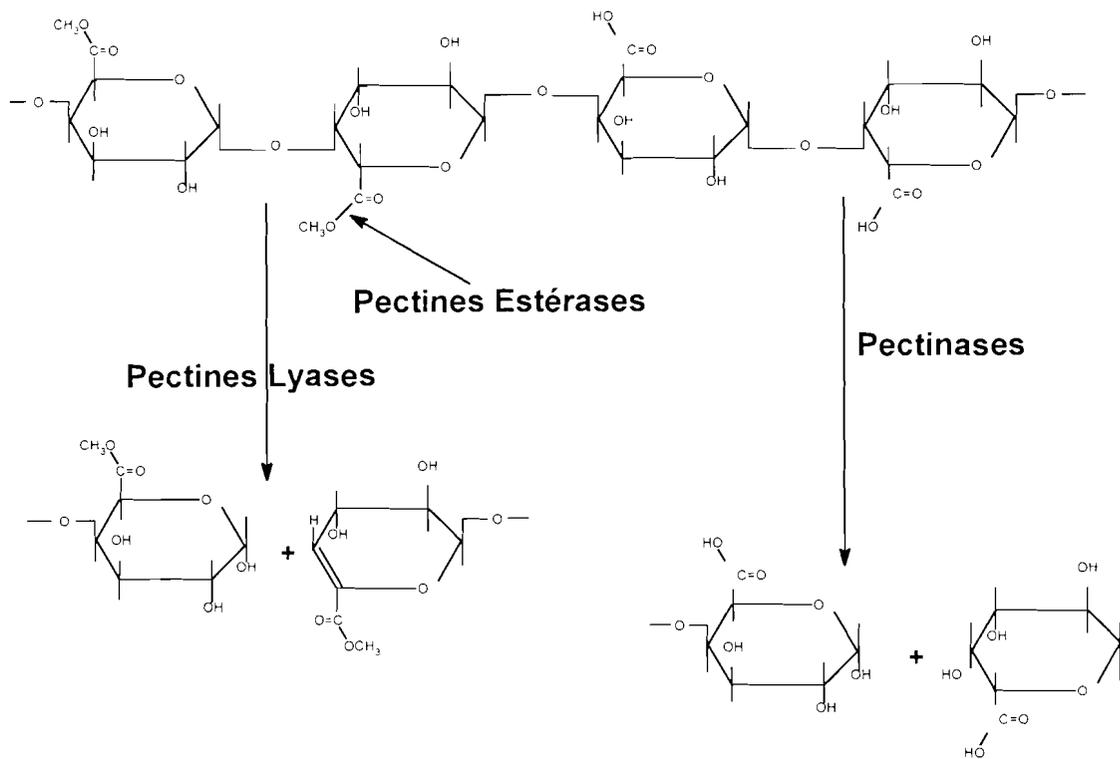
**Figure I.2 :** Rhéogramme de la solution à 2.5 % m/m de pectine HM, établi à l'aide du Rhéomat<sup>®</sup> T15. Les courbes ascendante et descendante sont parfaitement superposables et chaque point représente la moyenne de 3 déterminations. La viscosité ( $\eta$ ), déterminée par régression linéaire (pente de la droite), est de  $1086 \pm 19$  mPa.s (cps).

Comme cela a déjà été discuté dans la partie introductive de ce travail, les pectines forment des gels en milieu aqueux. Cette capacité de gélification est la propriété la plus connue et la plus exploitée dans l'industrie agro-alimentaire et dans le domaine pharmaceutique. Il est donc intéressant d'étudier le comportement rhéologique des gels de pectine. A cette fin, les rhéogrammes, représentant les variations des contraintes ( $\tau$ ) en fonction de la vitesse de cisaillement ( $D$ ), ont été déterminés à partir d'un gel aqueux à 2.5 % m/m de pectine HM (figure I.2). Comme on peut le voir à l'examen de la figure I.2, les courbes d'écoulement ascendante et descendante sont linéaires et se superposent parfaitement, indiquant que les solutions aqueuses de pectines HM, pour les faibles concentrations du moins, ont un comportement newtonien. En d'autres termes, la viscosité des gels de pectine HM est indépendante de la vitesse de cisaillement. La viscosité ( $\eta$ ) de la solution aqueuse à 2.5 % m/m de pectine HM, déterminée par régression linéaire (pente de la courbe), est de  $1086 \pm 19$  mPa.s (millipascals x seconde = cps = centipoises).

### 3.3. Etude de la dégradation de la pectine HM par les enzymes de Pectinex® Ultra SP-L

Le Pectinex® Ultra SP-L est une préparation d'enzymes pectinolytiques destinée à l'industrie agro-alimentaire pour le traitement de la pulpe de pommes et de poires, ainsi que pour la clarification des jus de fruits. Il est préparé à partir d'une souche sélectionnée d'*Apergillus niger*. Sa température et son pH d'activité optimale sont respectivement égaux à 37°C et à 4.5 unités. A pH 3.5 et à la température de 20°C, le Pectinex® Ultra SP-L a une activité de 26.000 PG / ml. 1 PG (polygalacturonase activity) est égal au nombre de milli-équivalents (mEq) de groupements réducteurs libérés par unité d'enzymes et par minute à partir de l'acide polygalacturonique.

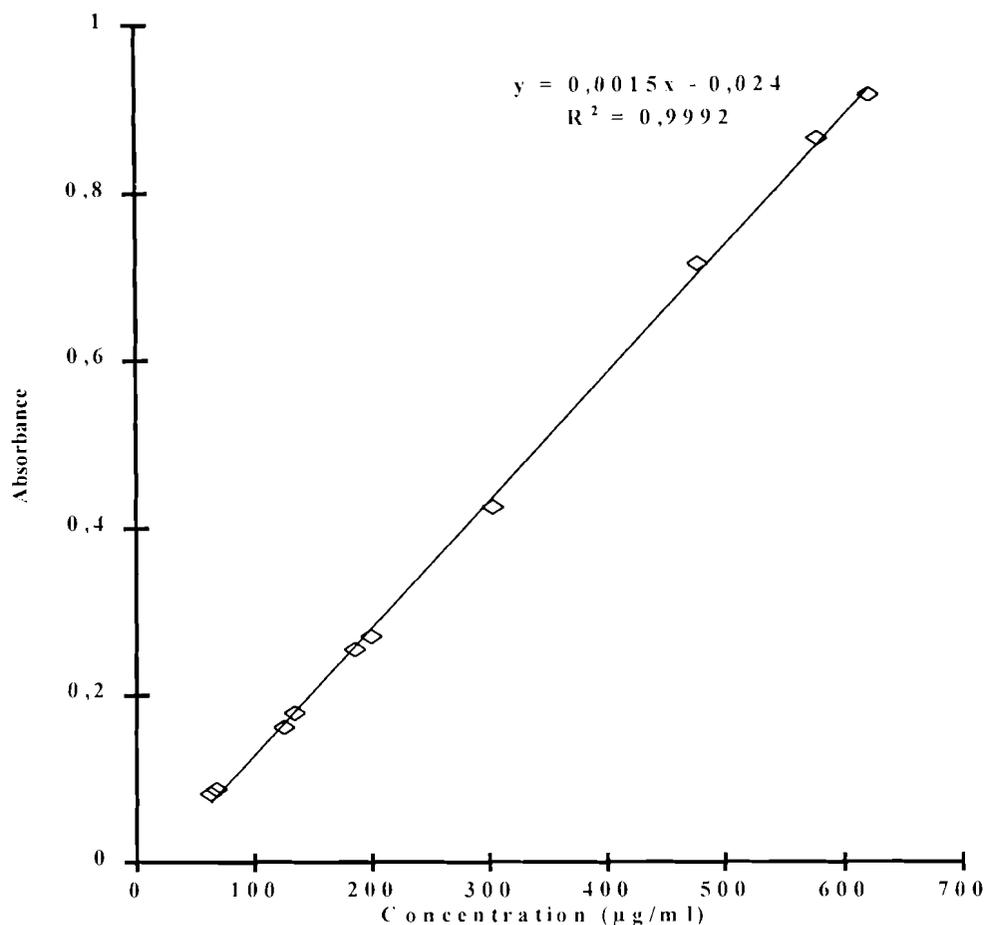
En fait, le Pectinex® Ultra SP-L contient les trois types d'enzymes pectinolytiques (figure I.3) : les pectines estérases qui hydrolysent les esters méthoxyles de la pectine, les pectinases ou polygalacturonases qui clivent les liens glycosidiques  $\alpha$ -1-4 de l'acide polygalacturonique et finalement, les pectines lyases ou trans-éliminases qui provoquent la rupture des mêmes liens osidiques mais avec, en plus, la formation de doubles liaisons entre les carbones  $C_4$  et  $C_5$  de l'acide galacturonique.



**Figure I.3 :** Mode d'action des enzymes pectinolytiques de Pectinex<sup>®</sup> Ultra SP-L.

L'action des lyases et des pectinases de Pectinex<sup>®</sup> Ultra SP-L va donc se traduire par une dépolymérisation de la pectine, entraînant une chute progressive de la viscosité des gels d'une part, et la libération de sucres réducteurs aldéhydiques, quantifiables par la méthode de Nelson (1944), d'autre part.

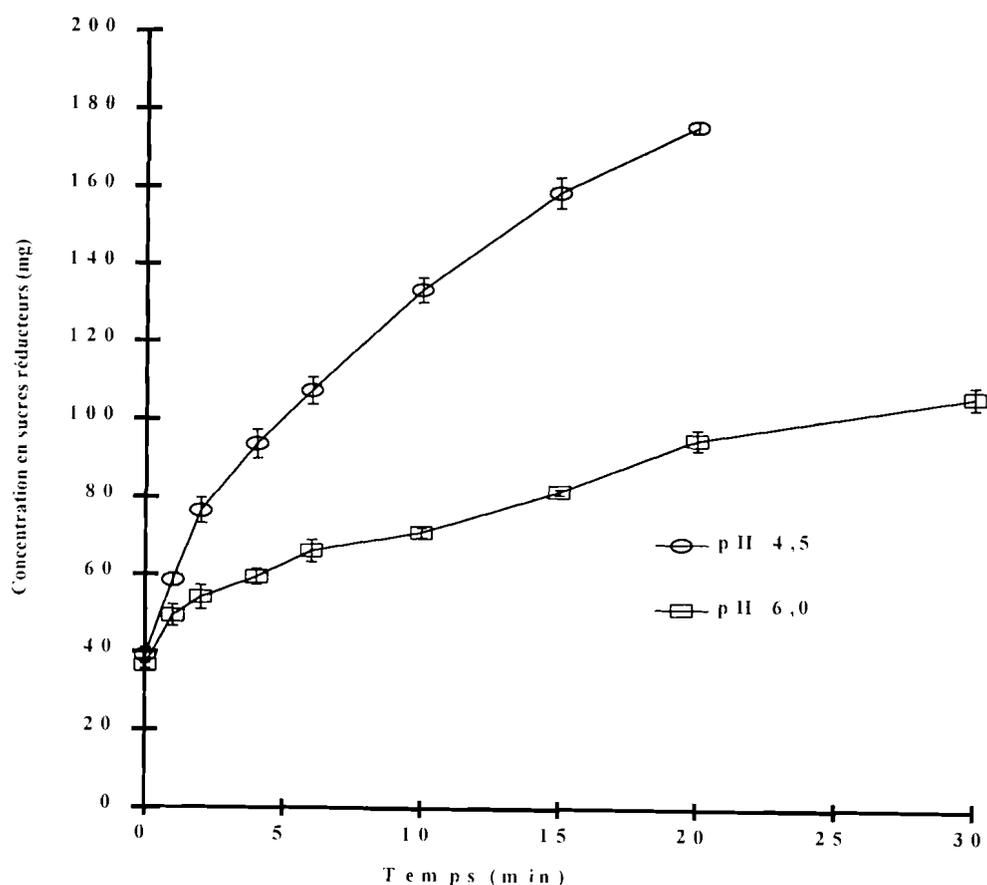
Dans cette méthode, les sucres réducteurs réduisent à chaud (100°C) une solution alcaline de sulfate cuivrique. Cela entraîne la formation d'un précipité rouge - brun d'oxyde cuivreux qui forme à froid avec le réactif arsénomolybdique un complexe bleu soluble (conf. paragraphe 2.2.1.4). Comme on peut le voir sur la figure I.4, qui représente la droite d'étalonnage obtenue avec l'acide galacturonique (substance de référence), l'absorbance de ce complexe, à 520 nm, est proportionnelle à la concentration en sucres réducteurs présents dans le milieu réactionnel. La linéarité est vérifiée dans l'intervalle de concentration en acide galacturonique compris entre 50 et 650  $\mu\text{g} / \text{ml}$ , avec un coefficient de régression ( $R^2$ ) de 0.9992.



**Figure I.4 :** Droite d'étalonnage utilisée dans la détermination ( $n = 3$ ) des sucres réducteurs selon la méthode de Nelson. L'acide galacturonique monohydraté (98-100 %), était utilisé comme substance de référence.

La figure I.5 montre la dégradation enzymatique de la pectine HM par le Pectinex<sup>®</sup> Ultra SP-L. Elle représente, en effet, l'augmentation de la concentration des sucres réducteurs dans le milieu lorsque 50 g de la solution de pectine HM à 0.5 % m/m sont incubés en présence de 100 µl de Pectinex<sup>®</sup> Ultra SP-L. Comme on pouvait s'y attendre, l'action de Pectinex<sup>®</sup> Ultra SP-L sur la pectine HM entraîne effectivement les ruptures des liens osidiques avec formation de groupements réducteurs. Un examen plus approfondi de la figure I.5 permet également de constater que l'action des enzymes pectinolytiques se manifeste très rapidement et de manière intense dans les premières minutes d'incubation. En effet, on constate qu'après 5 minutes, la vitesse de la réaction diminue progressivement, probablement à cause de l'épuisement progressif du substrat ou de la variation du pH.

A l'examen de la figure I.5, on peut aussi constater que le pH du milieu a une très grande influence sur la vitesse de dégradation de la pectine HM qui est beaucoup plus rapide à pH 4.5 qu'à pH 6.0. Malgré ce constat, nous avons préféré effectuer les études de dissolution à pH 6.0 afin d'être le plus proche possible des conditions qui prévalent dans le caecum et le côlon ascendant.

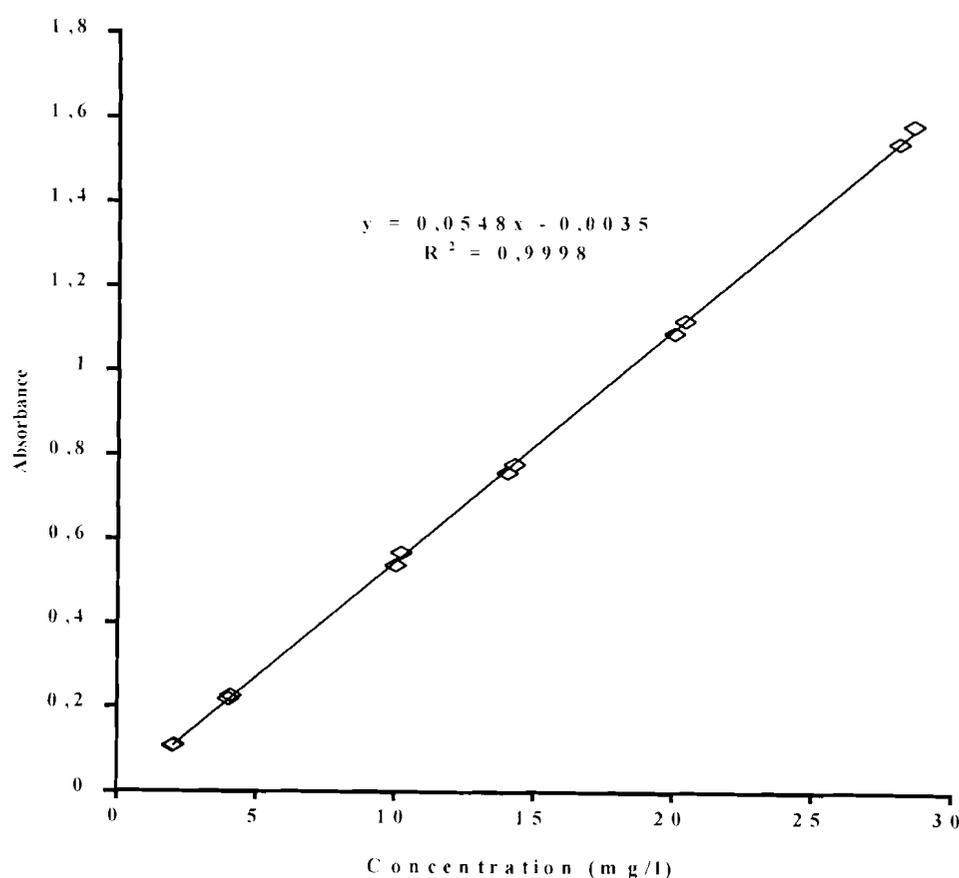


**Figure I.5 :** Augmentation de la quantité (mg) des sucres réducteurs ( $m \pm SD$ ,  $n = 3$ ) lors de l'incubation à 37°C de 50 g d'une solution à 0.5 % m/m de pectine HM en présence de 100  $\mu$ l de Pectinex® Ultra SP-L.

### 3.4. Essais de dissolution

Afin d'évaluer le potentiel des pectines comme matériaux utilisables pour la délivrance spécifique des médicaments dans le côlon, nous avons préparé des comprimés de théophylline enrobés par le procédé du dry coating avec de la pectine HM.

Les comprimés, dont les compositions et les caractéristiques sont résumées respectivement dans les tableaux I.3 et I.4, répondent aux normes de la Pharmacopée Européenne (3<sup>ème</sup> édition, 1995) définies pour les comprimés conventionnels à délitage rapide (uniformité de teneur, de masse, perte à l'effritement et temps de délitage). Le fait d'utiliser des comprimés à désagrégation rapide est nécessaire afin de pouvoir interpréter plus facilement les résultats des tests de dissolution effectués sur les comprimés enrobés. En effet, puisque la désagrégation des comprimés nus (noyaux) et la libération du traceur qui s'en suit sont extrêmement rapides, tout retard observable de la libération du traceur à partir des comprimés enrobés peut être attribué à la présence de l'enrobage.



**Figure I.6 :** Droite d'étalonnage de la théophylline dissoute dans le tampon acétate - phosphate 0.05 M de pH 6.0. Les absorbances des solutions ont été mesurées à 272 nm (n=3).

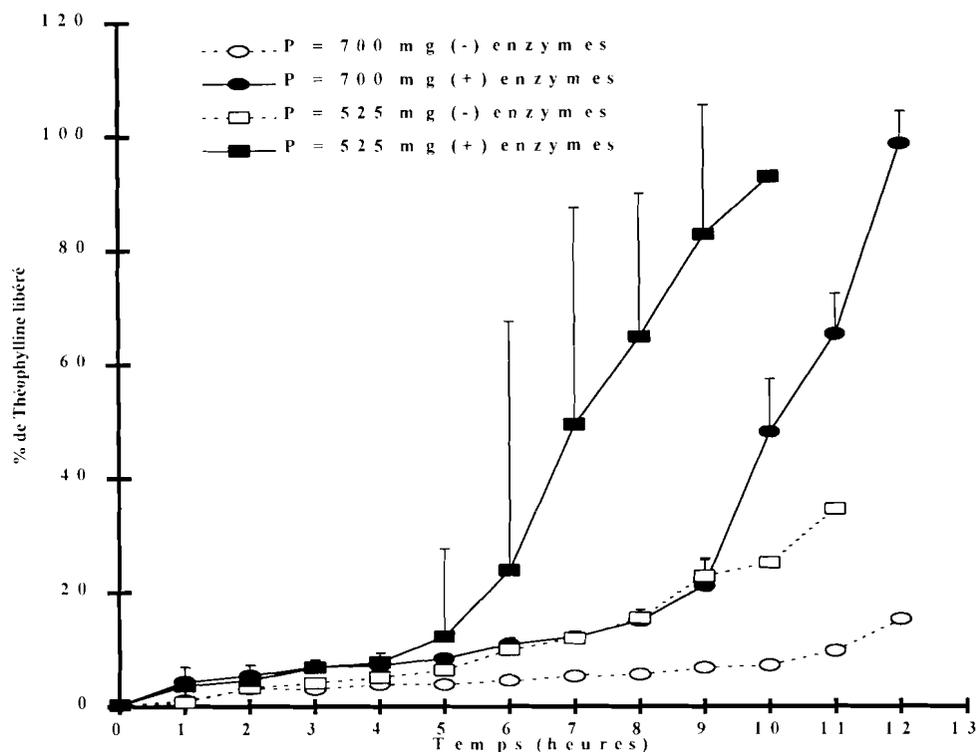
Le choix de la théophylline comme traceur dans nos études de dissolution a aussi été guidé par les propriétés physico-chimiques, analytiques et pharmacologiques de cet antiasthmatique. En effet, ce principe actif est très bien résorbé dans tout le tractus gastro-intestinal y compris dans le côlon. Il peut également être incorporé dans une formulation

“colonique” car le traitement de l’asthme pourrait être amélioré par l’utilisation d’une telle formulation. Le dosage de la théophylline est effectué par spectrophotométrie UV, à 272 nm. La figure 1.6, qui représente la droite d’étalonnage (absorbance – concentration) de la théophylline, a été utilisée pour la détermination des pourcentages de théophylline libérés pendant les tests de dissolution. Enfin, le spectre d’absorption, la solubilité et les caractéristiques de dissolution de la théophylline ne sont pratiquement pas influencés par le pH du milieu, ce qui facilite grandement l’interprétation des résultats.

Quant au choix des pectines HM comme matériaux d’enrobage, il repose sur le fait que comparativement aux pectines FM (faiblement méthoxylées), qui ont une capacité de gélification relativement très faible, les pectines HM peuvent mieux assurer la protection des principes actifs lors du transit de bouche à caecum. En effet, Ashford et coll. (1993c) ont enrobé par compression des noyaux (comprimés de 120 mg renfermant 20 mg de fluorescéine comme traceur) avec des pectines HM et des pectines FM. Ils ont observé que seuls les enrobages préparés à partir de 700 mg de pectines HM permettent de protéger les noyaux soumis aux conditions, *in vitro*, simulant le transit de bouche à caecum (2 heures à pH 1.3 suivi de 3 heures à pH 7.4). De plus, ils ont montré qu’à pH 6.0, la présence de Pectinex<sup>®</sup> Ultra SP-L dans les milieux de dissolution entraîne une accélération de la vitesse de libération du traceur et la désagrégation complète du comprimé. Ce phénomène a également été constaté par Wakerly et coll. (1996a) qui ont observé une accélération significative de la libération du Naphthol vert B à partir de comprimés de 300 mg enrobés par compression avec 600 mg de pectines HM, en présence des cultures de *Bacteroides ovatus*. Les études de scintigraphie gamma, effectuées sur 6 volontaires sains, ont confirmé les résultats des études *in vitro* en montrant que tous les comprimés enrobés se délitent dans le côlon (entre le caecum et l’anse splénique) (Ashford et coll., 1993c).

L’enrobage des comprimés de théophylline avec 700 mg de pectine HM nous a permis d’observer des résultats similaires. En effet, comme on peut le voir sur la figure I.7, les manteaux de 700 mg de pectine HM appliqués sur les comprimés de théophylline permettent une protection complète des noyaux pendant plus de 12 heures dans le tampon acétate – phosphate 0.05 M de pH 6.0. Cette capacité de protection est liée aux propriétés gélifiantes de la pectine HM. Au contact de l’eau, la pectine se solvate très rapidement et forme une “barrière gel” s’opposant à la diffusion du liquide de dissolution vers l’intérieur des

comprimés. L'examen des comprimés après 12 heures d'immersion dans le liquide de dissolution a effectivement permis de constater que les noyaux sont encore secs. De plus, nous avons également observé qu'au cours de l'épreuve de dissolution, la taille des comprimés enrobés diminue progressivement par érosion, de telle sorte que la libération du traceur ne peut intervenir qu'après une érosion suffisante de l'enrobage.



**Figure I.7 :** Libération de la théophylline (m + SD, n = 3) à partir des comprimés enrobés avec 525 mg et 700 mg de pectine HM, en l'absence et en présence des enzymes pectinolytiques.

Le Pectinex<sup>®</sup> Ultra SP-L, comme on l'a déjà vu, dépolymérise les pectines. Par conséquent, sa présence dans le milieu de dissolution provoque une diminution de la viscosité de la couche de polymère solvaté, ainsi qu'une augmentation de la vitesse de dissolution de la pectine et donc, une accélération de l'érosion de l'enrobage. Cela se traduit évidemment par une diminution du temps de latence de la libération de la théophylline, comme on peut le constater sur la figure I.7. En présence de Pectinex<sup>®</sup> Ultra SP-L, en effet, la libération du principe actif est fortement accélérée à partir de la 5<sup>ème</sup> et de la 9<sup>ème</sup> heure du test de dissolution et s'achève assez rapidement, avant la 9<sup>ème</sup> et la 12<sup>ème</sup> heure, respectivement pour les comprimés enrobés avec 525 et 700 mg de pectine HM.

Le phénomène de gélification, responsable de la formation de la couche mucilagineuse du polymère solvaté et donc des temps de latence observés, est à la base de l'utilisation des pectines dans la préparation des systèmes matriciels à libération prolongée. Dans ces systèmes matriciels en effet, la couche de polymère solvaté, en s'opposant d'une part à la pénétration des liquides d'épreuve dans le système et d'autre part, à la diffusion du principe actif vers l'extérieur, permet de ralentir la libération du principe actif. Ici aussi, l'érosion progressive de la matrice polymérique est souvent le mécanisme principal de la libération du principe actif. A cet égard, l'étude de la libération de la prednisolone à partir de comprimés matriciels de pectines HM et d'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) a permis à Kim et Fassihi (1997a,b) de démontrer, grâce aux images photographiques prises régulièrement pendant les essais de dissolution, que la libération du principe actif est régie par le gonflement et l'érosion de la matrice polymérique.

Rappelons que les pectines FM, qui présentent un faible pouvoir de gélification, peuvent être réticulées par le calcium pour former des pectinates de calcium qui ont un pouvoir gélifiant très élevé. De ce fait, les pectinates de calcium peuvent également jouer un rôle appréciable dans l'administration colonique des médicaments comme l'ont montré les nombreuses études effectuées sur des systèmes matriciels constitués de pectinates de calcium (Rubinstein et coll., 1993; Ashford et coll., 1994; Sriamornsak, 1998). Ces études ont notamment montré que les matrices de pectinates de calcium peuvent, dans une certaine mesure, ralentir de manière satisfaisante la libération des traceurs, particulièrement les traceurs peu hydrosolubles comme l'indométhacine (Rubinstein et Radai, 1995). Comme dans le cas des formes obtenues avec les pectines HM, la présence des enzymes pectinolytiques, en augmentant la vitesse d'érosion de la matrice, accélère la libération des traceurs de manière appréciable.

Comparés aux enrobages préparés avec 700 mg de pectine HM, ceux obtenus avec 525 mg protègent moins bien les noyaux (figure I.7). En effet, en l'absence des enzymes pectinolytiques, les comprimés enrobés avec 525 mg de pectine HM libèrent, endéans 11 heures, près de 35 % de leur contenu en théophylline. En revanche, en présence des enzymes, la libération de la théophylline est supérieure à 10 % de la teneur déclarée après 5 heures de test et atteint plus de 90 % endéans les 10 heures. De plus, les écarts observés entre les essais sont largement supérieurs dans les cas des comprimés enrobés avec 525 mg de pectine HM

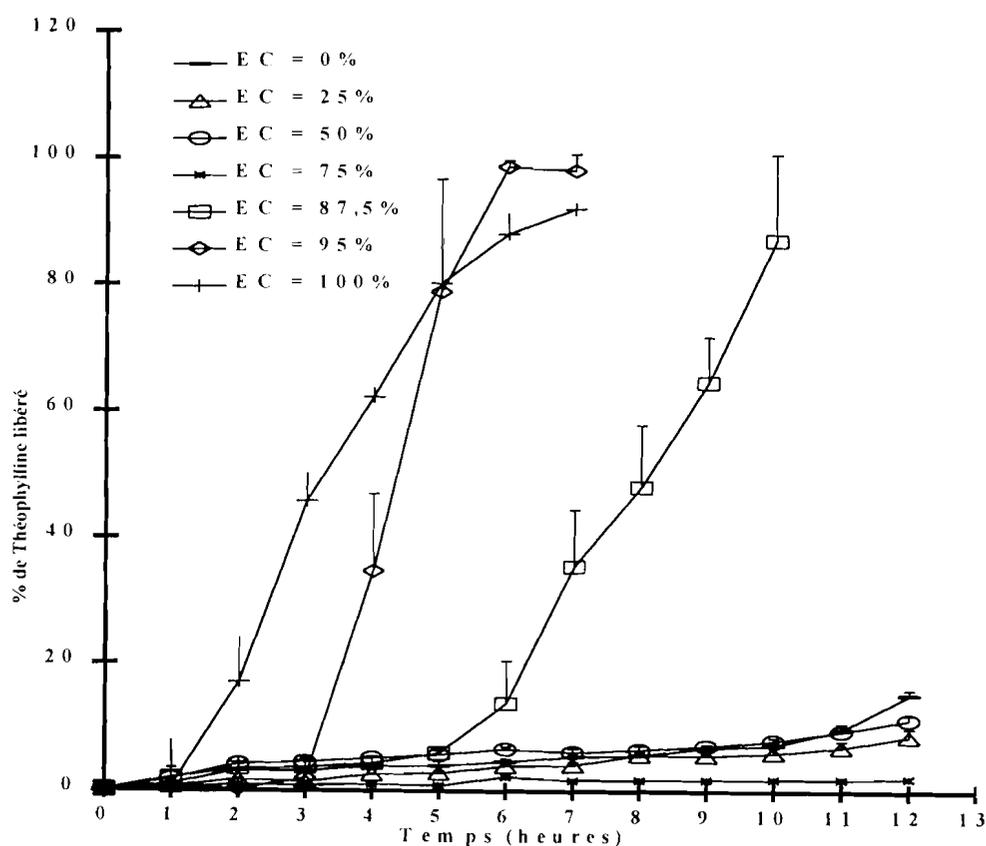
parce que le phénomène d'érosion est plus erratique suite à la formation d'une gangue mucilagineuse moins cohésive. L'épaisseur de l'enrobage a donc une importance considérable dans le contrôle des temps de latence de libération. Un manteau de 700 mg par unité nous a paru être un compromis optimal afin d'obtenir à la fois une protection satisfaisante des noyaux en l'absence des enzymes pectinolytiques et une libération assez rapide en présence de ces mêmes enzymes. Nous avons donc choisi cette quantité d'enrobage pour évaluer, par la suite, l'impact de la teneur en éthylcellulose du manteau sur la libération de la théophylline à partir des comprimés enrobés.

Les pectines sont des poudres difficilement compressibles. Nous avons pu constater, en effet, que les enrobages préparés à partir de pectine seule s'effritent facilement et doivent être manipulés avec précaution. Récemment, Kim et coll. (1998) ont aussi constaté que les poudres de pectines, utilisées telles quelles, sont très peu compressibles. Afin de pouvoir préparer des comprimés possédant des propriétés physiques compatibles avec les techniques de fabrication industrielle, ces auteurs ont suggéré d'ajouter une quantité égale d'agent liant, une cellulose microcristalline par exemple, aux pectines constituant l'enrobage manteau.

L'éthylcellulose, dérivé éthoxylé de la cellulose naturelle, est insoluble dans les milieux aqueux et possède de bonnes propriétés de compressibilité. Sa présence dans le manteau est susceptible d'améliorer non seulement les propriétés mécaniques et le contrôle de la perméabilité de l'enrobage mais aussi, la protection du principe actif en l'absence des enzymes pectinolytiques. D'autre part, les éthylcelluloses de faible viscosité, évaluées sous forme de comprimés matriciels, contrôlent mieux la libération des traceurs que les éthylcelluloses de haute viscosité (Upadrashta et coll., 1993). L'ensemble de ces considérations nous a conduit à utiliser l'Ethocel<sup>®</sup> STD 45 (le chiffre 45 représente la viscosité, en mPa.s, d'une solution à 2 % m/m de ce produit dans du toluène), qui est une éthylcellulose de faible viscosité, pour préparer les enrobages mixtes Pectine HM / Ethylcellulose.

La figure I.8 montre l'influence de la teneur de l'enrobage en éthylcellulose sur la libération de la théophylline dans le tampon acétate – phosphate 0.05 M de pH 6.0, à partir des comprimés enrobés avec les mélanges Pectine HM / Ethocel<sup>®</sup> STD 45. L'examen de cette figure permet de constater que jusqu'à des teneurs de 75 % m/m d'éthylcellulose, les enrobages mixtes permettent de bloquer totalement la libération de la théophylline pendant au

moins 12 heures. Pendant ce laps de temps, en effet, on constate que la libération est très faible puisque la quantité de théophylline détectée dans les milieux de dissolution est, dans tous ces cas, inférieure à 20 % de la teneur nominale. Cependant, l'augmentation du pourcentage d'éthylcellulose au delà de 87.5 % m/m entraîne une diminution importante du pouvoir protecteur de l'enrobage (figure I.8). En effet, la libération de la théophylline a lieu de plus en plus rapidement au fur et à mesure que la teneur des enrobages en éthylcellulose approche les 100 %. Ces enrobages, très riches en Ethocel® STD 45, ne conviennent donc pas pour assurer une délivrance colonique des médicaments car ils sont incapables de contenir la libération du principe actif dans l'intestin grêle.

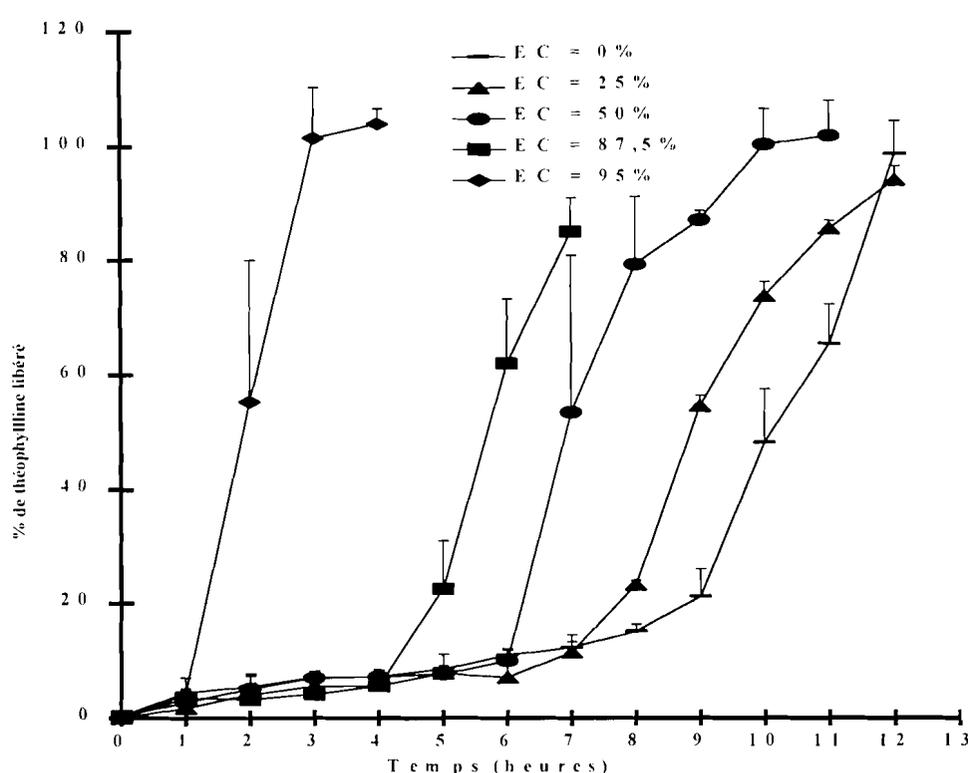


**Figure I.8 :** Libération de la théophylline ( $m + SD$ ,  $n = 3$ ) à partir des comprimés enrobés avec 700 mg des mélanges physiques Pectine HM / Ethocel® STD 45, dans lesquels les teneurs en éthylcellulose (EC) sont 0, 25, 50, 75, 87.5, 95 et 100 % m/m. Les milieux de dissolution (tampon acétate - phosphate 0.05 M de pH 6.0) ne contenaient pas d'enzymes pectinolytiques.

Le fait que les enrobages renfermant 75 % et moins d'éthylcellulose permettent une protection satisfaisante des noyaux alors que ceux dont la teneur en éthylcellulose dépasse

87.5 % perdent de plus en plus leur capacité de protection peut s'expliquer par l'incapacité de l'éthylcellulose à former un gel dans l'eau. Aux fortes teneurs en éthylcellulose, il n'y a donc plus de barrière gel empêchant la pénétration du liquide de dissolution dans les comprimés. Celui-ci peut alors atteindre plus rapidement les noyaux par simple diffusion, y dissoudre la théophylline qui sera finalement libérée soit par diffusion, soit après désagrégation de l'enrobage.

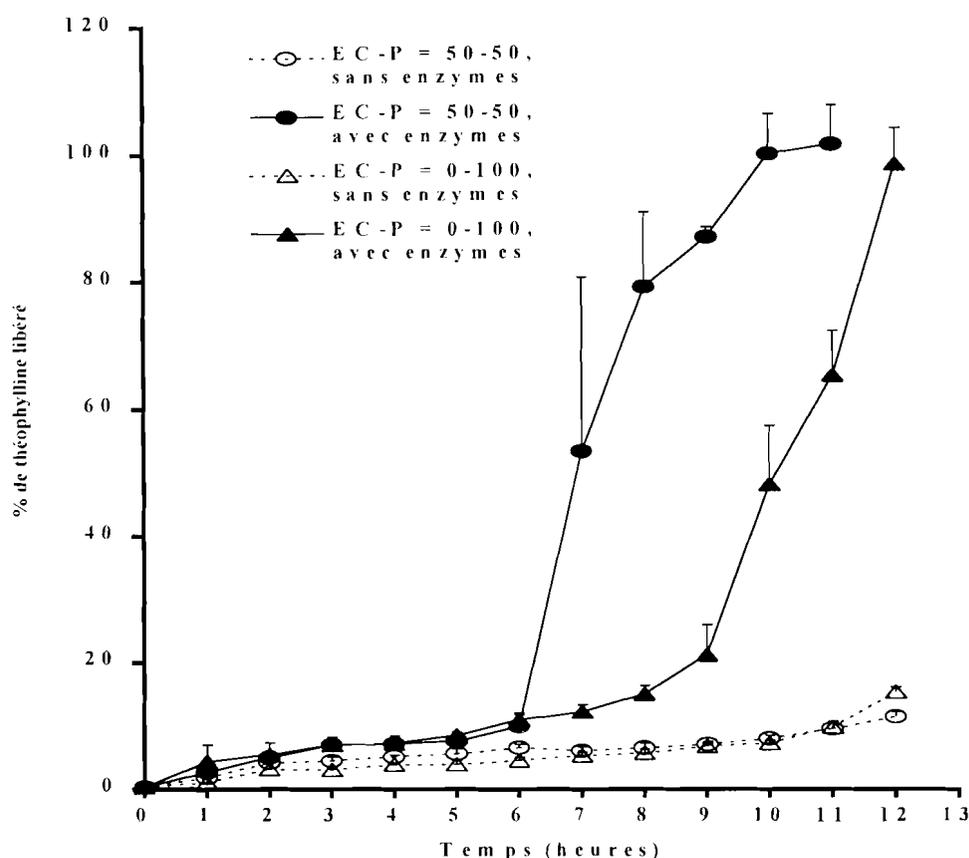
La figure I.9 représente les courbes de libération de la théophylline en présence des enzymes pectinolytiques.



**Figure I.9 :** Influence des enzymes pectinolytiques sur la libération de la théophylline ( $m \pm SD$ ,  $n = 3$ ) à partir des comprimés enrobés avec 700 mg des mélanges physiques Pectine HM / Ethocel<sup>®</sup> STD 45, dans lesquels les teneurs en éthylcellulose (EC) sont 0, 25, 50, 87.5 et 95 % m/m. Les enzymes pectinolytiques étaient ajoutées aux milieux de dissolution (tampon acétate - phosphate 0.05 M de pH 6.0) avant le début des tests.

L'addition des enzymes pectinolytiques aux milieux de dissolution s'accompagne, dans tous les cas où l'enrobage renferme de la pectine, d'une diminution du temps de latence de la libération de la théophylline. En effet, si on compare la figure I.9 à la figure I.8, on constate que la libération de la théophylline a lieu plus tôt en présence des enzymes

pectinolytiques. La dégradation de la pectine par ces enzymes s'accompagne donc d'un accroissement du nombre de pores de libération à travers l'enrobage et/ou d'une désagrégation plus rapide de ce dernier. En comparant les figures I.8 et I.9, on peut aussi constater que même lorsque les enrobages renferment des teneurs très faibles en pectine (EC = 95 % m/m), la présence des enzymes pectinolytiques dans les milieux de dissolution entraîne une accélération de la libération de la théophylline. Tous les enrobages mixtes Ethylcellulose - Pectine sont donc perméables aux enzymes de Pectinex® Ultra SP-L.



**Figure I.10 :** Influence des enzymes pectinolytiques sur la libération de la théophylline (m + SD, n = 3) à partir des comprimés enrobés avec 700 mg des mélanges physiques Ethocel® STD 45 / Pectine HM (EC-P = 50-50 et 0-100, m/m). Les enzymes pectinolytiques étaient ajoutées aux milieux de dissolution (tampon acétate - phosphate 0.05 M de pH 6.0) avant le début des tests.

A l'examen de la figure I.10, on peut observer qu'un manteau constitué de 50 % de pectine HM et de 50 % d'Ethocel® STD 45 permet d'obtenir des résultats très différents de ceux obtenus avec des comprimés dont l'enrobage est constitué uniquement de pectine HM. En effet, bien que les deux types d'enrobage offrent une protection satisfaisante du traceur en

l'absence des enzymes pectinolytiques (pendant plus de 12 heures), on observe qu'en présence des enzymes, les comprimés enrobés avec le mélange Pectine HM / Ethocel® STD 45 (50 : 50) libèrent beaucoup plus rapidement la théophylline (à partir de la 6<sup>ème</sup> heure) que les comprimés enrobés avec la pectine HM seule (la libération commence à partir de la 9<sup>ème</sup> heure).

Cette différence est probablement due au fait qu'il y a deux fois moins de pectine dans le manteau Pectine HM / Ethocel® STD 45 (50 : 50) que dans le manteau constitué de pectine HM seule, alors que la quantité totale d'enzymes pectinolytiques (2 ml de Pectinex Ultra SP-L) présente dans les milieux de dissolution est la même pour tous les essais de dissolution. On peut ainsi comprendre que la pectine incorporée dans le manteau Pectine / Ethocel® STD 45 (50 : 50) soit dégradée plus rapidement que celle des enrobages constitués par la pectine seule. Le volume libre créé par la disparition de la pectine sous l'action des enzymes favorise la pénétration du liquide de dissolution dans l'enrobage manteau, accélère le processus de désagrégation de ce dernier et, par conséquent, diminue le temps de latence de libération du principe actif.

#### 4. Conclusion

Les résultats obtenus montrent que la pectine HM, seule ou en combinaison avec l'éthylcellulose, est susceptible d'être utilisée pour effectuer la libération sélective des principes actifs dans le côlon. En effet, en l'absence des enzymes pectinolytiques, les enrobages mixtes Pectine HM / Ethylcellulose renfermant moins de 75 % m/m d'éthylcellulose, permettent de protéger les noyaux contre la pénétration du liquide de dissolution et cela pendant plus de 12 heures. D'autre part, l'addition des enzymes pectinolytiques aux milieux de dissolution entraîne une accélération de la libération de la théophylline. Cependant, lorsque la teneur en éthylcellulose des enrobages dépasse 75 % m/m, ceux-ci perdent leur capacité de protection mais, l'addition des enzymes pectinolytiques aux milieux de dissolution accélère toujours la libération de la théophylline à partir des comprimés enrobés.

Etant donné que tous les enrobages Pectine HM / Ethylcellulose, y compris ceux qui renferment de très faibles quantités de pectine (5 % m/m), sont accessibles aux enzymes

---

pectinolytiques, on peut imaginer que l'incorporation des pectines dans les dispersions aqueuses de polymères d'enrobage insolubles (Aquacoat<sup>®</sup> ECD 30, Surelease<sup>®</sup> clear, Eudragits<sup>®</sup> RS30D et NE30D), permettrait d'enrober, à l'aide de la technique du lit d'air fluidisé, des formes orales en vue d'une délivrance spécifique des principes actifs dans le côlon. Cette manière d'opérer permettrait d'éviter l'utilisation de la technique d'enrobage à sec, par compression d'un manteau autour du substrat, qui nécessite la mise en oeuvre de grandes quantités de matériaux d'enrobage (rapports enrobage / substrat élevés), mais aussi l'utilisation de machines à compression spécifiques (ex. comprimeuse Manesty<sup>®</sup> Dry Cota) pour atteindre des capacités industrielles de production.

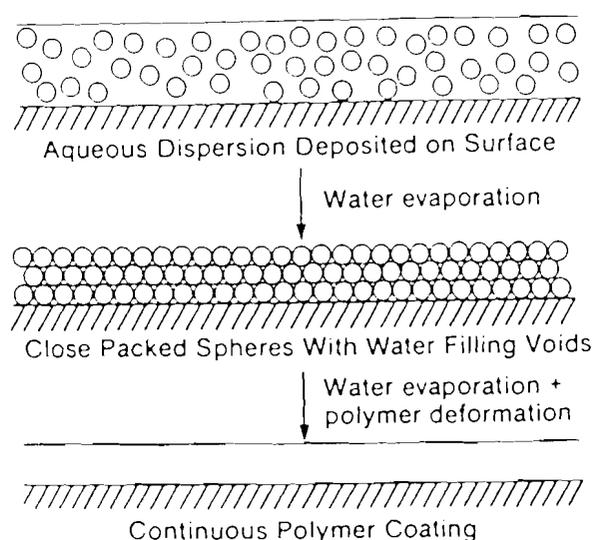
---

**Chapitre II : Etude de l'influence des enzymes pectinolytiques sur les cinétiques d'absorption d'eau et de libération de la pectine à partir des films mixtes obtenus à l'aide des dispersions aqueuses de polymères d'enrobage insolubles contenant de la pectine HM ou des pectinates de calcium**

<b>1. Introduction</b>	89
<b>2. Matériels et méthodes</b>	91
<b>2.1. Matériels</b>	91
<b>2.2. Méthodes</b>	93
<i>2.2.1. Préparation des gels de pectine HM et de pectinates de calcium</i>	93
<i>2.2.2. Préparation des films mixtes</i>	94
<i>2.2.3. Etude des cinétiques de libération de la pectine HM ou des pectinates de calcium à partir des films mixtes</i>	96
<i>2.2.4. Etude des cinétiques d'absorption d'eau (tampon acétate - phosphate 0.05 M de pH 4.5) par les films mixtes</i>	96
<b>3. Résultats et discussion</b>	97
<b>3.1. Cinétiques de libération de la pectine HM ou des pectinates de calcium à partir des films mixtes</b>	97
<b>3.2. Cinétiques d'absorption d'eau (tampon acétate - phosphate 0.05 M de pH 4.5) par les films mixtes</b>	104
<b>4. Conclusion</b>	107

## 1. Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons montré qu'associer la pectine à un polymère insoluble tel que l'éthylcellulose, par simple mélange physique des deux constituants, permet d'obtenir des enrobages coloniques. Cependant, les limitations liées à l'utilisation de la technique du dry coating nous conduisent à envisager l'usage de techniques d'enrobage facilement applicables à l'industrie pharmaceutique. Les enrobages réalisés à l'échelle industrielle sont généralement obtenus par pulvérisation continue sur les substrats à enrober, soit de solutions aqueuses ou organiques de polymères, soit de dispersions aqueuses de polymères insolubles. Ces dernières, appelées aussi latex ou pseudolatex, sont constituées de particules de polymères insolubles, de 0.1 à 0.3  $\mu\text{m}$  de diamètre, dispersées dans la phase aqueuse.



**Figure II.1 :** Processus de formation des films à partir d'une dispersion aqueuse de polymère insoluble (Wheatley et Steuernagel, 1997).

Alors que la formation d'un film d'enrobage continu à partir des solutions de polymères a lieu naturellement lors de l'évaporation du solvant, celle obtenue à partir des dispersions aqueuses de polymères insolubles est très complexe. En effet, elle nécessite la coalescence et la fusion des particules colloïdales polymériques déposées sur le substrat (figure II.1). Pour que la coalescence ait lieu, il faut que les polymères soient placés dans des conditions de température supérieures à leur température de transition vitreuse ( $T_g$ ) ou à leur

température minimale de formation du film (MFT) qui peuvent être, dans certains cas, très élevées. L'addition de plastifiants permet de réduire la Tg et la MFT des latex à des valeurs compatibles avec les conditions normales de travail. Les plastifiants permettent en plus l'amélioration des propriétés mécaniques des films d'enrobage (souplesse, élasticité).

Plusieurs polymères insolubles, destinés à l'enrobage des formes à libération prolongée, existent sur le marché sous forme de dispersions colloïdales aqueuses. Il s'agit notamment des pseudolatex d'éthylcellulose (Aquacoat<sup>®</sup> et Surelease<sup>®</sup>) et des copolymères d'esters méthacryliques (Eudragits<sup>®</sup> RS30D, RL30D et NE30D). Ces différents polymères filmogènes forment des enrobages insolubles dans l'eau, peu perméables, qui permettent de contrôler, indépendamment du pH du milieu, la libération du principe actif à partir du substrat enrobé.

D'autre part, la pulvérisation de solutions aqueuses des pectines permettent également d'obtenir des films possédant de bonnes propriétés physiques et mécaniques, surtout en présence d'un plastifiant (Coffin et Fishman, 1993; 1994). Malheureusement, ces films sont solubles dans l'eau et donc incapables de protéger le principe actif lors du transit gastrique et intestinal. En effet, Sriamornsak et coll. (1997a,b) ont montré que des pellets de théophylline enrobés avec du pectinate de calcium libèrent environ 80 % de leur contenu en principe actif endéans les 4 premières heures des tests de dissolution, alors que la durée du transit de la bouche au caecum des formes pharmaceutiques solides est généralement supérieure à 4 heures (Davis et coll., 1984a,b; 1986).

L'incorporation de quantités appropriées de pectines dans les enrobages préparés à partir des dispersions aqueuses de polymères insolubles dans l'eau, devrait en principe permettre de réaliser des enrobages très peu perméables lors du transit gastrique et intestinal, mais susceptibles d'être dégradés par les enzymes pectinolytiques de la flore intestinale. De cette manière, la pectine incorporée serait digérée dans le côlon et sa disparition de l'enrobage devrait entraîner la formation de pores à travers lesquels le principe actif serait libéré. Afin que cette double exigence (faible perméabilité et dégradation enzymatique) puisse être rencontrée, il est nécessaire que les enrobages mixtes soient capables de conserver la pectine qu'ils renferment lors du transit de bouche à caecum d'une part et, d'autre part, qu'ils soient suffisamment perméables aux enzymes pectinolytiques dès leur arrivée dans le côlon. Le but

de ce chapitre est de vérifier cette hypothèse sur des films isolés, constitués de pectines et de polymères d'enrobage insolubles.

Pour ce faire, des films mixtes ont été préparés à l'aide des dispersions aqueuses d'éthylcellulose (Aquacoat<sup>®</sup> ECD 30, Surelease<sup>®</sup> clear) ou de polymères d'esters méthacryliques (Eudragits<sup>®</sup> RS30D et NE30D) contenant de la pectine HM ou des pectinates de calcium. Les cinétiques de libération de la pectine à partir de ces films mixtes, incubés à 37°C dans le tampon acétate - phosphate 0.05 M de pH 4.5, en présence et en l'absence des enzymes pectinolytiques ont été étudiées. Dans les mêmes conditions d'incubation, les cinétiques d'absorption d'eau de quelques films mixtes (Eudragit<sup>®</sup> RS - Pectine HM 10:1, Eudragit<sup>®</sup> NE - Pectine HM 10:1 et Eudragit<sup>®</sup> NE - Pectinate de calcium 10:1) ont également été déterminées.

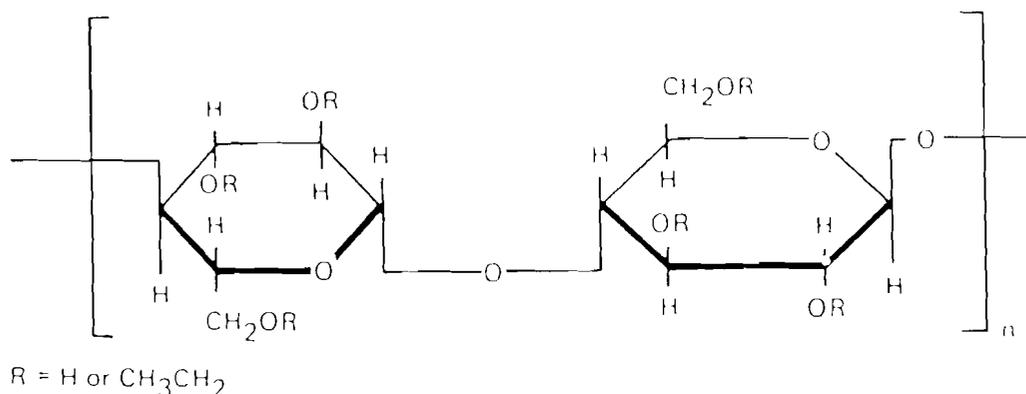
## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Matériels

La pectine type 170 ou pectine FM (faiblement méthoxylée) et la pectine HM (hautement méthoxylée) ont été respectivement fournies par Citrus colloids (Hereford, UK) et Fluka (Buchs, Suisse). Le degré de méthoxylation (DM) et la teneur en acides galacturoniques de la pectine HM ont été déterminés selon la monographie de l'USP XXIII, 1995 (voir paragraphe 2.2.1.1 du chapitre I). Les résultats sont respectivement égaux à  $59.9 \pm 0.6$  % et  $81.8 \pm 0.9$  % ( $n = 4$ ). Pour la pectine FM, les valeurs trouvées sont respectivement égales à  $38.6 \pm 1.1$  % et  $82.3 \pm 1.3$  % ( $n = 4$ ).

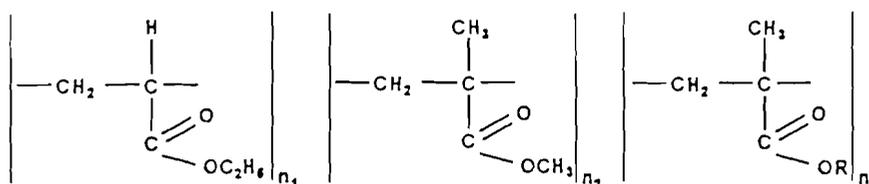
Les dispersions aqueuses d'éthylcellulose (figure II.2) utilisées sont l'Aquacoat<sup>®</sup> ECD 30 (F.M.C. Corporation, Newark, USA) et le Surelease<sup>®</sup> clear (Colorcon, Orpington, U.K.). L'Aquacoat<sup>®</sup> ECD 30 contient 29 - 32 % m/m de matière solide constituée d'éthylcellulose (24.5 - 29.5 % m/m), de lauryl sulfate de sodium (0.9 - 1.7 %) et d'alcool cétylique (1.7 - 3.3 %). Le lauryl sulfate de sodium et l'alcool cétylique sont utilisés comme stabilisants. L'usage de l'Aquacoat<sup>®</sup> ECD 30 nécessite l'addition d'environ 20 % m/m de plastifiant, contrairement au Surelease<sup>®</sup>. En effet, le Surelease<sup>®</sup> clear, qui contient environ 25 % m/m de matière solide,

renferme en plus de l'éthylcellulose, du dibutyl sébaçate qui joue le rôle de plastifiant, ainsi que de l'oléate d'ammonium et de la silice colloïdale utilisés comme stabilisants.



Figures II.2 : Structure chimique de l'éthylcellulose

### Copolymères d'esters (méth)acryliques



Nom scientifique	$n_1:n_2:n_3$	PM	Comportement dans les liquides du TGI	Nom commercial
Poly(éthylacrylate, méthylméthacrylate)	2 : 1	800.000	Films insolubles, présentant une perméabilité intermédiaire	Eudragit <sup>®</sup> NE30D
Poly(éthylacrylate, méthylméthacrylate) chlorure de triméthylaminoéthyl méthacrylate R: CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Cl <sup>-</sup>	1 : 2 : 0.1	150.000	Films insolubles, présentant une faible perméabilité	Eudragit <sup>®</sup> RS30D
Poly(éthylacrylate, méthylméthacrylate) chlorure de triméthylaminoéthyl méthacrylate R: CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Cl <sup>-</sup>	1 : 2 : 0.2	150.000	Films insoluble, présentant une perméabilité élevée	Eudragit <sup>®</sup> RL30D

Tableau II.1 : Structures chimiques et quelques propriétés des copolymères méthacryliques insolubles dans l'eau (Lehmann, 1997).

Les dispersions aqueuses des polymères d'esters méthacryliques (Eudragit<sup>®</sup> RS30D et NE30D) ont été fournies par Röhm GmbH Pharma polymer (Darmstadt, Allemagne). L'Eudragit<sup>®</sup> RS est un polyméthacrylate hydrophile faiblement cationique (présence de groupements d'ammonium quaternaires) et nécessite lors de son utilisation, l'addition de 10 à 20 % m/m de plastifiant (calculés par rapport à la teneur en polymère) afin d'abaisser sa température minimale de formation de film (MFT) en dessous de 20°C (Amighi et Moës, 1996). L'Eudragit<sup>®</sup> NE, qui est un polyacrylate neutre dont le MFT est d'environ 5°C, forme à la température du laboratoire, et sans aucune addition de plastifiant, des films mous, souples et élastiques (Amighi et Moës, 1997). Les structures chimiques et quelques propriétés des différents polymères méthacryliques insolubles sont présentées dans le tableau II.1.

Le dibutyl sébacate (DBS) et la triacétine, utilisés comme plastifiants, ont été respectivement fournis par Union Camp (USA) et Merck (Darmstadt, Allemagne). Le chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) a également été fourni par Merck. Tous les autres produits utilisés ont déjà été décrits dans le paragraphe 2.1 du chapitre I.

## 2.2. Méthodes

### 2.2.1. Préparation des gels de pectine HM et de pectinates de calcium

Le gel aqueux à 2 % m/m de pectine HM, qui a été utilisé pour la préparation des films mixtes (tableau II.2), a été préparé par simple agitation de la pectine HM dans de l'eau distillée jusqu'à sa dissolution complète.

Les gels aqueux à 1 % m/m de pectinates de calcium (rapport Calcium / Pectine FM = 0, 30 ou 60 mg/g) ont été obtenus à partir de la pectine FM, préalablement traitée dans le but d'éliminer les additifs de faible poids moléculaire comme le dextrose (purification). La méthode de purification est semblable à celle décrite dans l'USP XXIII (1995) pour quantifier les sucres et les acides organiques dans les pectines : une quantité d'environ 20 g de pectine FM est agitée pendant 1 heure avec 400 ml du mélange éthanol 95 % / eau / acide chlorhydrique concentré 30 % (60:40:5 v/v). La poudre est ensuite recueillie par filtration, lavée six fois avec des fractions de 60 ml du même mélange de solvants et finalement avec le mélange éthanol 95 % / eau (60:40, v/v) jusqu'à élimination des ions chlorures. Après avoir

été lavée avec de l'éthanol 95 %, puis séchée pendant une nuit à la température du laboratoire, la poudre a finalement été placée pendant 1 heure à 105°C dans une étuve. La quantité d'additifs extraits de la pectine FM est d'environ 48 % m/m.

La pectine FM purifiée a ensuite été utilisée pour préparer les gels aqueux à 1 % m/m de pectinates de calcium selon le mode opératoire suivant : une solution à 1.5 % m/m de pectine FM, dont la valeur du pH est préalablement ajustée à 4.5 avec une solution de NaOH 1 N, est chauffée et maintenue à la température de 80°C. Elle est ensuite additionnée d'une solution aqueuse à 3.31 % m/v de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , sous agitation lente, jusqu'à obtention des quantités de 0, 30 ou 60 mg de calcium par g de pectine FM. Les concentrations des pectinates de calcium ainsi préparés ont été finalement ajustées à 1 % m/m avec de l'eau distillée. Après refroidissement, les gels ont été conservés au frigo (4°C) pendant une nuit afin de permettre leur maturation complète avant leur utilisation pour la préparation des films mixtes contenant les pectinates de calcium (tableau II.3).

### 2.2.2. Préparation des films mixtes

Des quantités appropriées des gels à 2 % m/m de pectine HM ou à 1 % m/m de pectinates de calcium ont été lentement ajoutées, sous agitation, à chaque dispersion aqueuse de polymère insoluble (Aquacoat<sup>®</sup> ECD 30, Surelease<sup>®</sup> clear, Eudragit<sup>®</sup> NE30D ou RS30D), préalablement mélangée pendant 90 minutes si nécessaire, avec 24 % m/m (par rapport au polymère insoluble) du plastifiant requis (tableaux II.2 et II.3). Les teneurs en matière solide totale des dispersions ont ensuite été ajustées à leurs valeurs respectives avec de l'eau distillée. 10 g de chaque mélange contenant de la pectine HM ou 20 g des mélanges renfermant les pectinates de calcium ont été déposés dans des boîtes de pétri de 9 cm de diamètre. Les boîtes, recouvertes d'un entonnoir pour ralentir l'évaporation de l'eau, ont été conservées pendant une nuit dans une étuve à 60°C ou pendant 2 jours à la température du laboratoire dans le cas de la dispersion d'Eudragit<sup>®</sup> NE. Après ces temps, l'évaporation de l'eau est complète. Les films obtenus sont ensuite décollés des boîtes de pétri, mûris pendant 24 heures à 60°C et conservés dans un dessiccateur. Finalement, des échantillons d'environ 4 cm<sup>2</sup> ont été prélevés à partir des différents films et leur épaisseur a été mesurée à l'aide d'un micromètre (n = 6).

**Tableau II.2 :** Dispersions utilisées pour la préparation des films contenant 5, 10 ou 15 % m/m (par rapport à la teneur en polymère insoluble) de pectine HM.

<b>Formulation</b>	<b>Aquacoat® ECD 30</b>	<b>Surelease® clear</b>	<b>Eudragit® NE30D</b>	<b>Eudragit® RS30D</b>
Polymère insoluble (g à l'état sec)	3	3	3	3
Pectine HM (g à l'état sec)	0.15 ou 0.3	0.15 ou 0.3	0.15 ou 0.3	0.15, 0.3 ou 0.45
Dibutyl sébaçate DBS (g)	0.72	-	-	-
Triacétine (g)	-	-	-	0.72
Eau ad. (g)	32.3 ou 33.5	32.3 ou 33.5	32.3 ou 33.5	32.3, 33.5 ou 34.8
Teneur en résidu sec (% m/m) de la dispersion	12	10	10	12
Pectine / Polymère insoluble (en % m/m)	5 ou 10	5 ou 10	5 ou 10	5, 10 ou 15

**Tableau II. 3 :** Dispersions utilisées pour la préparation des films contenant 10 % m/m (par rapport à la teneur en polymère insoluble) de pectinates de calcium.

<b>Formulation</b>	<b>Aquacoat® ECD 30</b>	<b>Eudragit® RS30D</b>	<b>Eudragit® NE30D</b>
Polymère insoluble (g à l'état sec)	3	3	3
Dibutyl sébaçate (DBS) (g)	0.72	-	-
Triacétine (g)	-	0.72	-
Pectinates de calcium (g à l'état sec)	0.3	0.3	0.3
Eau ad. (g)	60	60	60
Rapport Ca / Pectine FM (mg/g)	0 ou 30	0, 30 ou 60	0, 30 ou 60
Teneur en résidu sec de la dispersion (% m/m)	6.7	6.7	5.5

### 2.2.3. *Etude des cinétiques de libération de la pectine HM ou des pectinates de calcium à partir des films mixtes*

Les échantillons de films, d'épaisseur comprise entre 130 et 170  $\mu\text{m}$ , ont été sélectionnés, pesés (Sartorius, MC1, Goettingen, Allemagne) et incubés sous agitation (100 secousses / min) à 37°C dans 25 ou 50 ml du tampon acétate - phosphate 0.05 M de pH 4.5.

A des intervalles de temps prédéterminés, des volumes de 0.5 ml des milieux d'incubation ont été prélevés et dilués avec le tampon d'incubation. La pectine HM, les pectinates de calcium et/ou leurs produits de dégradation (momomères et oligomères d'acides galacturoniques), libérés à partir des films dans les milieux d'incubation, ont ensuite été quantifiés par la méthode de Bitter et Muir, décrite dans le paragraphe 2.2.1.2 du chapitre I. Les pourcentages (moyenne  $\pm$  SD, n = 3) de pectine HM ou de pectinates de calcium libérés à partir des films mixtes ont été ensuite calculés et représentés en fonction du temps d'incubation.

L'influence des enzymes pectinolytiques sur le largage de la pectine HM ou des pectinates de calcium contenus dans les films a été étudiée de manière identique, en ajoutant 200  $\mu\text{l}$  de Pectinex<sup>®</sup> Ultra SP-L pour 100 ml de milieu d'incubation. Notons que la valeur du pH des milieux d'incubation a été fixée à 4.5 parce qu'elle correspond au pH d'activité optimale des enzymes pectinolytiques de Pectinex<sup>®</sup> Ultra SP-L.

### 2.2.4. *Etude des cinétiques d'absorption d'eau (tampon acétate - phosphate 0.05 M de pH 4.5) par les films mixtes*

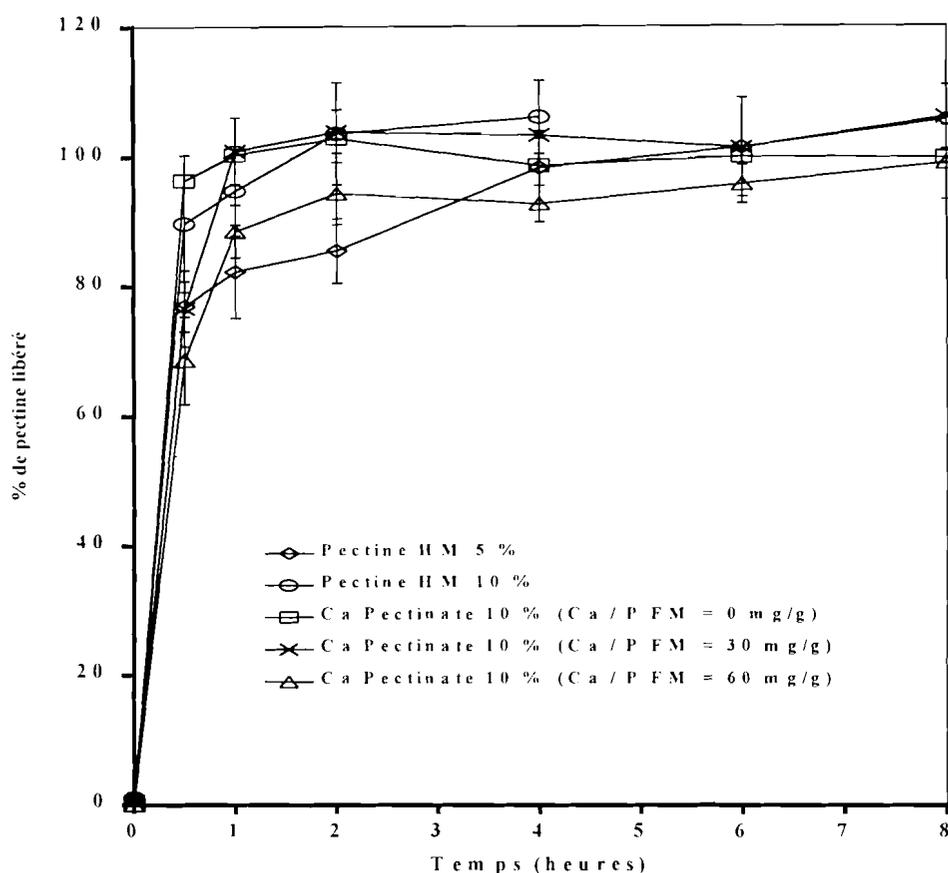
Des échantillons de films d'Eudragit<sup>®</sup> RS ou d'Eudragit<sup>®</sup> NE renfermant 10 % m/m de pectine HM ou de pectinate de calcium (rapport Ca / Pectine FM = 30 mg/g), d'environ 4  $\text{cm}^2$  et d'épaisseur comprise entre 130 et 170  $\mu\text{m}$ , ont été sélectionnés et pesés avec précision. Ils ont été ensuite incubés, à 37°C, sous agitation (100 secousses/min), dans 25 ml du tampon acétate - phosphate 0.05 M de pH 4.5, en présence ou non de Pectinex<sup>®</sup> Ultra SP-L (200 $\mu\text{l}$  / 100 ml).

A des intervalles de temps pré-établis, les échantillons de films ont été retirés des milieux d'incubation et examinés visuellement. Ils ont ensuite été rapidement pressés

légèrement entre deux papiers filtre afin d'éliminer l'excès de solution tampon, et pesés. Les pourcentages d'absorption d'eau des films, calculés à l'aide de la relation  $(100 \times (P_{ti} - P_s) / P_s)$ , où  $P_s$  est le poids du film à l'état sec et  $P_{ti}$  le poids du film humide au temps d'incubation  $t_i$ , ont été représentés en fonction du temps d'incubation.

### 3. Résultats et discussion

#### 3.1. Cinétiques de libération de la pectine HM ou des pectinates de calcium à partir des films mixtes



**Figure II.3 :** Libération, en l'absence des enzymes pectinolytiques, de la pectine ( $m \pm SD$ ,  $n = 3$ ) à partir des films d'Aquacoat® contenant 5 et 10 % m/m (par rapport à l'éthylcellulose) de pectine HM ou 10 % m/m de pectinates de calcium ( $Ca / P FM = Ca^{2+} / Pectine FM$ ).

La figure II.3 montre la libération de la pectine HM et des pectinates de calcium à partir des films mixtes préparés à l'aide de la dispersion aqueuse d'Aquacoat® ECD 30.

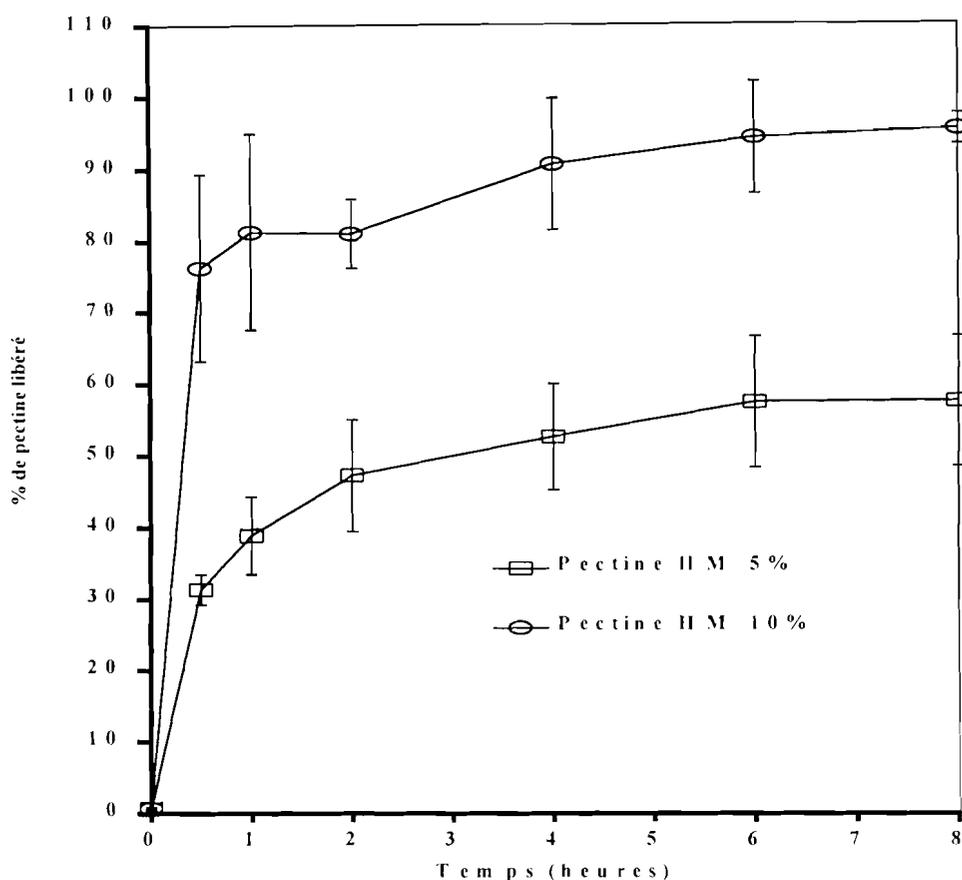
Comme on peut le constater, ces films sont incapables de contenir la libération de la pectine incorporée en l'absence des enzymes pectinolytiques, même lorsque leurs teneurs en pectine sont faibles (5 % m/m, par rapport à l'éthylcellulose). En effet, pratiquement toute la pectine contenue dans les films est libérée endéans les 30 premières minutes d'incubation. D'autre part, la libération des pectinates de calcium à partir des films d'Aquacoat<sup>®</sup>, en l'absence des enzymes pectinolytiques, est légèrement plus lente lorsque le rapport Ca / Pectine FM augmente. Ce ralentissement peut être attribué à la diminution de l'hydrosolubilité de la pectine, suite à sa réticulation par les ions calciques (Ca<sup>2+</sup>).

Nous avons également observé, comme Macleod et coll. (1997), que l'incorporation de 10 % m/m de pectine HM (par rapport à l'éthylcellulose) dans les films obtenus à partir de l'Aquacoat<sup>®</sup> ECD 30 ne compromet pas leur propriétés mécaniques. Il faut cependant reconnaître que malgré la réduction de l'hydrosolubilité de la pectine par le calcium et le fait que les films résultants possèdent de bonnes propriétés mécaniques, la combinaison des pectines et d'Aquacoat<sup>®</sup> ECD 30 semble inappropriée pour préparer des enrobages coloniques. En effet, tous les films mixtes obtenus à partir d'une telle association libèrent la totalité de leur contenu en pectine endéans les 60 minutes d'incubation, même en l'absence des enzymes pectinolytiques (figure II.3).

La figure II.4 représente les cinétiques de libération de la pectine à partir des films préparés à l'aide du Surelease<sup>®</sup> renfermant 5 et 10 % m/m (par rapport à l'éthylcellulose) de pectine HM. Il apparaît que la libération de la pectine à partir de ces films mixtes, incubés en l'absence des enzymes pectinolytiques dans le tampon acétate - phosphate 0.05 M de pH 4.5, varie fortement avec la teneur des films en pectine. En effet, la pectine est rapidement et presque complètement libérée endéans les 30 premières minutes d'incubation à partir des films à teneurs élevées en pectine HM (10 % m/m, par rapport à l'éthylcellulose). Cependant, les films obtenus à partir du Surelease<sup>®</sup> renfermant un faible pourcentage de pectine HM (5 % m/m) ne libèrent qu'environ 50 % de la quantité de pectine après 8 heures d'incubation.

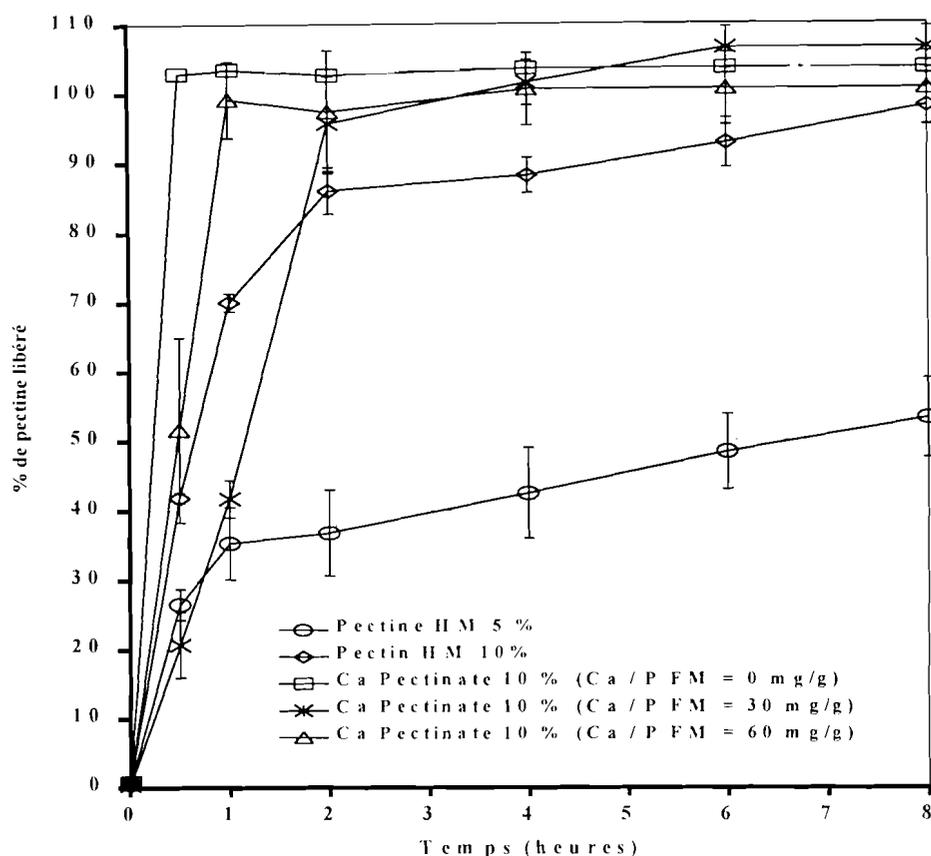
Ce phénomène de largage initial, appelé aussi "burst effect", est probablement dû à la libération des molécules de pectine situées à proximité de la surface des films. Le restant de la pectine, localisé en profondeur, est maintenu dans les films pendant plus de 8 heures d'incubation. Cette capacité de rétention de la pectine n'est observée que pour les films

renfermant 5 % m/m de pectine qui sont moins poreux que les films renfermant 10 % m/m de polymères hydrosolubles.



**Figure II.4 :** Libération, en l'absence des enzymes pectinolytiques, de la pectine ( $m \pm SD$ ,  $n = 3$ ) à partir des films de Surelease<sup>®</sup> renfermant 5 et 10 % m/m (par rapport à l'éthylcellulose) de pectine HM.

L'étude de la libération de la pectine à partir des films d'Eudragit<sup>®</sup> NE renfermant la pectine HM (figure II.5) a donné des résultats similaires à ceux observés avec les films préparés à partir du Surelease<sup>®</sup> et de la pectine HM. D'autre part, après incubation en l'absence des enzymes pectinolytiques, les films d'Eudragit<sup>®</sup> NE contenant 10 % m/m de pectinates de calcium libèrent la pectine plus lentement que ceux contenant les mêmes quantités de pectine FM ( $Ca / P \text{ FM} = 0 \text{ mg/g Ca}$ ) (figure II.5). Ce ralentissement de la libération de la pectine à partir des films d'Eudragit<sup>®</sup> NE renfermant des pectinates de calcium dépend du rapport  $Ca^{2+} / \text{Pectine FM}$ . Il est, en effet, plus important lorsque ce rapport est égal à 30 mg/g.



**Figure II.5 :** Libération, en l'absence des enzymes pectinolytiques, de la pectine ( $m \pm SD$ ,  $n = 3$ ) à partir des films d'Eudragit® NE renfermant 5 et 10 % m/m (par rapport à l'Eudragit® NE) de pectine HM ou 10 % m/m de pectinates de calcium ( $Ca / P FM = Ca^{2+} / Pectine FM$ ).

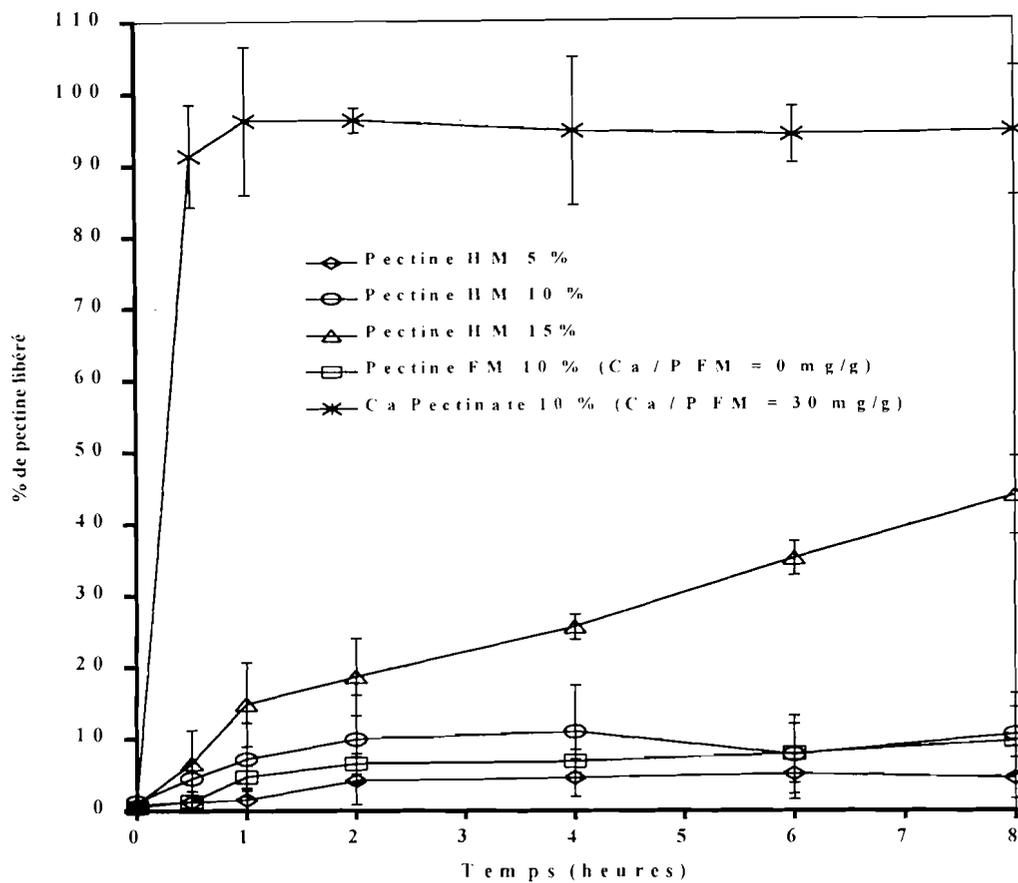
Tous les films étudiés peuvent être considérés comme des systèmes matriciels polymériques, insolubles dans l'eau et incorporant à l'état moléculaire, de la pectine HM ou des pectinates de calcium pouvant diffuser vers le milieu d'incubation. En effet, Bodmeier et Paeratakul (1992) ont démontré que les plastifiants hydrosolubles de faible poids moléculaire peuvent diffuser dans les milieux aqueux à partir des films obtenus à l'aide des dispersions aqueuses de polymères insolubles dans l'eau tels que l'Aquacoat® 30D, l'Eudragit® RS30D et RL30D. Il a été montré également que le polyéthylène glycol 600 (PEG-600), qui peut aussi jouer le rôle de plastifiant hydrosoluble, peut être relâché à partir des films d'acétate de cellulose, favorisant ainsi la formation de pores aqueux à travers lesquels les principes actifs encapsulés peuvent être libérés dans les milieux de dissolution (Guo, 1994).

Cependant, le passage des macromolécules dans les milieux d'incubation à partir des films préparés à l'aide des polymères insolubles dans l'eau est habituellement considéré comme étant négligeable. Etudiant la libération de l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC, utilisé comme agent de formation de pores dans les enrobages) à partir de films mixtes d'éthylcellulose et de HPMC, Lindstedt et coll. (1991) ont montré que la libération du polymère hydrosoluble (HPMC) n'est observée que lorsque la teneur des films mixtes en HPMC dépasse 24 % m/m.

D'autre part, Sato et Kim (1984) ont étudié la diffusion de macromolécules comme l'Insuline, le Cytochrome C et l'Albumine à travers différents types de membranes et de matrices polymériques. Ils ont observé que le transport de ces macromolécules se fait non seulement à travers les pores aqueux mais aussi, à travers le réseau polymérique. De plus, l'étendue et la vitesse avec lesquelles les macromolécules diffusent à travers les membranes dépendent du type de polymère filmogène utilisé et de la méthode de fabrication de la membrane. Ces auteurs ont aussi montré que le phénomène de partage de la substance diffusante entre la membrane et le milieu aqueux constitue le mécanisme principal de la diffusion des macromolécules susmentionnées. Le mécanisme de libération par formation de pores aqueux, qui intervient très peu dans la diffusion des macromolécules, est, par contre, prédominant dans la diffusion des substances hydrophiles de faible poids moléculaire à travers les films polymériques. Enfin, ces auteurs ont pu montrer que le mécanisme de partage, qui est le principal mécanisme régissant la diffusion des macromolécules à travers les films polymériques, est très fortement favorisé lorsque l'hydratation de ces dits films est faible.

Les résultats, présentés dans les figures II.3, II.4 et II.5, montrent clairement que la pectine HM ou les pectinates de calcium, dispersés à l'état moléculaire dans les films préparés à l'aide des polymères d'enrobage insolubles, peuvent effectivement diffuser vers le milieu d'incubation. De plus, la vitesse de diffusion dépend de la nature de l'espèce diffusante (pectine HM, FM ou pectinate de calcium), du type de polymère filmogène (éthylcellulose ou polymère acrylique) et pour le même polymère, du type de dispersion aqueuse (Aquacoat® ou Surelease®). A titre d'exemple, comparés aux films mixtes d'Eudragit® NE contenant de la pectine HM ou des pectinates de calcium dont le rapport  $\text{Ca}^{2+}$  / Pectine FM est de 0 et 60 mg/g, les films mixtes d'Eudragit® NE renfermant des pectinates de calcium dont le rapport

$\text{Ca}^{2+}$  / Pectine FM est égal 30 mg/g libèrent plus lentement leur contenu en pectine (figure II.5).



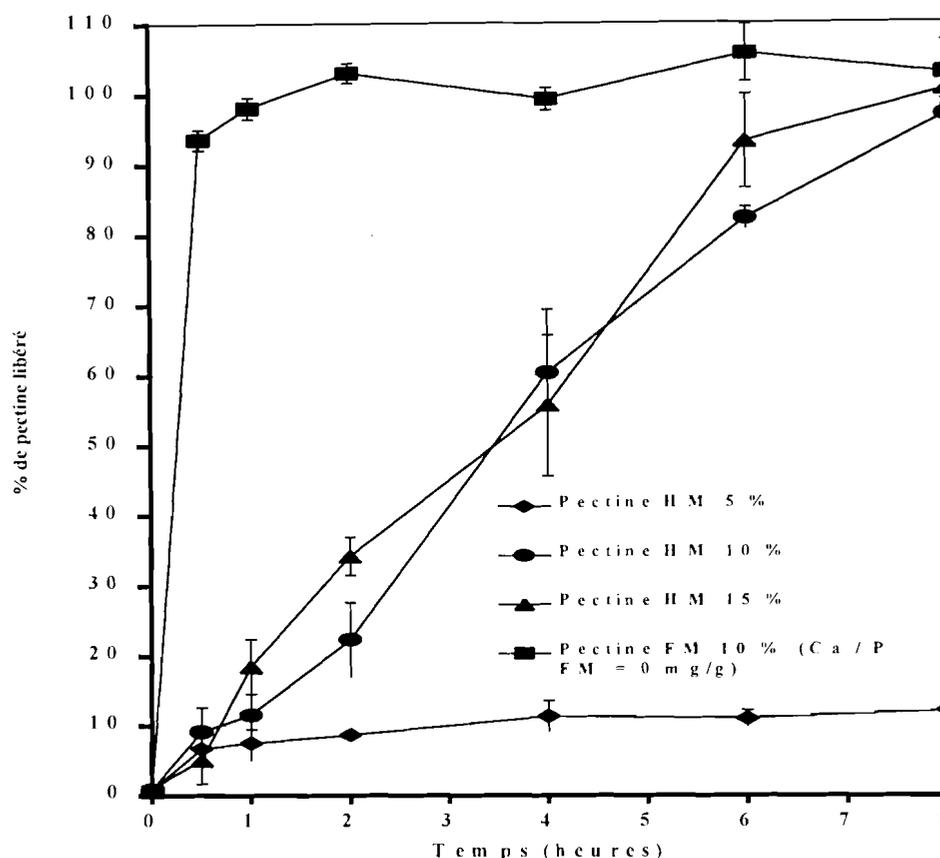
**Figure II.6 :** Libération, en l'absence des enzymes pectinolytiques, de la pectine ( $m \pm SD$ ,  $n = 3$ ) à partir des films d'Eudragit® RS contenant 5, 10 et 15 % m/m (par rapport à l'Eudragit® RS) de pectine HM ou 10 % m/m de pectinates de calcium ( $\text{Ca} / \text{P FM} = \text{Ca}^{2+} / \text{Pectine FM}$ ).

La figure II.6 représente les courbes de libération de la pectine à partir des films mixtes d'Eudragit® RS incubés en l'absence des enzymes pectinolytiques. Comme on peut le voir, la libération de la pectine dans le tampon à partir des films mixtes d'Eudragit® RS contenant 5 et 10 % m/m de pectine HM est très faible (moins de 10 % de la teneur nominale en pectine). Par contre, avec les films d'Eudragit® RS contenant 15 % m/m de pectine HM, la libération de la pectine est progressive et atteint environ 40 % m/m de sa teneur initiale endéans 8 heures d'incubation. Ce comportement des films mixtes d'Eudragit® RS en l'absence des enzymes pectinolytiques peut s'expliquer par l'existence d'interactions entre les groupements cationiques d'ammonium quaternaires de l'Eudragit® RS et les groupements

anioniques (acides carboxyliques) de la pectine HM. Ces interactions ioniques permettent la formation de complexes Pectine - Eudragit® RS qui empêchent la libération de la pectine à partir des films.

Cette explication est par ailleurs corroborée par le comportement des films mixtes d'Eudragit® RS contenant 10 % m/m de pectinates de calcium (figure II.6). En effet, à l'instar de la pectine HM, les pectines FM non réticulées par le calcium ( $\text{Ca}^{2+} / \text{P FM} = 0 \text{ mg/g}$ ) sont fermement retenues par les films d'Eudragit® RS en l'absence des enzymes pectinolytiques. Par contre, la totalité de la pectine contenue dans les films d'Eudragit® RS / Pectinate de calcium ( $\text{Ca}^{2+} / \text{P FM} = 30 \text{ mg/g}$ ) est libérée endéans les 30 premières minutes d'incubation. A partir de cette observation, on peut affirmer que 30 mg de calcium suffisent pour interagir avec tous les groupements anioniques présents dans 1 g de pectine FM, de sorte qu'au delà de ce rapport ( $\text{Ca}^{2+} / \text{P FM} = 30 \text{ mg/g}$ ), les interactions ioniques entre les molécules de pectine FM et les particules colloïdales de l'Eudragit® RS30D sont totalement inexistantes. Par conséquent, rien ne s'oppose plus à la libération de la pectine à partir des films mixtes d'Eudragit® RS et de pectinate de calcium. On comprend dès lors qu'en ce qui concerne la libération de la pectine dans les milieux d'incubation, les films d'Eudragit® RS contenant le pectinate de calcium ( $\text{Ca}^{2+} / \text{Pectine FM} = 30 \text{ mg/g}$ ) se comportent comme ceux préparés à partir des polymères neutres (Aquacoat®, Surelease®, Eudragit® NE), renfermant de la pectine HM ou des pectinates de calcium.

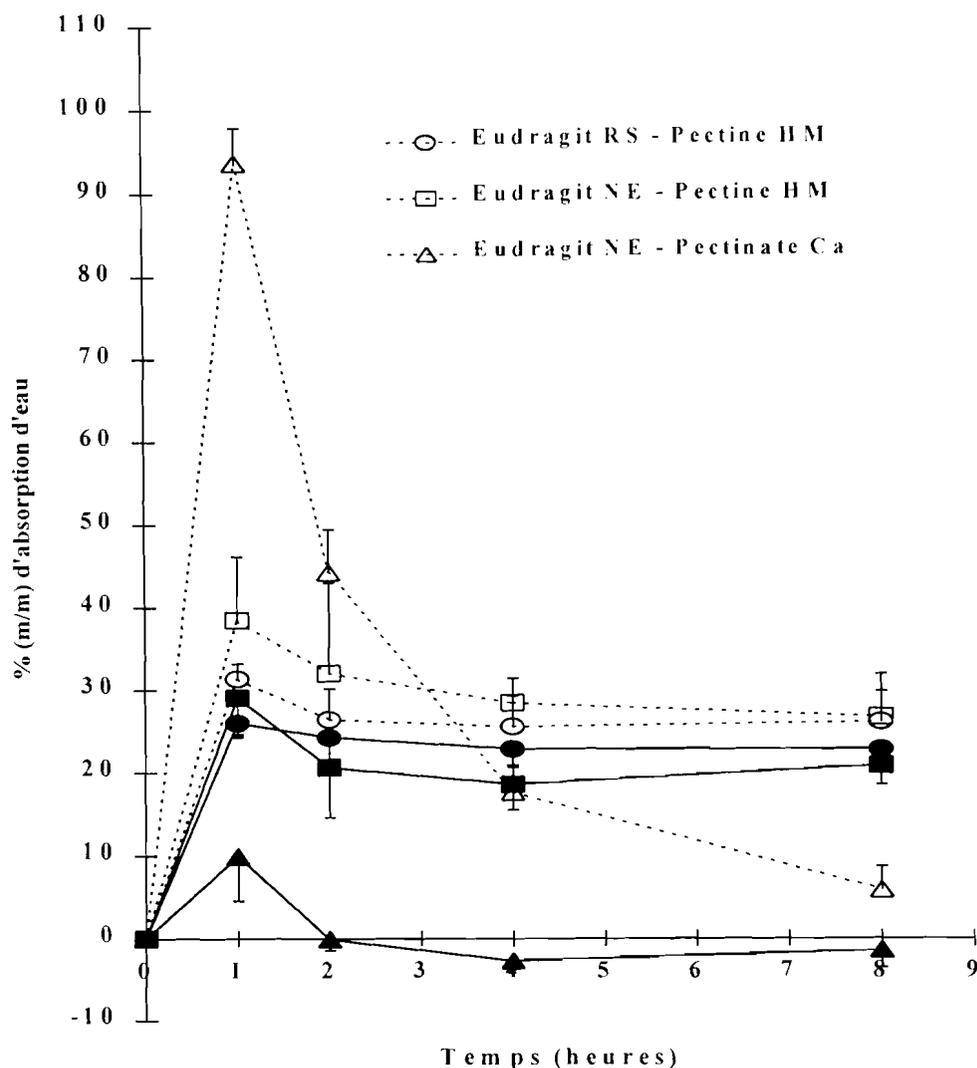
La figure II.7 représente les courbes de libération de la pectine à partir des films mixtes d'Eudragit® RS incubés en présence des enzymes pectinolytiques. On peut observer qu'en présence de ces dernières, la vitesse et l'étendue de la libération de la pectine à partir des films mixtes réalisés avec l'Eudragit® RS dépendent fortement de leur teneur en pectine. Les films renfermant 5 % m/m de pectine HM ne semblent pas être assez perméables aux enzymes pectinolytiques puisque la libération de la pectine à partir de ces films mixtes, incubés en présence ou en l'absence des enzymes pectinolytiques, est très faible pendant toute la durée de l'essai (elle est inférieure à 10 % de sa teneur initiale). Par contre, en présence de Pectinex® Ultra SP-L, la pectine est libérée beaucoup plus rapidement lorsque les films d'Eudragit® RS contiennent 10 % m/m et plus de pectine HM ou de pectine FM (figure II.7). Les films mixtes d'Eudragit® RS renfermant plus de 10 % m/m de pectines (HM ou FM) sont donc perméables aux enzymes pectinolytiques.



**Figure II.7 :** Libération, en présence des enzymes pectinolytiques, de la pectine ( $m \pm SD$ ,  $n = 3$ ) à partir des films d'Eudragit® RS contenant 5, 10 ou 15 % m/m (par rapport à l'Eudragit® RS) de pectine HM ou 10 % m/m de pectinates de calcium (Ca / P FM =  $Ca^{2+}$  / Pectine FM ; Ca / P FM = 0 équivaut à la pectine FM).

### 3.2. Cinétiques absorption d'eau (tampon acétate - phosphate 0.05 M de pH 4.5) par les films mixtes

L'absorption d'eau par les films d'enrobage immergés dans les milieux aqueux est une propriété physique très importante dans la mesure où elle peut conditionner la libération des principes actifs enrobés avec les polymères insolubles. En effet, la prise d'eau peut entraîner un gonflement des films d'enrobage, une augmentation de leur hydrophilie et enfin, l'apparition de pores aqueux. Dès lors, il nous a paru intéressant d'étudier les cinétiques d'absorption d'eau de quelques films mixtes (Pectine HM / Eudragit® RS, Pectine HM / Eudragit® NE et Pectinate de calcium / Eudragit® NE) incubés dans le tampon acétate - phosphate 0.05 M de pH 4.5, en présence et en l'absence des enzymes pectinolytiques (figure II.8).



**Figure II.8 :** Absorption d'eau ( $m + SD$  ou  $m - SD$ ,  $n = 3$ ) par les films mixtes ( $\square$ ) Eudragit<sup>®</sup> RS / Pectine HM, ( $\circ$ ) Eudragit<sup>®</sup> NE / Pectine HM et ( $\Delta$ ) Eudragit<sup>®</sup> NE / Pectinate de calcium ( $Ca^{2+}$  / Pectine FM = 30 mg/g). Les teneurs en pectine HM ou en pectinate de calcium par rapport aux polymères acryliques sont de 10 % m/m. Les films mixtes étaient incubés dans le tampon acétate - phosphate 0.05 M de pH 4.5, en présence (lignes continues) ou en l'absence (lignes pointillées) des enzymes pectinolytiques.

On peut observer qu'en l'absence de Pectinex<sup>®</sup> Ultra SP-L, les films mixtes Pectinate de calcium / Eudragit<sup>®</sup> NE absorbent beaucoup d'eau (jusqu'à environ 100 % de leur poids sec) durant la première heure d'incubation, période pendant laquelle une quantité relativement importante du pectinate de calcium (plus de 50 % de sa teneur initiale) est encore présente dans les films (figure II.5). Par la suite, l'absorption d'eau chute de manière drastique (moins de 10 % de leur poids sec après 8 heures d'incubation). Cela correspond, comme on peut le vérifier sur la figure II.5, à la période pendant laquelle le pectinate de calcium est presque

totalemment éliminé des films. Etant donné que le pectinate de calcium est rapidement largué en présence des enzymes pectinolytiques, on doit s'attendre à un faible pourcentage d'absorption d'eau par les films en présence de ces enzymes. En effet, on observe effectivement sur la figure II.8, qu'en présence de Pectinex<sup>®</sup> Ultra SP-L, l'absorption d'eau par les films mixtes Pectinate de calcium / Eudragit<sup>®</sup> NE est pratiquement nulle pendant presque toute la durée de l'essai.

Contrairement aux films précédents, l'absorption d'eau par les films d'Eudragit<sup>®</sup> RS ou d'Eudragit<sup>®</sup> NE contenant de la pectine HM atteint très rapidement, dès la première heure d'incubation, seulement 30 à 40 % du poids initial des films. Elle se stabilise par la suite aux alentours de 30 % et cela pendant toute la durée de l'expérience (8 heures). D'autre part, l'augmentation du poids de ces mêmes films incubés en présence des enzymes pectinolytiques est d'environ 25 %. L'impact des enzymes pectinolytiques sur la prise d'eau par les films mixtes Pectine HM / Eudragit<sup>®</sup> RS et Pectine HM / Eudragit<sup>®</sup> NE est donc relativement minime, contrairement à l'impact observé avec les films Pectinate de calcium / Eudragit<sup>®</sup> NE.

La comparaison des profils d'absorption d'eau, en l'absence des enzymes pectinolytiques, par les films mixtes Pectine HM / Eudragit<sup>®</sup> NE à ceux des films mixtes Pectinate de calcium / Eudragit<sup>®</sup> NE montrent que ces deux films se comportent différemment (figure II.8). On constate, en effet, que les films mixtes Pectine HM / Eudragit<sup>®</sup> NE absorbent, de la première à la huitième heure d'incubation, environ 30 % m/m d'eau. Par contre, les films mixtes Pectinate de calcium / Eudragit<sup>®</sup> NE absorbent environ 100 % m/m d'eau pendant la première heure d'incubation mais après, l'absorption d'eau chute de manière drastique, tombant en dessous de 10 % m/m après 8 heures d'incubation. La différence de comportement observée entre les films mixtes d'Eudragit<sup>®</sup> NE renfermant de la pectine HM et ceux contenant du pectinate de calcium pourrait avoir deux sources. D'abord, le pectinate de calcium, qui forme un gel beaucoup plus dense que la pectine HM (Ashford et al., 1994), absorbera plus d'eau. Deuxièmement, comme on peut le constater à l'examen de la figure II.5, les films mixtes Pectine HM / Eudragit<sup>®</sup> NE conservent encore environ 10 % de leur teneur initiale en pectine entre la 2<sup>ème</sup> et 8<sup>ème</sup> d'incubation. Les films mixtes Pectinate de calcium / Eudragit<sup>®</sup> NE par contre, libèrent la totalité de leur pectinate de calcium après la 2<sup>ème</sup> heure d'incubation.

On peut aussi observer sur la figure II.8, qu'en l'absence des enzymes pectinolytiques, les films mixtes Eudragit<sup>®</sup> NE / Pectine HM absorbent plus d'eau que les films mixtes Eudragit<sup>®</sup> RS / Pectine HM. D'autre part, l'impact des enzymes pectinolytiques sur l'absorption d'eau des films mixtes Eudragit<sup>®</sup> NE / Pectine HM est plus marqué que celui observé avec les films mixtes Eudragit<sup>®</sup> RS / Pectine HM. L'origine de ces deux observations s'explique probablement par la différence d'élasticité qui existe entre les films d'Eudragit<sup>®</sup> NE et ceux d'Eudragit<sup>®</sup> RS. Les films d'Eudragit<sup>®</sup> NE, qui sont beaucoup plus élastiques et plus souples, permettent probablement à la pectine incorporée d'absorber plus d'eau. Les films d'Eudragit<sup>®</sup> RS par contre, même s'ils retiennent plus de pectine à cause des interactions ioniques Pectine - Eudragit<sup>®</sup> RS, sont plus rigides. Par conséquent, ils ne permettent pas à la pectine incorporée d'absorber librement le tampon d'incubation.

#### 4. Conclusion

Un film d'enrobage colonique doit posséder à la fois deux propriétés essentielles que sont sa dégradation par la flore bactérienne du côlon et la protection des principes actifs lors du transit gastrique et intestinal (grêle). Les études de la cinétique de libération des pectines à partir des films isolés, réalisés à l'aide des dispersions aqueuses de polymères insolubles contenant de la pectine HM ou des pectinates de calcium, font apparaître que seules les associations de l'Eudragit<sup>®</sup> RS avec la pectine HM ou la pectine FM (10 % m/m) sont susceptibles de posséder ces deux propriétés essentielles.

En effet, les films mixtes préparés à partir d'Aquacoat<sup>®</sup> ECD 30, de Surelease<sup>®</sup> clear et d'Eudragit<sup>®</sup> NE30D en association avec la pectine HM ou les pectinates de calcium, de même que les films mixtes Eudragit<sup>®</sup> RS / Pectinates de calcium, libèrent presque tout leur contenu en pectine endéans une heure d'incubation, même en l'absence des enzymes pectinolytiques. Par contre, grâce aux interactions ioniques existant entre les molécules de pectine et les particules du latex d'Eudragit<sup>®</sup> RS30D, les films mixtes Eudragit<sup>®</sup> RS / Pectine HM ou FM (10 % m/m) sont capables de contenir la libération de la pectine pendant 8 heures d'incubation, en l'absence d'enzymes pectinolytiques. D'autre part, ces mêmes films, incubés en présence des enzymes pectinolytiques, libèrent progressivement et assez rapidement la pectine incorporée dans les milieux d'incubation.

On peut, dès lors, supposer que le largage de la pectine à partir des films d'enrobage Eudragit® RS / Pectine HM, suite à l'action des enzymes pectinolytiques, favorise la formation de pores aqueux à travers lesquels les principes actifs pourront être libérés. Les études de dissolution *in vitro* (Chapitre III), effectuées sur des pellets de théophylline enrobés avec les diverses associations étudiées dans ce chapitre, devraient permettre de confirmer cette hypothèse.

Afin de mieux comprendre et de mieux interpréter les résultats des études de dissolution (Chapitre III), les cinétiques d'absorption d'eau par les films isolés (incubés dans le tampon acétate – phosphate 0.05 M de pH 4.5), qui peuvent avoir un impact considérable sur les cinétiques de libération des substances actives à travers les films d'enrobage, ont été étudiées. Il a été notamment montré que le pourcentage d'absorption d'eau des films mixtes varie avec le type de polymère insoluble utilisé (Eudragit® RS ou NE) et avec le dérivé de pectine incorporée (pectine HM ou pectinate de calcium). On a également constaté que la quantité d'eau absorbée par les films mixtes incubés en présence des enzymes pectinolytiques est plus faible que celle obtenue en leur absence.

**Chapitre III : Etude de l'influence de quelques paramètres de formulation et des enzymes pectinolytiques sur la libération de la théophylline à partir de pellets enrobés à l'aide des dispersions aqueuses de polymères insolubles contenant de la pectine HM ou des pectinates de calcium**

<b>1. Introduction</b>	110
<b>2. Matériels et Méthodes</b>	110
<b>2.1. Matériels</b>	110
<b>2.2. Méthodes</b>	111
2.2.1. <i>Analyse granulométrique des pellets non enrobés</i>	111
2.2.2. <i>Préparation des gels de pectine HM et de pectinate de calcium</i>	111
2.2.3. <i>Préparation des dispersions utilisées pour l'enrobage des pellets</i>	111
2.2.4. <i>Opérations d'enrobage des pellets</i>	113
2.2.5. <i>Détermination de la teneur en théophylline des pellets enrobés et non enrobés</i>	115
2.2.6. <i>Essais de dissolution</i>	116
2.2.7. <i>Analyse des pellets enrobés par microscopie électronique à balayage environnementale (ESEM)</i>	117
<b>3. Résultats et discussion</b>	117
<b>3.1. Caractéristiques des pellets nus</b>	117
<b>3.2. Enrobage des pellets et mûrissement des pellets enrobés</b>	118
<b>3.3. Etudes de dissolution</b>	119
3.3.1. <i>Libération de la théophylline à partir des pellets non enrobés</i>	119
3.3.2. <i>Influence de quelques paramètres de formulation sur la libération de la théophylline à partir des pellets enrobés avec l'Eudragit® RS contenant de la pectine HM</i>	120
3.3.3. <i>Influence des enzymes pectinolytiques sur la libération de la théophylline à partir des pellets enrobés avec les polymères insolubles contenant de la pectine HM ou des pectinates de calcium</i>	124
<b>3.4. Examens microscopiques des pellets enrobés</b>	129
<b>3.5. Discussion générale</b>	130
<b>4. Conclusion</b>	135

## 1. Introduction

Ce chapitre est consacré à l'évaluation du potentiel colonique des enrobages préparés à partir des dispersions aqueuses de polymères insolubles renfermant de la pectine HM ou des pectinates de calcium. A cette fin, la technique du lit d'air fluidisé a été utilisée pour enrober des pellets de théophylline à l'aide des dispersions colloïdales aqueuses d'éthylcellulose (Aquacoat® ECD 30, Surelease® clear) ou de copolymères d'esters méthacryliques (Eudragit® RS30D, Eudragit® NE30D), renfermant de la pectine HM ou des pectinates de calcium. Ensuite, l'influence de quelques paramètres de formulation (teneur en pectine des enrobages, type de plastifiant utilisé, quantité d'enrobage déposée) sur la libération de la théophylline à partir des pellets enrobés, a été étudiée *in vitro* en présence ou non des enzymes pectinolytiques.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Matériels

Les pellets de théophylline (lot n° P 4802), utilisés comme substrat à enrober, ont été offerts par les Laboratoires S.M.B (Bruxelles, Belgique). Il s'agit de microbilles à forte teneur en théophylline, obtenues par le procédé d'extrusion – sphéronisation et destinées à la fabrication des différents dosages de la spécialité Xanthium®. Leur composition est la suivante :

Théophylline anhydre :	80.0 – 83.0 %
Cellulose microcristalline (Avicel PH101) :	≈ 10 %
Polyvinyl pyrrolidone (Povidone K30) :	≈ 5 %
Stéarate de saccharose (Crodesta F160) :	≈ 5 %

Le talc, de granulométrie inférieure à 10 µm (Aldrich chemical Ltd, Grande Bretagne), a été utilisé comme agent anti - agrégant destiné à réduire les problèmes de collage au cours des opérations d'enrobage. L'émulsion de silicone (Vel S.A., Belgium) a été utilisée comme agent anti - mousse lors de la préparation des dispersions pour enrobage. Tous les autres produits utilisés ont déjà été décrits dans les chapitres I et II.

## 2.2. Méthodes

### 2.2.1. Analyse granulométrique des pellets non enrobés

L'analyse granulométrique a été effectuée par la technique du tamisage : 100 g de pellets nus ont été tamisés, à sec, pendant 10 minutes, sur des tamis vibrants superposés (8 tamis d'ouverture de maille comprise entre 0.63 et 1.80 mm) (Rhewum type A2). L'évaluation du refus pondéral de chaque tamis a permis de déterminer la distribution granulométrique des pellets, ainsi que le diamètre moyen et son écart-type.

### 2.2.2. Préparation des gels de pectine HM et des pectinates de calcium

Les gels à 2 % m/m de pectine HM et à 1.5 % m/m de pectinates de calcium (Calcium / Pectine FM = 30 ou 60 mg/g) ont été préparés et leur pH ajusté à 4.5. Ces gels, dont la préparation a été décrite dans le chapitre II, ont ensuite été utilisés pour la préparation des différentes dispersions d'enrobage (tableaux III. 1 et III.2).

### 2.2.3. Préparation des dispersions utilisées pour l'enrobage des pellets

Des quantités adéquates de chaque dispersion aqueuse de polymère (Aquacoat<sup>®</sup> ECD 30, Surelease<sup>®</sup> clear, Eudragit<sup>®</sup> RS30D ou NE30D) ont été mélangées si nécessaire avec 20 % m/m de plastifiant (par rapport au polymère insoluble) pendant 90 minutes à l'aide d'un agitateur magnétique. Ensuite, les gels à 2 % m/m de pectine HM ou à 1.5 % m/m de pectinates de calcium ont été ajoutés lentement à chaque dispersion, sous agitation, jusqu'à obtention des teneurs spécifiées (% m/m, par rapport à la quantité du polymère insoluble) en pectine HM ou en pectinates de calcium. Le talc, préalablement dispersé dans l'eau désionisée en présence de l'émulsion de silicone, a été ensuite ajouté aux dispersions. Finalement, la teneur totale en matière solide de chaque dispersion a été ajustée à sa valeur spécifiée avec de l'eau désionisée. Les compositions des différentes dispersions d'enrobage sont présentées dans les tableaux III.1 et III.2.

**Tableau III.1 :** Composition des dispersions d'enrobage renfermant 10 %\* m/m (par rapport au polymère insoluble) de pectine HM.

<b>Formulation</b>	<b>Aquacoat® ECD 30</b>	<b>Surelease® clear</b>	<b>Eudragit® RS30D</b>
Polymère insoluble (poids sec en g)	160	160	160
Pectine HM (g)	16	16	16*
Dibutyl sébaçate (DBS) (g)	32	-	-
Triacétine (g)**	-	-	32
Talc (g)	-	-	32
Emulsion de silicone (g)	1.6	1.6	1.6
Eau ad. (g)	1500	1500	1500
Teneur (% m/m) en résidu sec de la dispersion	14.0	11.8	16.1
% (m/m) de film déposé (m ± SD, n = 3)	19.8 ± 0.9	21.7 ± 0.8	20.2 ± 0.4***

\*Sauf pour l'étude concernant l'influence de la teneur des enrobages en pectine HM (5.0, 7.5 et 10.0 % m/m) où les quantités de pectine HM sont respectivement égales à 8, 12 et 16 g.

\*\* Sauf pour l'étude concernant l'influence du type de plastifiant où la triacétine est remplacée soit par l'acétyltriéthyl citrate (ATEC), soit par le diéthyl phthalate (DEP).

\*\*\* Sauf pour l'étude concernant l'influence du niveau d'enrobage où les quantités de film déposés sont égales à 7.2 ± 0.7, 10.7 ± 0.5, 15.0 ± 0.8 et 20.2 ± 0.4 % m/m.

**Tableau III.2 :** Composition des dispersions d'enrobage renfermant 10 % m/m (par rapport au polymère insoluble) de pectinates de calcium.

<b>Formulation</b>	<b>Aquacoat® ECD 30</b>	<b>Eudragit® RS30D</b>	<b>Eudragit® NE30D</b>
Polymère insoluble (poids sec en g)	135	160	68
Dibutyl sébaçate (DBS) (g)	27	-	-
Triacétine (g)	-	32	-
Pectinates de calcium (g)	13.5	16	6.8
Talc (g)	-	-	17
Emulsion de silicone (g)	1.4	1.6	0.7
Eau ad. (g)	3000	2900	1450
Rapport Ca / Pectine FM (mg/g)	60	30	30
Teneur (% m/m) en résidu sec de la dispersion	6.0	7.2	6.4
% (m/m) de film déposé (m ± SD, n = 3)	19.3 ± 0.7	14.8 ± 0.2	8.0 ± 0.4

#### 2.2.4. Opérations d'enrobage des pellets

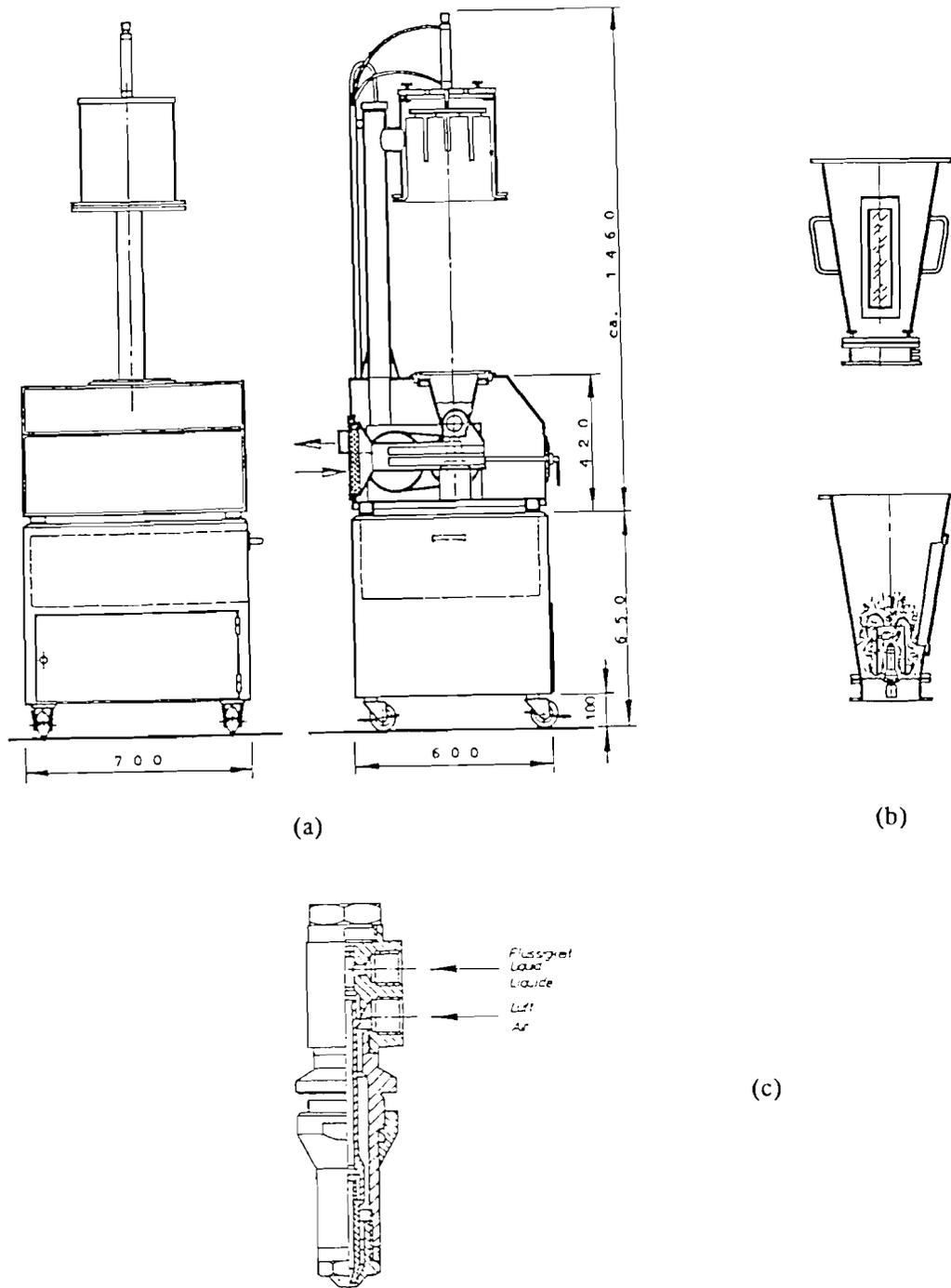
L'enrobage des pellets a été réalisé par la méthode du lit d'air fluidisé à l'aide d'un appareillage d'une contenance maximale d'environ 1.5 kg et équipé d'un système de pulvérisation par le bas de type Wurster (Uni-Glatt, Glatt® GmbH, Allemagne). L'appareillage complet, comprenant la cuve d'enrobage (Wurster 6'') et la buse de pulvérisation, est représenté dans la figure III.1 (Amighi, 1995a).

La hauteur du cylindre de partition, situé au dessus de la plaque de distribution d'air (type D-6/4676), à l'intérieur de la cuve d'enrobage, a été réglée de manière à obtenir une ouverture de 3 cm à la base du dispositif.

Les pellets sont maintenus à l'intérieur de la cuve d'enrobage à l'aide, d'une part, d'un tamis métallique de 0.25 mm d'ouverture de maille, fixé au niveau de la base de la cuve et d'autre part, d'un tamis en polyester de 0.4 mm d'ouverture de maille situé au niveau de la partie supérieure de la cuve.

La charge initiale en pellets mise en oeuvre est de 800 g. Les noyaux sont d'abord chauffés dans l'appareil pendant 10 minutes à des températures de 3 à 5°C au dessus de celles adoptées durant l'opération d'enrobage. Les températures d'entrée et de sortie de l'air de séchage des pellets sont maintenues pendant toutes les opérations d'enrobage à  $\pm 2^\circ\text{C}$  des valeurs prédéfinies.

Les transferts des dispersions d'enrobage, du réservoir jusqu'à la buse de pulvérisation, sont assurés par une pompe péristaltique (Watson Marlow, 6 galets), à travers des tuyaux en PVC de 3 mm de diamètre intérieur. Le débit de pulvérisation est réglé par la vitesse de rotation de la pompe (0 à 170 t/minute) et l'atomisation de la dispersion d'enrobage en fines gouttelettes est assurée par le réglage de la pression appliquée au niveau de la canule de pulvérisation (1 bar). L'enrobage est généralement poursuivi jusqu'à ce que la quantité voulue de film - déterminée par une balance sur laquelle est déposé le réservoir contenant la dispersion d'enrobage - soit déposée sur les noyaux. La balance (Sartorius, U6100) permet, en effet, de déterminer continuellement à  $\pm 0.1$  g près, la quantité de dispersion transférée dans la cuve d'enrobage. Pendant toutes ces opérations, une agitation modérée et continue des dispersions est maintenue afin d'éviter la sédimentation des particules solides.



**Figure III.1 :** Représentation du dispositif Uni-Glatt utilisé pour enrober les pellets. (a) Élément standard ; (b) Cuve d'enrobage avec système de pulvérisation par le bas : diamètre et hauteur de la cuve = 13.9 cm et 43.0 cm, diamètre et longueur du cylindre de partition = 7.1 cm et 15.0 cm ; (c) Buse de pulvérisation binaire à air comprimé pour enrobage (modèle 970/S3) : diamètre interne de la buse = 0.3 mm.

A l'issue de l'étape de pulvérisation, les pellets enrobés sont séchés pendant 10 minutes, dans le même dispositif et à des valeurs de température de 3 à 5°C au dessus de celles adoptées pour les opérations d'enrobage. L'ensemble des conditions de travail adoptées pour l'enrobage des pellets avec les différentes dispersions est résumé dans le tableau III.3.

A la fin du processus d'enrobage, les pellets ont été conservés pendant  $15 \pm 1$  heures dans une étuve à 60°C afin d'obtenir le mûrissement complet des films déposés.

**Tableau III.3 :** Conditions opératoires adoptées lors des enrobages des pellets.

Paramètres	Aquacoat <sup>®</sup> ECD 30	Surelease <sup>®</sup> clear	Eudragit <sup>®</sup> RS30D	Eudragit <sup>®</sup> NE30D
Charge initiale en pellets non enrobés (g)	800	800	800	800
Temp.* d'entrée (°C)	60	60	45	36
Temp.* de sortie pendant le chauffage (°C)	42-45	40-42	30-34	32-34
Temp.* de sortie pendant l'enrobage (°C)	38-40	36-38	28-30	28-30
Temp.* de sortie pendant le séchage (°C)	42-45	40-42	30-34	32-34
Pression de pulvérisation (bar)	1	1	1	1
Débit de pulvérisation (g/min)	10-12	10-12	8-10	8-10

Temp.\* : Température en degrés Celsius (°C)

### 2.2.5. Détermination de la teneur en théophylline des pellets enrobés et non enrobés

Les teneurs en théophylline anhydre des pellets enrobés et non enrobés ont été déterminées par spectrophotométrie UV (Hitachi Spectrophotometer, model 100-60), à 272 nm. Après avoir broyé au mortier une quantité d'environ 10 g de pellets, une prise d'essai de l'ordre de 50 mg de poudre est exactement pesée (Sartorius MC1, 0.01 mg près) et transférée dans un matras jaugé de 200 ml contenant de l'eau désionisée. Après solubilisation complète de la théophylline et mise au trait, la suspension est filtrée et le filtrat est dilué avec de l'eau désionisée de manière à avoir une concentration d'environ 12 µg / ml de théophylline. L'absorbance de la solution est finalement mesurée et sa concentration en théophylline est déterminée à l'aide de la droite d'étalonnage établie avec des solutions standards de théophylline anhydre (figure I.6, Chapitre I). Il faut aussi noter que les différents excipients

présents dans les pellets ne présentent aucune interférence avec le dosage de la théophylline (Amighi, 1995a).

Les quantités de films déposées lors des opérations d'enrobage, exprimées en % m/m par rapport au poids des pellets non enrobés, sont finalement calculées à partir de l'équation suivante ( $n = 3$ ) :  $\% \text{Enrobage} = [100 - \% \text{Théo}_{\text{ap}}] - [(100 - \% \text{Théo}_{\text{av}}) \times (\% \text{Théo}_{\text{ap}} / \% \text{Théo}_{\text{av}})]$ , où  $\% \text{Théo}_{\text{ap}}$  est la teneur (% m/m) en théophylline anhydre des pellets enrobés et  $\% \text{Théo}_{\text{av}}$  est celle des pellets non enrobés (Amighi, 1995a).

#### 2.2.6. Essais de dissolution

Les études de dissolution ont été effectuées à l'aide du dispositif à la pale tournante décrite dans la Pharmacopée Européenne (3<sup>ème</sup> éd., 1995). Les échantillons de pellets, contenant environ 100 mg de théophylline, sont exactement pesés (Sartorius MC1, 0.01 mg près) et placés dans 900 ml du tampon acétate - phosphate 0.05 M de pH 6.0 (tableau I.6. Chapitre I), en présence ou non de 3 ml de Pectinex<sup>®</sup> Ultra SP-L (enzymes pectinolytiques). La température du liquide d'épreuve et la vitesse de rotation de la pale ont été fixées respectivement, à 37°C et à 50 tours/min. Un dispositif automatique de prélèvement et d'analyse a été utilisé pour déterminer les cinétiques de libération de la théophylline (Amighi, 1995a).

Ce système d'analyse automatique fonctionne comme suit : le milieu de dissolution est continuellement prélevé à partir des ballons à l'aide d'une pompe péristaltique (Gilson minipuls 2, Villiers-Le-Bel, France), passé à travers un filtre de 10  $\mu\text{m}$  de porosité (Prolabo, France), puis à travers des cellules en quartz de 3 mm d'épaisseur d'un spectrophotomètre (Multi-cell Philips 8620 Series Spectrophotometer, Philips analytical, Cambridge, UK) qui mesure l'absorbance de la solution à 280 nm. La longueur d'onde de 280 nm a été préférée à celle de l'absorption maximale de la théophylline (272 nm) car elle permet d'effectuer les dosages sans dilution pendant toute la durée des tests de dissolution. La concentration de la théophylline dans les bains de dissolution a été calculée en tenant compte de l'absorbance d'une solution standard de concentration connue. Les quantités de théophylline libérées sont exprimées en % m/m de la quantité de substance active contenue dans les pellets. Toutes ces

opérations sont pilotées par le programme Philips PU 8605/60 Tablet Dissolution Monitoring System.

De plus, pour les pellets enrobés à l'aide du mélange Pectinate de calcium / Eudragit<sup>®</sup> NE, un test de dissolution, simulant les conditions de transit (Davis et coll., 1984a,b; 1986) et de pH (Evans et coll., 1988) des formes pharmaceutiques dans le tractus gastro-intestinal, a été effectué afin de pouvoir prédire les profils moyens de libération *in vivo* de la théophylline à partir de pellets enrobés. Les conditions du test ont été choisies afin de simuler respectivement le passage de la forme dans l'estomac, le duodénum, le jéjunum, l'iléon et le côlon droit.

<b>Temps (heures)</b>	0 → 1.5	1.5 → 2.0	2.0 → 4.0	4.0 → 6.0	6.0 → 15.0
<b>Valeurs du pH</b>	1.3	5.0	6.5	7.5	6.0

A la 6<sup>ème</sup> heure du test de dissolution, les valeurs du pH des milieux de dissolution ont été ramenées à 6.0 unités dans le but de simuler les conditions prévalant dans le côlon ascendant. Ensuite, 3 ml de Pectinex<sup>®</sup> Ultra SP-L (ou 3 ml de tampon pour le milieu contrôle) ont été ajoutés et le test poursuivi pendant encore 9 heures (durée totale du test = 15 heures).

### 2.2.7. Analyse des pellets enrobés par microscopie électronique à balayage environnementale

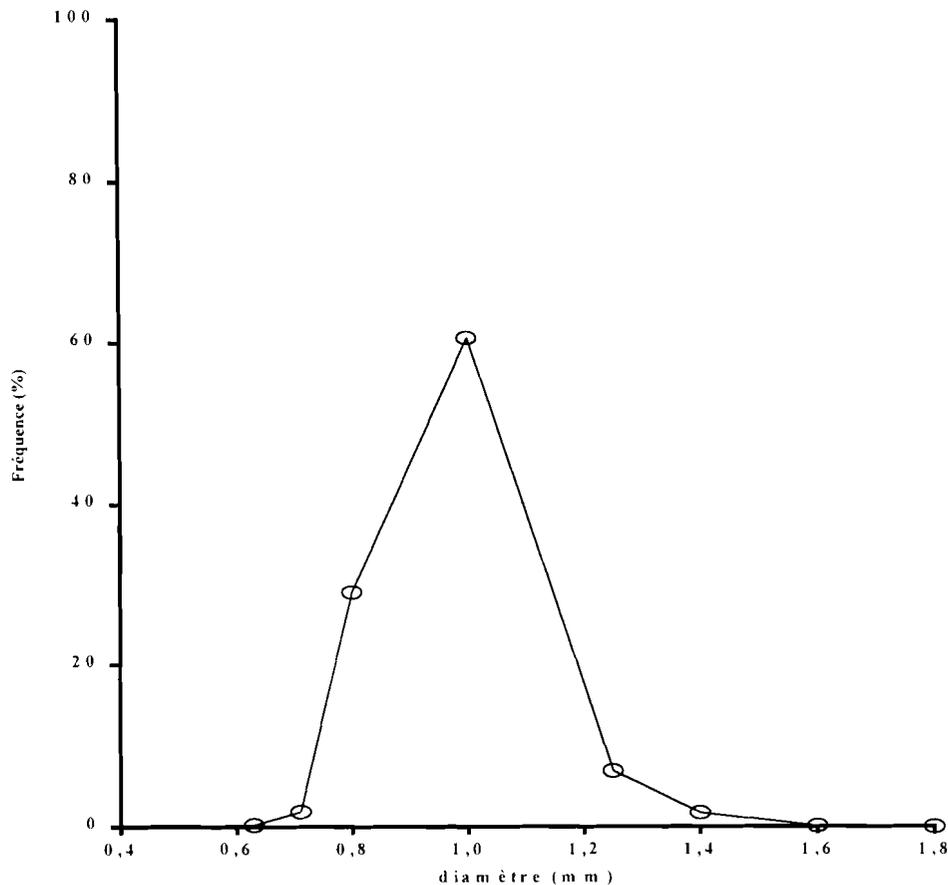
L'analyse de la structure fine des pellets enrobés a été effectuée à l'aide du microscope électronique à balayage environnemental (ElectroScan ESEM 2025, Cambridge, UK). Les pellets ont été incubés dans le tampon acétate - phosphate 0.05 M de pH 6.0, pendant 15 heures, en l'absence et en présence de 200 µl de Pectinex<sup>®</sup> Ultra SP-L pour 100 ml de tampon. Ils ont ensuite été retirés du milieu d'incubation et leur surface ainsi que des coupes transversales ont été directement examinées sans aucun traitement préalable.

## 3. Résultats et discussion

### 3.1. Caractéristiques des pellets nus

Les pellets nus ont été caractérisés par leur distribution granulométrique (figure III.2),

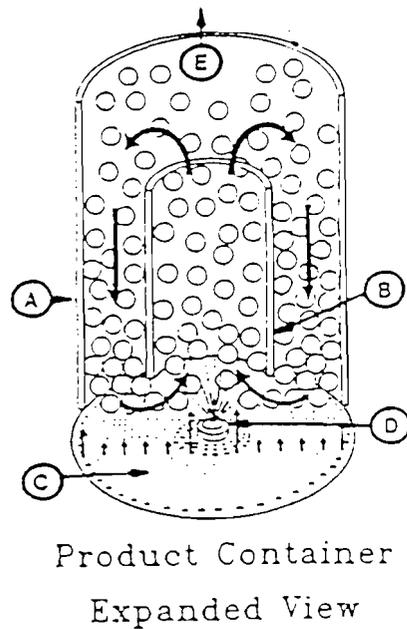
leur diamètre moyen ( $0.96 \pm 0.14$  mm,  $m \pm SD$ ), leur teneur en théophylline anhydre ( $80.9 \pm 0.2$  %,  $m \pm SD$ ) et enfin, par la détermination du profil de libération de la théophylline dans le tampon acétate - phosphate 0.05 M de pH 6.0 (figure III.4, paragraphe 3.3.1).



**Figure III.2 :** Distribution granulométrique des pellets de théophylline nus (noyaux), utilisés comme substrats pour enrobage.

### 3.2. Enrobage des pellets et mûrissement des pellets enrobés

La technique du lit d'air fluidisé, utilisée pour l'enrobage des pellets, est caractérisée par un débit d'air chaud ascendant très élevé qui permet la mise en mouvement et le séchage rapide des particules solides présentes dans la chambre d'expansion de l'appareil (figure III.3) (Mehta, 1997). La dispersion aqueuse arrive par une buse de pulvérisation située à proximité de la zone d'enrobage par où transitent rapidement et par cycles successifs, les particules à enrober. Ces caractéristiques de l'appareillage favorisent la distribution uniforme de l'enrobage autour des particules et diminuent les risques d'agglomération ou de collage des particules de petite taille.



**Figure III.3 :** Représentation schématique de l'intérieur de la chambre d'expansion du système Wurster (système de pulvérisation ascendant) pendant le processus d'enrobage des pellets : (A) Chambre d'enrobage ; (B) Cylindre de partition ; (C) Plaque de distribution avec orifices ; (D) Buse de pulvérisation ; (E) Chambre d'expansion.

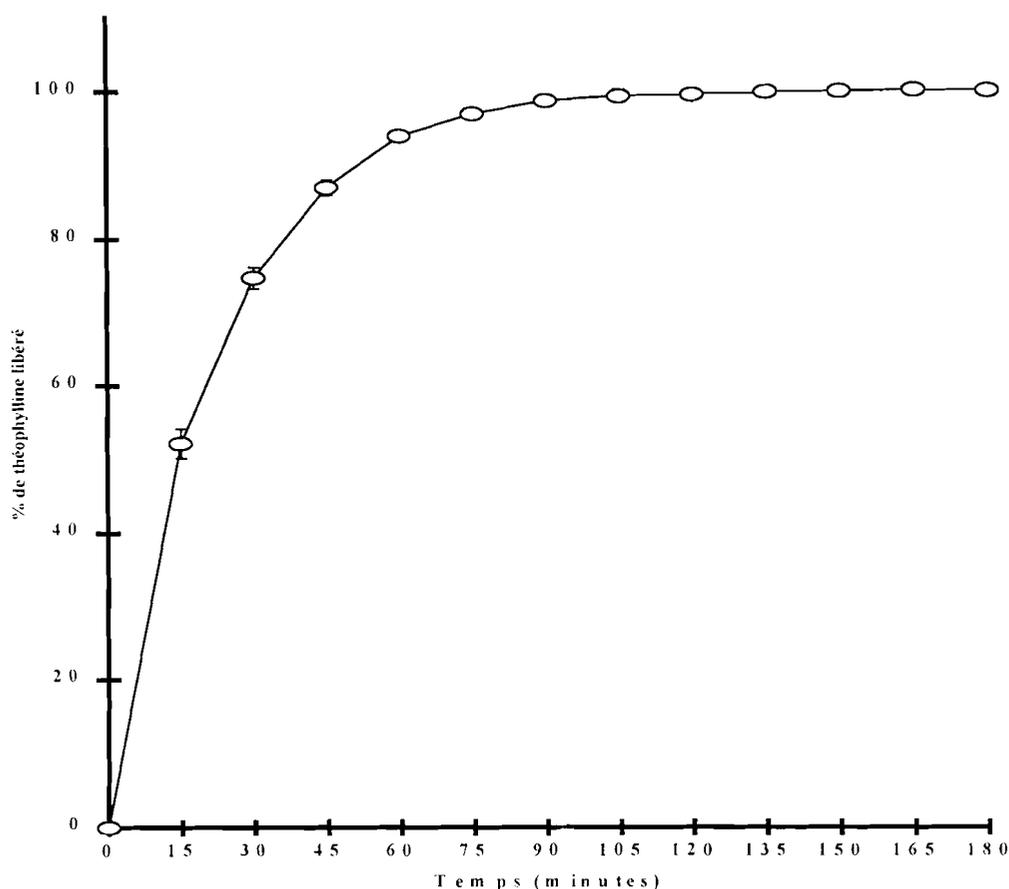
Après l'enrobage, les pellets subissent un vieillissement (mûrissement) accéléré afin d'assurer la stabilisation définitive de la structure des films et donc le maintien, au cours du temps, des caractéristiques de libération de la théophylline à partir des pellets enrobés. Le choix des conditions de mûrissement imposées aux pellets enrobés (température: 60°C ; durée: 15 ± 1 heures) a été guidé par les résultats de travaux antérieurs effectués sur des pellets enrobés avec l'éthylcellulose (Bodmeier et coll., 1997) ou avec les copolymères d'esters méthacryliques (Amighi, 1995a,b; Amighi et Moës, 1996; 1997).

### 3.3. Etudes de dissolution

#### 3.3.1. Libération de la théophylline à partir des pellets non enrobés

Les résultats de la libération de la théophylline dans le tampon acétate – phosphate 0.05 M de pH 6.0, à partir des pellets non enrobés, sont présentés dans la figure III.4. La théophylline contenue dans les pellets nus est très rapidement libérée. La totalité de la théophylline se retrouve en effet dans le milieu de dissolution endéans les 90 premières

minutes du test de dissolution. L'utilisation de pellets à libération rapide permet d'évaluer plus facilement l'effet protecteur des enrobages.



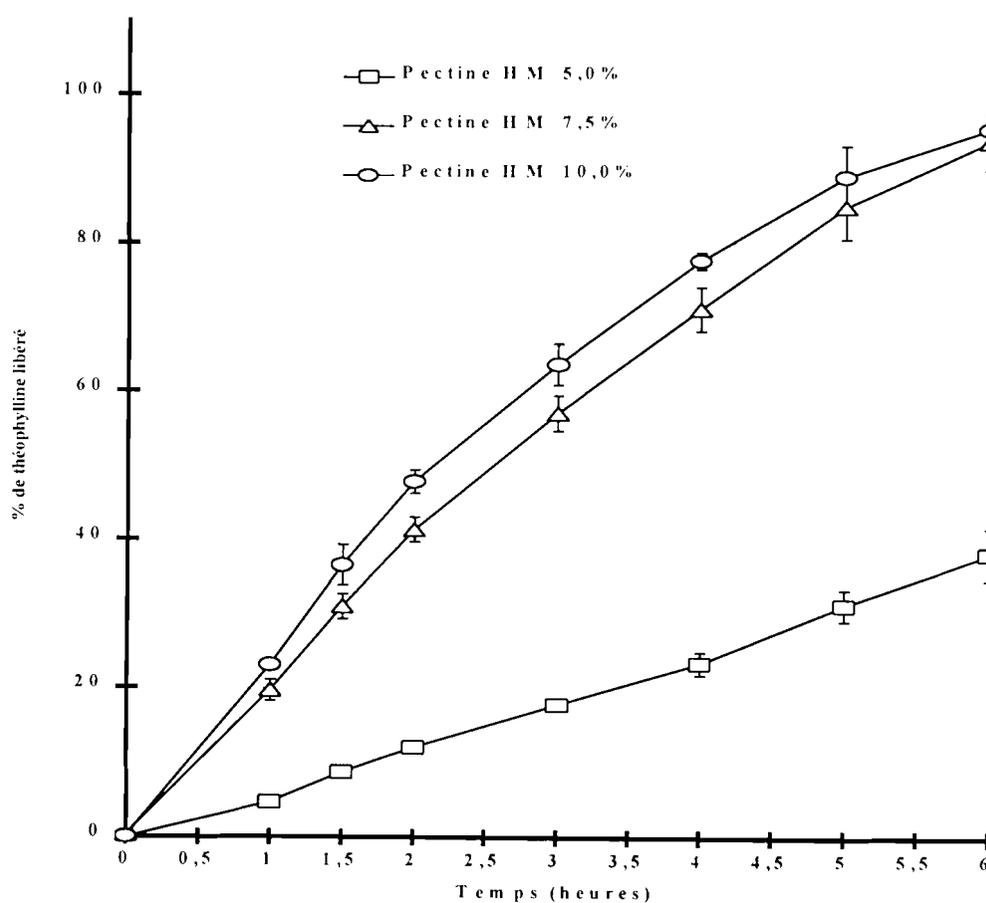
**Figure III.4 :** Libération de la théophylline ( $m \pm SD$ ,  $n = 5$ ) dans le tampon acétate – phosphate 0.05 M de pH 6.0, à partir des pellets non enrobés.

### 3.3.2. Influence de quelques paramètres de formulation sur la libération de la théophylline à partir des pellets enrobés avec l'Eudragit® RS contenant de la pectine HM

L'influence de différents paramètres de formulation (teneur de l'enrobage en pectine, nature du plastifiant, quantité d'enrobage déposée) sur les cinétiques de libération de la théophylline à partir des pellets enrobés a été étudiée, à pH 6.0, avec les pellets enrobés à l'aide des mélanges Pectine HM / Eudragit® RS.

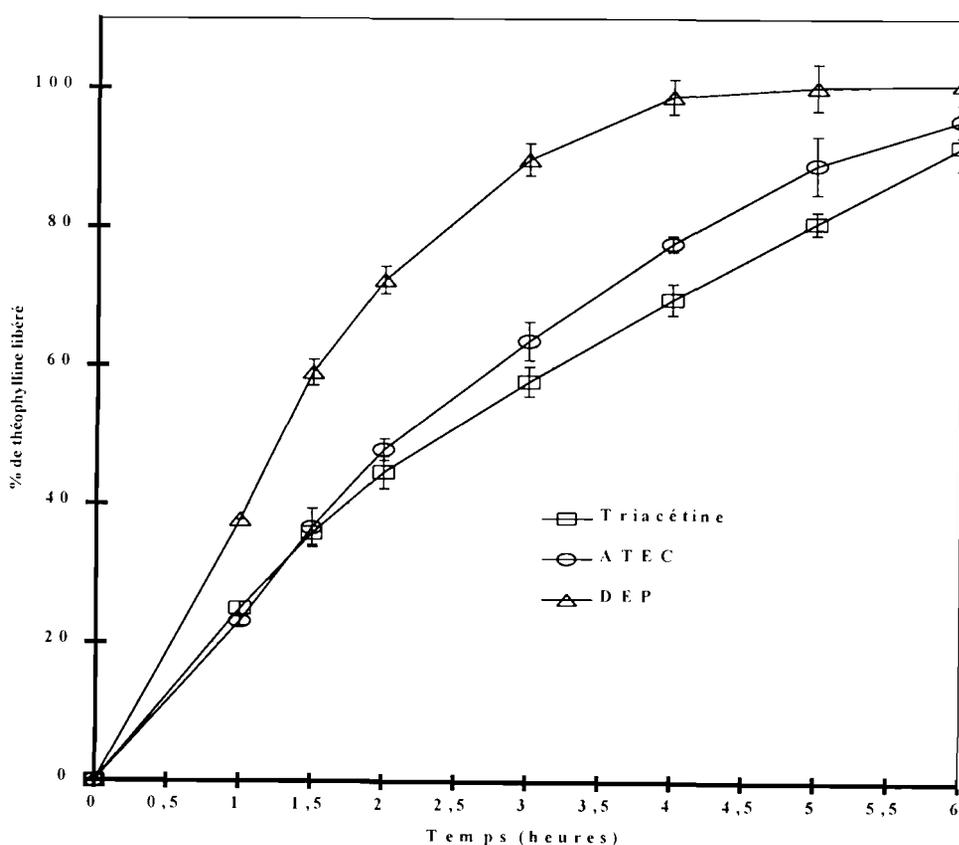
La figure III.5 montre l'influence de la teneur en pectine HM de l'enrobage sur la libération de la théophylline à partir des pellets enrobés avec l'Eudragit® RS. L'augmentation de 5 à 10 % m/m de la teneur de l'enrobage en pectine HM entraîne une augmentation de la

vitesse de libération de la théophylline. La pectine étant un polymère hydrosoluble, sa présence rend les enrobages plus hydrophiles et plus perméables aux principes actifs hydrophiles comme la théophylline. La libération de la théophylline sera donc d'autant plus rapide que la teneur en pectine de l'enrobage sera élevée. Ces résultats montrent que la pectine peut être incorporée dans les enrobages barrières constitués de polymères insolubles dans le but de réguler les vitesses de libération des principes actifs. En effet, la régulation de la vitesse de libération des principes actifs à travers les enrobages barrières est souvent réalisée par incorporation de polymères hydrophiles comme par exemple les hydroxypropyl-méthylcelluloses (HPMC) (Amighi, 1995a; Bodmeier et coll., 1997).



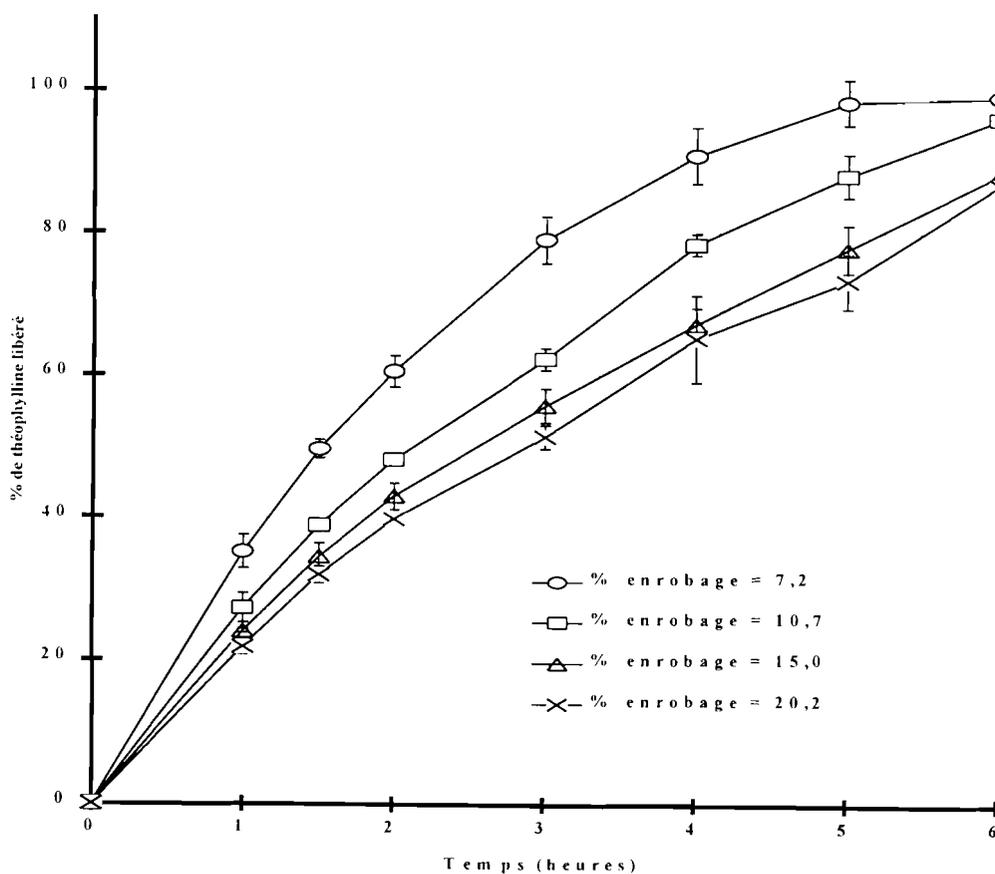
**Figure III.5 :** Influence de la teneur en pectine HM (5.0, 7.5 et 10.0 % m/m, par rapport à l'Eudragit® RS) sur la libération de la théophylline ( $m \pm SD$ ,  $n = 5$ ) dans le tampon acétate – phosphate 0.05 M de pH 6.0, à partir des pellets enrobés avec environ 19.5 % m/m d'Eudragit® RS. Les enrobages sont plastifiés avec 20 % m/m d'acétyltriéthyl citrate (ATEC).

Pour obtenir un enrobage continu, uniforme et possédant de bonnes propriétés mécaniques, il faut que le polymère filmogène soit placé à une température supérieure à sa  $T_g$  (température de transition vitreuse) et à sa MFT (température minimale de formation de film), qui sont très élevées dans le cas de l'éthylcellulose et de l'Eudragit® RS. Afin de ramener les valeurs de  $T_g$  et de MFT dans des zones de températures compatibles avec les conditions normales de travail et d'obtenir un film d'enrobage homogène, l'utilisation d'un plastifiant est souvent indispensable (Amighi et Moës, 1996; Gutiérrez-Rocca et McGinity, 1994). Cependant, le type de plastifiant utilisé, de même que sa concentration, peuvent avoir un impact considérable sur la cinétique de libération du principe actif à partir de la forme enrobée.



**Figure III.6 :** Influence de la nature du plastifiant (Triacétine, Diéthyl phthalate (DEP) et Acétyltriéthyl citrate (ATEC)) sur la libération de la théophylline ( $m \pm SD$ ,  $n = 5$ ) dans le tampon acétate – phosphate 0.05 M de pH 6.0, à partir des pellets enrobés avec environ 19.5 % m/m d'Eudragit® RS contenant 10 % m/m de pectine HM.

Dans la figure III.6, on constate en effet que la cinétique de libération de la théophylline à partir des pellets enrobés avec 19.5 % m/m d'Eudragit® RS renfermant 10 % m/m de pectine HM varie avec le type de plastifiant utilisé. La libération est beaucoup plus rapide lorsque les enrobages sont plastifiés avec le diéthyl phthalate (DEP), comparativement à celle obtenue avec les pellets dont les enrobages sont plastifiés avec la triacétine ou l'acétyltriéthyl citrate (ATEC). Parmi les trois plastifiants, la triacétine semble être celui qui permet le meilleur ralentissement de la libération de la théophylline à partir des pellets enrobés avec le mélange Pectine HM / Eudragit® RS. Ce constat nous a conduit à utiliser par la suite la triacétine comme plastifiant des enrobages mixtes d'Eudragit® RS renfermant de la pectine HM ou du pectinate de calcium.



**Figure III.7 :** Influence du pourcentage d'enrobage ( $7.2 \pm 0.7$ ,  $10.7 \pm 0.5$ ,  $15.0 \pm 0.8$  et  $20.2 \pm 0.4$  % m/m) sur la libération de la théophylline ( $m \pm SD$ ,  $n = 5$ ) dans le tampon acétate – phosphate 0.05 M de pH 6.0, à partir des pellets enrobés avec l'Eudragit® RS renfermant 10 % m/m de pectine HM.

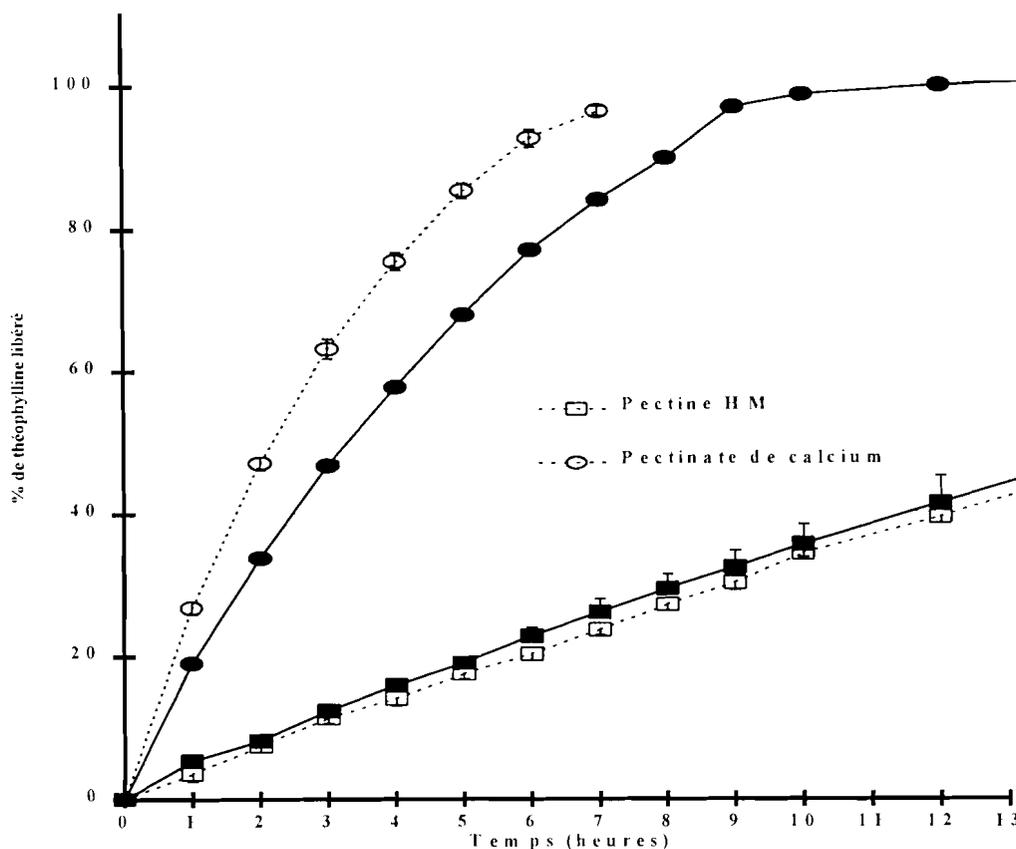
L'épaisseur de l'enrobage constitue également un paramètre dont dispose le formulateur pour réguler la vitesse de libération des principes actifs à partir des formes enrobées. Dans la figure III.7, qui présente les résultats de la libération de la théophylline à partir des pellets enrobés avec l'Eudragit® RS renfermant 10 % m/m de pectine HM, on constate effectivement un ralentissement de plus en plus important de la libération de la théophylline lorsque le pourcentage d'enrobage passe de 7.2 à 20.2 % m/m.

### *3.3.3. Influence des enzymes pectinolytiques sur la libération de la théophylline à partir des pellets enrobés avec les polymères insolubles contenant de la pectine HM ou des pectinates de calcium*

Les résultats des études effectuées sur films isolés, présentés dans le chapitre II, ont montré que parmi les différentes combinaisons possibles, celle de la pectine (environ 10 % m/m) et de l'Eudragit® RS semble être la plus prometteuse pour réaliser des enrobages permettant une délivrance spécifique des médicaments dans le côlon.

Cependant, étant donné que les films isolés peuvent avoir des comportements différents de ceux obtenus par dépôt progressif du polymère sur le substrat lors des processus d'enrobage par la technique du lit d'air fluidisé, il nous a paru intéressant d'étudier l'effet des enzymes pectinolytiques sur la libération de la théophylline à partir de pellets enrobés, non seulement avec l'Eudragit® RS30D, mais aussi, avec l'Aquacoat® ECD 30, le Surelease® clear et l'Eudragit® NE30D, renfermant de la pectine HM ou du pectinate de calcium. La teneur des enrobages en pectine HM ou en pectinate de calcium a été fixée dans tous les cas à 10 % m/m par rapport au poids du polymère insoluble. Les études de libération de la théophylline à partir des pellets enrobés ont été effectuées à 37°C, dans 900 ml du tampon acétate – phosphate 0.05 M de pH 6.0, contenant ou non 3 ml de Pectinex® Ultra SP-L.

La figure III.8 montre les courbes de libération de la théophylline à partir des pellets enrobés avec l'Aquacoat® ECD 30 renfermant de la pectine HM ou du pectinate de calcium. On peut observer qu'il n'existe aucun effet significatif des enzymes pectinolytiques, positif ou négatif, sur la libération de la théophylline contenue dans les pellets enrobés avec le mélange Pectine HM / Aquacoat® ECD 30. Par contre, la libération de la théophylline à partir des pellets enrobés avec le mélange Pectinate de calcium / Aquacoat® ECD 30, contrairement à notre attente, est plus lente en présence des enzymes pectinolytiques qu'en leur absence.

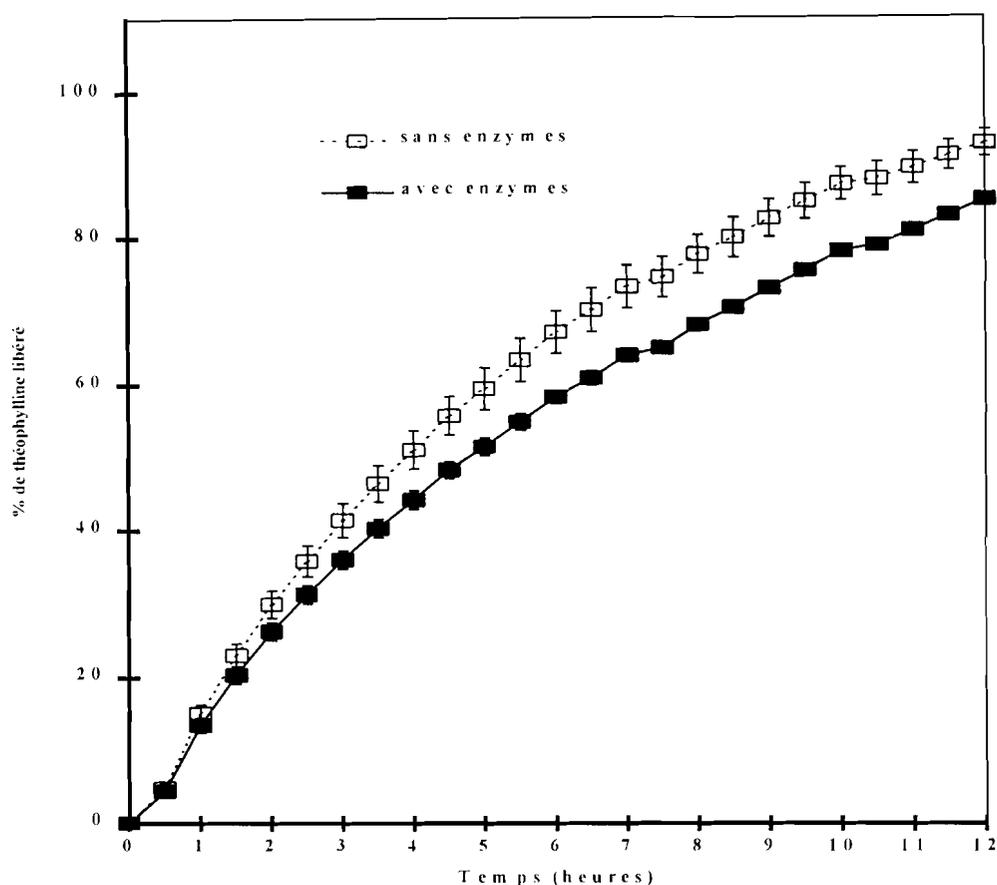


**Figure III.8** : Influence des enzymes pectinolytiques sur la libération de la théophylline ( $m \pm SD$ ,  $n = 5$ ) à partir des pellets enrobés avec environ 19.5 % m/m d'Aquacoat<sup>®</sup> ECD 30 renfermant 10 % m/m (par rapport à l'éthylcellulose) de pectine HM ou de pectinate de calcium (Ca / Pectine FM = 60 mg/g). Courbes en pointillés : en l'absence des enzymes; courbes continues : en présence des enzymes.

Dans le chapitre précédent, nous avons montré sur films isolés, qu'en l'absence des enzymes pectinolytiques, le largage du pectinate de calcium à partir des films mixtes Aquacoat<sup>®</sup> ECD 30 / Pectinate de calcium s'effectue un peu plus lentement que celui observé à partir des films mixtes Aquacoat<sup>®</sup> ECD 30 / Pectine HM. Ces derniers libèrent instantanément la totalité de leur contenu en pectine dans les milieux d'incubation. A partir de ces observations, on peut conclure que la présence des enzymes pectinolytiques dans les milieux de dissolution affectera plus la perméabilité des enrobages mixtes Aquacoat<sup>®</sup> ECD 30 / Pectinate de calcium que celle des enrobages mixtes Aquacoat<sup>®</sup> ECD 30 / Pectine HM.

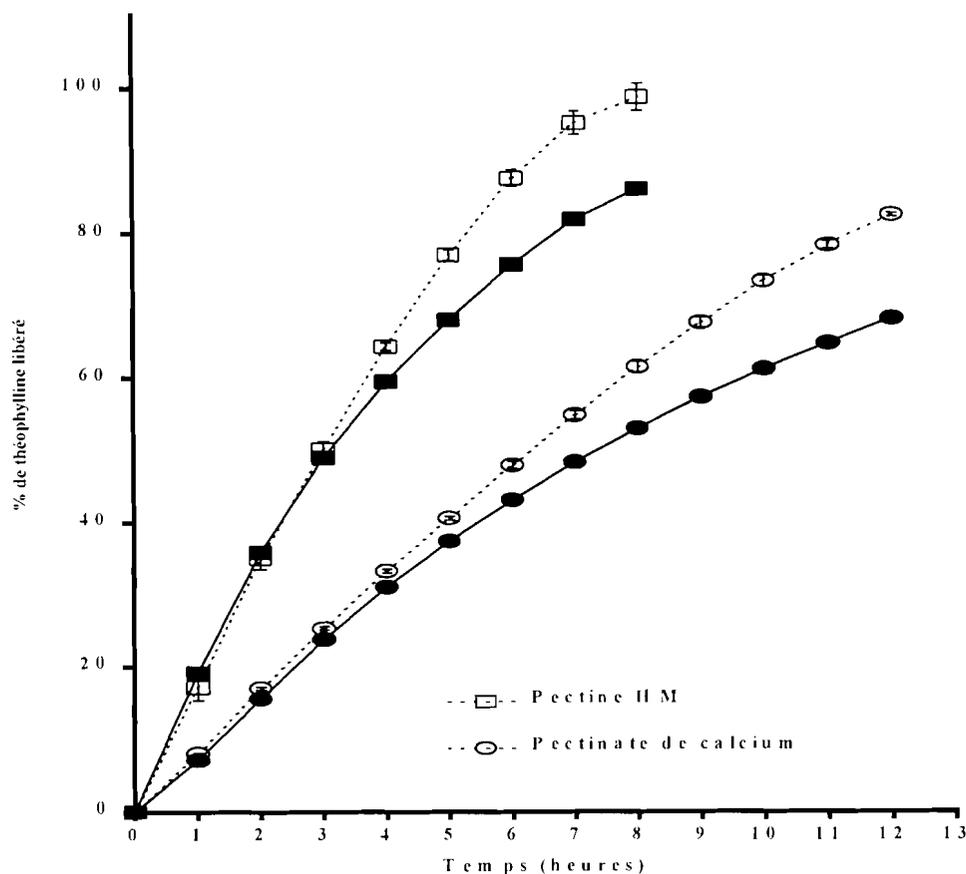
Les courbes de libération de la théophylline à partir des pellets enrobés avec les dispersions de Surelease<sup>®</sup> clear, d'Eudragit<sup>®</sup> RS30D et d'Eudragit<sup>®</sup> NE30D, renfermant de la pectine HM ou du pectinate de calcium sont respectivement représentées dans les figures III.9.

III.10 et III.11. On constate que les pellets enrobés à l'aide de ces différentes combinaisons libèrent le traceur plus lentement en présence des enzymes pectinolytiques qu'en leur absence.



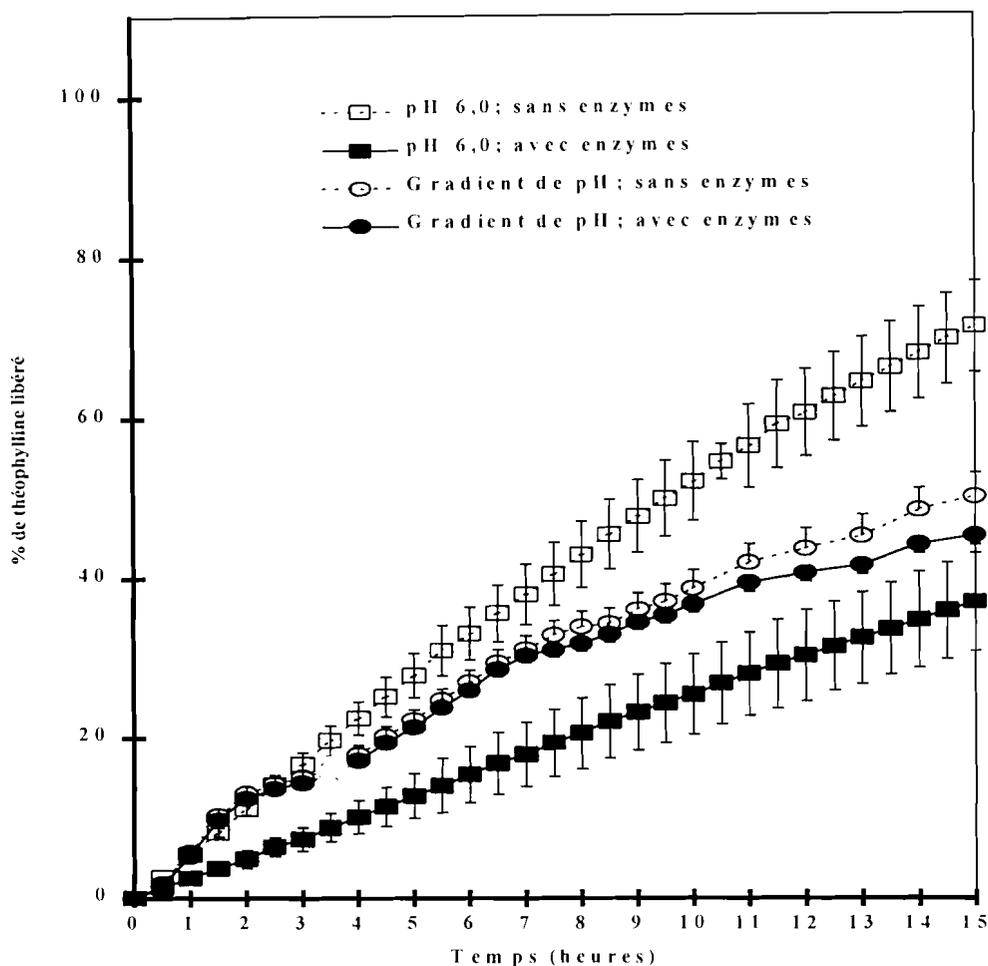
**Figure III.9** : Influence des enzymes pectinolytiques sur la libération de la théophylline ( $m \pm SD$ ,  $n = 5$ ) dans le tampon acétate – phosphate 0.05 M de pH 6.0, à partir des pellets enrobés avec  $21.7 \pm 0.8$  % m/m de Surelease® clear renfermant 10 % m/m (par rapport à l'éthylcellulose) de pectine HM.

Nous avons pourtant montré dans le chapitre II, qu'à l'exception de la combinaison Pectine HM / Eudragit® RS, tous les autres films mixtes libèrent très rapidement leur contenu en pectine dans les milieux de dissolution à pH 4.5. Si, à pH 6.0, les enrobages mixtes déposés sur les pellets à l'aide de la technique du lit d'air fluidisé, se comportent comme les films isolés, il ne devrait pas exister une différence significative entre la libération de la théophylline obtenue en l'absence des enzymes pectinolytiques et celle enregistrée en leur présence, pour les pellets enrobés avec les combinaisons autres que la combinaison Pectine HM / Eudragit® RS.



**Figure III.10 :** Influence des enzymes pectinolytiques sur la libération de la théophylline ( $m \pm SD$ ,  $n = 5$ ) dans le tampon acétate – phosphate 0.05 M de pH 6.0, à partir des pellets enrobés avec l'Eudragit® RS30D renfermant 10 % m/m (par rapport à l'Eudragit® RS) de pectine HM ou de pectinate de calcium (Ca / Pectine FM = 30 mg/g). Courbes en pointillés : en l'absence des enzymes; courbes continues : en présence des enzymes. Pour les niveaux d'enrobage, voir les tableaux III.1 et III.2.

On constate pourtant, en comparant les figures III.9, III.10 et III.11, que le ralentissement de la libération de la théophylline, en présence des enzymes pectinolytiques, est particulièrement prononcé lorsque l'enrobage est préparé à partir du mélange Pectinate de calcium / Eudragit® NE. Ce résultat ne peut être expliqué que si on admet, qu'à pH 6.0, les enrobages déposés sur les pellets à l'aide de la technique du lit d'air fluidisé sont capables de retenir une quantité substantielle de pectine HM ou de pectinate de calcium en l'absence des enzymes pectinolytiques. Ainsi, la présence des enzymes pectinolytiques dans les milieux de dissolution, qui provoque l'élimination de la pectine HM ou du pectinate de calcium des enrobages, va s'accompagner d'une modification de la perméabilité de ces derniers.



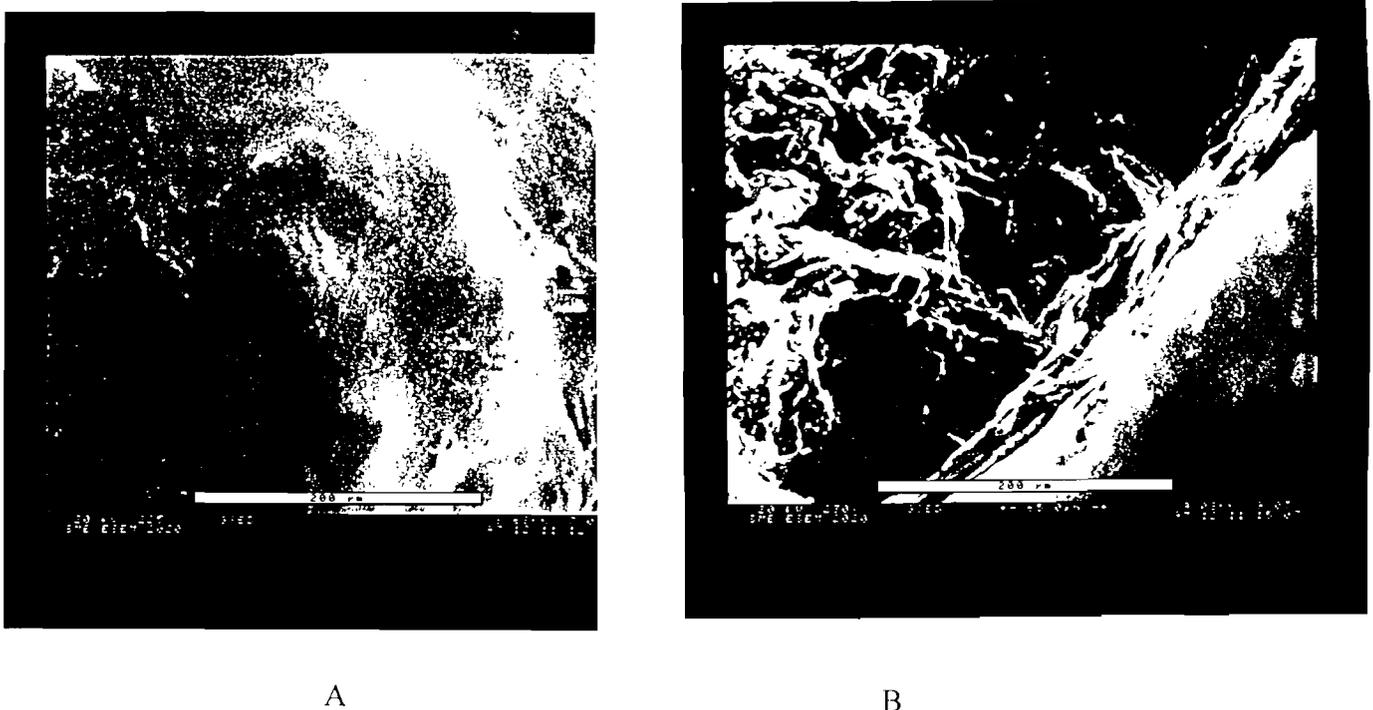
**Figure III.11** : Influence des enzymes pectinolytiques sur la libération de la théophylline ( $m \pm SD$ ,  $n = 5$ ) à partir des pellets enrobés avec  $8.0 \pm 0.4$  % m/m d'Eudragit® NE30D incorporant 10 % m/m (par rapport à l'Eudragit® NE) de pectinate de calcium (Ca / Pectine FM = 30 mg/g). Les pellets ont subis deux types de tests de dissolution différents : à pH constant (pH = 6.0, les enzymes sont ajoutées au début du test) et en gradient de pH (les enzymes sont ajoutées à la 6<sup>ème</sup> heure du test).

Les résultats du test de dissolution *in vitro* dans lequel, les conditions de pH, de durée de transit et de dégradation de la pectine simulent celles existant dans le tractus gastro-intestinal (figure III.11), montrent que l'addition des enzymes pectinolytiques dans le milieu de dissolution après la 6<sup>ème</sup> heure du test (équivalant au temps de transit moyen de bouche à caecum), affecte très faiblement la libération de la théophylline à partir des pellets enrobés avec le mélange Pectinate de calcium / Eudragit® NE. En effet, après la 15<sup>ème</sup> heure du test de dissolution, la différence entre les résultats obtenus en présence et en l'absence des enzymes pectinolytiques n'excède pas 5 % environ (test effectué en gradient de pH, figure III.11). Par

contre, lorsque le test a été effectué à pH constant (pH 6.0), où les enzymes sont ajoutées dès le début de l'essai, la différence entre les résultats obtenus en présence et en absence des enzymes pectinolytiques atteint pratiquement 35 % après la 15<sup>ème</sup> heure (test effectué à pH 6.0, figure III.11).

Il apparaît donc que l'effet des enzymes pectinolytiques sur la libération de la théophylline à partir des pellets enrobés à l'aide du mélange Pectinate de calcium / Eudragit<sup>®</sup> NE est influencé par les conditions du test de dissolution (à pH constant (6.0) ou en gradient de pH) ou par le moment d'addition des enzymes pectinolytiques.

#### 3.4. Examens microscopiques des pellets enrobés



**Figure III.12 :** Photographie de la surface (A) et de la coupe transversale (B) des pellets de théophylline enrobés avec  $20.2 \pm 0.4$  % m/m du mélange Pectine HM / Eudragit<sup>®</sup> RS (1/10), plastifié avec 20 % m/m (par rapport à l'Eudragit<sup>®</sup> RS) de triacétine. Les pellets ont été examinés après 15 heures d'immersion dans le milieu de dissolution, à pH 6.0, contenant ou non 200 µl / 100 ml de Pectinex<sup>®</sup> Ultra SP-L. Aucune différence de structure, due à la présence des enzymes pectinolytiques, n'a pu être mise en évidence. La surface des pellets (A) sont lisses et la coupe transversale (B) montre l'intérieur des pellets, de même que la couche d'enrobage.

La technique de la microscopie à balayage électronique environnementale (ESEM), qui permet d'examiner directement les échantillons sans aucun traitement préalable (D'Emanuele et Gilpin, 1996), a été utilisée pour examiner la microstructure de la surface et des coupes transversales des pellets enrobés avec le mélange Eudragit® RS / Pectine HM, directement après leur prélèvement du milieu de dissolution. Les pellets ont été immergés dans le milieu de dissolution pendant 15 heures. L'examen microscopique de la coupe transversale des pellets enrobés a clairement montré l'intérieur des pellets, mais aussi la couche d'enrobage. L'examen de la surface des pellets enrobés, après leur incubation, a montré une surface lisse. De plus, aucune structure poreuse dans l'enrobage, même en présence des enzymes pectinolytiques, n'a pu être mise en évidence (figure III.12).

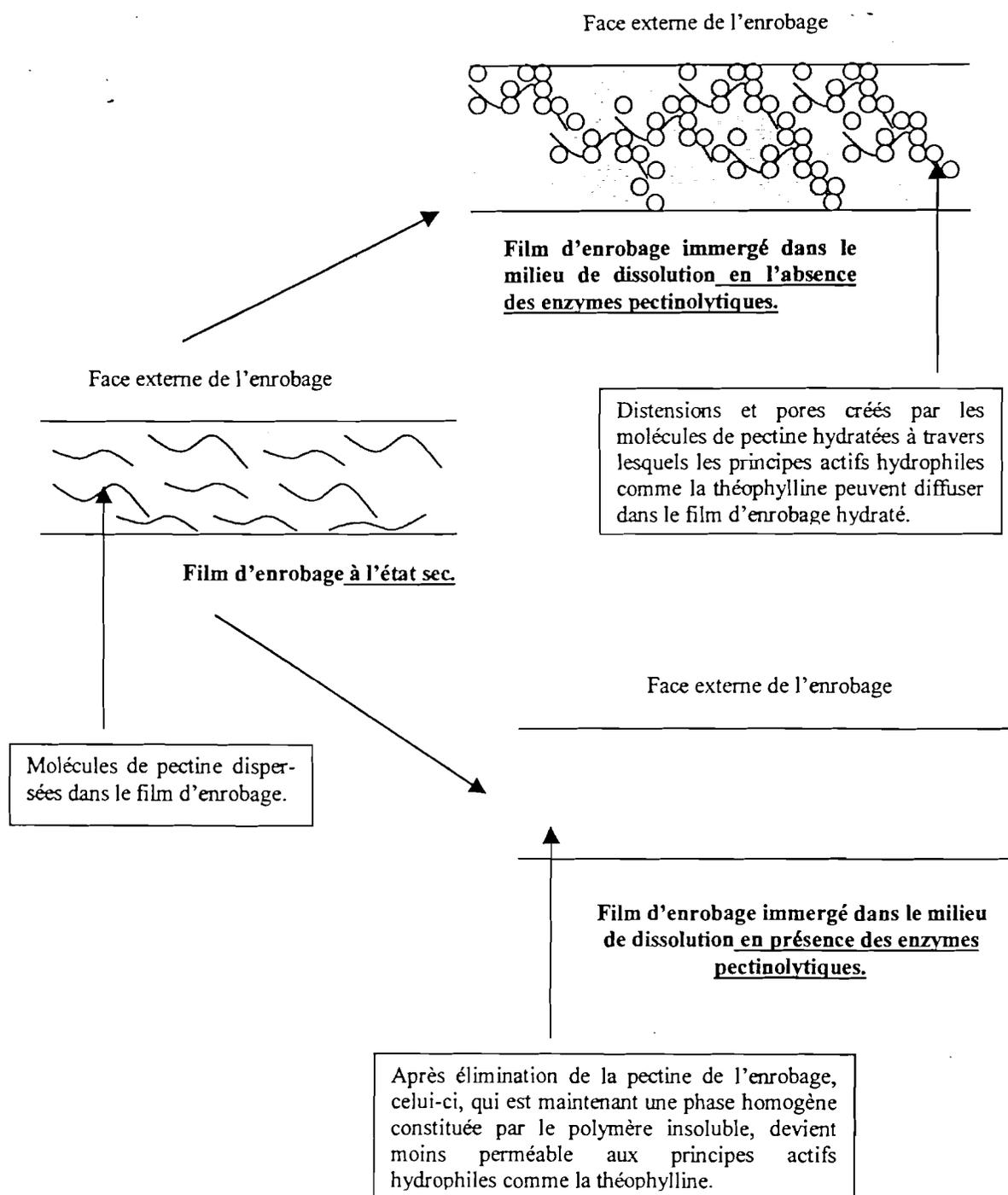
Les résultats de l'examen microscopique des pellets enrobés montrent donc que la présence des enzymes pectinolytiques dans les milieux de dissolution, qui provoque la libération de la pectine à partir des enrobages mixtes Eudragit® RS / Pectine HM, n'entraîne pas la formation de pores nettement visibles.

### 3.5. Discussion générale

En général, on peut dire que les résultats des tests de dissolution sont totalement en contradiction avec ce qui était attendu, en ce sens que la libération de la théophylline est plus lente en présence des enzymes pectinolytiques. Le ralentissement de la libération, suite à la dégradation enzymatique de la pectine contenue dans les enrobages, peut s'expliquer par les propriétés gélifiantes de la pectine HM et du pectinate de calcium. Dans les milieux aqueux, en effet, la pectine HM et le pectinate de calcium absorbent l'eau environnante et forment des gels qui participent à l'hydratation des films d'enrobage.

Ce phénomène a été mis en évidence par l'étude de l'absorption d'eau effectuée sur films isolés d'Eudragit® NE et d'Eudragit® RS renfermant de la pectine HM ou du pectinate de calcium (figure II.8 du chapitre II). En l'absence des enzymes pectinolytiques, la pectine ou le pectinate de calcium hydraté va constituer des pores hydrophiles dans les enrobages. De plus, le gonflement de la pectine ou du pectinate de calcium hydraté, peut provoquer des distensions des films d'enrobage, et ainsi perturber leur étanchéité. L'hydratation des films d'enrobage, la perturbation de leur étanchéité, ainsi que la formation de pores hydrophiles

constitués par la pectine hydratée vont favoriser la diffusion des molécules hydrophiles comme la théophylline à travers les enrobages (figure III.13).



**Figure III.13 :** Mécanismes par lesquels les enzymes pectinolytiques peuvent entraîner la diminution de la vitesse de libération de la théophylline à partir des pellets enrobés avec les enrobages mixtes Polymères insolubles / Pectines. Ex.: Pectinate de calcium / Eudragit® NE.

Dans le chapitre II (Figure II.8), nous avons montré que la présence des enzymes pectinolytiques dans les milieux d'incubation entraîne une diminution du pourcentage d'absorption d'eau par les films mixtes et donc, de leur hydratation (figure III.13). Par conséquent, la libération des principes actifs hydrosolubles comme la théophylline à partir des pellets enrobés avec les mélanges Polymères insolubles / Pectine HM ou Pectinates de calcium sera plus lente en présence des enzymes pectinolytiques.

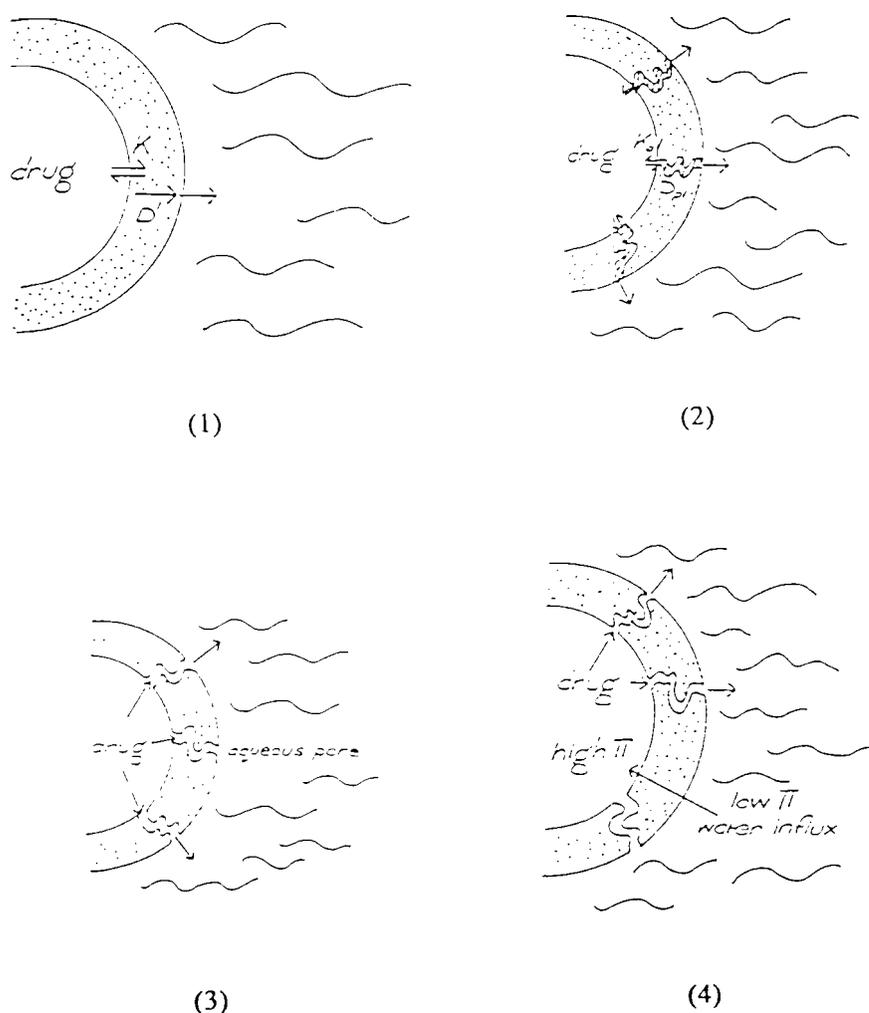
D'autre part, l'élimination de la pectine des enrobages est probablement suivie d'un resserrement de la structure de ces derniers, provoquant le colmatage des pores à travers lesquels les principes actifs pourraient être libérés (figure III.13). Une telle restructuration des enrobages au cours des tests de dissolution est possible car les températures de transition vitreuse ( $T_g$ ) des polymères plastifiés, utilisés dans cette étude (tous étaient plastifiés à l'exception de l'Eudragit® NE qui a une  $T_g$  d'environ  $-8^\circ\text{C}$ ), sont inférieures ou proches de la température des bains de dissolution ( $37^\circ\text{C}$ ). En effet, la  $T_g$  de l'Eudragit® RS plastifié par 20 % m/m de triacétine est égale à  $27^\circ\text{C}$  (O'Donnell et McGinity, 1997) et celle de l'éthylcellulose plastifiée par 20 % m/m de dibutyl sébaçate est égale à  $44^\circ\text{C}$  (Wheatley et Steuernagel, 1997).

**Tableau III.4 :** Propriétés mécaniques (à l'état sec et humide) et teneurs en eau à l'équilibre des films préparés à partir des dispersions colloïdales aqueuses d'éthylcellulose ou de copolymères d'esters méthacryliques. Les films sont plastifiés avec 20 % m/m de triéthyl citrate. Les résultats ( $n = 3$ ) sont exprimés en : m (SD) (Bodmeier et Paeratakul, 1994).

Type de dispersion (épaisseur des films, $\mu\text{m}$ )	Tension de rupture, MPa		% d'élongation		Teneur en eau des films (g d'eau / g de polymère)
	Sec	Humide	Sec	Humide	
Aquacoat® (309)	0.34(0.11)	0.10(0.02)	1.34(0.18)	0.13(0.02)	0.506 (0.032)
Surelease® (394)	0.23(0.04)	0.74(0.10)	0.62(0.12)	4.89(0.90)	0.100 (0.006)
Eudragit® NE30D (314)	2.16(0.19)*	1.58(0.10)*	>365.00	>365.00	0.268 (0.014)
Eudragit® RS30D (309)	1.99(0.23)	0.93(0.04)	142(4.32)	38.41(4.65)	0.331 (0.008)

\* La rupture du film n'a pas eu lieu.

Il est évident que le phénomène de colmatage des pores qui suit l'élimination de la pectine des enrobages doit être d'autant plus marqué que le film d'enrobage est très souple et très élastique. C'est le cas notamment des enrobages préparés à partir de l'Eudragit® NE qui, parmi tous les polymères utilisés, donne les films les plus flexibles, les plus souples et les plus élastiques (tableau III.4) (Bodmeier et Paeratakul, 1994; O'Donnell et McGinity, 1997). On peut ainsi expliquer le fait que le ralentissement le plus important de la libération de la théophylline en présence des enzymes pectinolytiques ait été observé avec les pellets enrobés à l'aide du mélange Eudragit® NE / Pectinate de calcium (comparaison des figures III.8, III.9, III.10 et III.11).



**Figure III.14 :** Schéma des différents mécanismes de libération qui régissent la libération des substances actives à partir des pellets enrobés par des polymères insolubles: (1) Solubilisation / diffusion à travers la phase homogène formée par le polymère plastifié; (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.

La figure III.14 rassemble les différents mécanismes proposés par Ozturk et coll. (1990) et Dressman et coll. (1994) pour expliquer la libération d'un principe actif à partir des pellets enrobés avec des polymères insolubles dans l'eau. Ils s'agit de la solubilisation / diffusion à travers la phase homogène du polymère plastifié, de la solubilisation / diffusion à travers des canaux de plastifiant, de la diffusion à travers des pores aqueux et enfin, de la pression osmotique élevée qui existe à l'intérieur des pellets. Cette dernière constitue la force de propulsion du principe actif de l'intérieur vers l'extérieur des pellets.

A ces mécanismes de libération, il faudrait donc ajouter la possibilité pour les principes actifs hydrophiles comme la théophylline, de diffuser à travers les canaux hydratés créés dans les enrobages barrières par les polymères hydrosolubles associés (HPMC, pectines,...) lors de l'hydratation des films par absorption d'eau. L'existence d'un tel mécanisme de diffusion permet, en effet, d'expliquer le ralentissement de la libération de la théophylline suite à l'élimination de la pectine de l'enrobage par hydrolyse enzymatique d'une part, et à la restructuration rapide des films grâce à leurs propriétés élastiques, d'autre part (figure III.13).

De l'ensemble des résultats obtenus, il apparaît clairement que l'utilisation des enrobages mixtes constitués de polymères insolubles et de pectine HM ou de pectinate de calcium ne permet pas de délivrer, de manière spécifique, les médicaments dans le côlon. Sur base du mécanisme proposé pour interpréter les résultats (figure III.13), on pourrait même avancer que lorsque la partie dégradable de l'enrobage mixte est un polymère hydrosoluble et gélifiant, on court le risque d'assister à une diminution de la libération du principe actif enrobé dans le côlon.

Cependant, Wakerly et coll. (1996b, 1997b) ont observé que la présence des enzymes pectinolytiques dans les milieux de dissolution (pH 6.0) entraîne une augmentation significative de la libération du paracétamol à partir de comprimés enrobés avec des mélanges de Surelease® (éthylcellulose) et de pectine HM. Par exemple, dans les milieux de dissolution contenant les enzymes pectinolytiques, les comprimés enrobés avec 14 mg d'éthylcellulose renfermant 7.1 % m/m de pectine HM, libèrent environ 35 % du paracétamol endéans 6 heures alors que dans le milieu contrôle, la libération n'atteint que 20 %. La formation de pores aqueux dans les films d'enrobage, suite à la dégradation enzymatique de la pectine et au largage consécutif de celle-ci, constitue l'hypothèse avancée par ces auteurs pour expliquer les

résultats obtenus. L'opposition existant entre leurs résultats (augmentation de la libération du traceur par les enzymes pectinolytiques) et les nôtres (diminution de la libération du traceur par les mêmes enzymes), pourrait peut-être provenir de la nature du traceur (theophylline vs paracétamol), de la forme, la taille et/ou la morphologie de surface du substrat enrobé (pellets vs comprimés) ou enfin, des conditions adoptées lors de l'enrobage et du vieillissement des formes enrobées.

Des enrobages mixtes obtenus par incorporation d'amylose dans les dispersions aqueuses de polymères insolubles ont été aussi étudiés en vue de la délivrance ciblée des médicaments dans le côlon. En présence des bactéries du côlon, les traceurs sont plus rapidement libérés à partir des pellets enrobés avec le mélange Amylose / Ethylcellulose (Ethocel<sup>®</sup>) (Milojevic et coll., 1996a,b; Cummings et coll., 1996). Il faut noter qu'avant d'être utilisée, l'amylose a d'abord été complexée avec le butane-1-ol qui réduit considérablement sa solubilité et son gonflement dans les milieux aqueux. Par ailleurs, la formation d'un complexe insoluble a permis d'incorporer de fortes proportions d'amylose (1:4, m/m) dans la dispersion d'Ethocel<sup>®</sup> sans pour autant compromettre ni la perméabilité, ni la dégradation des enrobages.

#### 4. Conclusion

La pectine HM et le pectinate de calcium sont des polymères dégradables par la flore intestinale mais très hydrosolubles. Leur incorporation dans les enrobages barrières constitués de polymères insolubles, favorise la libération de la théophylline à partir des pellets enrobés grâce à l'hydratation très rapide de ces polysaccharides. Leur dégradation enzymatique, en supprimant l'hydratation, va permettre aux enrobages de se restructurer tout en devenant moins perméables à la théophylline. Ce phénomène est d'autant plus marqué que le polymère filmogène est très souple et très élastique, comme par exemple l'Eudragit<sup>®</sup> NE. L'association des pectines (ou de tout autre polymère hydrosoluble et dégradé par la flore intestinale) avec les polymères insolubles risque donc d'entraîner une diminution significative de la libération du principe actif dans le côlon.

Cependant, à la lumière des résultats obtenus et de l'interprétation qui a été proposée pour les expliquer, il nous semble toujours possible d'envisager l'association des pectines avec les dispersions aqueuses de polymères insolubles comme matériaux d'enrobage

colonique. En effet, étant donné que la pectine est un polymère anionique, il pourrait former un complexe insoluble avec un polymère cationique, non dégradé par les enzymes de la flore intestinale comme par exemple l'Eudragit® RL.

Si on incorpore une quantité suffisamment importante d'un tel complexe dans les films d'enrobage de polymères insolubles et élastiques comme ceux de l'Eudragit® NE, on devrait s'attendre, après l'action des enzymes pectinolytiques, à une accélération de la libération de la théophylline à partir des pellets enrobés. En effet, le complexe Pectine - Eudragit® RL incorporé étant insoluble, l'enrobage sera peu perméable à la théophylline en l'absence des enzymes pectinolytiques. La dégradation enzymatique et le largage consécutif de la pectine de l'enrobage, vont s'accompagner d'une destruction du complexe, permettant ainsi à l'Eudragit® RL de recouvrir ces propriétés originelles. Il pourra alors se solvater, gonfler et favoriser ainsi la libération de la théophylline enrobée. C'est cela que nous allons tenter de démontrer dans le chapitre suivant.

## Chapitre IV : Etude des enrobages mixtes d'Eudragit<sup>®</sup> NE30D renfermant des complexes Pectine HM - Eudragit<sup>®</sup> RL en vue de la délivrance spécifique des médicaments dans le côlon

<b>1.</b>	<b>Introduction</b>	138
<b>2.</b>	<b>Matériels et méthodes</b>	140
<b>2.1.</b>	<b>Matériels</b>	140
<b>2.2.</b>	<b>Méthodes</b>	140
2.2.1.	<i>Préparation et études rhéologiques des dispersions aqueuses des complexes Pectine HM - Eudragit<sup>®</sup> RL</i>	140
2.2.2.	<i>Préparation des films mixtes Pectine HM / Eudragit<sup>®</sup> RL / Eudragit<sup>®</sup> NE et étude des cinétiques de libération de la pectine à partir de ces films</i>	141
2.2.3.	<i>Enrobages des pellets avec les mélanges Pectine HM / Eudragit<sup>®</sup> RL / Eudragit<sup>®</sup> NE et essais de dissolution</i>	142
<b>3.</b>	<b>Résultats et Discussion</b>	144
<b>3.1.</b>	<b>Etudes rhéologiques des complexes Pectine HM - Eudragit<sup>®</sup> RL</b>	144
<b>3.2.</b>	<b>Influence des enzymes pectinolytiques sur les cinétiques de libération de la pectine à partir des films mixtes Pectine HM /Eudragit<sup>®</sup> RL / Eudragit<sup>®</sup> NE</b>	149
<b>3.3.</b>	<b>Etudes de dissolution des pellets enrobés</b>	151
3.3.1.	<i>Influence de la teneur des enrobages en Eudragit<sup>®</sup> RL et de la présence des enzymes pectinolytiques dans les milieux de dissolution sur la libération de la théophylline à partir des pellets enrobés</i>	151
3.3.2.	<i>Influence de la teneur des enrobages en pectine HM et de la présence des enzymes pectinolytiques dans les milieux de dissolution sur la libération de la théophylline à partir des pellets enrobés</i>	153
<b>4.</b>	<b>Conclusion</b>	162

## 1. Introduction

Ce chapitre a pour objectif l'évaluation des propriétés des enrobages mixtes Pectine HM / Eudragit® RL / Eudragit® NE en vue de leur utilisation potentielle pour la délivrance spécifique des médicaments dans le côlon.

L'Eudragit® RL, comme son homologue l'Eudragit® RS, est un copolymère d'éthyl acrylate et de méthyl méthacrylate rendu cationique par la présence de groupements d'ammonium quaternaires (triméthylaminoéthyl méthacrylate). Il est très stable dans le tractus gastro-intestinal et résiste totalement à l'activité de dégradation de la flore intestinale. A la différence de l'Eudragit® RS, l'Eudragit® RL contient plus de groupements cationiques (le double de l'Eudragit® RS). De ce fait, il est beaucoup plus hydrophile et forme des films qui sont insolubles dans l'eau mais qui sont caractérisés par une absorption d'eau (gonflement) et une perméabilité très élevées (Lehmann, 1997). L'Eudragit® RL étant un polymère cationique, il serait donc susceptible de former avec les pectines HM (polyanions) des complexes peu hydrophiles et insolubles dans l'eau.

Il faut également remarquer que les dispersions aqueuses d'Eudragit® NE30D et RL30D sont tout à fait incompatibles car les particules de latex présentent des valeurs de potentiel électrocinétique (potentiel zéta,  $\xi$ ) de charge opposée (Schmidt et Bodmeier, 1999). Leur mélange provoque une déstabilisation irréversible de la dispersion qui se manifeste par l'agglomération et la précipitation des particules de latex. Dès lors, la formation des complexes Pectine HM - Eudragit® RL permettrait non seulement de neutraliser les charges positives présentes à la surface des particules du latex d'Eudragit® RL30D, mais aussi, de provoquer, pour les plus fortes proportions en pectine HM, l'apparition de charges négatives, et rendre ainsi compatible, le mélange des dispersions aqueuses d'Eudragit® RL30D et d'Eudragit® NE30D.

Le choix de la pectine HM et non de la pectine FM pour préparer les complexes Pectine - Eudragit® RL a été dicté par l'importance de la densité des charges négatives au sein de la macromolécule, qui dépend de la valeur du degré de méthylation des groupements carboxyliques (DM) de ces polymères. Le degré de méthylation de la pectine HM étant environ deux fois plus petit que celui de la pectine FM, il est possible d'incorporer une plus

grande quantité de pectine HM dans les enrobages mixtes pour y jouer le rôle de polymère dégradable par les enzymes de la flore intestinale.

La complexation, qui réduit à la fois l'hydrophilie et la capacité de gonflement de la pectine HM et de l'Eudragit® RL, permettrait d'incorporer de grandes quantités de complexes Pectine HM - Eudragit® RL dans les enrobages d'Eudragit® NE30D, sans entraîner une augmentation trop importante de leur perméabilité. Les films d'enrobage obtenus à partir de l'Eudragit® NE30D étant très souples et très élastiques, les diverses modifications apportées aux complexes Pectine HM - Eudragit® RL incorporés, devraient se traduire par une restructuration de l'enrobages et donc, par une modification du profil de libération du principe actif encapsulé.

Il se pourrait, en effet, que l'action des enzymes pectinolytiques entraîne la dégradation et le largage de la pectine hors des enrobages (à condition évidemment que ces enrobages soient accessibles aux enzymes) et, par conséquent, la destruction du complexe Pectine HM - Eudragit® RL. L'Eudragit® RL ainsi régénéré recouvrerait ses propriétés d'origine et pourrait se solvater librement, gonfler et entraîner l'apparition de distensions au sein de l'enrobage. L'ensemble de ces phénomènes devrait conduire à une augmentation de la libération du principe actif.

Dans ce but, nous avons d'abord étudié l'influence de la teneur en pectine HM sur le comportement rhéologique des complexes Pectine HM - Eudragit® RL. Ensuite, des films isolés ont été préparés à partir de l'Eudragit® NE30D renfermant les complexes Pectine HM - Eudragit® RL. Ces films ont ensuite été incubés dans le tampon acétate – phosphate 0.05 M de pH 4.5, et les cinétiques de largage de la pectine ont été déterminées, en présence et en l'absence des enzymes pectinolytiques. Finalement, des essais de dissolution ont été réalisés sur des pellets de théophylline enrobés, par la technique du lit d'air fluidisé, à l'aide des mélanges ternaires Pectine HM / Eudragit® RL / Eudragit® NE. L'établissement des profils de libération de la théophylline à partir des pellets enrobés a permis de déterminer l'influence de la teneur des enrobages en pectine HM et en Eudragit® RL, de même que celle de la présence des enzymes pectinolytiques dans le milieu de dissolution (tampon acétate – phosphate 0.05 M de pH 6.0) sur la perméabilité des enrobages mixtes.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Matériels

A l'exception de l'Eudragit® RL30D (dispersion colloïdale aqueuse à 30 % m/m de matière solide), fourni par Röhm Pharma Polymer (Darmstadt, Allemagne) et du lauryl sulfate de sodium (Texapon® K12) qui a été obtenu de Henkel – Dehydag (Düsseldorf, Allemagne), tous les autres produits utilisés ont déjà été décrits dans les chapitres précédents. Ajoutons aussi que les structures chimiques, les modes de fabrication et les propriétés des différents polymères acryliques utilisés sont rassemblés dans le tableau II.1 (Chapitre II).

### 2.2. Méthodes

#### 2.2.1. Préparation et études rhéologiques des dispersions aqueuses des complexes Pectine HM - Eudragit® RL

Un gel aqueux à 4.34 % m/m de pectine HM a été préparé par simple agitation à 500 tours / min (agitateur à hélice, Ika Werk, Allemagne). Après avoir ajusté le pH à 5.0 avec une solution de NaOH 1 N, le gel a ensuite subi un repos d'une nuit au frigo (4-8°C) avant d'être utilisé pour la préparation des dispersions aqueuses des complexes Pectine HM - Eudragit® RL renfermant des quantités croissantes de pectine HM (0.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0 et 20.0 % m/m). La préparation de ces complexes a été effectuée par addition lente (goutte à goutte), sous agitation (500 tours / min, agitateur à hélice, Ika Werk), de la quantité requise du gel de pectine HM à 50 g de la dispersion d'Eudragit® RL30D. Toutes ces dispersions ont ensuite été portées à 120 g avec de l'eau désionisée afin d'obtenir une teneur de 12.5 % m/m en Eudragit® RL (tableau IV.1).

Les propriétés rhéologiques des différentes dispersions aqueuses des complexes Pectine HM - Eudragit® RL ont été étudiées, à  $20.0 \pm 0.5$  °C, à l'aide du viscosimètre Rhéomat® T15, comme décrit dans le chapitre I, sous 2.2.1.2.

**Tableau IV.1 :** Composition des dispersions aqueuses de complexes pectine HM - Eudragit® RL utilisées pour les études rhéologiques.

<b>Formule</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
Eudragit® RL30D (g)	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
Gel à 4.34% de Pectine HM (g)	0	8.6	17.3	25.9	34.6	43.2	51.8	69.1
Eau ad. (g)	120	120	120	120	120	120	120	120
Matière solide (% m/m)	12.5	12.8	13.1	13.5	13.8	14.1	14.4	15
Pectine HM / Eudragit® RL (% m/m)	0.0	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	20.0

### 2.2.2. Préparation des films mixtes Pectine HM / Eudragit® RL / Eudragit® NE et étude des cinétiques de libération de la pectine à partir de ces films isolés

Les films isolés ont été préparés à partir de la dispersion aqueuse d'Eudragit® NE30D et de la dispersion aqueuse du complexe Pectine HM - Eudragit® RL, contenant 12.5 % m/m de pectine HM par rapport au poids sec de l'Eudragit® RL (rapport 1.25-10). Le choix du complexe Pectine HM - Eudragit® RL de rapport 1.25-10 (formule 6, tableau IV.1) parmi toutes les autres combinaisons possibles sera justifié dans la partie " résultats et discussion ".

**Tableau IV.2 :** Formulation des dispersions utilisées pour la préparation des films isolés constitués du mélange Pectine HM / Eudragit® RL / Eudragit® NE.

<b>Formule</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
Eudragit® NE30D (poids sec en g)	3.0	3.0
Eudragit® RL30D (poids sec en g)	0.6	1.2
Pectine HM (poids sec en g)	0.075	0.15
Eau ad. (g)	30.0	30.0
Pectine / Polymères acryliques (% m/m)	2.08	3.57
Pectine / Eudragit® RL (% m/m)	12.5	12.5
Matière solide dans la dispersion (% m/m)	12.25	14.5
Eudragit® RL / Eudragit® NE (% m/m)	<b>20</b>	<b>40</b>

### 2.2.3. Enrobage des pellets avec les mélanges Pectine HM / Eudragit<sup>®</sup> RL / Eudragit<sup>®</sup> NE et essais de dissolution

La préparation des dispersions aqueuses destinées à l'enrobage des pellets de théophylline (tableaux IV.3 et IV.4) a été effectuée comme suit : un gel aqueux de pectine HM (concentration comprise entre 2.5 et 3.5 %) est d'abord préparé par simple agitation de la pectine HM dans de l'eau désionisée. Le pH de ce gel, de même que celui des dispersions aqueuses d'Eudragit<sup>®</sup> RL30D et d'Eudragit<sup>®</sup> NE30D, sont séparément ajustés à 5.0 unités à l'aide d'une solution de NaOH 1 N ou de HCl 1 N.

A la quantité spécifiée de la dispersion aqueuse d'Eudragit<sup>®</sup> RL30D, sont ajoutés 3.2 % m/m (par rapport au poids sec de l'Eudragit<sup>®</sup> RL) de polysorbate (tween) 80, utilisé comme stabilisant. Ensuite, la quantité requise du gel aqueux de pectine HM est ajoutée lentement (goutte à goutte), sous agitation (500 tours/min, agitateur à hélice, Ika Werk). Les complexes Pectine HM - Eudragit<sup>®</sup> RL ainsi obtenus sont ensuite ajoutés lentement et sous agitation modérée (agitateur magnétique) à la quantité spécifiée de l'Eudragit<sup>®</sup> NE30D, contenant de l'émulsion de silicone utilisée comme agent anti – mousse. La quantité de l'émulsion de silicone utilisée est de 3.2 % m/m, calculée par rapport au poids sec de l'Eudragit<sup>®</sup> RL.

**Tableau IV.3 :** Formulation des dispersions utilisées pour préparer les enrobages mixtes Pectine HM / Eudragit<sup>®</sup> RL / Eudragit<sup>®</sup> NE, destinés à l'étude de l'influence de la teneur des enrobages en Eudragit<sup>®</sup> RL sur la libération de la théophylline à partir des pellets enrobés. La teneur en pectine HM est fixée à 12.5 % m/m par rapport à celle de l'Eudragit<sup>®</sup> RL.

Formule	1	2	3
Eudragit <sup>®</sup> NE30D (poids sec en g)	100.0	90.0	75.0
Eudragit <sup>®</sup> RL30D (poids sec en g)	50.0	67.5	75.0
Pectine HM (poids sec en g)	7.5	8.4	9.4
Tween 80 (g)	1.6	2.2	2.4
Emulsion de silicone (g)	1.6	2.2	2.2
Eau ad. (g)	1000	1070	1000
Teneur en résidu sec (% m/m) de la dispersion	16.1	15.9	16.4
Pectine HM / Polymères acryliques (% m/m)	5.0	5.4	6.3
Eudragit <sup>®</sup> RL / Eudragit <sup>®</sup> NE (% m/m)	50	75	100
Quantité (% m/m) de film déposée (m ± SD, n = 3)	19.5 ± 0.8	18.9 ± 0.3	19.4 ± 0.9

**Tableau IV.4 :** Formulation des dispersions utilisées pour préparer les enrobages mixtes Pectine HM / Eudragit® RL / Eudragit® NE, destinés à l'étude de l'influence de la teneur des enrobages en pectine HM sur la libération de la théophylline à partir des pellets enrobés. La teneur en Eudragit® RL est fixée à 50 % m/m par rapport à celle de l'Eudragit® NE.

Formule	1	2	3	4	5	6
Eudragit® NE30D (poids sec en g)	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Eudragit® RL30D (poids sec en g)	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
Pectine HM (poids sec en g)	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5	15.0
Tween 80 (g)	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
Emulsion de silicone (g)	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
Eau ad. (g)	1180	1000	1000	1000	1060	1100
Teneur en résidu sec (% m/m)	13.3	15.9	16.1	16.3	15.6	15.3
Pectine HM / Eudragit® RL (% m/m)	10	12.5	15.0	20.0	25.0	30.0
Pectine / Polymères acryliques (% m/m)	3.33	4.16	5.00	6.67	8.33	10.00
Quantité (% m/m) de film déposée (m ± SD, n = 3)	20.2 ± 0.2	19.5 ± 0.8	19.8 ± 0.5	19.2 ± 0.1	18.9 ± 0.1	19.1 ± 0.9

Les teneurs en matières solides des dispersions sont ensuite ajustées aux valeurs correspondantes avec de l'eau désionisée. Les dispersions finales, dont les compositions sont présentées dans les tableaux IV.3 et IV.4, sont finalement passées à travers un tamis de 0.315 mm d'ouvertures de mailles (élimination des gros agglomérats) avant d'être immédiatement utilisées pour l'enrobage des pellets par la méthode au lit d'air fluidisé.

Toutes les précautions observées lors de la préparation des dispersions pour enrobage (pH 5.0, présence de tween 80, addition lente du gel de pectine HM au latex d'Eudragit® RL30D, ...) sont nécessaires pour limiter la déstabilisation des latex utilisés (Lehmann, 1997).

L'enrobage des pellets, dont les conditions opératoires sont reprises dans le tableau IV.5, de même que la détermination des quantités de films déposées sur les pellets sont respectivement décrits dans les paragraphes 2.2.4 et 2.2.5 du chapitre III. Les pellets enrobés ont finalement été conservés pendant  $15 \pm 1$  heures dans une étuve à 60°C (vieillessement accéléré des films d'enrobage) avant d'être soumis aux tests de libération de la théophylline

dans le tampon acétate – phosphate 0.05 M de pH 6.0, en présence et en l'absence des enzymes pectinolytiques (Pectinex® Ultra SP-L). La description détaillée des tests de dissolution figure dans le paragraphe 2.2.6 du chapitre III.

**Tableau IV.5 :** Conditions opératoires adoptées lors des enrobages des pellets.

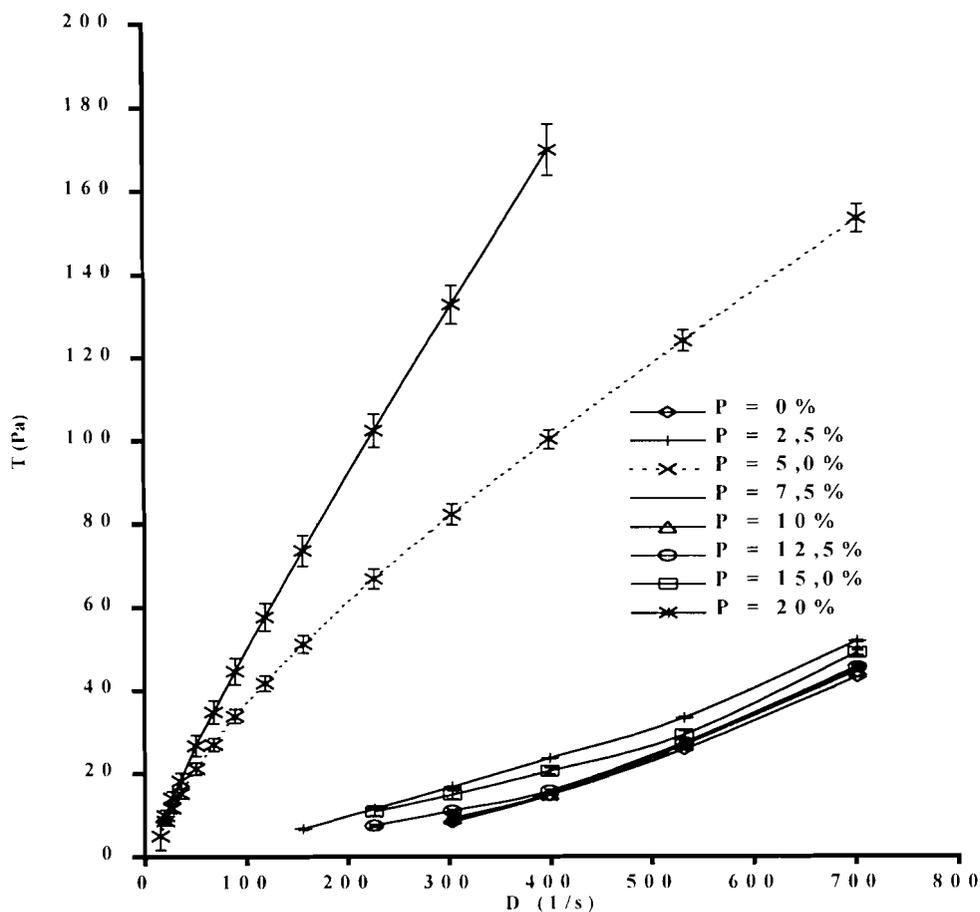
Paramètres	Préchauffage	Enrobage	Séchage
Température d'entrée (°C)	36	36	36
Température de sortie (°C)	32-34	27-29	32-34
Débit de pulvérisation (g / min)	-	9.5-11.5	-
Pression de pulvérisation (bar)	1	1	1
Durée de l'opération (min)	10	90-120	10
Charge initiale en pellets nus (g)	800	800	-

### 3. Résultats et discussion

#### 3.1. Etude rhéologiques des complexes Pectine HM - Eudragit® RL

Lors de la préparation des dispersions aqueuses des complexes Pectine HM - Eudragit® RL, l'addition du gel de pectine entraîne la floculation voire, pour certaines concentrations en pectine (5 % m/m par rapport au poids sec de l'Eudragit® RL), l'agglomération du latex d'Eudragit® RL30D. Le même phénomène (floculation et agglomération du latex) a aussi été observé lors de l'addition de quantités croissantes du gel de pectine HM à la dispersion d'Eudragit® RS30D.

Dans les figures IV.1 et IV.2, sont présentés les résultats de l'étude du comportement rhéologique du latex d'Eudragit® RL30D lors de l'addition de quantités croissantes du gel de pectine HM.

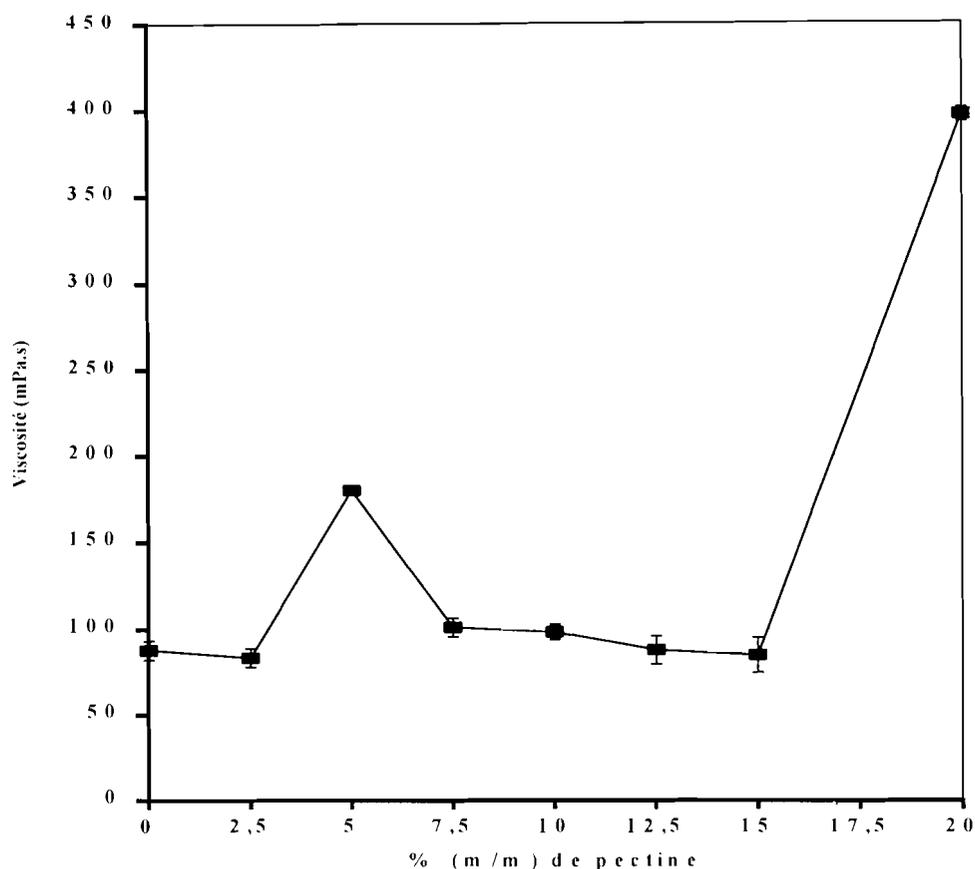


**Figure IV.1 :** Influence de la teneur en pectine HM (P en % m/m par rapport au poids sec de l'Eudragit® RL) sur le comportement rhéologique de l'Eudragit® RL30D. T ( $m \pm SD$ ,  $n = 3$ ) représente la contrainte de cisaillement (pascals; Pa) et D la vitesse de cisaillement ( $s^{-1}$ ).

L'examen des deux figures (IV.1 et IV.2) permet de constater que la viscosité du système Pectine HM - Eudragit® RL est relativement faible lorsque la teneur des complexes en pectine HM est comprise entre 0 et 2.5 % m/m par rapport au poids sec de l'Eudragit® RL30D. Dans cette plage de concentrations en pectine, la quantité de pectine est insuffisante pour provoquer la floculation des particules du latex d'Eudragit® RL30D.

Cependant, au delà de 2.5 % m/m de pectine HM par rapport au poids sec de l'Eudragit® RL30D, la viscosité augmente en passant par une valeur maximale lorsque la teneur des complexes en pectine HM est de 5.0 % m/m. En effet, la présence de quantités croissantes de pectine dans le milieu va provoquer une neutralisation progressive des charges positives présentes à la surface des particules du latex d'Eudragit® RL30D, avec apparition éventuelle de pontages interparticulaires, et ainsi, favoriser un resserrement de la structure. A

cette concentration en pectine HM (5 % m/m), l'Eudragit® RL30D se trouve probablement à l'état floclé, état caractérisé par la neutralisation partielle des particules du latex et par la formation d'agrégats lâches, responsables de la forte augmentation de la viscosité du système. A ce stade, la sédimentation des particules floclées est très lente (plusieurs jours), le sédiment volumineux et le surnageant limpide.



**Figure IV.2 :** Influence de la teneur en pectine HM (% m/m par rapport au poids sec de l'Eudragit® RL) sur la viscosité (mPa.s) de la dispersion aqueuse d'Eudragit® RL30D ( $m \pm SD$ ,  $n = 3$ ).

Ensuite, la viscosité du système diminue et atteint ses valeurs minimales lorsque la teneur en pectine HM dans les complexes est comprise entre à 10.0 et 15.0 % m/m par rapport au poids sec de l'Eudragit® RL30D. Dans cette zone de concentrations en pectine HM, le système passe par une neutralisation totale des particules du latex qui vont se trouver sous forme d'agrégats de plus en plus serrés. Ces agrégats auront tendance à se charger négativement (apparition de forces de répulsion, état défloclé) lorsque le seuil de

neutralisation sera dépassé par la présence d'une quantité excédentaire de pectine. A ce stade, les agrégats formés sédimentent après seulement quelques heures de repos, le volume du sédiment est faible et le surnageant limpide.

On peut donc supposer que la taille des agrégats est supérieure à 1  $\mu\text{m}$  de diamètre puisque c'est seulement au delà de cette dimension que la sédimentation des dispersions aqueuses peut être observée (Lehmann, 1997). L'observation au microscope optique des agrégats montre néanmoins que leur taille est inférieure à 10  $\mu\text{m}$  de diamètre, indiquant que les agrégats peuvent être incorporés tels quels dans les dispersions d'enrobage sans affecter de manière importante la formation du film lors du processus d'enrobage par la technique du lit d'air fluidisé.

D'autre part, il est important de signaler que l'incorporation du complexe pectine HM - Eudragit<sup>®</sup> RL dans la dispersion d'Eudragit<sup>®</sup> NE30D ne sera possible que pour des concentrations en pectine à partir desquelles une neutralisation, voire une inversion, des charges à la surface des particules du latex d'Eudragit<sup>®</sup> RL30D est obtenue. Des essais d'incorporation de ces complexes à la dispersion d'Eudragit<sup>®</sup> NE30D ont permis de constater que le système devenait compatible lorsque la teneur des complexes en pectine HM était supérieure à 10 % m/m (par rapport au poids sec de l'Eudragit<sup>®</sup> RL30D).

Nous pensons que dans la zone de concentration en pectine (10 - 15 % m/m), l'hydrophilie et le gonflement de la pectine HM, de même que ceux de l'Eudragit<sup>®</sup> RL, sont alors à leur minima. C'est la raison pour laquelle le complexe Pectine HM - Eudragit<sup>®</sup> RL de rapport 1.25 - 10 a été choisi pour être incorporé dans les films d'Eudragit<sup>®</sup> NE destinés à l'étude des cinétiques de largage de la pectine à partir des films isolés (paragraphe 3.2). Les mêmes raisons sont à la base du choix de ce même complexe pour être incorporé dans les enrobages ternaires destinés à l'étude de l'influence de la teneur des enrobages en Eudragit<sup>®</sup> RL sur la libération de la théophylline à partir des pellets enrobés (paragraphe 3.3.1).

Néanmoins, étant donné que lors de la formation du complexe les deux polymère ne se trouvent pas en solution (la complexation se produit entre les charges négatives des molécules de pectine en solution et les molécules d'Eudragit<sup>®</sup> RL30D se trouvant à la surface des particules du latex), l'incorporation de quantités supérieures de pectine à celles déterminées

par l'étude rhéologique, pourrait être nécessaire pour l'obtention d'un état de complexation optimale (caractérisé par la perméabilité la plus faible) au sein des films d'enrobage.

La floculation d'une dispersion liquide, c'est-à-dire l'agglomération des particules dispersées sous forme d'agrégats, est une instabilité fréquente dont la source peut être la présence d'un non solvant, d'un électrolyte de charges opposées, d'un polymère hydrophile ou d'un polymère de charges opposées. Dans le cas particulier de l'Eudragit® RL30D et de la pectine HM, l'instabilité (floculation) pourrait résulter essentiellement de la neutralisation des charges des particules cationiques de l'Eudragit® RL par les groupements carboxyliques de la pectine d'une part, et d'autre part, de l'agglomération des particules cationiques du latex d'Eudragit® RL30D par réticulation ou " pontage ionique " avec les molécules anioniques de la pectine.

La neutralisation des charges des particules, même si nous pensons qu'elle contribue à causer l'instabilité observée, ne semble pas être la cause principale de la floculation du latex d'Eudragit® RL30D par la pectine HM. En effet, l'addition de quantités croissantes, jusqu'à 20 % m/m (par rapport au poids sec de l'Eudragit® RL30D) de lauryl sulfate de sodium (contre-ion), n'a pas entraîné la floculation du latex.

De plus, l'incubation à 37°C en présence des enzymes pectinolytiques (1 ml de Pectinex® Ultra SP-L) de la dispersion d'Eudragit® RL30D, préalablement floculée avec 12.5 % m/m de pectine HM (Formule 6 du tableau IV.1), a entraîné la reconstruction complète du latex en moins de 4 heures. La dégradation enzymatique de la pectine entraîne donc la destruction des complexes et spontanément, la remise en suspension des particules colloïdales de l'Eudragit® RL30D. Pourtant, l'action des enzymes pectinolytiques ne conduit pas à la disparition des charges négatives de la pectine HM. Bien au contraire, leur nombre augmente dans la mesure où la pectine estérase (enzyme hydrolysant les esters méthoxyles de la pectine), qui est une composante importante de Pectinex® Ultra SP-L, fait apparaître de nouvelles charges négatives dans le système. La destruction des complexes en présence de Pectinex® Ultra SP-L provient donc de la dépolymérisation de la pectine HM par les pectinases et les pectines lyases.

La réticulation ou le pontage ionique apparaît donc être la principale cause du phénomène de floculation de l'Eudragit® RL30D par la pectine HM. Les molécules de

pectine, portant les charges négatives, peuvent en effet s'adsorber sur les particules du latex d'Eudragit® RL30D chargées positivement, et former dès lors des agrégats insolubles et moins hydrophiles. Une molécule de pectine en solution peut, en effet, se lier à plusieurs particules du latex d'Eudragit® RL30D et vice versa. La formation des d'agrégats insolubles entre deux polymères de charges opposées est un phénomène courant. Par exemple, les alginates et les chitosans sont des polysaccharides hydrosolubles à pH 5.0, mais leur association donne des complexes insolubles, par réticulation ionique entre les groupements amines protonés des chitosans et les groupements carboxyliques des alginates. Les proportions relatives de chaque polymère, requises pour obtenir une complexation optimale, ont pu être déterminées grâce à des études rhéologiques (Matsumoto et coll., 1993; Takahashi et coll., 1990).

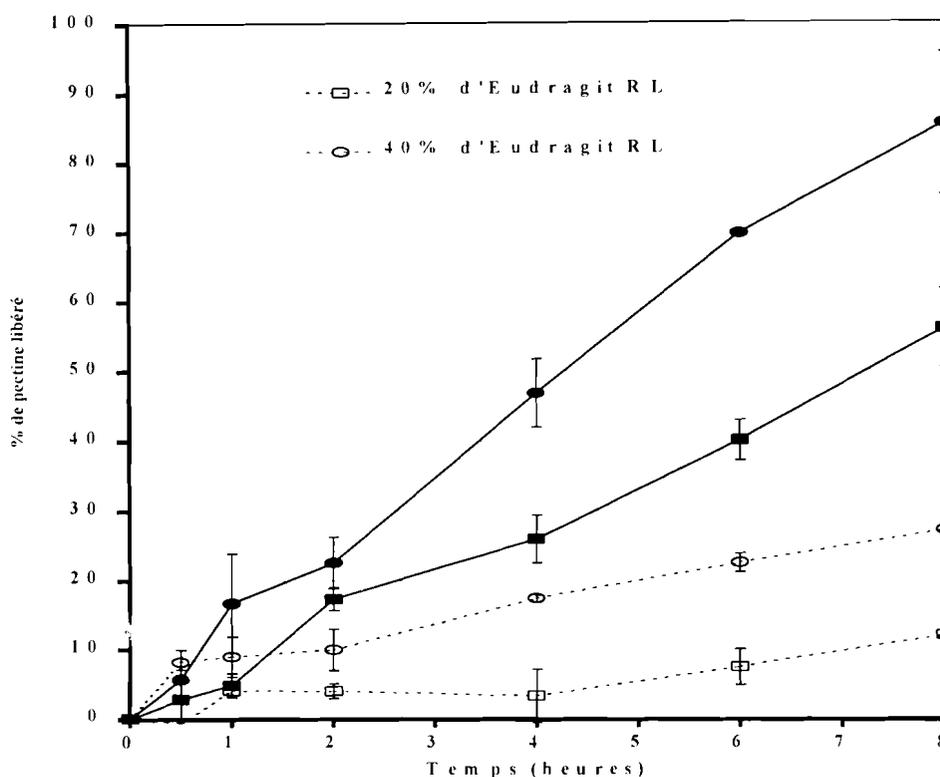
Notons pour terminer, que lorsque la teneur en pectine HM dans les agrégats dépasse 15 % m/m par rapport au poids sec de l'Eudragit® RL30D, on observe une remontée importante de la viscosité du système (figures IV.1 et IV.2). Celle-ci atteint 400 mPa.s lorsque la teneur en pectine HM est de 20 % m/m par rapport au poids sec de l'Eudragit® RL30D (figure IV.2). A ce stade, la pectine, qui est en quantité excédentaire, n'est plus totalement intégrée dans la structure des complexes. L'excès de pectine peut donc s'hydrater librement et augmenter la viscosité du système.

### **3.2. Influence des enzymes pectinolytiques sur les cinétiques de libération de la pectine à partir des films mixtes Pectine HM / Eudragit® RL / Eudragit® NE**

Des films ont été obtenus après évaporation de l'eau (à 60°C) des dispersions du complexe Pectine HM - Eudragit® RL (1.25 - 10), plastifié avec 24 % m/m de triacétine. Après avoir ainsi vérifié que la complexation n'entrave pas le caractère filmogène de l'Eudragit® RL, les films d'Eudragit® NE incorporant le complexe Pectine HM - Eudragit® RL (1.25 - 10) ont été préparés et soumis aux tests de libération de la pectine, en l'absence et en présence des enzymes pectinolytiques. Les teneurs en Eudragit® RL des films étaient de 20 et 40 % m/m par rapport à celles de l'Eudragit® NE. Il faut signaler que tous les films obtenus étaient parfaitement transparents.

La figure IV.3 représente les cinétiques de libération de la pectine dans le tampon acétate – phosphate 0.05 M de pH 4.5, à partir des films mixtes Pectine HM / Eudragit® RL / Eudragit® NE. La libération de la pectine, qui augmente lorsque la teneur en Eudragit® RL

passé de 20 % à 40 % m/m par rapport à celle de l'Eudragit® NE, est faible en l'absence des enzymes pectinolytiques. En effet, après 8 heures d'incubation, la quantité de pectine libérée est inférieure à 30 % m/m de la teneur initiale en pectine pour les films renfermant 40 % d'Eudragit® RL. Comme dans le cas de l'association de l'Eudragit® RS avec la pectine HM (Chapitre II), la formation préalable des complexes Pectine HM- Eudragit® RL limite considérablement le largage de la pectine à partir des films isolés dans les milieux d'incubation ne contenant pas les enzymes pectinolytiques.



**Figure IV.3 :** Cinétiques de libération de la pectine ( $m \pm SD$ ,  $n = 3$ ) à partir des films isolés d'Eudragit® NE incorporant le complexe Pectine HM - Eudragit® RL (1.25 - 10). Les teneurs en Eudragit® RL par rapport à celles de l'Eudragit® NE sont égales à 20 % et 40 % m/m. Les films ont été incubés à 37°C dans 25 ml de tampon acétate – phosphate 0.05 M de pH 4.5, en l'absence (courbes en pointillés) et en présence (courbes continues) des enzymes pectinolytiques.

L'addition des enzymes pectinolytiques aux milieux d'incubation entraîne une augmentation très importante de la libération de la pectine. En effet, après les 8 heures d'incubation, on enregistre la libération d'environ 55 et 85 % de la quantité initiale en pectine des films renfermant respectivement 20 % et 40 % m/m d'Eudragit® RL (figure IV.3). Tous les films étudiés sont donc perméables aux enzymes pectinolytiques. Ces résultats permettent

d'envisager l'utilisation des mélanges Pectine HM / Eudragit® RL / Eudragit® NE comme matériaux d'enrobage colonique. On s'attend, en effet, à ce que le largage de la pectine à partir des films d'enrobage après l'action des enzymes pectinolytiques entraîne le gonflement de l'Eudragit® RL incorporé et, par conséquent, l'augmentation de la perméabilité des enrobages.

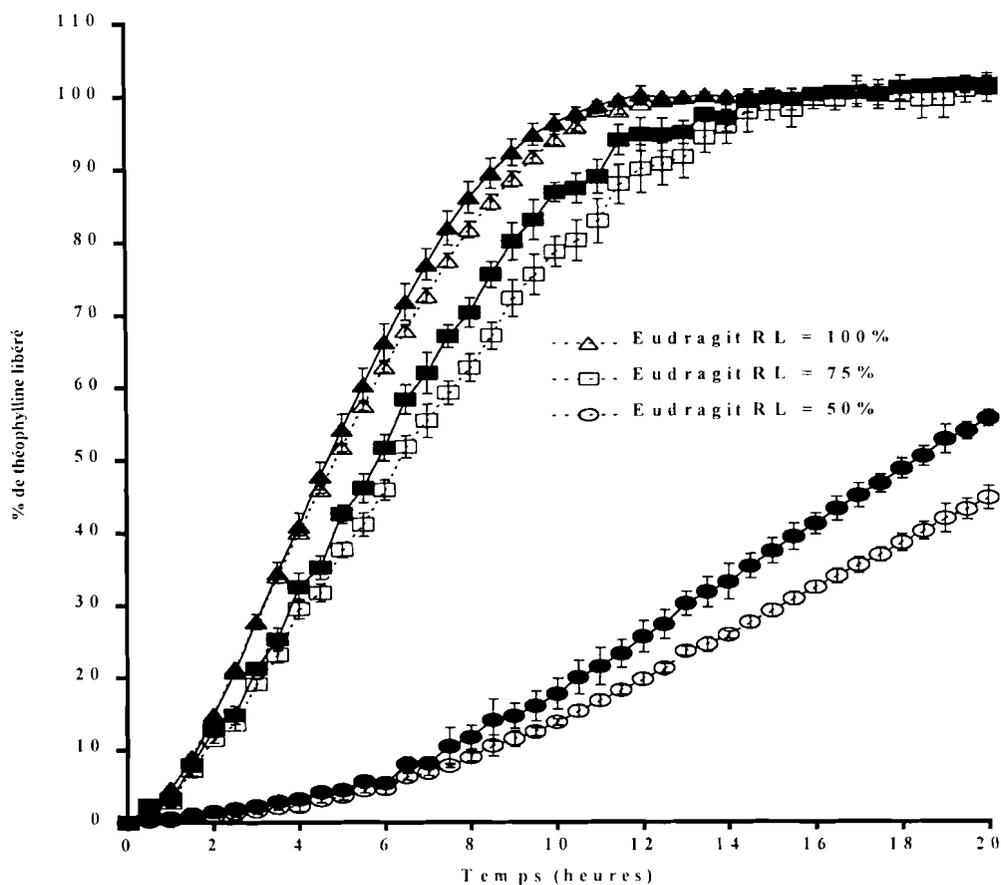
### 3.3. Etudes de dissolution des pellets enrobés

L'influence de la composition des différents mélanges Pectine HM / Eudragit® RL / Eudragit® NE sur les cinétiques de libération *in vitro* de la théophylline à partir des pellets enrobés a été étudiée en utilisant le tampon acétate – phosphate 0.05 M de pH 6.0 comme milieu de dissolution, en présence et en l'absence des enzymes pectinolytiques.

#### 3.3.1. Influence de la teneur des enrobages en Eudragit® RL et de la présence des enzymes pectinolytiques dans les milieux de dissolution sur la libération de la théophylline à partir des pellets enrobés

En prenant en compte l'ensemble des résultats présentés jusqu'ici (comportement rhéologique des complexes et libération de la pectine à partir des films isolés), nous avons enrobé les pellets de théophylline à l'aide d'environ 19 % m/m des mélanges Pectine HM / Eudragit® RL / Eudragit® NE contenant des quantités croissantes en Eudragit® RL (50, 75, 100 % m/m par rapport à la teneur en Eudragit® NE). Les teneurs en pectine HM au sein des complexes sont maintenues constantes et sont égales à 12.5 % m/m par rapport à celles de l'Eudragit® RL (tableau IV.3).

Les résultats de l'étude de la libération de la théophylline à partir de ces pellets enrobés sont présentés dans la figure IV.4. Ils montrent, qu'en l'absence des enzymes pectinolytiques, l'augmentation de la teneur en Eudragit® RL dans les enrobages entraîne une augmentation de la vitesse de libération de la théophylline. En guise d'exemple, les temps requis pour obtenir la libération de 40 % de théophylline ( $t_{40}$ ), en l'absence d'enzymes pectinolytiques, sont égaux à 18.5, 5.5 et 4.0 heures pour les pellets enrobés avec les mélanges Pectine HM / Eudragit® RL / Eudragit® NE renfermant respectivement 50, 75 et 100 % m/m d'Eudragit® RL calculés par rapport à la teneur des enrobages en Eudragit® NE.



**Figure IV.4 :** Influence de la teneur des enrobages en Eudragit® RL et de la présence des enzymes pectinolytiques dans le tampon acétate – phosphate 0.05 M de pH 6.0 sur la libération de la théophylline ( $m \pm SD$ ,  $n = 5$ ) à partir des pellets enrobés avec environ 19 % m/m des mélanges Pectine HM / Eudragit® RL / Eudragit® NE. La teneur en pectine est de 12.5 % m/m par rapport à celle de l'Eudragit® RL. Courbes en pointillés : en l'absence des enzymes pectinolytiques ; courbes continues : en présence des enzymes pectinolytiques.

On peut aussi observer sur la figure IV.4, que la présence des enzymes pectinolytiques dans les milieux de dissolution provoque une augmentation significative de la libération de la théophylline. Ces résultats étaient attendus dans la mesure où l'action des enzymes pectinolytiques, qui entraîne l'élimination de la pectine des enrobages, doit être suivie de la solvatisation et du gonflement de l'Eudragit® RL incorporé. Cependant, l'effet des enzymes pectinolytiques sur la libération de la théophylline n'est pas considérable, même lorsque la teneur des enrobages mixtes en complexe Pectine HM - Eudragit® RL est très élevée (75 et 100 % m/m d'Eudragit® RL par rapport à la teneur en Eudragit® NE).

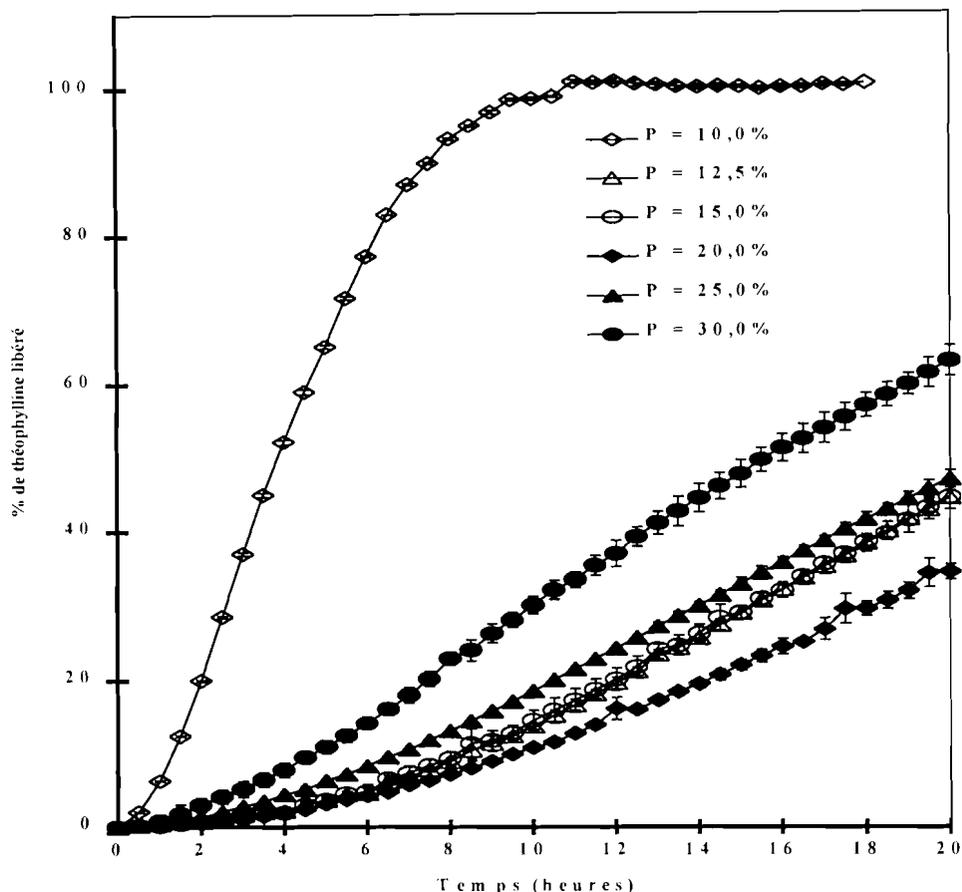
On s'attendait aussi à ce que la présence des enzymes pectinolytiques dans les milieux de dissolution entraîne une augmentation beaucoup plus importante de la cinétique de libération de la théophylline lorsque la teneur des enrobages en complexe Pectine HM - Eudragit® RL augmente. Cependant, c'est le phénomène inverse qui a été observé, à savoir que l'augmentation de la libération de la théophylline par les enzymes pectinolytiques est plus importante lorsque la teneur des enrobages en complexe est relativement faible (50 % m/m par rapport à celle de l'Eudragit® NE). En effet, lorsque la teneur des enrobages en Eudragit® RL est égale à 50 % m/m, la différence de libération de la théophylline existant entre la présence et l'absence des enzymes pectinolytiques est d'environ 10 % après la 20<sup>ème</sup> heure du test de dissolution (55 % de libération en présence des enzymes pectinolytiques contre 45 % en l'absence des enzymes).

Cette différence, comme on peut l'observer sur la figure IV.4, diminue de plus en plus en fonction de l'augmentation de la teneur des enrobages en Eudragit® RL (50, 75 et 100 % m/m). Etant donné que la libération de la théophylline en l'absence des enzymes pectinolytiques est relativement rapide lorsque les teneurs des enrobages en complexe sont de 75 et 100 % m/m, on peut supposer que les enzymes pectinolytiques n'ont pas suffisamment de temps pour améliorer de manière significative la perméabilité des enrobages. De plus, il faut aussi considérer qu'en général, une faible variation de la perméabilité des films aura une répercussion d'autant plus importante sur les cinétiques de libération d'un principe actif que la perméabilité initiale du film est faible, et donc dans le cas présent, que la teneur des enrobages en complexe est la plus basse.

### *3.3.2. Influence de la teneur des enrobages en pectine HM et de la présence des enzymes pectinolytiques dans les milieux de dissolution sur la libération de la théophylline à partir des pellets enrobés*

Des cinétiques de libération plus lentes et une augmentation plus importante de la libération de la théophylline en présence des enzymes pectinolytiques sont obtenues lorsque la teneur des enrobages en Eudragit® RL est égale à 50 % m/m par rapport celle de l'Eudragit® NE (figure IV.4). Nous avons donc choisi cette teneur en Eudragit® RL pour étudier l'influence de la teneur des enrobages en pectine sur la libération de la théophylline à partir des pellets enrobés avec les mélanges Pectine HM / Eudragit® RL / Eudragit® NE (X:5:10).

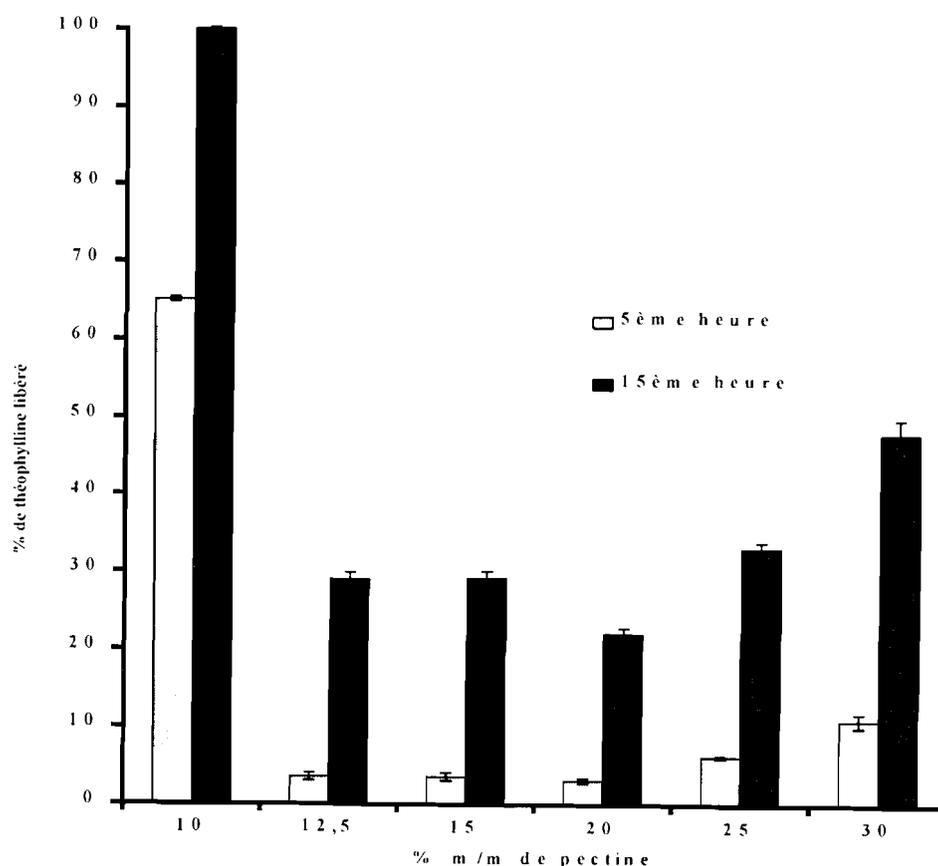
Les pourcentages d'enrobage sont d'environ 19 % m/m et les teneurs en pectine HM, exprimées en pourcentage (% m/m) par rapport à celles de l'Eudragit® RL, varient entre 10.0 % et 30.0 % (tableau IV.4).



**Figure IV.5 :** Libération de la théophylline ( $m \pm SD$ ,  $n = 5$ ) dans le tampon acétate – phosphate 0.05 M de pH 6.0, à partir des pellets enrobés avec 19 % m/m des mélanges Pectine HM / Eudragit® RL / Eudragit® NE (X:5:10) renfermant 10.0, 12.5, 15.0, 20.0, 25.0 et 30.0 % m/m de pectine HM par rapport à la teneur en Eudragit® RL.

La figure IV.5, qui représente les courbes de libération de la théophylline à partir des pellets enrobés avec les mélanges Pectine HM / Eudragit® RL / Eudragit® NE, montre qu'après une phase initiale plus ou moins longue, caractérisée par une libération plus lente, la libération de la théophylline s'effectue de manière linéaire. En effet, après la phase initiale, qui correspond probablement au temps mis par le liquide d'épreuve pour diffuser et équilibrer les échanges hydrodynamiques à travers l'enrobage, les coefficients de régression linéaire, calculés à partir des parties linéaires des courbes de libération de la théophylline de la figure IV.5, sont compris entre 0.9961 et 0.9999. D'autre part, les constantes de libération, calculées

aussi par la méthode des moindres carrés (régression linéaire) à partir des parties linéaires des courbes de libération de la théophylline (figure IV.5) sont égales à  $14.3 \pm 0.4$ ,  $3.09 \pm 0.02$ ,  $3.00 \pm 0.02$ ,  $2.56 \pm 0.07$ ,  $2.85 \pm 0.01$  et  $3.37 \pm 0.03$  mg / h pour les pellets enrobés avec les mélanges Pectine HM / Eudragit® RL / Eudragit® NE dans lesquels les teneurs en pectine HM par rapport à celles de l'Eudragit® RL sont respectivement égales à 10, 12.5, 15, 20, 25 et 30 % m/m. La vitesse de libération de la théophylline à partir des pellets enrobés est donc très fortement influencée par la teneur des enrobages en pectine HM. Elle passe par un minimum lorsque la teneur en pectine HM est égale à 20 % m/m par rapport à celle de l'Eudragit® RL.



**Figure IV.6 :** Pourcentages de théophylline libérés ( $m \pm SD$ ,  $n = 5$ ) à la 5<sup>ème</sup> et à la 15<sup>ème</sup> heure du test de dissolution (tampon acétate – phosphate 0.05 M de pH 6.0, sans enzymes pectinolytiques), à partir des pellets enrobés avec environ 19 % m/m des mélanges Pectine HM / Eudragit® RL / Eudragit® NE (X:5:10) renfermant 10.0, 12.5, 15.0, 20.0, 25.0 et 30.0 % m/m de pectine HM par rapport à la teneur en Eudragit® RL.

L'influence de la teneur des enrobages en pectine HM sur les cinétiques de la libération de la théophylline à partir des pellets enrobés est nettement plus visible dans la

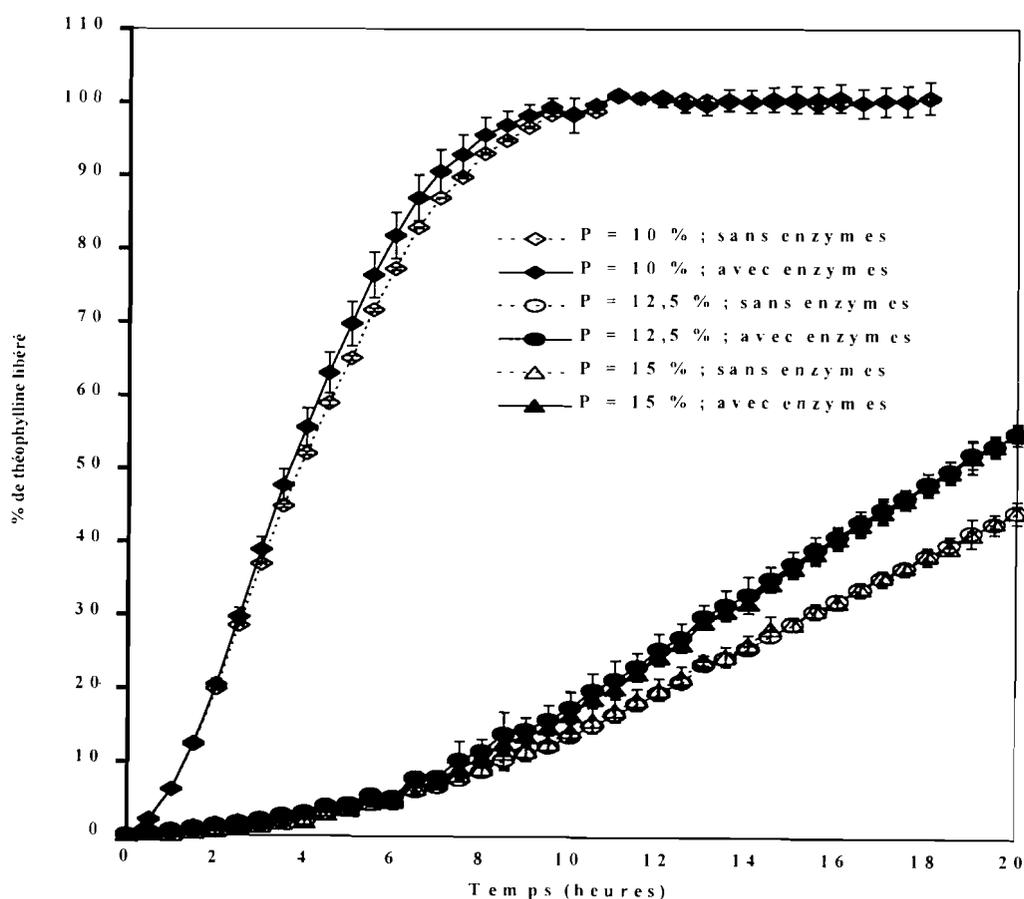
figure IV.6 qui représente les pourcentages de théophylline libérés à la 5<sup>ème</sup> et à la 15<sup>ème</sup> heure du test de dissolution, en fonction de la teneur en pectine HM. On constate aussi que les quantités de théophylline libérées à partir des pellets enrobés passent par un minimum lorsque la teneur en pectine est de 20 % m/m par rapport à celle de l'Eudragit® RL. Plus on s'éloigne de cette zone de concentration des enrobages en pectine (en deçà et au delà), plus la vitesse de libération de la théophylline augmente.

La comparaison des résultats de dissolution, qui reflètent la perméabilité des enrobages, avec les résultats des études rhéologiques effectuées sur le système Pectine HM - Eudragit® RL30D permet de constater que les teneurs en pectine nécessaires pour obtenir une perméabilité minimale des films (complexation optimale) sont plus élevées que celles suggérées par les études de viscosité. En effet, pour une teneur en pectine de 20 % m/m par rapport à celle de l'Eudragit® RL (perméabilité minimale, figure IV.6), les études rhéologiques montrent que la pectine se trouve en excès au sein du système (agglomérats floculés avec un excès de charges négatives) puisqu'une proportion non négligeable s'y trouve à l'état libre (non complexé) et provoque une augmentation importante de la viscosité du milieu (figure IV.2). Comme expliqué plus haut, cette différence provient essentiellement du fait que, dans notre cas, la complexation a lieu entre la pectine (en solution) et les particules du latex d'Eudragit® RL30D et non entre 2 polymères en solution.

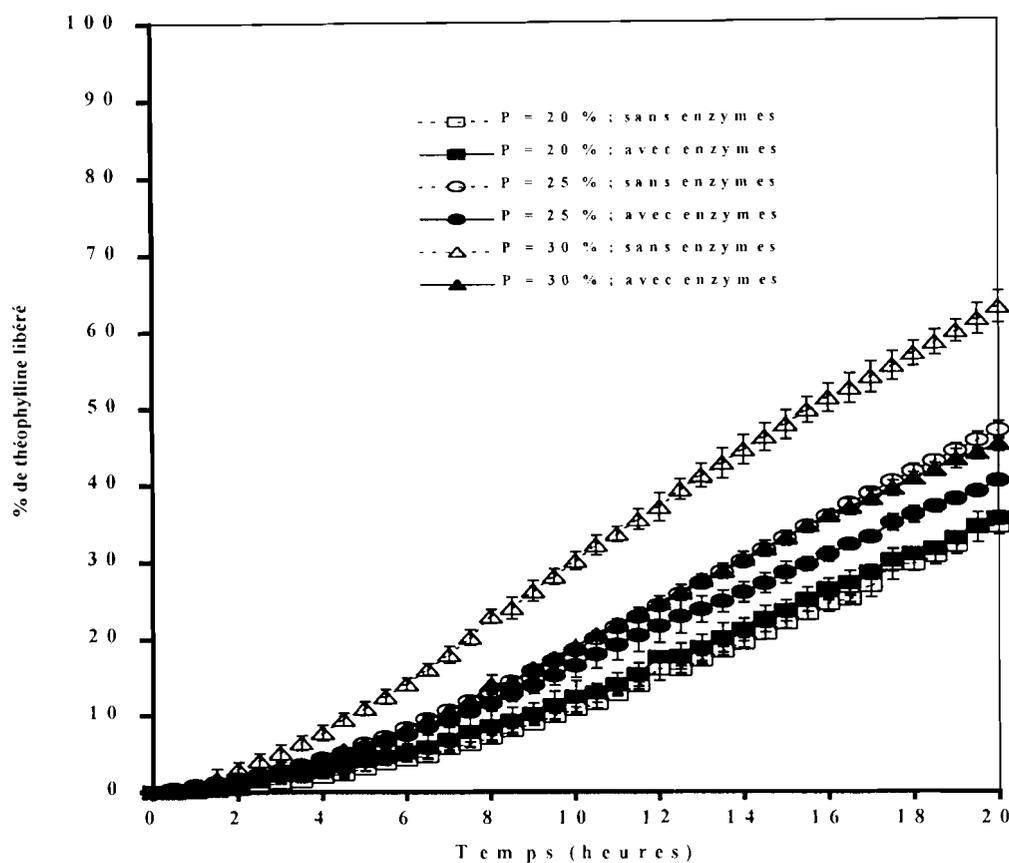
Comparée à la libération de la théophylline observée à partir des pellets enrobés avec les autres formulations, celle obtenue à partir des pellets dont les enrobages renferment 10 % m/m de pectine HM par rapport à l'Eudragit® RL est extrêmement rapide (figures IV.5 et IV.6). La faible teneur en pectine HM au sein des enrobages est probablement responsable de cette forte libération puisqu'après la formation du complexe Pectine HM - Eudragit® RL, des particules d'Eudragit® RL chargées (+) sont susceptibles de contribuer à augmenter la perméabilité de l'enrobage d'une part, et à perturber la formation des films lors du processus d'enrobage (incompatibilité partielle avec la dispersion d'Eudragit® NE30D), compromettant ainsi les qualités physiques des films déposés d'autre part. On a en effet constaté, lors de l'addition du complexe Pectine HM - Eudragit® RL (1 – 10) à la dispersion d'Eudragit® NE30D, la floculation de la dispersion d'enrobage, accompagnée d'une augmentation de la viscosité. Même si l'enrobage a pu être effectué sans difficulté après une dilution appropriée de la dispersion (tableau IV.4, formule 1), la qualité du film déposé a pu être affectée de

manière significative. C'est pour cette même raison que les complexes contenant des teneurs en pectine HM inférieures à 10 % m/m n'ont pu être utilisés pour la préparation des dispersions d'enrobage.

Les figures IV.7 et IV.8 montrent à la fois l'influence de la teneur des enrobages en pectine HM et de la présence des enzymes pectinolytiques dans les milieux de dissolution sur les cinétiques de libération de la théophylline à partir des pellets enrobés avec les mélanges Pectine HM / Eudragit® RL / Eudragit® NE. La figure IV.9 représente, en fonction de la teneur des enrobages en pectine HM, les pourcentages de théophylline libérés après la 20<sup>ème</sup> heure du test de dissolution en présence et en l'absence des enzymes pectinolytiques.

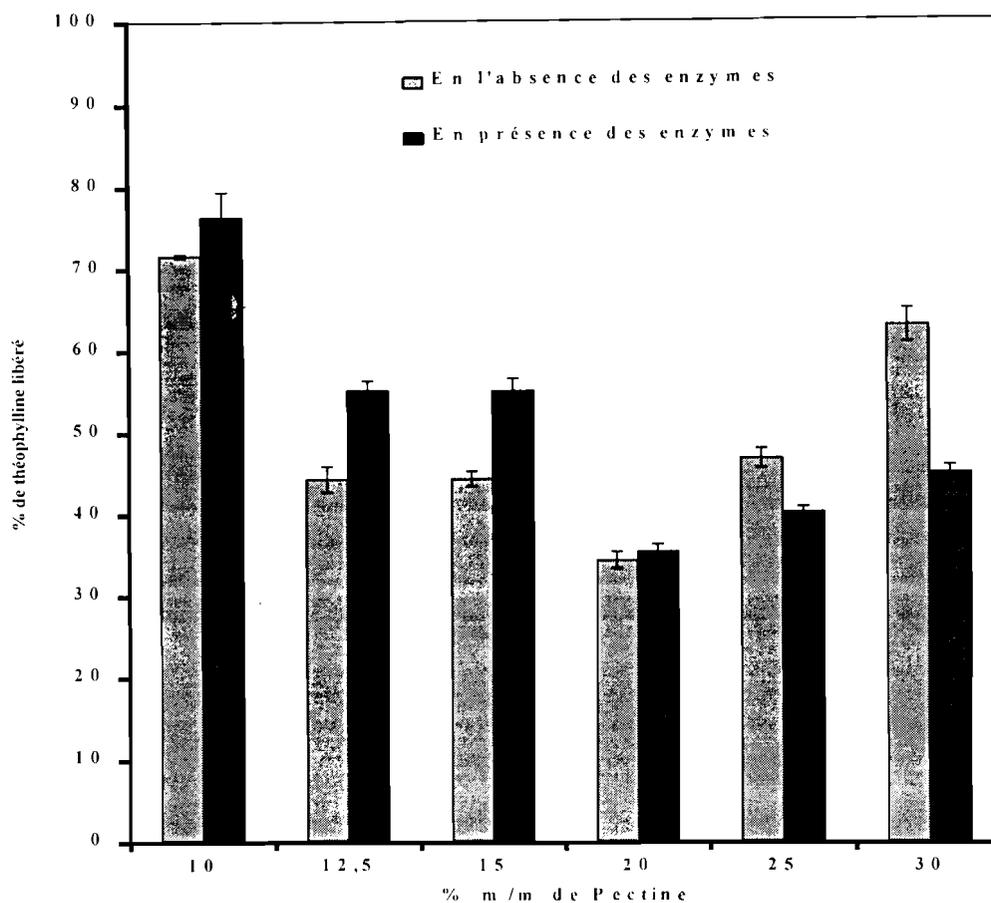


**Figure IV.7 :** Influence des enzymes pectinolytiques sur la libération de la théophylline ( $m \pm SD$ ,  $n = 5$ ) dans le tampon acétate – phosphate 0.05 M de pH 6.0, à partir des pellets enrobés avec environ 19 % des mélanges Pectine HM / Eudragit® RL / Eudragit® NE (X:5:10) renfermant 10.0, 12.5 et 15.0 % m/m de pectine HM par rapport à la teneur de l'Eudragit® RL.



**Figure IV.8 :** Influence des enzymes pectinolytiques sur la libération de la théophylline ( $m \pm SD$ ,  $n = 5$ ) dans le tampon acétate – phosphate 0.05 M de pH 6.0, à partir des pellets enrobés avec environ 19 % des mélanges Pectine HM / Eudragit<sup>®</sup> RL / Eudragit<sup>®</sup> NE (X:5:10) renfermant 20.0, 25.0 et 30.0 % m/m de pectine HM par rapport à la teneur de l'Eudragit<sup>®</sup> RL.

L'examen des figures IV.7, IV.8 et IV.9 permet de constater que selon la teneur des enrobages en pectine HM, la présence des enzymes pectinolytiques dans les milieux de dissolution provoque soit une diminution, soit une augmentation, ou soit encore, aucune modification significative de la vitesse de libération de la théophylline. La constatation de cette différence permet de supposer que l'action des enzymes pectinolytiques au niveau des enrobages s'accompagne de deux effets opposés sur la perméabilité des films : soit une augmentation de la perméabilité par la libération des molécules d'Eudragit<sup>®</sup> RL à partir des complexes (concentrations faibles à intermédiaires en pectine HM), soit une diminution de la perméabilité par la dégradation de la pectine non complexée en excès (fortes concentrations en pectine HM).



**Figure IV.9 :** Influence des enzymes pectinolytiques sur les pourcentages de théophylline libérés ( $m \pm SD$ ,  $n = 5$ ) à la 20<sup>ème</sup> heure du test de dissolution à partir des pellets enrobés avec environ 19 % m/m des mélanges Pectine HM / Eudragit<sup>®</sup> RL / Eudragit<sup>®</sup> NE (X:5:10) renfermant 12.5, 15.0, 20.0, 25.0 et 30.0 % m/m de pectine HM par rapport à la teneur en Eudragit<sup>®</sup> RL. En ce qui concerne les enrobages dont la teneur en pectine HM est de 10 % m/m par rapport à celle de l'Eudragit<sup>®</sup> RL, les valeurs représentent les pourcentages de théophylline libérés à la 5<sup>ème</sup> heure du test de dissolution.

Lorsque la teneur en pectine HM par rapport à celle de l'Eudragit<sup>®</sup> RL est supérieure à 20 % m/m au sein des complexes, la pectine est en excès par rapport à l'Eudragit<sup>®</sup> RL et favorise donc la diffusion de la théophylline. Comme on l'a montré dans le chapitre précédent, l'action des enzymes pectinolytiques dans une telle situation s'accompagne d'un ralentissement de la libération de la théophylline.

Pour des teneurs en pectine comprises entre 10 % et 15 % m/m, on peut supposer que la quantité de pectine est déficitaire par rapport à celle d'Eudragit<sup>®</sup> RL et, dès lors, que le largage de la pectine, consécutif à l'action des enzymes pectinolytiques, permet la libération des molécules cationiques de l'Eudragit<sup>®</sup> RL (qui vont retrouver leurs propriétés originales de

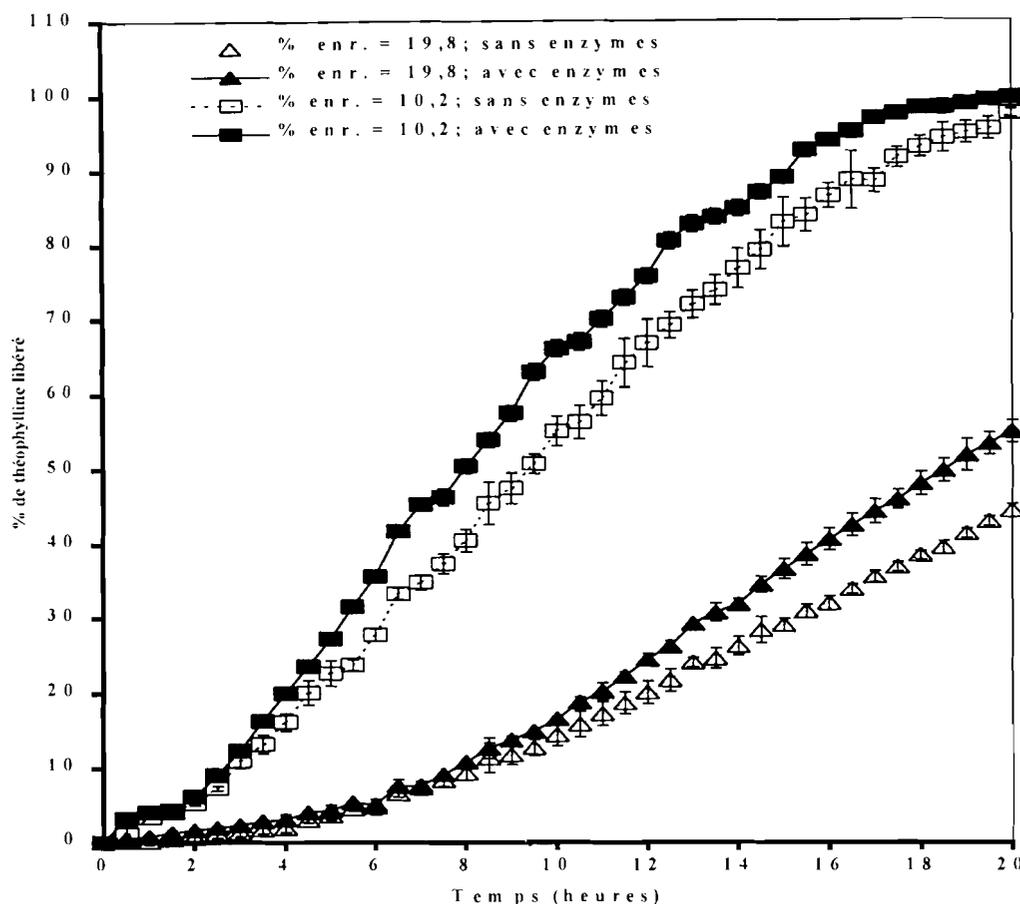
solvation et de gonflement) et provoque une augmentation de la perméabilité des enrobages. De ce fait, on observe une augmentation de la libération de la théophylline lorsque la teneur des enrobages en pectine HM est comprise entre 10 et 15 % m/m par rapport à celle de l'Eudragit® RL.

En revanche, l'effet des enzymes pectinolytiques sur la libération de la théophylline est pratiquement nul lorsque la teneur des enrobages en pectine HM est de 20 % m/m par rapport à celle de l'Eudragit® RL. De plus, à cette concentration particulière, l'influence de l'interaction Pectine (anion) - Eudragit® RL (cation) sur la perméabilité des enrobages est optimale (complexes présentant une neutralisation maximale et une hydrophilie minimale). Dans ce cas, l'absence d'effet enzymatique sur la libération de la théophylline permet de supposer que la complexation entre ces deux polymères, présentant des charges opposées, ne permet pas d'entraver leurs propriétés de solvation et de gonflement. Dès lors, pour cette teneur en pectine HM, l'action des enzymes pectinolytiques sur le complexe partiellement solvatoé va se traduire par une annulation de deux effets opposés sur la libération de la théophylline : une diminution de la perméabilité suite au largage de la pectine et une augmentation de la perméabilité suite à la destruction du complexe, et donc à l'augmentation de la densité de charges positives au sein des enrobages.

L'hypothèse de la solvation partielle de la pectine et de l'Eudragit® RL au sein des complexes peut être vérifiée en comparant les résultats de dissolution, obtenus en l'absence des enzymes pectinolytiques, avec ceux obtenus par Amighi (1995a) à partir de microbilles enrobées par l'Eudragit® NE30D. En effet, ce dernier a obtenu, à partir de microbilles enrobées dans des conditions similaires, par une quantité nettement plus faible de film (5.7 % m/m), une libération d'environ 9 % de principe actif après 12 heures de test; tandis que dans le cas présent, cette libération est de l'ordre de 15 % mais pour un pourcentage en enrobage de 19 % m/m.

La figure IV.10 montre que la libération de la théophylline à partir des pellets enrobés avec le mélange Pectine HM / Eudragit® RL / Eudragit® NE (0.75:5:10 m/m) dépend fortement du pourcentage d'enrobage appliqué. En effet, alors que la totalité de la théophylline est libérée endéans les 20 heures du test de dissolution lorsque la quantité de film déposée est égale à  $10.2 \pm 0.4$  % m/m ( $m \pm SD$ ,  $n = 3$ ), on enregistre seulement 45 % de

libération après le même laps de temps lorsque la quantité de film déposée est égale à  $19.8 \pm 0.5$  % m/m ( $m \pm SD$ ,  $n = 3$ ).



**Figure IV.10 :** Effet du pourcentage d'enrobage appliqué et des enzymes pectinolytiques sur la libération de la théophylline ( $m \pm SD$ ,  $n = 5$ ) dans le tampon acétate – phosphate 0.05 M de pH 6.0, à partir des pellets enrobés avec le mélange Pectine HM / Eudragit® RL / Eudragit® NE (0.75:5:10 m/m).

De plus, l'examen de la figure IV.10 indique que la présence des enzymes pectinolytiques dans les milieux de dissolution entraîne une augmentation de la libération de la théophylline à partir des pellets enrobés. Toutefois, l'augmentation totale observée après 20 heures de test ne dépend pas de la quantité d'enrobage déposée sur les pellets. En effet, la différence maximale existant entre les pourcentages de théophylline libérés en présence et en l'absence des enzymes pectinolytiques est d'environ 10 %, quelle que soit la quantité de film déposée. Cependant, on remarquera que cette différence d'environ 10 % est plus rapidement atteinte avec les pellets faiblement enrobés (après 6 à 8 heures de test vs 16 à 18 heures de test pour les pellets fortement enrobés). Cette observation est tout à fait classique puisque la

vitesse de diffusion du liquide de dissolution dans les pellets (IN) et celle du soluté (OUT) dépendent toutes deux de l'épaisseur de l'enrobage.

#### 4. Conclusion

Les résultats des essais de libération de la théophylline à partir des pellets enrobés avec les mélanges Pectine HM / Eudragit® RL / Eudragit® NE ont permis de montrer que la présence des enzymes pectinolytiques dans les milieux de dissolution entraîne une augmentation de la libération lorsque que la teneur des enrobages en pectine HM est comprise entre 10 et 15 % m/m par rapport à celle de l'Eudragit® RL. Par contre, pour des teneurs en pectine HM des enrobages supérieures à 20 % m/m par rapport à celle de l'Eudragit® RL, l'action des enzymes pectinolytiques provoque une diminution de la libération de la théophylline. L'étude du comportement rhéologique de l'Eudragit® RL30D en présence de quantités croissantes de pectine HM nous a permis de comprendre et d'interpréter l'effet des enzymes pectinolytiques sur les cinétiques de libération de la théophylline à partir des pellets enrobés.

Cependant, l'augmentation de la libération de la théophylline par les enzymes pectinolytiques, observée lorsque la teneur des enrobages mixtes en pectine HM est comprise entre 10 et 15.0 % m/m par rapport à celle de l'Eudragit® RL, n'est pas considérable. En effet, la libération de la théophylline obtenue en présence des enzymes pectinolytiques dépasse rarement 10 % de celle observée dans les milieux exempts d'enzymes, et cela quel que soit le pourcentage de films déposé ou la teneur des enrobages en Eudragit® RL.

Les systèmes étudiés ne permettent donc pas une libération massive du traceur à pH 6.0, en présence des enzymes pectinolytiques. Pour pallier cet inconvénient, nous avons évalué le potentiel de libération colonique de nouveaux polymères obtenus par modification chimique des pectines, en particulier des pectines réticulées avec l'épichlorohydrine.

## Chapitre V : Synthèse, caractérisation, dégradation enzymatique et évaluation du potentiel colonique des pectines réticulées par l'épichlorohydrine

<b>1. Introduction</b>	164
<b>2. Matériels et méthodes</b>	166
<b>2.1. Matériels</b>	166
<b>2.2. Méthodes</b>	166
<i>2.2.1. Synthèse des pectines réticulées</i>	166
2.2.1.1. Préparation du pectate sodique	167
2.2.1.2. Réticulation du pectate sodique par l'épichlorohydrine	167
2.2.1.3. Méthoxylation des pectates de sodium réticulés	168
<i>2.2.2. Caractérisation des pectines réticulées</i>	169
2.2.2.1. Détermination du degré de réticulation	169
2.2.2.2. Essais de solubilité des pectines réticulées	170
2.2.2.3. Détermination des teneurs en acides galacturoniques et des degrés de méthylation des pectines réticulées	170
<i>2.2.3. Etude de la dégradation enzymatique des pectines réticulées</i>	170
<i>2.2.4. Etude des comprimés matriciels préparés à partir des pectines réticulées contenant de l'indométhacine ou de la théophylline</i>	171
<b>3. Résultats et discussion</b>	171
<b>3.1. Discussion à propos de la méthode de synthèse</b>	171
<b>3.2. Caractérisation des pectines réticulées</b>	172
<i>3.2.1. Degré de réticulation des pectines réticulées</i>	172
<i>3.2.2. Solubilité des pectines réticulées dans le tampon acétate - phosphate 0.05 de pH 6.0</i>	174
<i>3.2.3. Teneurs en acides galacturoniques et degrés de méthylation des pectines réticulées</i>	175
<b>3.3. Dégradation enzymatique des pectines réticulées</b>	176
<b>3.4. Libération de l'indométhacine ou de la théophylline à partir des comprimés matriciels préparés avec les pectines réticulées</b>	177
<b>4. Conclusion</b>	186

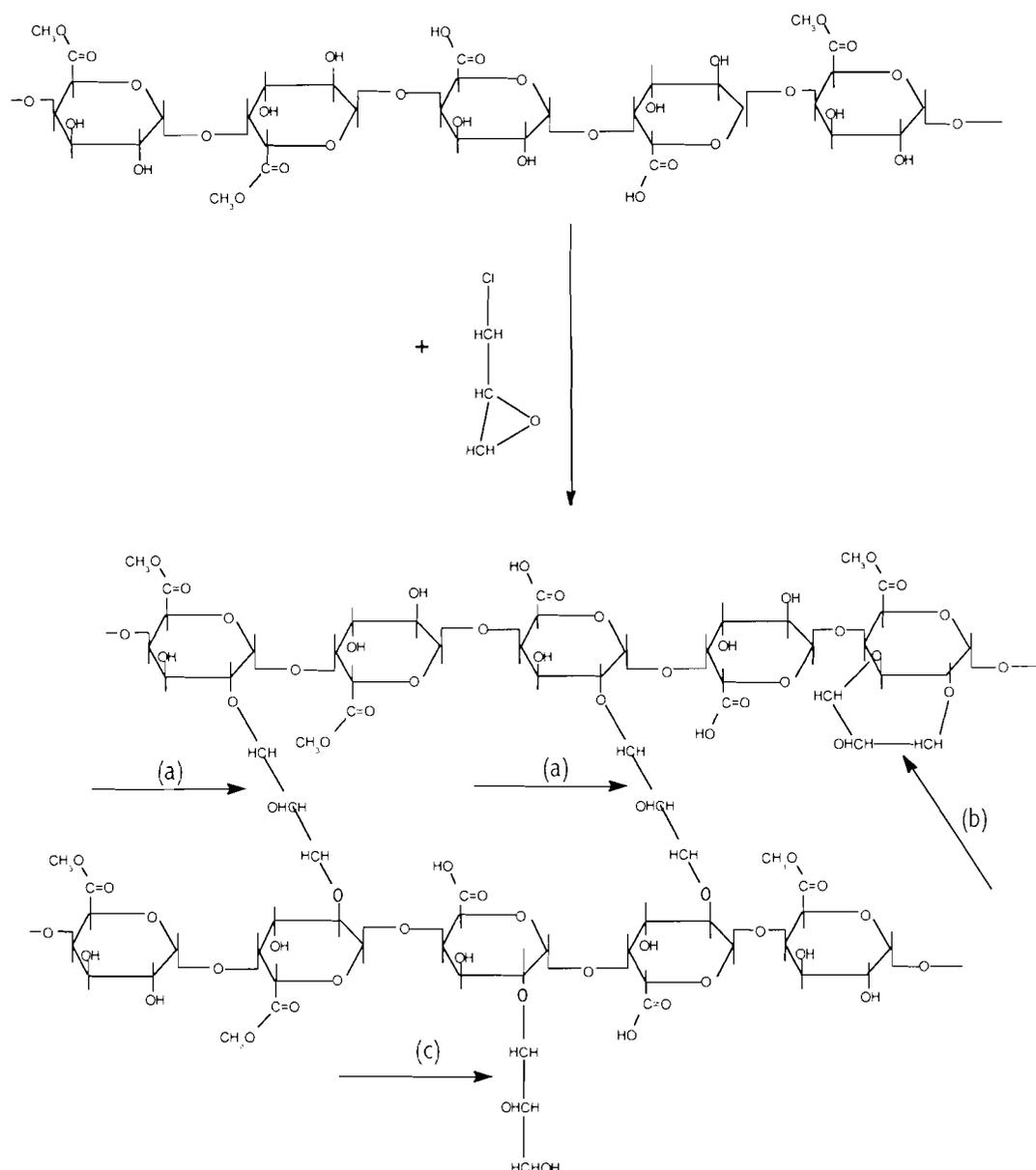
## 1. Introduction

Dans les chapitres précédents, la diminution de l'hydrosolubilité des pectines a été réalisée au moyen de méthodes physiques, consistant à incorporer les pectines dans des polymères d'enrobage insolubles tels que l'éthylcellulose et les copolymères d'esters méthacryliques (Eudragits® NE, RS et RL). Dans ce chapitre, la réduction de l'hydrosolubilité des pectines est obtenue par des moyens chimiques, notamment en les faisant réagir avec des quantités croissantes d'épichlorohydrine utilisé comme agent de réticulation. La réduction de la solubilité, grâce à la réticulation, devrait permettre d'obtenir des produits plus aptes à assurer la protection des principes actifs lors du transit de bouche à caecum.

Le problème général que l'on rencontre avec les polymères réticulés est, en plus de leur insolubilité dans les solvants organiques et aqueux, leur incapacité à former des films d'enrobage. Une alternative de formulation envisageable avec ce type de produits reste leur utilisation sous forme de systèmes matriciels. Si on envisage l'utilisation des pectines chimiquement modifiées comme matériaux d'enrobage, il serait plus indiqué de synthétiser non pas des dérivés réticulés, mais des dérivés linéaires comme par exemple les pectines acétylées. Nous avons, en effet, constaté que l'acétylation complète de la pectine donne des produits filmogènes et solubles dans le chloroforme. Malheureusement, l'incubation des films préparés à partir des pectines acétylées, en présence des enzymes pectinolytiques et pendant une période de plus de 24 heures, n'a révélé aucun signe de dégradation, probablement parce que ces dérivés sont très hydrophobes. Bien que d'autres méthodes d'acétylation des pectines sont décrites dans la littérature (Carson et Maclay, 1945; Dongowski et coll., 1997), nous avons réalisé l'acétylation complète de la pectine en agitant à 50°C, pendant une nuit, la pectine préalablement dispersée dans de l'acétonitrile contenant un excès de chlorure d'acétyle.

A l'inverse des pectines acétylées, les pectines réticulées par l'épichlorohydrine, bien qu'elles soient non filmogènes, présentent l'avantage d'être très hydrophiles puisque les dérivés réticulés se différencient seulement de la pectine par la présence des molécules de glycérol et par un poids moléculaire plus élevé. En effet, comme on peut le constater sur la figure V.1, qui schématise la structure théorique des dérivés réticulés, l'épichlorohydrine effectue un pontage entre deux chaînes polymériques de pectine, bien qu'on ne puisse pas

exclure la possibilité de la retrouver latéralement ou sous forme de ponts internes au niveau d'une même chaîne de pectine.



**Figure V.1** : Schéma théorique de la réaction de réticulation de la pectine par l'épichlorohydrine. Les flèches indiquent les différentes modifications possibles : pontage entre deux chaînes polymériques de pectine (a), ponts internes au niveau d'une même chaîne polymérique (b) et enfin, liaisons latérales (c).

L'objectif de ce chapitre est d'évaluer l'aptitude des pectines réticulées par l'épichlorohydrine à délivrer de manière spécifique les médicaments dans le côlon. Pour ce faire, des pectines réticulées avec des quantités croissantes d'épichlorohydrine ont été

synthétisées. Les dérivés réticulés ont été ensuite caractérisés grâce à la détermination de leur teneur en agent réticulant (degré de réticulation), en groupements méthoxyles (degré de méthylation) et en acides galacturoniques. Finalement, après avoir étudié leurs cinétiques de dégradation par les enzymes pectinolytiques, les pectines réticulées ont été utilisées pour préparer des comprimés matriciels contenant 10 % (m/m) de traceur (indométhacine ou théophylline). Les essais de dissolution, effectués sur ces comprimés matriciels, ont permis d'évaluer l'influence du degré de réticulation de la pectine, de l'hydrosolubilité du traceur, ainsi que l'effet de la présence des enzymes pectinolytiques dans les bains de dissolution sur les cinétiques de libération du principe actif.

## **5.2. Matériels et méthodes**

### **5.2.1. Matériels**

L'épichlorohydrine (Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, USA) a été utilisé pour effectuer la réticulation de la pectine (pectine de pomme, Fluka). L'éthanol 95 % et le méthanol pour HPLC ont été respectivement fournis par les Laboratoires Stella s.a. (Liège, Belgique) et la firme Labscan Ltd (Dublin, Ireland). L'indométhacine et la théophylline anhydre (Certa, Braine-l'alleud, Belgique) ont été utilisées comme traceurs. Le HPMC 4000 (Methocel K4M PREMIUM EP, Colorcon Ltd, Orpington, Grande Bretagne), l'éthylcellulose 22 cps (Aldrich) et l'éthylcellulose 100 cps (EC-N100 NF, Aqualon, Grande Bretagne) ont été utilisées comme excipients destinés à ralentir la libération du traceur à partir des comprimés matriciels. Toutes les autres substances utilisées dans cette étude ont déjà été décrites dans les chapitres précédents.

## **2.2. Méthode**

### *2.2.1. Synthèse des pectines réticulées*

La synthèse des pectines réticulées s'effectue en 3 étapes : la déestérification en milieu alcalin de la pectine HM pour former le pectate sodique, la réticulation du pectate par l'épichlorohydrine et finalement, la méthylation des pectates réticulés.

### 2.2.1.1. Préparation du pectate sodique

La synthèse des pectines réticulées par l'épichlorohydrine commence par la préparation du pectate sodique. Le passage par le pectate de sodium est indispensable car celui-ci est chimiquement plus stable que la pectine HM. En effet, les pectines, contrairement au pectate, subissent en milieu alcalin, une dépolymérisation intense et rapide par trans-élimination (Albersheim et coll., 1960).

Le pectate de sodium se prépare à froid (4-8°C), par hydrolyse alcaline des esters méthoxyles de la pectine HM, préalablement dispersée dans le mélange eau - éthanol 95 % (1:3), selon le mode opératoire suivant : une quantité d'environ 100 g de pectine est dispersée dans 500 ml du mélange eau - éthanol 95 % (1:3). Après la 1<sup>ère</sup>, 2<sup>ème</sup>, 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> heure, des volumes de 125 ml d'une solution à 2 M de NaOH dissout dans le mélange eau - éthanol 95 % (1:3) sont ajoutés. Après avoir agité la suspension pendant encore 3 heures, la poudre est recueillie sur un filtre G3. Elle est à nouveau remise en suspension dans 1 l d'une solution à 0.5 M de NaOH dissout dans le mélange eau - éthanol 95 % (1:3). Après une nuit d'agitation, elle est recueillie par filtration, lavée successivement avec le mélange eau - éthanol 95 % (1:3) jusqu'à neutralité et enfin avec de l'éthanol 95 % (Rombouts et coll., 1979).

La poudre de pectate de sodium ainsi obtenue est desséchée à la température ambiante pendant 2 jours, puis à 60°C jusqu'à poids constant. Finalement, elle est tamisée au travers d'un tamis de 315 µm d'ouverture de mailles avant d'être utilisée dans la réaction de réticulation. Le pourcentage (% m/m) des galacturonates sodiques ( $76.1 \pm 0.8$  %,  $m \pm SD$ ,  $n = 3$ ) présents dans la poudre de pectate de sodium a été déterminé par titration acido-basique en milieu aqueux.

### 2.2.1.2. Réticulation du pectate sodique par l'épichlorohydrine

Le pectate sodique est réticulé avec des quantités croissantes d'épichlorohydrine, selon la méthode décrite par Rombouts et coll. en 1979. En résumé, la réticulation a été effectuée de la manière suivante : une quantité d'environ 5 g de poudre de pectate sodique, exactement pesée (balance Sartorius MC1), est introduite dans une fiole conique de 50 ml. Un volume de 15 ml d'éthanol 95 %, contenant la quantité requise d'épichlorohydrine, est ensuite ajouté, à la température ambiante et sous agitation. Finalement, 5 ml d'une solution aqueuse de NaOH 5

M sont ajoutés, toujours sous agitation. Les mélanges réactionnels résultants, dont les compositions sont présentées dans le tableau V.1, sont incubés à 40°C, pendant 4 heures, dans un bain à oscillations horizontales (GFL 1087, Vel) dont la vitesse d'agitation a été réglée à 200 secousses / minute.

A la fin de la réaction, les fioles sont retirées du bain et la réaction est arrêtée par addition d'une solution d'acide acétique 0.5 M jusqu'à atteindre le point de neutralité (pH 7.0), déterminé à l'aide d'un pH-mètre. Les pectates réticulés sont ensuite recueillis par filtration à travers un filtre G3, lavés avec le mélange eau - éthanol 95 % (1:3) jusqu'à la disparition des ions sodium et finalement, avec 2 fois 15 ml d'éthanol à 95 %.

**Tableau V.1** : Exemple de la composition des milieux réactionnels utilisés pour la synthèse des différentes pectines réticulées (P-RX) par l'épichlorohydrine.

<b>Pectine réticulée (P-RX)</b>	<b>P-R37</b>	<b>P-R56</b>	<b>P-R75</b>	<b>P-R100</b>	<b>P-R150</b>	<b>P-R250</b>
Pectate sodique (g)	5.0095	5.0013	5.0059	5.0075	5.0023	5.0002
Epichlorohydrine (ECH) (g)	0.6545	0.9825	1.3062	1.7265	2.6020	4.3161
Volume d'éthanol (ml)	15	15	15	15	15	15
Volume de NaOH 5 M (ml)	5	5	5	5	5	5
<b>ECH / NaGal. (mole / mole)</b>	<b>0.37</b>	<b>0.56</b>	<b>0.74</b>	<b>0.98</b>	<b>1.47</b>	<b>2.44</b>

NB : L'épichlorohydrine (ECH) a un poids moléculaire de 92.52. Le pectate de sodium est constitué de 76.1 % (m/m) de galacturonate de sodium (NaGal.) dont la masse molaire (Mr) est égale à 199. Donc, 5 g de pectate de sodium renferment  $19.12 \cdot 10^{-3}$  moles. Le rapport molaire NaOH / NaGal. est de 1 : 0.765.

### 2.2.1.3. Méthoxylation des pectates de sodium réticulés

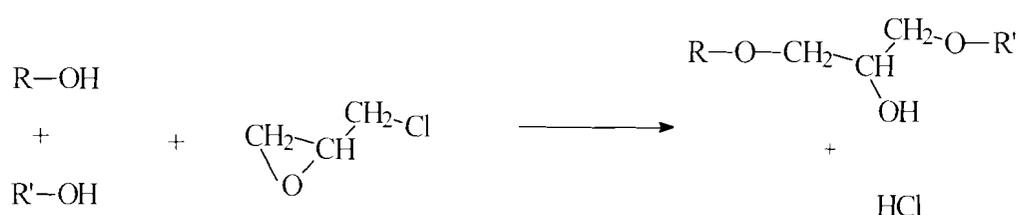
Les pectates réticulés sont ensuite estérifiés chimiquement, jusqu'à obtention d'un degré de méthylation (DM) compris entre 60 et 70 %. La méthylation a été effectuée selon la méthode décrite par Heri et coll. (1961). Cette méthode consiste à traiter à froid (4°C) et cela pendant une période de 8 jours, les 5 g de pectates réticulés avec 250 ml d'une solution méthanolique d'acide sulfurique 1 molaire (M). Les pectines réticulées ainsi obtenues sont recueillies par filtration, lavées ensuite avec du méthanol jusqu'à la disparition des sulfates. Elles sont finalement séchées à 100°C (étuve) jusqu'à poids constant.

## 2.2.2. Caractérisation des pectines réticulées

### 2.2.2.1. Détermination du degré de réticulation

La quantité d'épichlorohydrine n'ayant pas réagi se retrouve dans le filtrat après la réticulation du pectate sodique. L'épichlorohydrine présente dans le filtrat peut être transformée en glycérol. Ce dernier peut ensuite être quantifié, directement par des méthodes enzymologiques (Wieland, 1974) ou indirectement par des méthodes chimiques (Rombouts et coll., 1979). Cependant, nous avons préféré utiliser une méthode simple et aisée pour déterminer, de manière directe, la quantité d'épichlorohydrine qui a effectivement réagi avec le pectate sodique.

Dans le paragraphe 2.2.1.2, il a été mentionné que la réaction de réticulation est arrêtée par addition d'une solution d'acide acétique 0.05 M. La quantité d'acide acétique (n1) utilisée pour neutraliser le milieu réactionnel (pH 7.0) est déterminée à l'aide d'un pH mètre. Elle permet le calcul de la quantité d'épichlorohydrine qui a effectivement réagi avec le pectate de sodium. En effet, la réaction générale de réticulation des polysaccharides par l'épichlorohydrine consomme une quantité équivalente de NaOH car, comme le montre la figure V.2, la réaction libère de l'acide chlorhydrique (HCl). En réalité, la quantité d'acide acétique utilisée pour atteindre le point de neutralité correspond à celle du NaOH qui n'a pas été consommée par l'acide chlorhydrique (HCl) libéré.



**Figure V.2** : Schéma simplifié de la réaction qui a lieu en milieu alcalin entre l'épichlorohydrine et les polysaccharides contenant des groupements hydroxyles libres. Les hydroxyles du pectate de sodium sont situés sur les carbones C<sub>2</sub> et C<sub>3</sub> des unités de galacturonates sodiques.

Un blanc réactif, c'est-à-dire un mélange réactionnel ne contenant pas d'épichlorohydrine, a été réalisé dans les mêmes conditions et la quantité d'acide acétique (n2) qui a été nécessaire pour atteindre le point de neutralité a également été déterminée.

D'autre part, un test témoin, consistant en une réaction de synthèse dans laquelle le pectate de sodium a été omis, nous a permis de constater que le milieu réactionnel ne réagit pas avec l'épichlorohydrine.

La quantité totale d'épichlorohydrine incorporée dans le pectate de sodium est égale au nombre de moles d'acide acétique utilisé pour doser le NaOH présent dans le blanc réactif ( $n_2$ ), moins celui qui a été utilisé pour doser le NaOH restant après la réaction de réticulation ( $n_1$ ). La détermination de la quantité totale d'épichlorohydrine incorporée dans le pectate de sodium a permis de calculer par la suite le pourcentage molaire d'épichlorohydrine incorporé dans le pectate de sodium, de même que le degré de réticulation réel des dérivés de synthèse (conf. paragraphe 3.2.1, figure V.3).

#### 2.2.2.2. Essais de solubilité des pectines réticulées

La solubilité des pectines réticulées a été testée à froid et à chaud (100°C), sur une quantité d'environ 50 mg de produit préalablement dispersés dans 5 ml de tampon acétate - phosphate 0.05 M de pH 6.0.

#### 2.2.2.3. Détermination des teneurs en acides galacturoniques et des degrés de méthylation des pectines réticulées

Les valeurs de ces deux paramètres des pectines réticulées ont été déterminées par titration acido-basique, en milieu aqueux, des acides galacturoniques, libres et estérifiés, exactement selon la méthode de la pharmacopée américaine USP 23 (1995), décrite dans le paragraphe 2.2.1 du chapitre I.

#### 2.2.3. *Etude de la dégradation enzymatique des pectines réticulées*

L'étude de la dégradation enzymatique des pectines réticulées a été effectuée avec 25 g d'une suspension à 0.5 % (m/m) de produit, dispersé dans le tampon acétate - phosphate 0.05 M de pH 4.5, en présence de 50  $\mu$ l de pectinex Ultra SP-L. Après incubation à 37°C et sous agitation (100 secousses / minute), les pourcentages (% m/m) de sucres réducteurs libérés au cours du temps, calculés en équivalents d'acides galacturoniques, sont déterminés selon la

méthode de Nelson (1945). La description détaillée de cette étude de dégradation enzymatique peut être trouvée dans le paragraphe 2.2.1.4 du chapitre I.

#### *2.2.4. Etude des comprimés matriciels préparés à partir des pectines réticulées contenant 10 % (m/m) d'indométhacine ou de théophylline*

La préparation des comprimés matriciels de théophylline et d'indométhacine a été effectuée à l'aide d'une comprimeuse alternative (Korsch) reliée à un dispositif à quartz piézo-électrique qui permet la mesure directe de la force de compression. Un comprimé est constitué de 30 mg de principe actif (indométhacine ou théophylline), de 3 mg de stéarate de magnésium utilisé comme lubrifiant et de 267 mg de pectine réticulée. Le mélange de poudre a été effectué manuellement, à l'aide d'un mortier et d'un pilon. Une quantité équivalente à 300 mg de chaque mélange de poudres est introduite manuellement dans la matrice de la comprimeuse, puis elle est comprimée sous une force comprise entre 13500 et 14500 N. Le diamètre des poinçons plats utilisés est de 9 mm et l'épaisseur des comprimés obtenus est de  $4.53 \pm 0.08$  mm ( $m \pm SD$ ,  $n = 10$ ).

Les comprimés ont été ensuite soumis aux essais de dissolution, à pH 6.0, en présence ou non des enzymes pectinolytiques (Pectinex Ultra SP-L). Ces essais de dissolution ont été effectués exactement comme ceux décrits dans le paragraphe 2.2.6 du chapitre III, exceptés que les absorbances des solutions ont été mesurées aux longueurs d'onde de 272 nm et 320 nm, qui sont respectivement les longueurs d'onde d'absorption maximale de la théophylline et de l'indométhacine.

### **3. Résultats et discussion**

#### **3.1. Discussion à propos de la méthode de synthèse**

La synthèse des pectines réticulées se fait en trois étapes successives à partir des pectines HM. Dans toutes les étapes de la synthèse, la pectine ou ses dérivés se trouvent toujours à l'état dispersé, et non en solution. Notons qu'il existe d'autres méthodes de réticulation des pectines par l'épichlorohydrine, dans lesquelles les pectines ou le pectate se trouvent en solution aqueuse (Rexova-Benkova, 1972a; Rexova-Benkova et Tibenski, 1972b).

Dans ces dites méthodes, l'efficacité de la réaction de réticulation est compromise parce que non seulement l'épichlorohydrine est une substance peu soluble dans l'eau mais aussi parce que, au contact de l'eau, le pectate forment des grumeaux, ce qui rend la réaction et la purification des produits de synthèse plus difficiles (Rombouts et coll., 1979).

Dans la méthode de synthèse de Rombouts et coll. (1979), utilisée ici, tout se passe en milieu dispersé. La taille particulaire des produits de synthèse reste théoriquement la même que celle de la pectine de départ. En effet, la synthèse ayant lieu en milieu dispersé, la réaction de réticulation nécessite la pénétration de l'épichlorohydrine, qui est soluble dans l'éthanol, à l'intérieur des pores présents dans les particules du pectate. La réaction a donc lieu à l'intérieur même des particules et non pas entre deux particules du pectate. Par conséquent, la taille particulaire des produits réticulés reste la même que celle du produit de départ. Notons pour terminer que le mélange réactionnel contient une quantité appropriée d'eau pour assurer une solvation suffisante des particules du pectate, ce qui permet d'assurer un contact intime entre l'épichlorohydrine et le pectate de sodium lors de la réaction de réticulation.

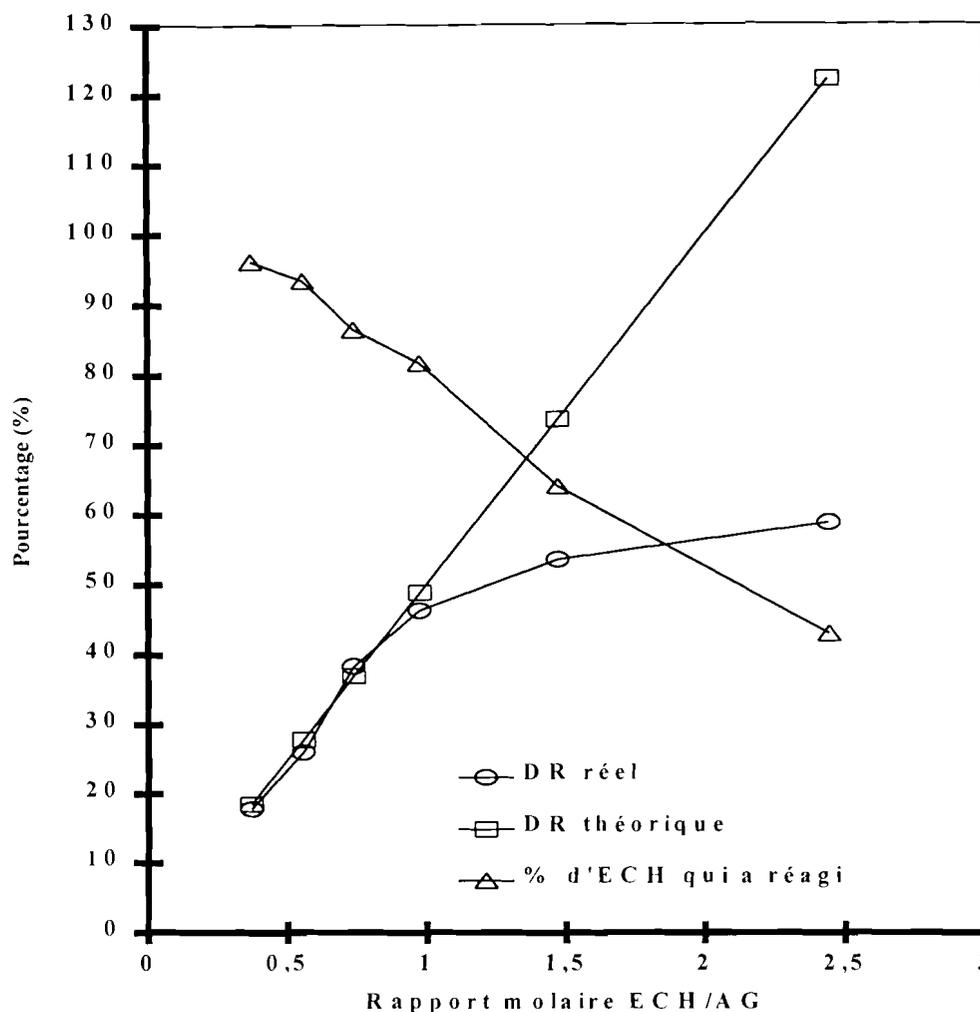
### **3.2. Caractérisation des pectines réticulées**

#### *3.2.1. Degré de réticulation des pectines réticulées*

Un certain nombre d'études ont déjà été réalisées en vue d'utiliser les pectates ou les pectines réticulées comme supports chromatographiques destinés à séparer les enzymes pectinolytiques (Rexova-Benkova, 1972a; Rexova-Benkova et Tibenski, 1972b; Rombouts et coll., 1979). Rombouts et coll. (1979) ont montré que la quantité d'épichlorohydrine incorporée dans le pectate de sodium sous forme de ponts internes et de chaînes latérales (voir figure V.1 (b et c)) est inférieure à 16 % de la quantité totale d'agent réticulant impliquée dans la réaction de réticulation. En d'autres termes, la réaction entre l'épichlorohydrine et le pectate donne essentiellement des produits réticulés (figure V.1 (a)).

En prenant cette observation en compte, nous avons utilisé la quantité d'épichlorohydrine incorporée dans le pectate de sodium, déterminée comme décrite dans le paragraphe 2.2.2.1, pour calculer le pourcentage ou le degré de réticulation (DR). Le degré de réticulation est défini comme étant le pourcentage des hydroxyles (OH) libres, situés en

position C<sub>2</sub> et C<sub>3</sub> de l'acide galacturonique, qui a effectivement réagi avec l'épichlorohydrine. Puisque chaque acide galacturonique possède deux OH libres, le degré de réticulation (DR) est donc égal à la moitié du rapport (nombre de moles d'épichlorohydrine qui a été incorporé / (nombre de moles d'acides galacturoniques présents dans le milieu réactionnel)).



**Figure V.3 :** Pourcentages d'épichlorohydrine incorporés dans le pectate de sodium (% d'ECH qui a réagi) et degrés de réticulation (DR), théorique et réel, des différentes pectines réticulées. Ils sont représentés en fonction du rapport molaire Epichlorohydrine / Acide galacturonique (ECH / AG) initialement présent dans le milieu réactionnel.

La figure V.3 représente, en fonction du rapport molaire Epichlorohydrine / Acide galacturonique (ECH / AG) initialement présent dans le milieu réactionnel, les pourcentages d'épichlorohydrine incorporés dans le pectate (rendement de la réaction), les degrés de réticulation théorique et réel. Les valeurs de ces deux derniers paramètres des pectines réticulées sont également mentionnées dans le tableau V.2, qui donne le résumé récapitulatif

des caractéristiques des différents dérivés réticulés synthétisés. Comme on s'y attendait, le degré de réticulation réel augmente progressivement avec le rapport molaire Epichlorohydrine / Acide galacturonique (ECH / AG). Il atteint un plateau lorsque la quantité d'épichlorohydrine présente dans le milieu réactionnel dépasse celle de l'acide galacturonique. Le degré de réticulation maximal obtenu est de 59 % (figure V.3, tableau V.2).

### 3.2.2. Solubilité des pectines réticulées dans le tampon acétate - phosphate 0.05 M de pH 6.0

Les essais effectués ont montré que la solubilité des dérivés réticulés dépend du degré de réticulation (tableau V.2). Les dérivés (P-R0 et P-R37), dont les degrés de réticulation réels sont de 0 et 17.8 %, sont solubles dans le tampon acétate - phosphate 0.05 M de pH 6.0. et cela même à froid. Par contre, les autres produits (P-R56, P-R75, P-R100, P-R150 et P-R250) sont insolubles dans le même tampon.

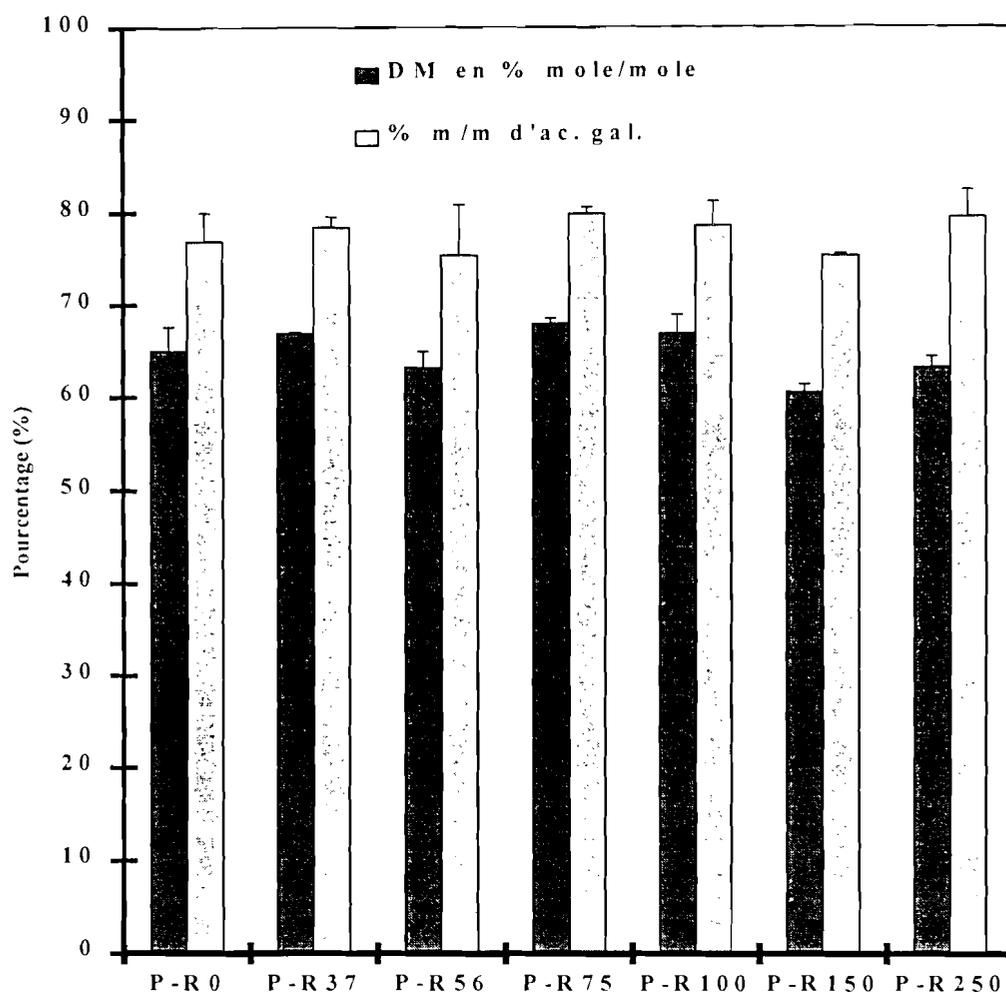
**Tableau V.2** : Récapitulatif des résultats relatifs à la caractérisation des pectines réticulées.

Pectine réticulée (P-RX)	P-R0	P-R37	P-R56	P-R75	P-R100	P-R150	P-R250
Rapport initial ECH / AG (mole / mole)	0.00	0.37	0.56	0.74	0.98	1.47	2.44
% molaire de ECH incorporé dans les pectines	-	96.2	93.5	86.5	81.7	64.0	42.9
DR théorique (% molaire)	0.00	18.5	27.8	36.9	48.8	73.60	122.1
DR réel (% molaire)	0.00	17.8	26.0	38.3	46.2	53.5	58.7
% m/m d'AG (m ± SD, n = 3)	77 ± 3	78 ± 1	75 ± 5	79.9 ± 0.7	79 ± 3	75.4 ± 0.2	80 ± 3
DM (m ± SD, n = 3)	65 ± 2.6	66.9 ± 0.5	63 ± 2	68.0 ± 0.6	67 ± 2	60.5 ± 0.9	63 ± 1
Solubilité à froid	S	S	IS	IS	IS	IS	IS
Solubilité à chaud (100°C)	S	S	IS	IS	IS	IS	IS

**N.B:** ECH = Epichlorohydrine. AG = Acides galacturoniques. DR = Degré de réticulation. DM = Degré de méthylation. La solubilité des pectines réticulées a été testée dans le tampon acétate – phosphate 0.05 M de pH 6.0 (50 mg / 5 ml) : S = Soluble ; IS = Insoluble.

### 3.2.3. Teneurs en acides galacturoniques et degrés de méthylation des pectines réticulées

La figure V.4 représente les teneurs en acides galacturoniques et les degrés de méthylation (DM) des différentes pectines réticulées. Rappelons que le pourcentage d'acides galacturoniques exprime le pourcentage (m/m) d'acides galacturoniques présents dans le produit desséché et le degré de méthylation (DM) exprime le pourcentage molaire d'acides galacturoniques estérifiés par le méthanol.



**Figure V.4 :** Pourcentage (% m/m) d'acides galacturoniques (Gal.) et degré de méthylation (DM) des différentes pectines réticulées. Ils ont été déterminés par titration acido-basique en milieu aqueux. Le nombre de détermination est égal à 3 et les barres d'erreurs représentent l'écart type.

L'examen de la figure V.4 permet de constater que les valeurs des degrés de méthylation (DM) des différentes pectines réticulées ne sont pas statistiquement différentes

(ANOVA,  $p < 0.05$ ), indiquant que l'encombrement stérique, apparaissant après la réticulation du pectate, ne perturbe pas la réaction de méthylation.

Les résultats présentés sur la figure V.4 montrent également que les pourcentages d'acides galacturoniques des différents dérivés réticulés sont pratiquement les mêmes. En principe, les valeurs de ce paramètre devraient diminuer avec le degré de réticulation, étant donné le fait que l'incorporation de l'épichlorohydrine provoque l'augmentation du poids moléculaire de la pectine par la présence des molécules de glycérol dans la structure (voir figure V.1). Si les résultats indiquent l'absence d'une baisse de la teneur en acides galacturoniques lorsque le degré de réticulation augmente, c'est peut être parce que la méthode utilisée pour quantifier ce paramètre (titration acido-basique en milieu aqueux) n'est pas suffisamment sensible et ne permet pas la mise en évidence des variations attendues.

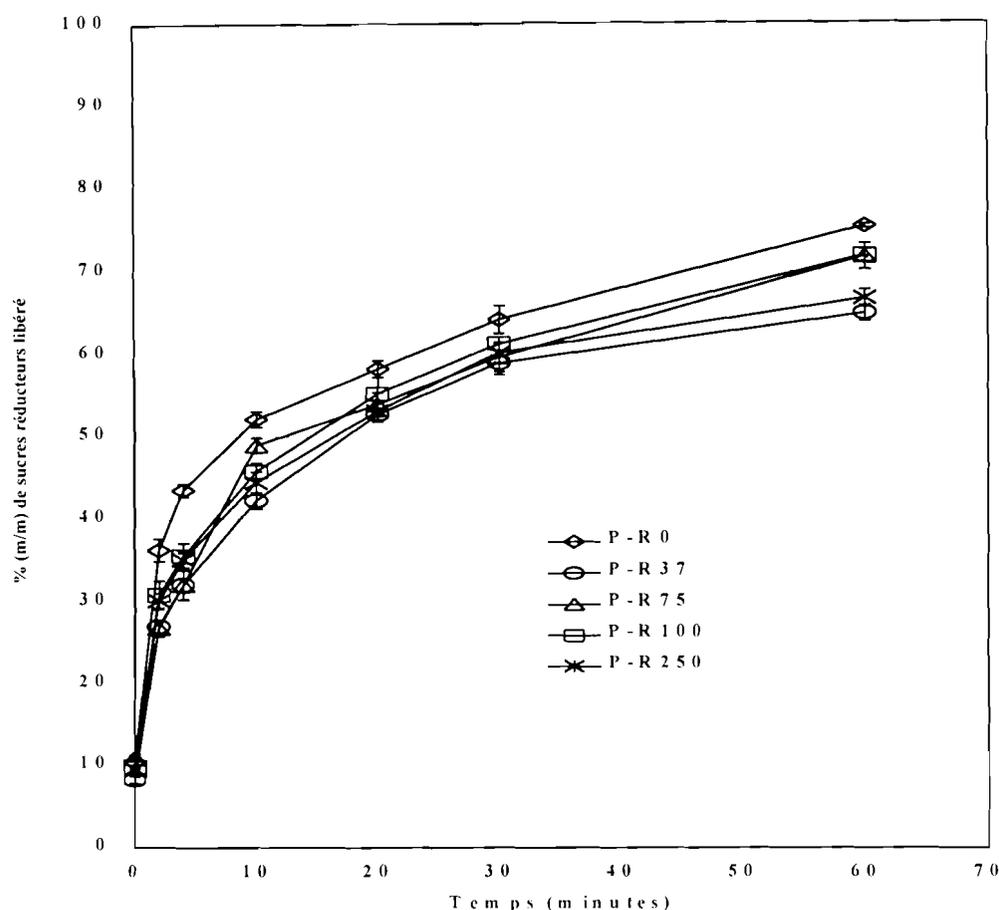
### 3.3. Dégradation enzymatique des pectines réticulées

Les cinétiques de dégradation des pectines réticulées, incubées à 37°C dans le tampon acétate - phosphate 0.05 M de pH 4.5, en présence des enzymes pectinolytiques de Pectinex<sup>®</sup> Ultra SP-L, sont présentées dans la figure V.5.

L'examen de la figure V.5 permet de constater que toutes les pectines réticulées sont dégradées par les enzymes pectinolytiques quel que soit le degré de réticulation. Il est intéressant de souligner le fait que la dégradation, qui libère après une heure d'incubation environ 70 % (m/m) des groupements réducteurs, s'effectue selon une cinétique pratiquement identique pour tous les dérivés. En d'autres termes, la cinétique de dégradation des pectines réticulées est indépendante du degré de réticulation.

Cette observation inattendue mais heureuse peut s'expliquer par le fait que, comme on l'a montré sur la figure V.1, les dérivés réticulés se différencient seulement de la pectine par un poids moléculaire plus élevé et par la présence du glycérol. La réticulation, qui introduit des molécules de glycérol dans la structure des pectines, rend les dérivés de synthèse plus hydrophiles et, de ce fait, plus facilement solvatés par le milieu d'incubation. Dès lors, les enzymes pectinolytiques peuvent accéder, aussi facilement qu'avec la pectine non réticulée.

aux liens osidiques et provoquer leur rupture. Par conséquent, la cinétique de dégradation est extrêmement rapide quel que soit le degré de réticulation.



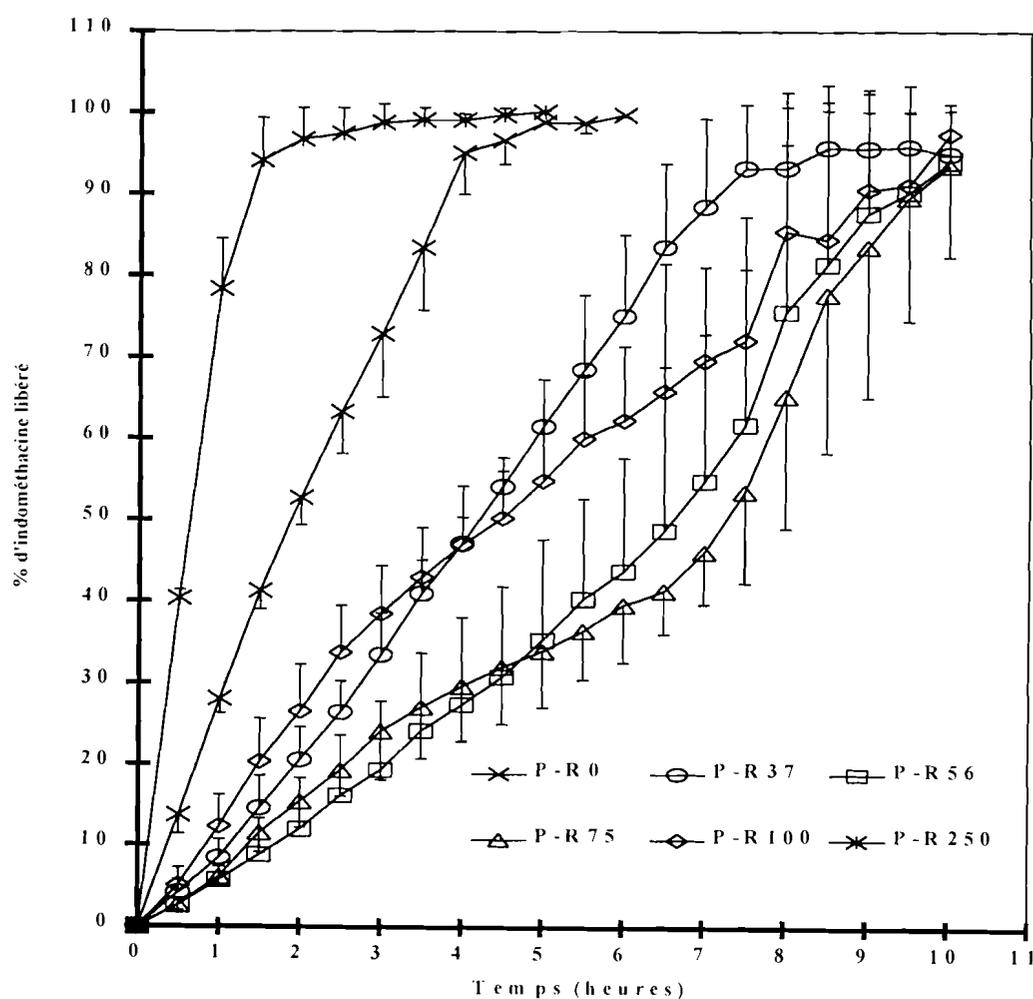
**Figure V.5 :** Augmentation du pourcentage (m/m) des sucres réducteurs ( $m \pm SD$ ,  $n = 3$ ), exprimés en équivalents d'acides galacturoniques, lors de l'incubation à 37°C et en présence de 50  $\mu$ l de Pectinex® Ultra SP-L, de 25 g des dispersions à 0.5 % (m/m) des différentes pectines réticulées (P-RX). Le milieu d'incubation est le tampon acétate – phosphate 0.05 M de pH 4.5.

### 3.4. Libération de l'indométhacine ou de la théophylline à partir des comprimés matriciels préparés avec les pectines réticulées

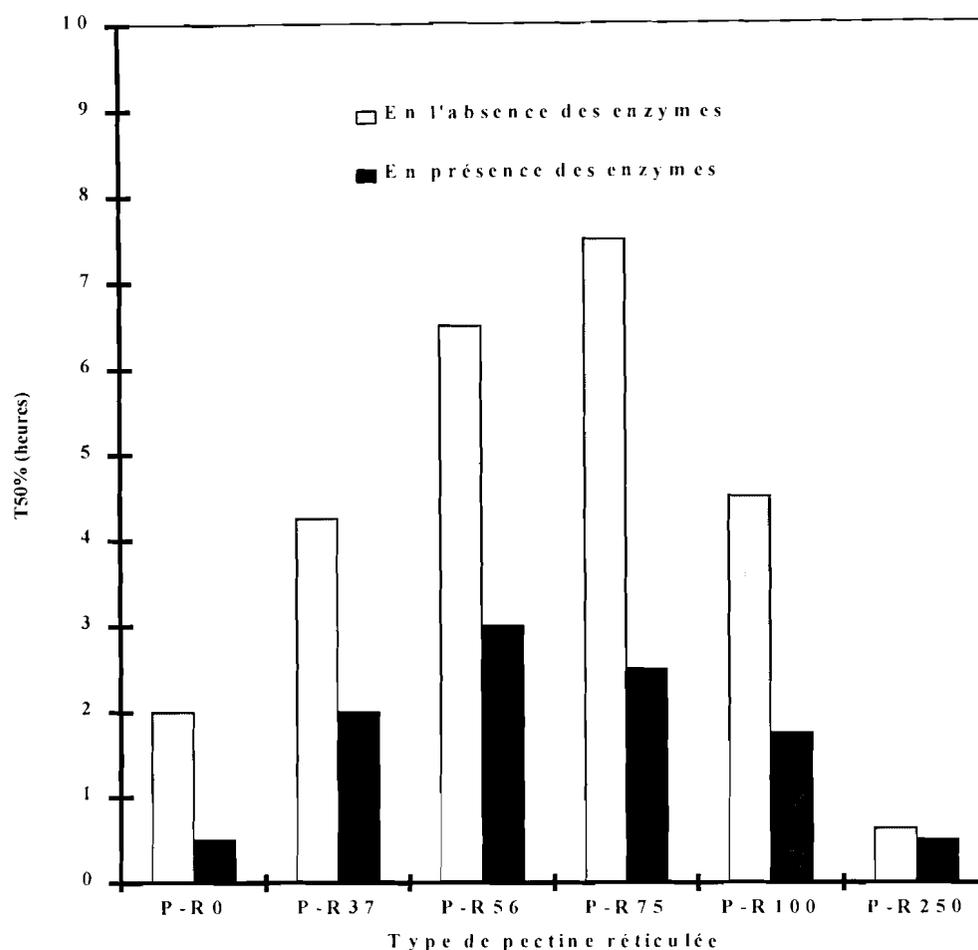
Comme on l'a rappelé dans la partie introductive de ce chapitre, une des alternatives de formulation avec les dérivés réticulés de la pectine est leur utilisation sous forme de systèmes matriciels. Dès lors, des comprimés matriciels composés de pectines réticulées et d'un traceur (10 % m/m d'indométhacine ou de théophylline) ont été préparés. Les essais de dissolution ont été effectués sur ces comprimés dans le but d'étudier l'influence du degré de

réticulation, de la solubilité du traceur et de l'effet de la présence des enzymes pectinolytiques dans les bains de dissolution sur les cinétiques de libération des principes actifs.

Les courbes de libération de l'indométhacine à partir des comprimés matriciels obtenus avec les différentes pectines réticulées, sont représentées dans la figure V.6. Le milieu de dissolution, qui est le tampon acétate - phosphate 0.05 M de pH 6.0, ne contient pas d'enzymes pectinolytiques (Pectinex Ultra SP-L). Il apparaît nettement que les cinétiques de libération de l'indométhacine sont fortement influencées par le degré de réticulation de la pectine. La prolongation de la libération de l'indométhacine à partir des matrices atteint son maximum pour le degré de réticulation réel de 38 %, c'est-à-dire avec le dérivé P-R75.



**Figure V.6 :** Influence du degré de réticulation sur la libération de l'indométhacine ( $m + SD$  ou  $m - SD$ ,  $n = 4$ ) dans le tampon acétate - phosphate 0.05 M de pH 6.0, à partir des comprimés matriciels obtenus avec les pectines réticulées (P-RX) par l'épichlorohydrine.



**Figure V.7 :** Influence du degré de réticulation et des enzymes pectinolytiques sur le temps de libération de 50 % d'indométhacine ( $T_{50\%}$ ) à partir des comprimés matriciels obtenus avec les pectines réticulées (PR-X) par l'épichlorohydrine. Le milieu de dissolution est le tampon acétate – phosphate 0.05 M de pH 6.0.

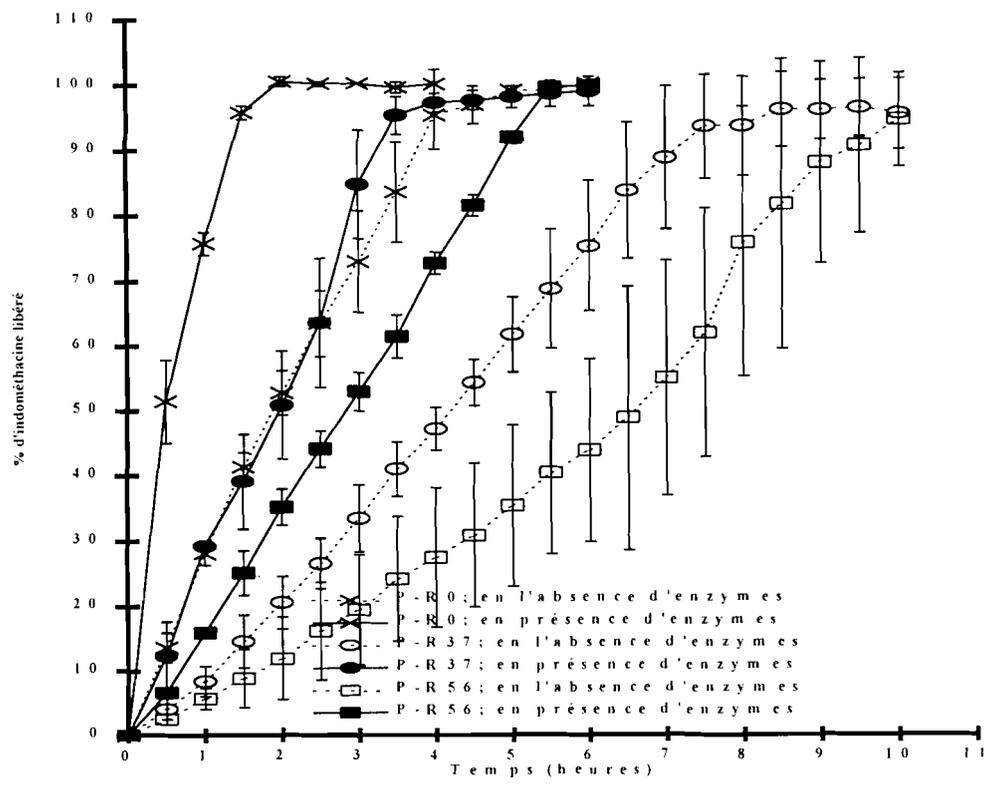
La supériorité des matrices préparées à partir la pectine réticulée P-R75 apparaît plus nettement à l'examen de la figure V.7. Celle-ci montre, en effet, que le temps requis pour libérer 50 % de la quantité d'indométhacine présente dans la matrice ( $T_{50\%}$ ) est le plus long pour les matrices préparées à partir du dérivé P-R75. Cette performance pourrait être expliquée par le fait que, parmi toutes les pectines réticulées qui ont été synthétisées, le dérivé P-R75 posséderait les meilleures propriétés gélifiantes. En effet, la gélification d'un polymère réticulé augmente généralement avec l'augmentation du degré de réticulation. Cette augmentation du pouvoir gélifiant entraîne un ralentissement de la libération du traceur car le gel formé limite non seulement la pénétration du liquide d'épreuve dans les comprimés mais aussi, ralentit la diffusion du principe actif vers le milieu de dissolution. On peut ainsi

expliquer le fait que la vitesse de libération de l'indométhacine diminue (donc  $T_{50\%}$  augmente) lorsqu'on passe de la pectine réticulée P-R0 au dérivé P-R75.

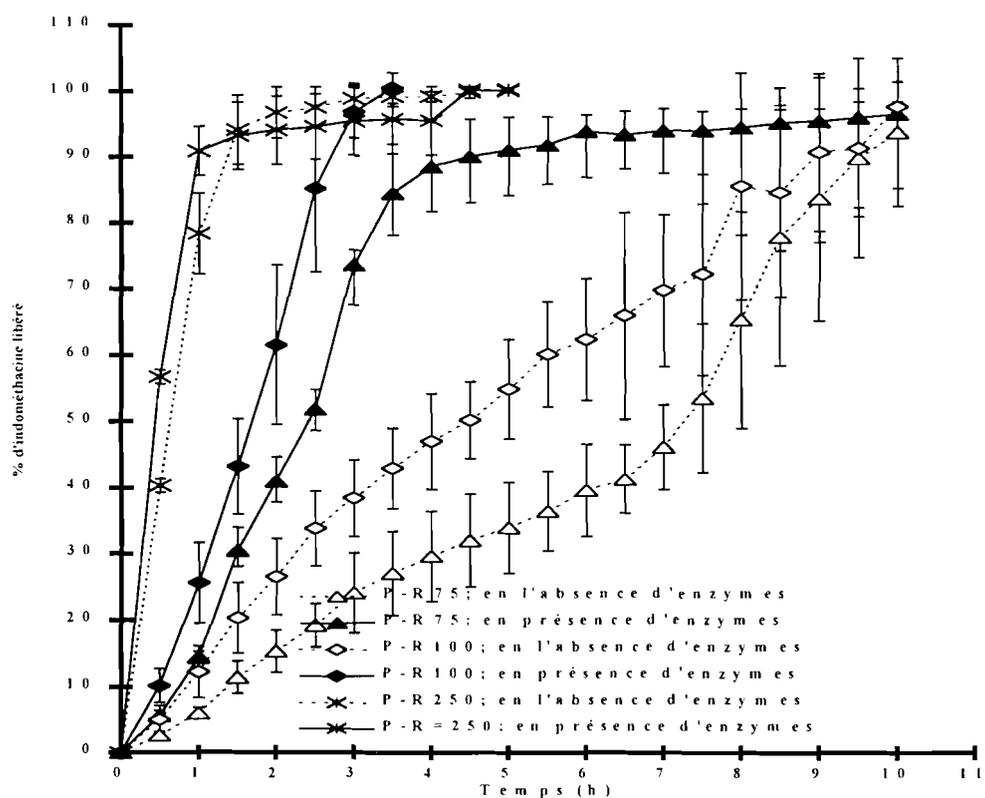
Cependant, au delà d'un degré de réticulation réel supérieur à 38 % (dérivé P-R75), la capacité de gélification du polymère décroît probablement en fonction de l'augmentation du degré de réticulation. En effet, la libération du traceur devient de plus en plus rapide car le polymère, qui perd de plus en plus son pouvoir gélifiant, perd en même temps ses propriétés liantes. Dès lors, l'érosion de la matrice devient le moteur principal de la libération du traceur incorporé. On peut ainsi expliquer pourquoi la libération de l'indométhacine devient de plus en plus rapide lorsqu'on passe du dérivé P-R75 au dérivé P-R250. De la même manière, on comprend aussi que la libération la plus rapide soit obtenue avec la pectine réticulée P-R250 qui possède le degré de réticulation réel le plus élevé (DR = 59 %).

Nos observations confirment les résultats obtenus lors des études réalisées avec les comprimés matriciels préparés à partir de l'amidon réticulé par l'épichlorohydrine (Lenaerts et coll., 1991). Ces études ont notamment montré que la libération de la théophylline à partir de ces comprimés matriciels variait également en fonction du degré de réticulation de l'amidon. Les amidons réticulés avec 7.5 % (m/m) d'épichlorohydrine étaient responsables du ralentissement maximal de la libération du traceur. En deçà et au delà de ce degré de réticulation, la libération du traceur, qui s'effectue suivant une cinétique pratiquement linéaire, devient de plus en plus rapide. Les mesures du degré de gonflement dans l'eau, effectuées sur des comprimés préparés à partir des amidons réticulés, ont permis de montrer que les meilleures performances de l'amidon réticulé par 7.5 % (m/m) d'épichlorohydrine étaient dues au fait que ce dérivé possède le meilleur degré de gonflement.

Par la suite, il a été aussi démontré que la force de compression, le pH et la pression osmotique du milieu ont une incidence minimale sur le degré de gonflement des comprimés préparés à partir des amidons réticulés avec 6 % (m/m) d'épichlorohydrine (Moussa et coll., 1998a). D'autre part, l'analyse des images photographiques de ces comprimés immergés dans l'eau a permis de démontrer qu'une couche de gel assez épaisse se forme très rapidement autour des comprimés immergés (Moussa et coll., 1998b; Lenaerts et coll., 1998). Par conséquent, la pénétration du liquide d'épreuve dans les comprimés, de même que la diffusion des traceurs vers l'extérieur sont fortement ralenties.



(a)



(b)

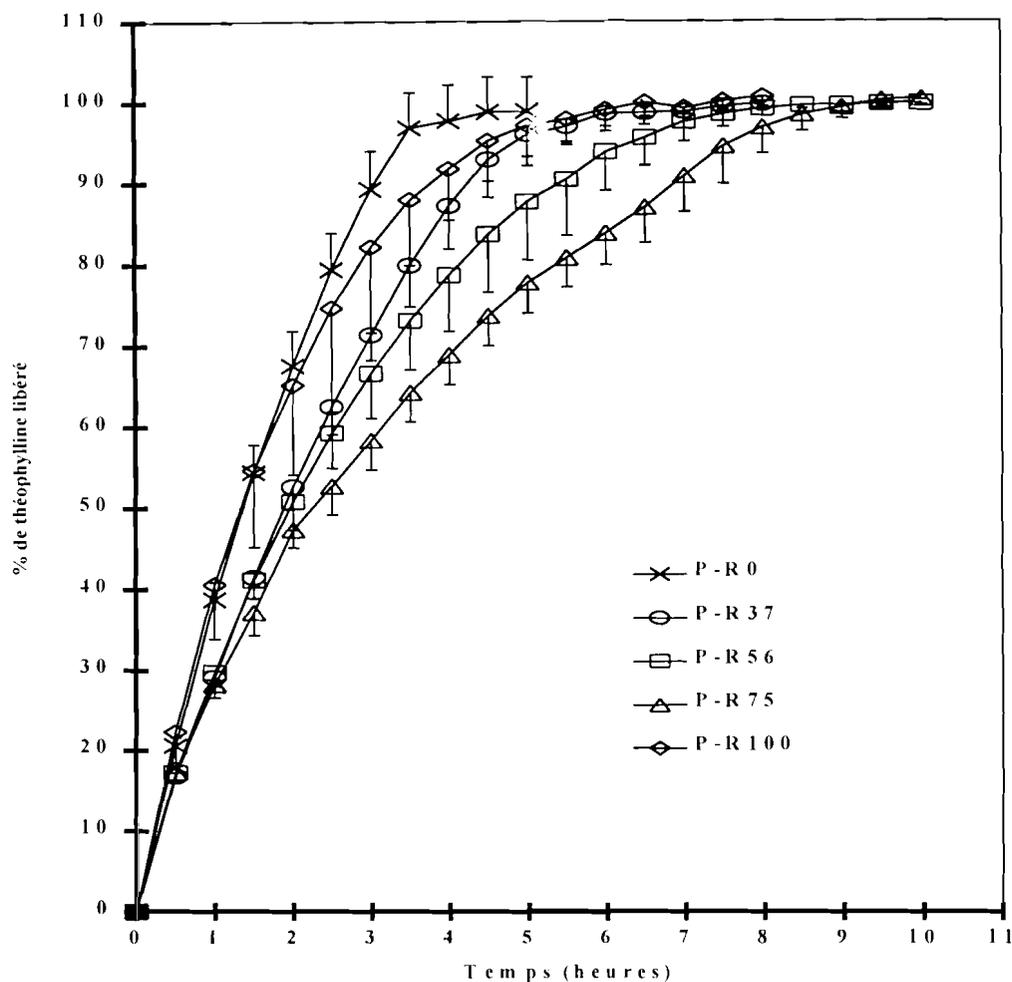
**Figures V.8 :** Influence des enzymes pectinolytiques sur la libération de l'indométhacine ( $m \pm SD$ ,  $n = 4$ ) à partir des comprimés matriciels obtenus avec les pectines réticulées (P-RX) par l'épichlorohydrine. Le milieu de dissolution est constitué de 900 ml de tampon acétate – phosphate 0.05 M de pH 6.0, contenant ou non 3 ml de Pectinex Ultra SP-L.

L'examen des résultats représentés par les figures V.6 et V.8 montre qu'en l'absence des enzymes pectinolytiques, les profils de libération de l'indométhacine à partir des comprimés préparés avec les dérivés P-R56, P-R75 et P-R100 ont une allure bimodale. Par contre, pour les comprimés préparés à partir des autres dérivés réticulés, la libération semble s'effectuer suivant une cinétique linéaire, comme dans le cas des comprimés matriciels préparés à partir des amidons réticulés (Lenaerts et coll., 1991; Lenaerts et coll., 1998). Notons que le comportement bimodal observé avec certains types de comprimés n'a rien de surprenant car, dans tout système matriciel, la libération des principes actifs est généralement contrôlée par deux phénomènes distincts : la diffusion à travers le réseau matriciel hydraté et l'érosion de la matrice. La contribution de l'érosion de la matrice à la libération des traceurs devient prédominante lorsque le polymère utilisé possède de mauvaises propriétés liantes, comme c'est le cas avec le dérivé P-R250.

Il est évident qu'en présence des enzymes pectinolytiques, l'érosion des comprimés est fortement accélérée. En effet, lors des études de dégradation enzymatique (paragraphe 3.3), on a pu mettre en évidence que les enzymes pectinolytiques du pectinex<sup>®</sup> Ultra SP-L possèdent une forte activité de dépolymérisation des pectines réticulées. L'augmentation de la vitesse d'érosion de la matrice, suite à la dégradation des dérivés de la pectine par les enzymes pectinolytiques, permet d'expliquer la très forte accélération de la libération de l'indométhacine en présence de pectinex<sup>®</sup> Ultra SP-L. On peut, en effet, observer sur les figures V.7 et V.8, qu'à l'exception des matrices préparées à partir du dérivé P-R250, la libération de l'indométhacine est beaucoup plus rapide lorsqu'on ajoute du pectinex<sup>®</sup> Ultra SP-L au milieu de dissolution.

L'examen des figures V.6 et V.8 permet aussi de constater que la libération de l'indométhacine à partir des différentes matrices s'accompagne de grandes variations, mises en évidence par la dimension des barres d'erreurs qui représentent les écarts types (SD) calculés à chaque temps ( $n = 4$ ). Cette variabilité, dont l'origine probable est le manque de contrôle satisfaisant des temps de désagrégation des comprimés, devrait pouvoir être atténuée par l'utilisation de la technique de granulation humide des mélanges de poudres en présence d'une quantité appropriée d'agent liant insoluble dans l'eau, tels que l'éthylcellulose et les Eudragits<sup>®</sup> NE, RL et RS. L'addition de tels agents liants permettrait, par ailleurs, d'améliorer non seulement la compressibilité des mélanges de poudres, mais aussi les propriétés

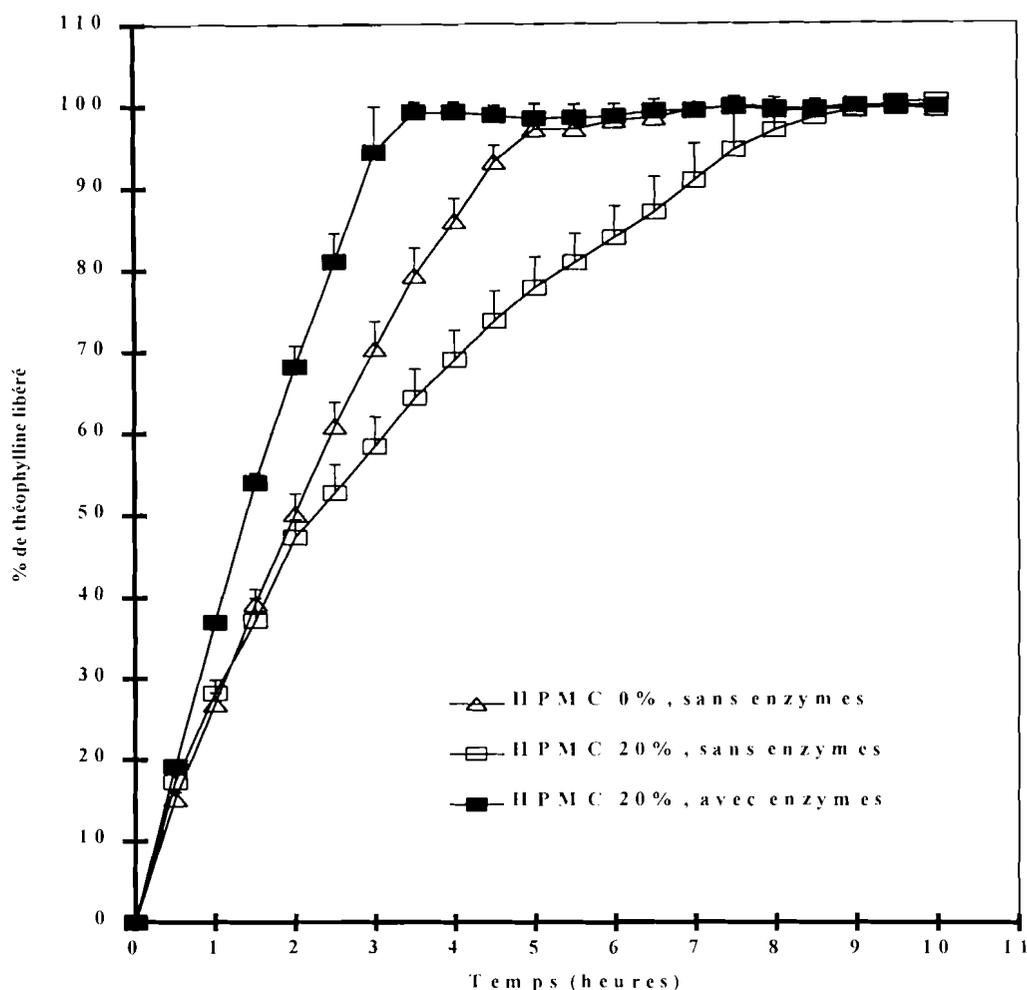
physiques des comprimés obtenus. D'autre part, les agents liants insolubles permettraient un meilleur contrôle (libération prolongée plus marquée) de la libération des traceurs, surtout en l'absence des enzymes pectinolytiques (Tsai et coll., 1998).



**Figure V.9 :** Libération de la théophylline ( $m + SD$  ou  $m - SD$ ,  $n = 3$ ) à partir des comprimés matriciels obtenus avec les pectines réticulées (P-RX) par l'épichlorohydrine. Le milieu de dissolution est le tampon acétate - phosphate 0.05 M de pH 6.0.

La solubilité du traceur influence également la cinétique de sa libération à partir des comprimés matriciels préparés avec les pectines réticulées. La figure V.9, qui représente les cinétiques de libération de la théophylline à partir des différentes matrices, montre que, comparées aux formulations renfermant de l'indométhacine (figure V.6), la libération de la théophylline s'effectue beaucoup plus rapidement. Par exemple, le  $t_{50\%}$  de libération de l'indométhacine à partir des matrices préparées avec le dérivé P-R75 est égal à 7.5 heures

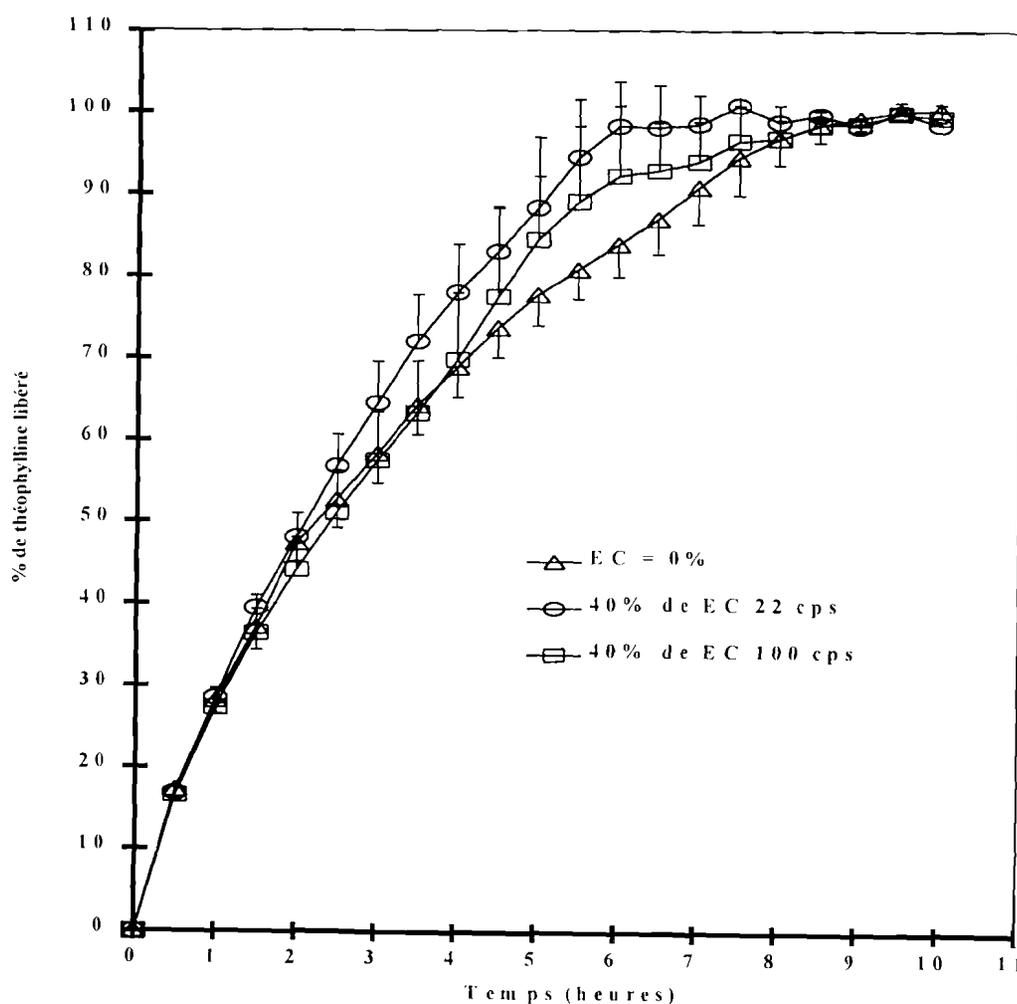
(figure V.7) alors que celui de la théophylline est égal à 2.5 heures (figure V.9). La différence observée entre la vitesse de libération de l'indométhacine et celle de la théophylline est probablement une question de solubilité dans le liquide d'épreuve. A titre d'exemple, la solubilité dans l'eau de l'indométhacine est égale à 0.187 mg / ml (Huart-Oth, 1987), à pH 6.0 et à 37°C alors que celle de la théophylline est égale à 8.33 mg / ml (The Merck Index, 12<sup>ème</sup> édition, 1996).



**Figure V.10 :** Influence de la présence de 20 % (m/m) de HPMC dans les comprimés sur la libération de la théophylline ( $m + SD$ ,  $n = 3$ ) à partir des comprimés matriciels obtenus avec les pectines réticulées P-R75. Le milieu de dissolution est le tampon acétate – phosphate 0.05 M de pH 6.0.

La libération de la théophylline étant plus rapide, nous avons pensé que l'incorporation d'autres polymères pourrait ralentir de manière significative sa libération en l'absence des enzymes pectinolytiques. C'est ainsi que des comprimés matriciels de

théophylline, renfermant 20 % (m/m) de HPMC 4000 (hydroxypropylméthylcellulose 4000) ou 40 % (m/m) d'éthylcellulose 22 cps ou 100 cps ont été préparés à partir du dérivé P-R75. La présence de ces deux excipients devrait aussi permettre d'améliorer la compressibilité des pectines réticulées. Les essais de dissolution, réalisés sur ces comprimés, ont permis d'étudier l'influence de la présence de ces deux types de polymères (HPMC 4000, éthylcellulose) sur la cinétique de libération de la théophylline. Le HPMC 4000, qui est un polymère caractérisé par un pouvoir de gélification très élevé, permet de ralentir de manière significative la libération de la théophylline (figure V.10). Par contre, l'éthylcellulose qui est incapable de former un gel dans les milieux de dissolution, ne permet pas d'obtenir un ralentissement significatif de la libération de la théophylline (figure V.11).



**Figure V.11 :** Influence de la présence de 40 % (m/m) de deux types d'éthylcellulose (22 cps et 100 cps) sur la libération de la théophylline ( $m + SD$  ou  $m - SD$ ,  $n = 3$ ) à partir des comprimés matriciels obtenus avec les pectines réticulées P-R75. Le milieu de dissolution est le tampon acétate – phosphate 0.05 M de pH 6.0.

## 4. Conclusion

La réticulation chimique de la pectine par l'épichlorohydrine a permis de préparer des dérivés hydrophiles mais non hydrosolubles de la pectine. La dégradation de ces dérivés par les enzymes pectinolytiques est très rapide et n'est pas très affectée par le degré de réticulation. En effet, après une heure d'incubation, près de 70 % des liens glycosidiques sont clivés par les enzymes.

Afin d'évaluer l'aptitude des pectines réticulées à véhiculer les principes actifs vers le côlon, des essais de dissolution ont été effectués sur des comprimés matriciels préparés à partir des différents dérivés renfermant 10 % (m/m) de traceur (indométhacine ou théophylline). La cinétique de libération varie fortement en fonction de la solubilité dans l'eau du traceur, du degré de réticulation de la pectine mais aussi, de la présence ou non des enzymes pectinolytiques dans les milieux de dissolution.

L'indométhacine, qui est moins hydrosoluble que la théophylline à pH 6.0, est libérée plus lentement à partir des comprimés matriciels. D'autre part, la diminution la plus importante de la vitesse de libération des traceurs en l'absence des enzymes pectinolytiques a été observée avec le dérivé P-R75 dont le degré de réticulation (DR) réel est de 38 %. Dans tous les cas, l'addition des enzymes pectinolytiques dans les milieux de dissolution accélère fortement la vitesse de libération de l'indométhacine.

Bien qu'une adaptation de la formulation des comprimés matriciels soit nécessaire en fonction de la nature du traceur, les résultats présentés dans ce chapitre démontrent clairement que les pectines réticulées par l'épichlorohydrine peuvent constituer des excipients très intéressants pour la préparation des formes coloniques.

## Conclusions générales et perspectives

Les formes coloniques ont fait l'objet, depuis ces vingt dernières années, d'intenses recherches car de nombreuses et importantes applications pharmaceutiques et médicales pourraient leur être associées. En effet, elles permettraient un meilleur traitement des pathologies dont le siège est le côlon (constipation, diarrhées, syndrome du côlon irritable, colite ulcéreuse, maladie de Crohn, infections microbiennes ...). Elles offrent aussi une opportunité intéressante dans la maîtrise des maladies affectées par les rythmes circadiens tel que l'asthme par exemple. Une autre perspective d'application importante des formes coloniques est l'administration orale des macromolécules médicamenteuses comme les peptides et les protéines. Enfin, les formes coloniques, tout en permettant au formulateur de programmer une décharge massive du principe actif dans le côlon, prolongeraient par la même occasion l'activité de certains médicaments.

Plusieurs approches, comprenant l'utilisation de prodrogues, de systèmes matriciels et/ou enrobés, ont été étudiées dans le but de concevoir un système efficace, capable de délivrer sélectivement le principe actif qu'il renferme dans le côlon. Ces approches sont basées sur l'utilisation des différentes caractéristiques physiologiques du tractus gastro-intestinal (pH, temps de transit des formes pharmaceutiques, potentiel redox, flore intestinale) pour déclencher ou accentuer la libération du principe actif dans le côlon. Les approches basées sur l'utilisation du pH et des temps de transit risquent d'être moins sélectives car elles sont caractérisées par une très grande variabilité inter- et intra-sujets.

Par contre, les approches basées sur la dégradation des formes pharmaceutiques par la flore intestinale, qui est essentiellement localisée dans le côlon et présente moins de variabilité inter- et intra- sujets, offrent une plus grande spécificité quand au site de libération du principe actif. C'est ainsi que de nombreux polymères synthétiques et naturels, dégradés par les enzymes de la flore intestinale, ont été sélectionnés pour véhiculer les médicaments vers le côlon. Parmi ceux-ci, les polysaccharides présentent le double avantage d'être dégradés par la flore bactérienne du côlon et de ne pas présenter des problèmes de toxicité. A cet égard, les pectines, polysaccharides naturels des végétaux et constituants majeurs des fibres alimentaires, sont des substances très intéressantes. En effet, elles sont abondamment utilisées dans l'industrie agro-alimentaire comme agent de gélification et résistent à la digestion

gastrique et intestinale pour se retrouver intactes dans le côlon. A ce niveau, elles sont rapidement et totalement dégradées par les enzymes pectinolytiques de la flore intestinale. Etant donné que leur hydrosolubilité constitue le principal facteur limitant à leur utilisation comme excipients des formes coloniques, nous avons envisagé deux stratégies différentes destinées à masquer leur caractère hydrosoluble, sans empêcher leur dégradation par les enzymes pectinolytiques de la flore intestinale.

La première stratégie a consisté à contourner l'impact négatif dû à l'hydrosolubilité des pectines par des moyens physiques, notamment en incorporant celles-ci dans des polymères d'enrobage insolubles dans l'eau.

Pour ce faire, nous avons d'abord étudié les enrobages mixtes constitués de mélanges de pectine HM (hautement méthoxylée) et d'éthylcellulose, appliqués par compression (dry coating) sur des comprimés de théophylline (noyaux). L'utilisation de ces enrobages manteaux a permis de montrer qu'il est possible, par ajustement de la proportion de pectine dans l'enrobage, d'obtenir une libération beaucoup plus massive et rapide de la théophylline dans les bains de dissolution contenant les enzymes pectinolytiques extraites d'*Aspergillus niger* (Pectinex<sup>®</sup> Ultra SP-L). D'autre part, en l'absence des enzymes pectinolytiques, les enrobages mixtes Pectine HM / Ethylcellulose renfermant 75 % m/m et moins d'éthylcellulose sont capables de protéger les noyaux contre la pénétration du liquide de dissolution et cela pendant une période de plus de 12 heures. Cependant, lorsque la teneur en éthylcellulose dans les enrobages dépasse 75 % m/m, ceux-ci perdent progressivement leur capacité de protection du principe actif en l'absence des enzymes pectinolytiques.

Ces observations nous ont encouragés à incorporer les pectines dans les dispersions colloïdales aqueuses de polymères d'enrobage insolubles tels que l'Aquacoat<sup>®</sup> ECD 30, le Surelease<sup>®</sup> clear, les Eudragits<sup>®</sup> RS30D et NE30D, dans le but d'enrober, à l'aide de la technique du lit d'air fluidisé, des pellets de théophylline en vue de la délivrance spécifique du principe actif dans le côlon. Afin de mieux comprendre le comportement des pellets enrobés, nous avons déterminé les cinétiques de largage de la pectine et celles de l'absorption d'eau par les films mixtes isolés, préparés à partir des dispersions colloïdales aqueuses de polymères d'enrobage insolubles (Aquacoat<sup>®</sup> ECD 30, Surelease<sup>®</sup> clear, Eudragits<sup>®</sup> NE30D et RS30D) renfermant diverses proportions de pectines HM ou de pectinates de calcium.

Les résultats des études relatives aux cinétiques de largage de la pectine par les différents films mixtes ont montré que seules les associations Eudragit® RS / Pectine HM ou FM (10 % m/m) sont susceptibles de répondre aux exigences d'un film d'enrobage colonique. En effet, les films mixtes préparés à partir de l'Aquacoat® ECD 30, du Surelease® clear et de l'Eudragit® NE30D renfermant de la pectine HM ou des pectinates de calcium, de même que les films mixtes Eudragit® RS / Pectinates de calcium, larguent dès la première heure d'incubation, la presque totalité de la pectine qu'ils renferment, et cela même en l'absence des enzymes pectinolytiques. Par contre, les films obtenus à partir de l'Eudragit® RS renfermant environ 10 % m/m de pectine HM ou FM sont capables de conserver la pectine incorporée pendant les 8 heures d'incubation en l'absence des enzymes pectinolytiques, et cela grâce aux interactions ioniques existant entre les molécules de pectine et les particules du latex d'Eudragit® RS30D. D'autre part, ces mêmes films, incubés en présence des enzymes pectinolytiques, libèrent progressivement et assez rapidement la pectine incorporée dans les milieux d'incubation.

Les cinétiques d'absorption d'eau par les films d'enrobage peuvent avoir un impact considérable sur la libération des substances actives à partir des formes enrobées. L'établissement des cinétiques d'absorption d'eau par les films isolés, obtenus à partir des mélanges Eudragit® RS ou NE / Pectine HM ou Pectinate de calcium, nous a permis de démontrer que la capacité d'absorption d'eau des films mixtes, qui dépend fortement du type de polymère insoluble utilisé (Eudragit® RS ou NE) et du dérivé de la pectine incorporée (pectine HM ou pectinate de calcium), est généralement plus faible en présence des enzymes pectinolytiques.

Ayant supposé que le largage de la pectine hors des films d'enrobage laisserait apparaître des pores aqueux à travers lesquels les principes actifs pourraient diffuser, nous avons préparés des pellets de théophylline enrobés avec les différents mélanges Pectine HM ou Pectinates de calcium / Polymères insolubles. Les essais de dissolution *in vitro*, effectués sur ces pellets enrobés, ont montré que, contrairement à notre attente, la libération de la théophylline s'effectue plus lentement en présence des enzymes pectinolytiques. Pour expliquer ces résultats, nous avons été contraints d'émettre l'hypothèse selon laquelle les principes actifs hydrophiles comme la théophylline diffusent à travers des canaux hydratés créés dans les enrobages par la pectine ou le pectinate de calcium. De ce fait, l'élimination de

la pectine de l'enrobage suite à son hydrolyse enzymatique va entraîner la diminution de l'hydratation des films, la disparition des canaux formés par la pectine hydratée, mais aussi une restructuration très rapide des films d'enrobage grâce aux propriétés élastiques des polymères non hydrosolubles utilisés. Par conséquent, la libération de la théophylline s'effectue plus lentement en présence des enzymes pectinolytiques.

En nous basant sur l'hypothèse qui vient d'être esquissée, nous avons formulé des enrobages ternaires constitués de l'Eudragit® NE, de l'Eudragit® RL et de la pectine HM. La pectine qui est un polymère anionique, forme des complexes insolubles avec l'Eudragit® RL qui est un polymère cationique, non dégradé par la flore intestinale. Ces complexes ont été incorporés dans l'Eudragit® NE30D et utilisés pour enrober les pellets de théophylline. Les résultats des essais de dissolution effectués sur ces pellets enrobés ont montré que la présence des enzymes pectinolytiques dans les milieux de dissolution entraîne une diminution de la libération de la théophylline lorsque que la teneur en pectine HM des enrobages ternaires (Eudragit® NE / Eudragit® RL / Pectine HM) est supérieure à 20 % de la teneur en Eudragit® RL. Par contre, lorsque que la teneur de ces enrobages en pectine HM est comprise entre 12.5 et 15 % de la teneur en Eudragit® RL, l'action des enzymes pectinolytiques entraîne une augmentation significative de la libération de la théophylline.

Cette augmentation de la libération de la théophylline par les enzymes pectinolytiques, n'est cependant pas très importante. En effet, la libération de la théophylline obtenue en présence des enzymes pectinolytiques dépasse rarement 10 % de celle observée dans les milieux contrôles, et cela quelle que soit la teneur des enrobages en complexes Pectine HM / Eudragit® RL. Cette faible augmentation de la libération de la théophylline en présence des enzymes est probablement due au faible pouvoir de gonflement de l'Eudragit® RL. Nous pensons en effet que le remplacement de l'Eudragit® RL par un autre polymère cationique hydrosoluble ou possédant un meilleur pouvoir de gélification (chitosans et Eudragit® E par exemple) permettrait d'obtenir une libération beaucoup plus substantielle de la théophylline en présence des enzymes pectinolytiques.

Parallèlement aux méthodes physiques envisagées pour réduire l'hydrosolubilité des pectines, des méthodes chimiques, consistant à réticuler la pectine par l'épichlorohydrine, ont permis de préparer des dérivés hydrophiles mais insolubles dans l'eau. La dégradation de ces

dérivés par les enzymes pectinolytiques est extrêmement rapide et n'est pas très affectée par le degré de réticulation des pectines réticulées. En effet, après une heure d'incubation à pH 4.5 et en présence des enzymes pectinolytiques, près de 70 % des liens glycosidiques présents dans les pectines réticulées sont clivés.

L'évaluation de leur potentiel colonique a été effectuée avec des comprimés matriciels préparés à partir des différents dérivés réticulés renfermant 10 % m/m de traceur (indométhacine ou théophylline). Les essais de dissolution *in vitro*, effectués sur ces comprimés à pH 6.0, ont permis de montrer que la cinétique de libération du principe actif varie principalement en fonction de sa solubilité dans l'eau, du degré de réticulation de la pectine mais aussi, de la présence ou non des enzymes pectinolytiques dans les milieux de dissolution.

L'indométhacine, qui est un principe actif moins hydrosoluble que la théophylline à pH 6.0, est libérée plus lentement à partir des comprimés matriciels. D'autre part, la diminution la plus importante de la vitesse de libération des traceurs en l'absence des enzymes pectinolytiques a été observée avec le dérivé P-R75 dont le degré de réticulation (DR) effectif est de 38 %. Dans tous les cas, l'addition des enzymes pectinolytiques dans les milieux de dissolution entraîne une forte accélération de la vitesse de libération de l'indométhacine.

Bien qu'une adaptation de la formulation des comprimés matriciels soit nécessaire en fonction de la nature du principe actif, les résultats obtenus avec les formulations matricielles à base de pectines réticulées par l'épichlorohydrine ont clairement démontré que celles-ci peuvent constituer des excipients très intéressants pour la préparation des formes coloniques.

## Références bibliographiques

- Abrahamsson B., Alpsten M., Jonsson U.E., Lundberg P.J., Sandberg A., Sundgren M., Svenheden A., Tölli J., 1996. Gastro-intestinal transit of a multiple-unit formulation (metoprolol CR/ZOK) and a non-disintegrating tablet with the emphasis on colon. *Int. J. Pharm.*, 140, 229-235.
- Adkin D.A., Davis S.S., Sparrow R.A., and Wilding I.R., 1993. Colonic transit of different sized tablets in healthy subjects. *J. Control. Rel.*, 23, 147-156.
- Adkin D.A., Kenyon C.J., Lerner E.I., Landau I., Strauss E., Caron D., Penhasi A., Rubinstein A., and Wilding I.R., 1997. The use of scintigraphy to provide "Proof of Concept" for novel Polysaccharide preparations designed for colonic drug delivery. *Pharm. Res.*, 14 (1), 103-107.
- Albersheim P., Neukom H., and Deuel H., 1960. Splitting of pectin chain molecules in neutral solutions. *Arch. Biochem. Biophys.*, 90, 46-51.
- Amighi K., 1995a. Etude de l'influence des paramètres de formulation, de fabrication et de conservation sur les propriétés de formes orales multiunitaires à libération prolongée, enrobées à l'aide des dispersions aqueuses de polymères acryliques. Thèse de doctorat, Université Libre de Bruxelles.
- Amighi K., and Moës A.J., 1995b. Evaluation of thermal and film forming properties of acrylic aqueous polymer dispersion blends : application to the formulation of sustained-release film coated theophylline pellets. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 21 (20), 2355-2369.
- Amighi K., and Moës A.J., 1996. Influence of plasticizer concentration and storage conditions on the drug release rate from Eudragit® RS30D film-coated sustained-release theophylline pellets. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 42 (1), 29-35.
- Amighi K., and Moës A.J., 1997. Influence of curing conditions on the drug release rate from Eudragit® NE30D film-coated sustained release theophylline pellets. *S.T.P. Pharm. Sci.*, 7 (2), 141-147.

- Anderlé P., Rubas W., Largiadèr F., Merkle H.P., and Langguth P., 1998. Stability and absorption of IGF-I in the gastro-intestinal tract. Proc. 2<sup>nd</sup> World Meeting APGI/APV, 1141-1142.
- Antonin K.-H., 1993. Other methods in studying colonic drug absorption. In Colonic drug absorption and metabolism Bieck P. R. (Ed.), Drugs and the pharmaceutical sciences, Marcel Dekker, Inc., New York-Basel-Hong Kong, Vol. 60, 89-107.
- Antonin K.H., Rak R., Bieck P.R., Preiss R., Schenker U., Hastewell J., Fox R., Mackay M., 1996. The absorption of human calcitonin from the transverse colon of man. Int. J. Pharm., 130, 33-39.
- Ashford M., Fell J.T., Attwood D., and Woodhead P.J., 1993a. An *in vitro* investigation into the suitability of pH-dependent polymers for colonic targeting. Int. J. Pharm., 91, 241-245.
- Ashford M., Fell J.T., Attwood D., Sharma H., and Woodhead P.J., 1993b. An *in vivo* investigation into the suitability of pH dependent polymers for colonic targeting. Int. J. Pharm., 95, 193-199.
- Ashford M., Fell J., Attwood D., Sharma H., and Woodhead P., 1993c. An evaluation of pectin as carrier for drug targeting to the colon. J. Control. Rel., 26, 213-220.
- Ashford M., Fell J., Attwood D., Sharma H., Woodhead P., 1994. Studies on pectin formulations for colonic drug delivery. J. Control. Rel., 30, 225-232.
- Aungst B.J., Saitoh H., Burcham D.L., Huang S.-M., Mousa S.A., Hussain M.A., 1996. Enhancement of the intestinal absorption of peptides and non-peptides. J. Control. Rel., 41, 19-31.
- Aydin Z., Akbuga J., 1996. Preparation and evaluation of pectin beads. Int. J. Pharm., 137, 133-136.
- Bach E., and Schollmeyer E., 1992. An ultraviolet-spectrophotometric method with 2-cyanoacetamide for the determination of the enzymatic degradation of reducing polysaccharides. Anal. Biochem., 203, 335-339.

- Bai J.P.F., 1994a. Distribution of brush-border membrane peptidases along the rat intestine. *Pharm. Res.*, 11 (6), 897-900.
- Bai J.P.F., 1994b. Comparison of distribution of brush-border exo- and endopeptidases in rat and rabbit intestine. *J. Pharm. Pharmacol.*, 46, 928-930.
- Barrow L., Steed K.P., Spiller R.C., Watts P.J., Melia C.D., Davies M.C., and Wilson C.G., 1992. Scintigraphic demonstration of lactulose-induced accelerated proximal colon transit. *Gastroenterology*, 103, 1167-1173.
- Baudys M., Mix D., Kim S.W., 1996. Stabilization and intestinal absorption of human calcitonin. *J. Control. Rel.*, 39, 141-151.
- Bazzocchi G., Ellis J., Villanueva-Meyer J., Jing J., Reddy S.N., Mena I., and Snape W.J., 1990. Postprandial colonic transit and motor activity in chronic constipation. *Gastroenterology*, 98, 686-693.
- Bernkop-Schnürch A., 1998. The use of inhibitory agents to overcome the enzymatic barrier to perorally administered therapeutic peptides and proteins. *J. Control. Rel.*, 52, 1-16.
- Bitter T., and Muir H.M., 1962. A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.*, 4, 330-334.
- Bodmeier R., and Paeratakul O., 1992. Leaching of water-soluble plasticizers from polymeric films prepared from aqueous colloidal polymer dispersions. *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, 18 (17), 1865-1882.
- Bodmeier R., and Paeratakul O., 1994. Mechanical properties of dry and wet cellulosic and acrylic films prepared from aqueous colloidal polymer dispersions used in the coating of solid dosage forms. *Pharm. Res.*, 11 (6), 882-888.
- Bodmeier R., Guo X., and Paeratakul O., 1997. Process and formulation factors affecting the drug release from pellets coated with the ethylcellulose-pseudolatex Aquacoat. In *Aqueous polymeric coatings for pharmaceutical dosage forms*, Mc Ginity J.W., *Drugs and pharmaceutical science*, 2<sup>nd</sup> ed., rev. and expanded, Marcel Dekker, Inc., New York-Basel-Hong Kong., Vol. 79, 55-80.

- Bolton S., 1997. Pharmaceutical statistics. Practical and clinical applications; third edition. Drugs and the pharmaceutical sciences, Marcel Dekker, Inc., New York - Basel - Hong Kong, Vol. 80.
- Bragger J.L., Lloyd W.A., Soozandehfar S.H., Bloomfield S.F., Marriott C., Martin G.P., 1997. Investigations into the azo reducing activity of a common colonic microorganism. *Int. J. Pharm.*, 157, 61-71.
- Brondsted H., and Kopecek J., 1991. Hydrogels for site-specific drug oral delivery: synthesis and characterization. *Biomaterials*, 12, 584-592.
- Brondsted H., and Kopecek J., 1992. Hydrogels for site-specific drug delivery to the colon: *in vitro* and *in vivo* degradation. *Pharm. Res.*, 9 (12), 1540-1545.
- Brondsted H., Andersen C., Hovgaard L., 1998. Crosslinked dextran – a new capsule material for colon targeting of drugs. *J. Control. Rel.*, 53, 7-13.
- Brondsted H., Hovgaard L., Simonsen L., 1995. Dextran hydrogels for colon-specific drug delivery. II. Synthesis and characterization. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 41 (6), 341-345.
- Campbell D.E.S., and Berlingdh T., 1988. Pharmacology of olsalazine, *Scand. J. Gastroenterol.*, 23 (suppl. 148), 7-12.
- Carson J.F., and Maclay W.D., 1945. The acylation of pectin. *J. Am. Chem. Soc.*, 67, 787-789.
- Chaussade S., Roche H., Khyari A., Couturier D., et Guerre J., 1986. Mesure du temps de transit colique (TTC): description et validation d'une nouvelle technique. *Gastroenterol. Clin. Biol.*, 10, 385-389.
- Ciftci K., and Groves M.J., 1996. Delivery of antitumor compounds to the rat colon: *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Int. J. Pharm.*, 145, 157-164.
- Coffin D.R., and Fishman M.L., 1993. Viscoelastic properties of pectin / starch blends. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 1192-1197.

- Coffin D.R., and Fishman M.L., 1994. Physical and mechanical properties of highly plasticized pectin / starch films. *J. Appl. Polym. Sci.*, 54, 1311-1320.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45 (3), 1025-1033.
- Cummings J.H., Southgate D.A.T., Branch W.J., Wiggins H.S., Houston H., Jenkins D.J.A., Jivraj T., and Hill M.J., 1979. The digestion of pectin in the human gut and its effect on calcium absorption and large bowel function. *Br. J. Nutr.*, 41, 477-485.
- Cummings J.H., 1984. Colonic absorption: the importance of short chain fatty acids in man. *Scand. J. Gastroenterol.*, 19, suppl. 93, 89-99.
- 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., Newton J.M., 1996. *In vivo* studies of amylose- and ethylcellulose-coated [<sup>13</sup>C]glucose microspheres as a model for drug delivery to the colon. *J. Control. Rel.*, 40, 123-131.
- Daniel M., Wisker E., Rave G., and Feldheim W., 1997. Fermentation in human subjects of nonstarch polysaccharides in mixed diets, but not in a barley fiber concentrate, could be predicted by *in vitro* fermentation using human fecal inocula. *J. Nutr.*, 127, 1981-1988.
- Davis S.S., Hardy J.G., Taylor M.J., Whalley D.R, and Wilson C.G., 1984a. A comparative study of the gastrointestinal transit of a pellet and tablet formulation. *Int. J. Pharm.*, 21, 167-177.
- Davis S.S., Hardy J.G., Taylor M.J., Whalley D.R, and Wilson C.G., 1984b. The effect of food on the gastrointestinal transit of pellets and an osmotic device (Osmet). *Int. J. Pharm.*, 21, 331-340.
- Davis S.S., Hardy J.G., and Fara J.W., 1986. Transit of pharmaceutical dosage forms through the small intestine. *Gut*, 27, 886-892.
- D'Emanuele A., and Gilpin C., 1996. Applications of the environmental scanning electron microscope to the analysis of pharmaceutical formulations. *Scanning*, 18, 522-527.

- Dongowski G., Schnorrenberger B., Plätzer M., Schwarz M., Neubert R., 1997. Interactions between food components and drugs. Part 5: Effect of acetylation and amidation of pectins on the interaction with drugs. *Int. J. Pharm.*, 158, 99-107.
- Drasar B.S., and Hill M.J., 1974. *Human intestinal flora*. Academic Press, London.
- Dressman J.B., Palsson B.O., Ozturk A., and Ozturk S., 1994. Mechanisms of release from coated pellets. In *Multiparticulate oral drug delivery*, Ghebre-Sellassie I., *Drug and pharmaceutical sciences*, Marcel Dekker, Inc., New York, 65, 285-306.
- Duchêne D., and Ponchel G., 1993. Colonic administration, development of drug delivery systems, contribution of bioadhesion. *S.T.P. Pharma Sci.*, 3 (4), 277-285.
- Edwards C.A., 1993. Anatomical and physiological basis: physiological factors influencing drug absorption. In *Colonic drug absorption and metabolism*. Bieck P. R. (Ed.), *Drugs and the pharmaceutical sciences*, Marcel Dekker, Inc., New York-Basel-Hong Kong, Vol. 60, 1-28.
- Evans D.F., Pye G., Bramley R., Clark A.G., Dyson T.J., and Hardcastle J.D., 1988. Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects. *Gut*, 29, 1035-1041.
- Fernandez-Hervas M.J., and Fell J.T., 1998. Pectin/chitosan mixtures as coating for colon-specific drug delivery: an in vitro evaluation. *Int. J. Pharm.*, 169, 115-119.
- Fishman M.L., Gillespie D.T., Sondey S.M., and Barford R.A., 1989. Characterization of pectins by size exclusion chromatography in conjunction with viscosity detection. *J. Agric. Food Chem.*, 37, 584-591.
- Friend D.R., 1991a. Colon-specific drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 7, 149-199.
- Friend D.R., Phillips S., and Tozer T.N., 1991b. Colon-specific drug delivery from a glucoside prodrug in the guinea-pig. Efficacy study. *J. Control. Rel.*, 15, 47-54.
- Gazzaniga A., Iamartino P., Maffione G., and Sangalli M.E., 1994. Oral delayed-release system for colonic specific delivery. *Int. J. Pharm.*, 108, 77-83.

- Gliko-Kabir I., Yagen B., Penhasi A., and Rubinstein A., 1998. Low swelling, crosslinked guar and its potential use as colon-specific drug carrier. *Pharm. Res.*, 15 (7), 1019-1025.
- Gorbach S.L., Plaut A.G., Nahas L., Weinstein L., Spanknebel G., Levitan R., 1967. Studies of intestinal microflora. II. Microorganisms of the small intestine and their relations to oral and fecal flora. *Gastroenterology*, 53 (6), 856-867.
- Gorbach S.L., 1971. Intestinal microflora. *Gastroenterology*, 60, (6), 1110-1129.
- Guo J.-H., 1994. An investigation into the formation of plasticizer channels in plasticized polymer films. *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, 20 (11), 1883-1893.
- Gustafsson B.E., 1982. The physiological importance of the colonic microflora. *Scand. J. Gastroenterol.*, 17, suppl. 77, 117-131.
- Gutiérrez-Rocca J.C., and McGinity J.W., 1994. Influence of water soluble plasticizers on the physical and mechanical properties of acrylic resin copolymers. *Int. J. Pharm.*, 103, 293-301.
- Habib W.A., and Sakr A., 1998. Colonic targeting of the polypeptide drug Nisin. *Proceed. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 25, 166-167.
- Haeberlin B., and Friend D.R., 1992. In vitro evaluation of dexamethasone- $\beta$ -D-glucuronide for colon-specific treatment of colitis. *Proceed. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 19, 287-288.
- Haeberlin B., Rubas W., Nolen III H.W., and Friend D.R., 1993. *In vitro* evaluation of dexamethasone- $\beta$ -D-glucuronide for colon-specific drug delivery. *Pharm. Res.*, 10 (11), 1553-1562.
- Hamilton S.R., 1984. Structure of the colon. *Scand. J. Gastroenterol.*, 19, suppl. 93, 13-23.
- Hammer J., Camilleri M., Phillips S.F., Aggarwal A., Haddad A.M., 1993. Does the ileocolonic junction differentiate between solids and liquids?. *Gut*, 34, 222-226.
- Hardy J.G., Wilson C.G., and Wood E., 1985. Drug delivery to the proximal colon. *J. Pharm. Pharmacol.*, 37, 874-877.

- Hardy J.G., Lee S.W., Clark A.G., and Reynolds J.R., 1986. Enema volume and spreading. *Int. J. Pharm.*, 31, 151-155.
- Hardy J.G., Davis S.S., Khosla R., and Robertson C.S., 1988. Gastrointestinal transit of small tablets in patients with ulcerative colitis. *Int. J. Pharm.*, 48, 79-82.
- Hastewell J., Lynch S., Fox R., Williamson I., Skelton-Stroud P., and Mackay M., 1994. Enhancement of human calcitonin absorption across the rat colon *in vivo*. *Int. J. Pharm.*, 101, 115-120.
- Hastewell J., Antonin K.H., Fox R., Mackay M., 1995. The colonic absorption of human calcitonin: the effect of increasing local concentration and co-administration with a protease inhibitor. *Int. J. Pharm.*, 126, 245-251.
- Hennink W.E., Franssen O., van Dijk-Wolthuis, Talsma H., 1997. Dextran hydrogels for the controlled release of proteins. *J. Control. Rel.*, 48, 107-114.
- Heri W., Neukom H., and Deuel H., 1961. Chromatographie von pektinen mit verscheidener verteilung der methylester-gruppen auf den Fadenmolekeln. *Helv. Chim. Acta.*, 44, 1945-1949.
- Hirayama F., Minami K., and Uekama K., 1998. Colon-specific drug delivery based on cyclodextrin prodrug, *in vitro* and *in vivo* drug release behaviour from biphenylacetic acid/ $\beta$ -cyclodextrin conjugates in rats. *Proc. 2<sup>nd</sup> World Meeting APGI/APV*, 935-936.
- Hoagland P.D., Fishman M.L., Konja G., and Clauss E., 1993. Size exclusion chromatography with viscosity detection of complex polysaccharides: Component analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 1274-1281.
- Hovgaard L., Brøndsted H., 1995. Dextran hydrogels for colon-specific drug delivery. *J. Control. Rel.*, 36, 159-166.
- Hovgaard L., Brøndsted H., Jensen J.G., Norgaard L., 1997. Biodegradable hydrogel capsules based on dextran for the controlled delivery of drugs to the colon. *J. Control. Rel.*, 48, 345-346.

- Huart-Oth M., 1987. Contribution à l'étude des dispersions solides : - Utilisation des coévaporés pour un meilleur passage de l'interface huile/eau. - Investigation des coévaporés à libération contrôlée. Thèse de doctorat, Université Libre de Bruxelles.
- 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. *J. Appl. Bacteriol.*, 77, 185-194.
- Ishibashi T., Hatano H., Kobayashi M., Mizobe M., Yoshino H., 1998. Design and evaluation of a new capsule-type dosage form for colon-targeted delivery of drugs. *Int. J. Pharm.*, 168, 31-40.
- Kakoulides E.P., Smart J.D., Tsibouklis J., 1998a. Azocross-linked poly(acrylic acid) for colonic delivery and adhesion specificity: synthesis and characterisation. *J. Control. Rel.*, 52, 291-300.
- Kakoulides E.P., Smart J.D., Tsibouklis J., 1998b. Azocross-linked poly(acrylic acid) for colonic delivery and adhesion specificity: *In vitro* degradation and preliminary *ex vivo* bioadhesion studies. *J. Control. Rel.*, 54, 95-109.
- Kalala W., Kinget R., Van den Mooter G., Samyn C., 1996. Colonic drug-targeting: *in vitro* release of ibuprofen from capsules coated with poly(ether-ester) azopolymers. *Int. J. Pharm.*, 139, 187-195.
- Khosla R., Feely L.C., and Davis S.S., 1989a. Gastrointestinal transit of non-disintegrating tablets in fed subjects. *Int. J. Pharm.*, 53, 107-117.
- Khosla R., and Davis S.S., 1989b. Gastric emptying and small and large bowel transit of non-disintegrating tablets in fasted subjects. *Int. J. Pharm.*, 52, 1-10.
- Kim H., and Fassihi R., 1997a. Application of a binary polymer system in drug release rate modulation. 1. Characterization of release mechanism. *J. Pharm. Sci.*, 86 (3), 316-322.

- Kim H., and Fassihi R., 1997b. Application of a binary polymer system in drug release rate modulation. 2. Influence of formulation variables and hydrodynamic conditions on release kinetics. *J. Pharm. Sci.*, 86 (3), 323-328.
- Kim H., and Fassihi R., 1997c. A new ternary polymeric matrix system for controlled drug delivery of highly soluble drugs: I. Diltiazem hydrochloride. *Pharm. Res.*, 14 (10), 1415-1421.
- Kim H., Venkatesh G., Fassihi R., 1998. Compactibility characterization of granular pectin for tableting operation using a compaction simulator. *Int. J. Pharm.*, 161, 149-159.
- Kimura Y., Makita Y., Kumagai T., Yamane H., Kitao T., Sasatani H., and Kim S.-I., 1992. Degradation of azo-containing polyurethane by the action of intestinal flora: its mechanism and application as a drug delivery system. *Polymer*, 33, 5294-5299.
- Kopecek J., Kopeckova P., Brondsted H., Rathi R., Rihova B., Yeh P.Y., and Ikesue K., 1992. Polymers for colon-specific drug delivery. *J. Control. Rel.*, 19, 121-130.
- Kopeckova P., Rathi R., Takada S., Rihova B., Berenson M.M., and Kopecek J., 1994. Bioadhesive N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymers for colon-specific drug delivery. *J. Control. Rel.*, 28, 211-222.
- Langguth P., Breves G., Stöckli A., Merkle H.P., and Wolfram S., 1994. Colonic absorption and bioavailability of the pentapeptide metkephamid in the rat. *Pharm. Res.*, 11 (11), 1640-1645.
- Langguth P., Bohner V., Heizmann J., Merkle H.P., Wolfram S., Amidon G.L., Yamashita S., 1997. The challenge of proteolytic enzymes in intestinal peptide delivery. *J. Control. Rel.*, 46, 39-57.
- Lehmann K.O.R., 1989. Chemistry and application properties of polymethacrylate coating systems. In *Aqueous polymeric coatings for pharmaceutical dosage forms*, Mc Ginity J.W. (Ed.), *Drugs and the pharmaceutical sciences*, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, Vol. 36, 1-94.

- Lehmann K.O.R., 1997. Chemistry and application properties of polymethacrylate coating systems. In Aqueous polymeric coatings for pharmaceutical dosage forms, Mc Ginity J.W., Drugs and the pharmaceutical sciences, 2<sup>nd</sup> ed., rev. and expanded, Marcel Dekker, Inc., New York - Basel - Hong Kong, Vol. 79, 101-176.
- Lenaerts V., Dumoulin Y., and Mateescu M.A., 1991. Controlled release of theophylline from cross-linked amylose tablets. *J. Control. Rel.*, 15, 39-46.
- Lenaerts V., Moussa I., Dumoulin Y., Mebsout F., Chouinard F., Szabo P., Mateescu M.A., Cartilier L., Marchessault R., 1998. Cross-linked high amylose starch for controlled release of drugs: recent advances. *J. Control. Rel.*, 53, 225-234.
- Leopold C.S., and Eikeler D., 1998a. Drug release from Eudragit® E-coated mini tablets for colon targeting: *in vitro* study. *Proceed. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 25, 856-857.
- Leopold C.S., and Eikeler D., 1998b. Basic polymers as coating materials for the pH-controlled drug delivery in inflammatory colonic disorders – An *in vitro* assessment. *Proc. 2<sup>nd</sup> World Meeting APGI/APV*, 363-364.
- Lindstedt B., Sjöberg M., and Hjærtstam J., 1991. Osmotic pumping release from KCl tablets coated with porous and non-porous ethylcellulose. *Int. J. Pharm.*, 67, 21-27.
- Lloyd W.A., Martin G.P., Soozandehfar S.H., 1994. Azopolymers: a means of colon specific drug delivery?. *Int. J. Pharm.*, 106, 255-260.
- Lorenzo-Lamosa M.L., Remunan-Lopez C., Vila-Jato J.L., Alonso M.J., 1998. Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery. *J. Control. Rel.*, 52, 109-118.
- Lu R.H., Kopeckova P., and Kopecek J., 1998. Degradation study of human calcitonin *in vitro* provides rationale for colon peptide delivery. *Proceed. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 25, 770-771.

- 
- Mackey M., and Tomlinson E., 1993. Colonic delivery of therapeutic peptides and proteins. In Colonic drug absorption and metabolism, Bieck P.R. (Ed.), Drugs and the pharmaceutical sciences, Marcel Dekker, Inc., New York-Basel-Hong Kong., Vol. 60, 159-176.
- Macleod G.S., Fell J.T., Collett J.H., 1997. Studies on the physical properties of mixed pectin/ethylcellulose films intended for colonic drug delivery. *Int. J. Pharm.*, 157, 53-60.
- Mallett A.K., Bearne C.A., and Rowland I.R., 1983. Metabolic activity and enzyme induction in rat fecal microflora maintained in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46 (3), 591-595.
- Mallett A.K., Bearne C.A., and Rowland I.R., 1986. The use of continuous flow systems for studying the metabolic activity of the hindgut microflora *in vitro*. *Food Chem. Toxic.*, 24 (6/7), 743-747.
- Maness N.O, Ryan J.D., and Mort A.J., 1990. Determination of the degree of methyl esterification of pectins in small samples by selective reduction of esterified galacturonic acid to galactose. *Anal. Biochem.*, 185, 346-352.
- Mangos T.J., and Haas M.J., 1997. A spectrophotometric assay for the enzymatic demethoxylation of pectins and the determination of pectinesterase activity. *Anal. Biochem.*, 244, 357-366.
- Maroni A., Sangalli M.E., Busetti C., Zema L., Giordano F., and Gazzaniga A., 1998. Chronotropic® system, influence of various HPMC grades as coating agents on the release behaviour. *Proc. 2<sup>nd</sup> World Meeting APGI/APV*, 337-338.
- Matsumoto T., Kawai M, and Masuda T., 1993. Rheological properties and fractal structure of concentrated polyion complexes of chitosan and alginate. *Biorheology*, 30, 435-441.
- May C.D., 1990. Industrial pectins: Sources, production and applications. *Carbohydr. Polym.*, 12, 79-99.
- McComb E.A., and McCready M., 1957. Determination of acetyl in pectin and in acetylated carbohydrate polymers. Hydroxamic acid reaction. *Anal. Chem.*, 29 (5), 819-821.

- Mehta A.M., 1997. Processing and equipment considerations for aqueous coatings. In Aqueous polymeric coatings for pharmaceutical dosage forms, McGinity J.W., Drugs and pharmaceutical science, 2<sup>nd</sup> ed., rev. and expanded, Marcel Dekker, Inc., New York-Basel-Hong Kong., Vol. 79, 287-326.
- Metcalf A.M., Phillips S.F., Zinsmeister A.R., MacCarty R.L., Beart R.W., and Wolff B.G., 1987. Simplified assessment of segmental colonic transit. *Gastroenterology*, 92, 40-47.
- Miller T.L., and Wolin M.J., 1981. Fermentation by the human large intestine microbial community in an *in vitro* semicontinuous culture system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 42 (3), 400-407.
- Milojevic S., Newton J.M., Cummings J.H., Gibson G.R., Botham R.L., Ring S.G., Stockham M., Allwood M.C., 1996a. Amylose as a coating for drug delivery to the colon: preparation and *in vitro* evaluation using 5-aminosalicylic acid pellets. *J. Control. Rel.*, 38, 75-84.
- Milojevic S., Newton J.M., Cummings J.H., Gibson G.R., Botham R.L., Ring S.G., Stockham M., Allwood M.C., 1996b. Amylose as a coating for drug delivery to the colon: preparation and *in vitro* evaluation using glucose pellets. *J. Control. Rel.*, 38, 85-94.
- Minami K., Hirayama F., and Uekama K., 1998. Colon-specific drug delivery based on cyclodextrin prodrug: release behaviour from biphenylacetic acid from cyclodextrin conjugates in rat intestinal tracts after oral administration. *J. Pharm. Sci.*, 87 (6), 715-720.
- Molly K., Vande Woestyne M., Verstraete W., 1993. Development of a 5-step multi-chamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 39, 254-258.
- Moussa I.S., Lenaerts V., Cartilier L.H., 1998a. Effect of some physical parameters on the swelling properties of cross-linked amylose matrices. *Int. J. Pharm.*, 173, 35-41.
- Moussa I.S., Lenaerts V., Cartilier L.H., 1998b. Image analysis studies of water transport and dimensional changes occurring in the early stages of hydration in cross-linked amylose matrices. *J. Control. Rel.*, 52, 63-70.

- Mrsny R.J., 1992. The colon as a site for drug delivery. *J. Control. Rel.*, 22, 15-34.
- Munjeri O., Collett J.H., Fell J.T., 1997. Hydrogel beads based on amidated pectins for colon-specific drug delivery: the role of chitosan in modifying drug release. *J. Control. Rel.*, 46, 273-278.
- Munk J., Gannaway R., Hoare M., and Johnson A., 1978. Direct measurement of pyloric diameter and tone in man and their response to cholecystokinin. In *Gastrointestinal motility in health and disease*, Duthie H.L., Ed., MTP Press, Lancaster, 349.
- Muraoka M., Hu Z., Shimokawa T., Sekino S.-I, Kurogoshi R., Kuboi Y., Yoshikawa Y., Takada K., 1998. Evaluation of intestinal pressure-controlled colon delivery capsule containing caffeine as a model drug in human volunteers. *J. Control. Rel.*, 52, 119-129.
- Murata S., Ueda S., Shimojo F., Tokunaga Y., Hata T., Ohnishi N., 1998. *In vivo* performance of time-controlled explosion system (TES) in GI physiology regulated dogs. *Int. J. Pharm.*, 161, 161-168.
- Naggar V.F., El-Khawas M., Ismail F.A., and Boraie N.A., 1992. Pectin, a possible matrix for oral sustained-release preparations of water-soluble drugs. *S.T.P. Pharma. Sci.*, 2 (3), 227-234.
- Nelson N., 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of Glucose. *J. Biol. Chem.*, 375-380.
- Nolen III H.W., and Friend D.R., 1994. Menthol- $\beta$ -D-glucuronide: a potential prodrug for treatment of the irritable bowel syndrome. *Pharm. Res.*, 11 (12), 1707-1711.
- O'Donnell P.B., and McGinity J.W., 1997. Mechanical properties of polymeric films prepared from aqueous polymeric dispersion. In *Aqueous polymeric coatings for pharmaceutical dosage forms*, McGinity J.W., *Drugs and pharmaceutical science*, 2<sup>nd</sup> ed., rev. and expanded, Marcel Dekker, Inc., New York-Basel-Hong Kong., Vol. 79, 287-326.
- Onderdonk A.B., Johnston J., Mayhew J.W., and Gorbach S.L., 1976. Effect of dissolved oxygen and Eh on *Bacteroides fragilis* during continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 31 (2), 168-172.

- Owens H.S., Lotzkar H., Schultz T.H., and Maclay W.D., 1946. Shape and size of pectinic acid molecules deduced from viscosimetric measurements. *J. Am. Chem. Soc.*, 68, 1628-1632.
- Ozturk A.G., Ozturk S.S., Palsson B.O., Wheatley T.A., and Dressman J.B., 1990. Mechanism of release from pellets coated with an ethylcellulose-based film. *J. Control. Rel.*, 14, 203-213.
- Palmer K.J., and Hartzog M.B., 1945. An X-ray diffraction investigation of sodium pectate. *J. Chem. Soc.*, 67, 2122-2127.
- Parker G., Wilson C.G., and Hardy J.G., 1988. The effect of capsule size and density on the transit through the proximal colon. *J. Pharm. Pharmacol.*, 40, 376-377.
- Pharmacopée Européenne (Ph. Eur.), 3<sup>ème</sup> édition, 1995.
- Phillips S.F., 1984. Functions of the large bowel : An overview. *Scand. J. Gastroenterol.*, 19, suppl. 93, 1-12.
- Phillips S.F., Quigley E.M.M., Kumar D., and Kamath P.S., 1988. Motility of the ileocolonic junction. *Gut*, 29, 390-406.
- Pierre D., and Semdé R., 1997. Permeability and azoreduction in polymers. *Polymer Preprint*, 38 (2), 598-599.
- Prasad Y.V.R., Krishnaiah Y.S.R., Satyanarayana S., 1998. *In vitro* evaluation of guar gum as a carrier for colon-specific drug delivery. *J. Control. Rel.*, 51, 281-287.
- Price J.M.C., Davis S.S., and Wilding I.R., 1991. The effect of fibre on gastrointestinal transit times in vegetarians and omnivores. *Int. J. Pharm.*, 76, 123-131.
- Price J.M.C., Davis S.S., Sparrow R.A., and Wilding I.R., 1993. The effect of meal composition on the gastrocolonic response: implications for drug delivery to the colon. *Pharm. Res.*, 10 (5), 722-726.

- Proano M., Camilleri M., Phillips S.F., Brown M.L., and Thomforde G.M., 1990. Transit of solids through the human colon: regional quantification in the unprepared bowel. *Am. J. Physiol.*, 258, (Gastrointest. Liver Physiol., 21) G856-G862.
- Proano M., Camilleri M., Phillips S.F., Thomforde G.M., Brown M.L., and Tucker R.L., 1991. Unprepared human colon does not discriminate between solids and liquids. *Am. J. Physiol.*, 260, (Gastrointest. Liver Physiol., 23) G13-G16.
- Rao S.S., and Ritschel W.A., 1992. Development and *in vitro* / *in vivo* evaluation of a colonic release capsule of vasopressin. *Int. J. Pharm.*, 86, 35-41.
- Rees D.A., and Wight A.W., 1971. Polysaccharide conformation. Part VII. Model building computations for  $\alpha$ -1,4 galacturonan and the kinking function of L-rhamnose residues in pectic substances. *J. Chem. Soc.*, 67, 1366-1372.
- Rexova-Benkova L., 1972a. On the character of the interaction of endopolygalacturonase with cross-linked pectic acid. *Biochim. Biophys. Acta*, 276, 215-220.
- Rexova-Benkova L., and Tibenski V., 1972b. Selective purification of *Aspergillus Niger* endopolygalacturonase by affinity chromatography on cross-linked pectic acid. *Biochim. Biophys. Acta*, 268, 187-193.
- Rombouts F.M., Wissenburg A.K., and Pilnik W., 1979. Chromatographic separation of orange pectinesterase isoenzymes on pectates with different degrees of cross-linking. *J. Chromatogr.*, 168, 151-161.
- Rubinstein A., 1990. Microbially controlled drug delivery to the colon. *Biopharm. Drug Dispos.*, 11, 465-475.
- Rubinstein A., Nakar D., and Sintov A., 1992a. Chondroitin sulfate: a potential biodegradable carrier for colon-specific drug delivery. *Int. J. Pharm.*, 84, 141-150.
- Rubinstein A., Nakar D., and Sintov A., 1992b. Colonic drug delivery: enhanced release of Indomethacin from cross-linked chondroitin matrix in rat cecal content. *Pharm. Res.*, 9, 276-278.

- Rubinstein A., Ezra M., and Rokem J.S., 1992c. Adhesion of bacteria on pectin casted films. *Microbios.*, 70, 163-170.
- Rubinstein A., Radai R., Ezra M., Pathak S., and Rokem J.S., 1993. *In vitro* evaluation of calcium pectinate: a potential colon-specific drug delivery carrier. *Pharm. Res.*, 10 (2), 258-263.
- Rubinstein A., and Radai R., 1995. *In vitro* and *in vivo* analysis of colon specificity of calcium pectinate formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 41 (5), 291-295.
- Rubinstein A., Tirosh B., Baluom M., Nassar T., David A., Radai R., Gliko-Kabir I., Friedman M., 1997. The rationale for peptide drug delivery to the colon and the potential of polymeric carriers as effective tools. *J. Control. Rel.*, 46, 59-73.
- Rumney C.J., and Rowland I.R., 1992. *In vivo* and *in vitro* models of the human colonic flora. *Crit. Rev. Food Sc. Nutr.*, 31 (4), 299-331.
- Saffran M., Kumar G.S., Savariar C., Burnham J.C., Williams F., Neckers D.C., 1986. A new approach to the oral administration of insulin and other peptide drugs. *Science*, 233, 1081-1084.
- Saffran M., Kumar G.S., Neckers D.C., Pena J., Jones R.H., and Field J.B., 1990. Biodegradable azopolymer coating for oral delivery of peptide drugs. *Biochem. Soc. Trans.*, 18, 752-754.
- Saffran M., Field J.B., Pena J., Jones R.H., and Okuda Y., 1991. Oral insulin in diabetic dogs. *J. Endocrinol.*, 131, 267-278.
- Saffran M., Pansky B., Budd G.C., Williams F.E., 1997. Insulin and the gastrointestinal tract. *J. Control. Rel.*, 46, 89-98.
- Salyers A.A., Vercellotti J.R., West S.E.H., and Wilkins T.D., 1977. Fermentation of mucin and plant polysaccharides by strains of *Bacteroides* from the human colon. *Appl. Environ. Microbiol.*, 23 (2), 319-322.
- Sandberg-Gertzén H., Järnerot G., and Tysk C., 1988. Long-term treatment with olsalazine for ulcerative colitis: safety and relapse prevention: a follow-up study. *Scand. J. Gastroenterol.*, 23 (suppl. 148), 48-50.

- 
- Sangalli M.E., Busetti C., Maroni A., Zema L., Olgiati V., Giordano F., and Gazzaniga A., 1998. Chronotropic® system for colon specific delivery: Pharmacokinetic and scintigraphic evaluation. Proceed. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., 25, 858-859.
- Sato S., and Kim S.W., 1984. Macromolecular diffusion through polymer membranes. Int. J. Pharm., 22, 229-255.
- Schacht E., Gevaert A., Kenawy E.R., Molly K., Verstraete W., Adriaensens P., Carleer R., Gelan J., 1996. Polymers for colon specific drug delivery. J. Control. Rel., 39, 327-338.
- Schmidt C., and Bodmeier R., 1999. Incorporation of polymeric nanoparticles into solid dosage forms. J. Control. Rel., 57, 115-125.
- Semdé R., Pierre D., Geuskens G., Devleeschouwer M., and Moës A.J., 1996. Important factors involved in azo derivative degradation by *Clostridium perfringens*. J. Pharm. Belg., Tome L1 (2), 119.
- Semdé R., Pierre D., Geuskens G., Devleeschouwer M., Moës A.J., 1998a. Study of some important factors involved in azo derivative reduction by *Clostridium perfringens*. Int. J. Pharm., 161, 45-54.
- Semdé R., Amighi K., and Moës A.J., 1998b. Epichlorohydrin cross-linked pectins for colonic drug delivery. Proceed. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., 25, 806-807.
- Semdé R., Amighi K., and Moës A. J., 1998c. Effect of pectinolytic enzymes on theophylline release from pellets coated with calcium pectinate / cellulosic or acrylic polymer blends. Proc. 2<sup>nd</sup> World Meeting APCI / APV, 283-284.
- Semdé R., Amighi K., Pierre D., Devleeschouwer M.J., Moës A. J., 1998d. Leaching of pectin from mixed pectin / insoluble polymer films intended for colonic drug delivery. Int. J. Pharm., 174, 233-241.
- Shamat M.A., 1993. The role of the gastrointestinal microflora in the metabolism of drugs. Int. J. Pharm., 97, 1-13.
- Simon G.L., and Gorbach S.L., 1984. Intestinal flora in health and disease. Gastroenterology, 86, 174-193.

- Simonsen L., Hovgaard L., Mortensen P.B., Brøndsted H., 1995. Dextran hydrogels for colon-specific drug delivery. V. Degradation in human intestinal incubation models. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 3, 329-337.
- Sinitsya A., Copikova J., and Pavlikova H., 1998.  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR Spectroscopy in the analysis of pectins. *J. Carbohydr. Chem.*, 17 (2), 279-292.
- Siragusa R.S., Cerda J.J., Baig M.M., Burgin C.W., and Robbins F.L., 1988. Methanol production from the degradation of pectin by human colonic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.*, 47, 848-851.
- Sriamornsak P., Prakongpan S., Puttipipatkachorn S., and Kennedy R.A., 1997a. Development of sustained release theophylline pellets coated with calcium pectinate. *J. Control. Rel.*, 47, 221-232.
- Sriamornsak P., Puttipipatkachorn S., Prakongpan S., 1997b. Calcium pectinate gel coated pellets as an alternative carrier to calcium pectinate beads. *Int. J. Pharm.*, 156, 189-194.
- Sriamornsak P., 1998. Investigation of pectin as a carrier for oral delivery of proteins using calcium pectinate gel beads. *Int. J. Pharm.*, 169, 213-220.
- Steed K.P., Hooper G., Ventura P., Musa R., Wilding I.R., 1994. The *in vivo* behaviour of a colonic delivery system: a pilot study in man. *Int. J. Pharm.*, 112, 199-206.
- Steed K.P., Hooper G., Monti N., Benedetti M.S., Fornasini G., Wilding I.R., 1997. The use of pharmacoscintigraphy to focus the development strategy for a novel 5-ASA colon targeting system ("Time Clock<sup>®</sup>" system). *J. Control. Rel.*, 49, 115-122.
- Stirrup V., Ledingham S.J., Thomas M., Pye G., and Evans D.F., 1994. Redox potential measurement in the gastro-intestinal tract in man. *Brit. Soc. Gastroenterol.*, A1171.
- Takahashi T., Takayama K., Machida Y., and Nagai T., 1990. Characteristics of polyion complexes of chitosan with sodium alginate and sodium polyacrylate. *Int. J. Pharm.*, 61, 35-41.

- 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. *J. Pharma. Pharmacol.*, 47, 474-478.
- Taylor K.A., and Buchanan-Smith J.G., 1992. A colorimetric method for the quantitation of uronic acids and a specific assay for galacturonic acid. *Anal. Biochem.*, 201, 190-196.
- TenHoor C.N., and Dressman J.B., 1992. Oral absorption of peptides and proteins. *S.T.P. Pharma. Sci.*, 2 (4) 301-312.
- The Merck Index, an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals, 12th edition, 1996. Published by Merck Research Laboratories, division of Merck and Co., Inc., Whitehouse station, N.J., USA.
- Theeuwes F., Wong P.L., Burkoth T.L., and Fox D.A., 1993. Osmotic delivery of therapeutic peptides and proteins. In *Colonic drug absorption and metabolism*, Bieck P.R. (Ed.), *Drugs and the pharmaceutical sciences*, Marcel Dekker, Inc., New York - Basel - Hong Kong, Vol. 60, 137-159.
- Thibault J.F., 1980. Les substances pectiques. Dans les polymères végétaux, polymères pariétaux et alimentaires non azotés, Monties B. ed., Gautiers- Villars, Paris, pp. 232-251.
- Tomlin J., and Read N.W., 1988. The relation between bacterial degradation of viscous polysaccharides and stool output in human beings. *Br. J. Nutr.*, 60, 467-475.
- Tozaki H., Komoike J., Tada C., Maruyama T., Terabe A., Suzuki T., Yamamoto A., and Muranishi S., 1997. Chitosan capsules for colon-specific drug delivery: Improvement of insulin absorption from the rat colon. *J. Pharm. Sci.*, 86 (9), 1016-1021.
- Tsai T., San Y.-P., Ho H., Wu J.-S., and Sheu M.-T., 1998. Film-forming polymer-granulated excipients as the matrix materials for controlled release dosage forms. *J. Control. Rel.*, 51, 289-299.
- Ueda T., Yamaoka T., Miyamoto M., Kiruma Y., Sasatani H., and Kim S.-I., 1996. Bacterial reduction of azo compounds as a model reaction for the degradation of azo-containing polyurethane by the action of intestinal flora. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 69, 1139-1142.

- Upadrashta S.M., Katikaneni P.R., Hileman G.A., and Keshary P.R., 1993. Direct compression controlled release tablets using ethylcellulose matrices. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 19 (4), 449-460.
- US Pharmacopeia (USP) XXIII, 1995. US Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, pp. 1161-1162.
- Van den Mooter G., Samyn C., and Kinget R., 1992. Azo polymers for colon-specific drug delivery. *Int. J. Pharm.*, 87, 37-46.
- Van den Mooter G., 1994a. Contribution to oral colon-specific drug delivery: synthesis and evaluation of biodegradable azo polymers. Thèse de doctorat, Katholieke Universiteit Leuven (KUL), Belgique.
- Van den Mooter G., Samyn C., and Kinget R., 1994b. Characterization of colon-specific azo polymers: a study of the swelling properties and the permeability of isolated polymers films. *Int. J. Pharm.*, 111, 127-136.
- Van den Mooter G., Samyn C., and Kinget R., 1994c. The relation between swelling properties and enzymatic degradation of azo polymers designed for colon-specific drug delivery. *Pharm. Res.*, 11 (12), 1737-1741.
- Van den Mooter G., Maris B., Samyn C., Augustijns P., and Kinget R., 1997. Use of azo polymers for colon-specific drug delivery. *J. Pharm. Sci.*, 86 (12), 1321-1327.
- Vandelli M.A., Leo E., Forni F., and Bernabei M.T., 1996. *In vitro* evaluation of a potential colonic delivery system that releases drug after a controllable lag-time. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 43 (2) 148-151.
- Vervoort L., Kinget R., 1995. *In vitro* bacterial degradability of inulinHP incorporated in Eudragit RS films. Proc. 1<sup>st</sup> world meeting APGI/APV, 329-330.
- Vervoort L., Kinget R., 1996. *In vitro* degradation by colonic bacteria of inulinHP incorporated in Eudragit RS films. *Int. J. Pharm.* 129, 185-190.

- Vervoort L., Van den Mooter G., Augustijns P., Busson R., Toppet S., and Kinget R., 1997. Inulin hydrogels as carriers for colonic drug targeting: I. Synthesis and characterization of methacrylated Inulin and hydrogel formation. *Pharm. Res.*, 14 (12), 1730-1737.
- Vervoort L., Van den Mooter G., Augustijns P., Kinget R., 1998a. Inulin hydrogels: I. Dynamic and equilibrium swelling properties. *Int. J. Pharm.*, 172, 127-135.
- Vervoort L., Rombaut P., Van den Mooter G., Augustijns P., Kinget R., 1998b. Inulin hydrogels. II. In vitro degradation study. *Int. J. Pharm.*, 172, 137-145.
- Wakerly Z., Fell J.T., Attwood D., Parkins D.A., 1996a. *In vitro* evaluation of pectin-based colonic drug delivery systems. *Int. J. Pharm.*, 129, 73-77.
- Wakerly Z., Fell J.T., Attwood D., and Parkins D., 1996b. Pectin/Ethylcellulose film coating formulations for colonic drug delivery. *Pharm. Res.*, 13 (8), 1210-1212.
- Wakerly Z., Fell J., Attwood D., and Parkins D., 1997a. Studies on amidated pectins as potential carriers in colonic drug delivery. *J. Pharm. Pharmacol.*, 49, 622-625.
- Wakerly Z., Fell J.T., Attwood D., Parkins D., 1997b. Studies on drug release from Pectin/Ethylcellulose film-coated tablets: a potential colonic delivery system. *Int. J. Pharm.*, 153, 219-224.
- Wang X., and Gibson G.R., 1993. Effects of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *J. Appl. Bacteriol.*, 75, 373-380.
- Watts P.J., Barrow L., Steed K.P., Wilson C.G., Spiller R.C., Melia C.D., and Davies M.C., 1992. The transit rate of different-sized model dosage forms through the human colon and the effects of a lactulose-induced catharsis. *Int. J. Pharm.*, 87, 215-221.
- Watts P.J., Wilson C.G., Davies M.C., and Melia C.D., 1994. Radiolabelling of polymer microspheres for scintigraphic investigations by neutron activation. 4. A pharmacoscintigraphic study of colon-targeted Eudragit RS-sulphapyridine microspheres in human volunteers. *Int. J. Pharm.*, 102, 101-108.
- Watts P.J., and Illum L., 1997. Colonic drug delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 23 (9), 893-913.

- Wheatley T.A., and Steuernagel C.R., 1997. Latex emulsions for controlled drug delivery. In Aqueous polymeric coatings for pharmaceutical dosage forms, Mc Ginity J.W., Drugs and pharmaceutical science, 2<sup>nd</sup> ed., rev. and expanded, Marcel Dekker, Inc., New York-Basel-Hong Kong., Vol. 79, 1-54.
- Wieland O., 1974. Glycerol UV - Method. In Methods of enzymatic analysis, Vol. 3, 2<sup>nd</sup> English Edition, edited by Hans Ulrich Bergmeyer in collaboration with Karlfried Gawehn, Academic Press, Inc., New York, pp. 1404 - 1414.
- Wikberg M., Ulmius J., and Ragnarsson G., 1997. Review article: Targeted drug delivery in treatment of intestinal diseases. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 11, suppl. 3, 109-115.
- Wilding I.R., Davis S.S., Pozzi F., Furlani P., and Gazzaniga A., 1994. Enteric coated timed release systems for colonic targeting. *Int. J. Pharm.*, 111, 99-102.
- Willoughby C.P., Cowan R.E., Gould S.R., Machell R.J., and Stewart J.B., 1988. Double-blind comparison of olsalazine and sulphasalazine in active ulcerative colitis. *Scand. J. Gastroenterol.*, 23 (suppl. 148), 40-44.
- Wilson C.G., Washington N., Greaves J.L., Kamali F., Rees J.A., Sempik A.K., and Lampard J.F., 1989. Bimodal release of ibuprofen in a sustained-release formulation: a scintigraphic and pharmacokinetic open study in healthy volunteers under different conditions of food intake. *Int. J. Pharm.*, 50, 155-161.
- Wojciechowski C.L., and Fall R., 1996. A continuous fluorometric assay for pectin methylesterase. *Anal. Biochem.*, 237, 103-108.
- Wong D., Larrabee S., Clifford K., Tremblay J., Friend D.R., 1997. USP dissolution apparatus III (reciprocating cylinder) for screening of guar-based colonic delivery formulation. *J. Control. Rel.*, 47, 173-179.
- Yamamoto A., Taniguchi T., Rikyu K., Tsuji T., Fujita T., Murakami M., and Muranishi S., 1994. Effects of various protease inhibitors on the intestinal absorption and degradation of insulin in rats. *Pharm. Res.*, 11 (10), 1496-1500.

Yeh P.-Y., Berenson M.M., Samowitz W.S., Kopeckova P., Kopecek J., 1995. Site-specific drug delivery and penetration enhancement in the gastrointestinal tract. *J. Control. Rel.*, 36, 109-124.

Yuen K.H., Deshmukh A.A., Newton J.M., Short M., and Melchor R., 1993. Gastrointestinal transit and absorption of theophylline from a multiparticulate controlled release formulation. *Int. J. Pharm.*, 97, 61-77.