
Dépôt Institutionnel de l'Université libre de Bruxelles /
Université libre de Bruxelles Institutional Repository
Thèse de doctorat/ PhD Thesis

Citation APA:

Hamdani, J. (2005). *Développement de formes orales divisées à libération prolongée par la technique de la pellétisation thermoplastique* (Unpublished doctoral dissertation). Université libre de Bruxelles, Institut de pharmacie, Bruxelles.

Disponible à / Available at permalink : <https://dipot.ulb.ac.be/dspace/bitstream/2013/211027/4/b3c40639-9ce4-4aeb-9bde-21ac6997478b.txt>

(English version below)

Cette thèse de doctorat a été numérisée par l'Université libre de Bruxelles. L'auteur qui s'opposerait à sa mise en ligne dans DI-fusion est invité à prendre contact avec l'Université (di-fusion@ulb.be).

Dans le cas où une version électronique native de la thèse existe, l'Université ne peut garantir que la présente version numérisée soit identique à la version électronique native, ni qu'elle soit la version officielle définitive de la thèse.

DI-fusion, le Dépôt Institutionnel de l'Université libre de Bruxelles, recueille la production scientifique de l'Université, mise à disposition en libre accès autant que possible. Les œuvres accessibles dans DI-fusion sont protégées par la législation belge relative aux droits d'auteur et aux droits voisins. Toute personne peut, sans avoir à demander l'autorisation de l'auteur ou de l'ayant-droit, à des fins d'usage privé ou à des fins d'illustration de l'enseignement ou de recherche scientifique, dans la mesure justifiée par le but non lucratif poursuivi, lire, télécharger ou reproduire sur papier ou sur tout autre support, les articles ou des fragments d'autres œuvres, disponibles dans DI-fusion, pour autant que :

- Le nom des auteurs, le titre et la référence bibliographique complète soient cités;
- L'identifiant unique attribué aux métadonnées dans DI-fusion (permalink) soit indiqué;
- Le contenu ne soit pas modifié.

L'œuvre ne peut être stockée dans une autre base de données dans le but d'y donner accès ; l'identifiant unique (permalink) indiqué ci-dessus doit toujours être utilisé pour donner accès à l'œuvre. Toute autre utilisation non mentionnée ci-dessus nécessite l'autorisation de l'auteur de l'œuvre ou de l'ayant droit.

----- English Version -----

This Ph.D. thesis has been digitized by Université libre de Bruxelles. The author who would disagree on its online availability in DI-fusion is invited to contact the University (di-fusion@ulb.be).

If a native electronic version of the thesis exists, the University can guarantee neither that the present digitized version is identical to the native electronic version, nor that it is the definitive official version of the thesis.

DI-fusion is the Institutional Repository of Université libre de Bruxelles; it collects the research output of the University, available on open access as much as possible. The works included in DI-fusion are protected by the Belgian legislation relating to authors' rights and neighbouring rights. Any user may, without prior permission from the authors or copyright owners, for private usage or for educational or scientific research purposes, to the extent justified by the non-profit activity, read, download or reproduce on paper or on any other media, the articles or fragments of other works, available in DI-fusion, provided:

- The authors, title and full bibliographic details are credited in any copy;
- The unique identifier (permalink) for the original metadata page in DI-fusion is indicated;
- The content is not changed in any way.

It is not permitted to store the work in another database in order to provide access to it; the unique identifier (permalink) indicated above must always be used to provide access to the work. Any other use not mentioned above requires the authors' or copyright owners' permission.

Université Libre de Bruxelles
Institut de Pharmacie

Laboratoire de Pharmacie Galénique et de Biopharmacie

Professeur K. AMIGHI, promoteur
Professeur A.J. MOËS, copromoteur

B.P.A.H.

**DEVELOPPEMENT DE FORMES ORALES DIVISEES A
LIBERATION PROLONGEE PAR LA TECHNIQUE DE LA
PELLETISATION THERMOPLASTIQUE**

Jamila HAMDANI

Pharmacien

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

Bruxelles, avril 2005

Universite Libre de Bruxelles



003201897

Université Libre de Bruxelles
Institut de Pharmacie

Laboratoire de Pharmacie Galénique et de Biopharmacie

Professeur K. AMIGHI, promoteur
Professeur A.J. MOËS, copromoteur

**DEVELOPPEMENT DE FORMES ORALES DIVISEES A
LIBERATION PROLONGEE PAR LA TECHNIQUE DE LA
PELLETISATION THERMOPLASTIQUE**

Jamila HAMDANI

Pharmacien

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

Bruxelles, avril 2005



Remerciements

Lorsque l'on entreprend un travail de recherche, aussi modeste soit-il, on s'endette auprès de beaucoup de personnes. Qu'elles soient toutes ici vivement remerciées.

Je tiens en particulier à exprimer ma profonde gratitude au Professeur André Moës pour la confiance qu'il m'a accordée en m'accueillant dans son service et la rigueur avec laquelle il a suivi mon travail. Je tiens également à lui témoigner toute mon admiration devant sa grande qualité scientifique.

J'adresse mes plus vifs remerciements au Professeur Karim Amighi, qui a supervisé de près ce travail. Je le remercie pour sa disponibilité, ses nombreux conseils ainsi que les moyens qu'il a mis en œuvre pour le bon déroulement de ce travail. Je lui témoigne toute ma reconnaissance.

Je tiens également à remercier les Professeurs Luc Delattre et Michel Devleeschouwer pour leur contribution à la supervision de ce travail. Je remercie tout particulièrement le Professeur Luc Delattre ainsi que toute son équipe pour avoir généreusement mis leurs équipements à ma disposition.

Je suis également redevable au Docteur Marianne Oth et à Monsieur Philippe Scieur pour l'accueil chaleureux qu'ils m'ont réservé au sein de leur laboratoire (Eli Lilly, Mont-Saint-Guibert) ainsi que pour les équipements mis à ma disposition.

Je remercie vivement Madame Tiriana Segato ainsi que Messieurs L. Szabo et Patrizio Madau pour leur précieux support technique au sein du laboratoire de Chimie Industrielle de l'ULB, ainsi que pour leur gentillesse et disponibilité.

Je remercie également le Professeur Jean Nève ainsi que son équipe pour avoir gentiment mis à ma disposition leur spectrofluorimètre.

Je remercie la société Gattefossé pour les produits mis généreusement à notre disposition.

Je tiens aussi à remercier le docteur François Dufrasne pour m'avoir prêté sa caméra numérique afin d'effectuer les essais de comptage des microbilles flottantes.

Je n'oublie pas mes collègues de travail, membres du service de Pharmacie Galénique et Biopharmacie, pour la part qu'ils ont prise à l'élaboration de ce travail. Ainsi que pour leurs encouragements et leur soutien.

Je remercie plus particulièrement Monsieur Jonathan Goole pour son aide, sa gentillesse et sa disponibilité.

Je remercie également Mesdames Rita Cesaratto et Stéphanie Pochet ainsi que Monsieur Claude Durand.

Une pensée particulière va à ma maman et mes remerciements à mon papa ainsi qu'à ma famille pour leur amour et soutien inconditionnels depuis toujours.

Enfin, mes remerciements, chargés d'émotion et d'amour vont à :

Pierre, mon mari, qui depuis quelques années m'entoure de ses attentions, de son soutien, de son affection et de son merveilleux sens de l'humour. Je le remercie pour tout ce qu'il m'apporte affectueusement, mais également pour les nombreux échanges scientifiques que nous avons eus à propos de ce travail.

Norah, notre petit soleil qui éclaire nos vies, à son papa et à moi, de ses sourires et gazouillis depuis quelques mois.

I.	Résumé.....	5
II.	Introduction.....	7
II.1	Les Formes Divisées à Libération Prolongée.....	8
II.1.1.	Généralités sur les formes à libération prolongée	8
II.1.2.	L'intérêt des formes divisées à libération prolongée	12
II.2	Les Formes Divisées Flottantes.....	15
II.2.1.	Historique	15
II.2.2.	Quelques rappels sur la physiologie du tractus gastro-intestinal et la vidange gastrique	18
A.	Le tractus gastro-intestinal	18
B.	La vidange gastrique	21
II.2.3.	Les différentes approches des formes flottantes	25
A.	Les formes monolithiques flottantes	25
B.	Les formes divisées flottantes	26
B.1.	Les systèmes basés sur l'utilisation d'agents non-effervescents	26
B.2.	Les systèmes basés sur l'utilisation d'agents effervescents	29
II.2.4.	L'approche retenue.....	31
II.3	La Pelletisation Thermoplastique.....	32
II.3.1.	Historique	32
II.3.2.	De la granulation à la pelletisation thermoplastique	33
II.3.3.	Equipements	41
A.	Influence du bras du mélangeur et du chopper	43
B.	Influence de la double paroi	46
II.3.4.	Conclusion.....	46
III.	Partie Expérimentale	48
III.1	Caractérisation Physico-Chimique des Corps Gras Utilisés	48
III.1.1.	Introduction	48
III.1.2.	Matériels et méthodes.....	52
A.	Les produits utilisés.....	52
B.	Préparation des échantillons.....	53
C.	Analyses par calorimétrie différentielle à balayage (DSC).....	54
D.	Analyses par microscopie sur platine chauffante (HSM).....	58
E.	Analyses par diffraction aux rayons X (DRX).....	60

F. Etude des caractéristiques rhéologiques du Compritol® et du Précirol® en fonction de la température	62
III.1.3. Résultats et discussion.....	64
III.1.4. Conclusion.....	86
III.2 Mise au Point d'une Forme Divisée à Libération Prolongée par la Méthode de la Pelletisation Thermoplastique	87
III.2.1. Introduction	87
III.2.2. Matériels et méthodes.....	88
A. Produits utilisés	88
B. La diffraction laser	90
C. Les équipements de granulation.....	92
C.1. Le Pellmix P/L 1/8.....	92
C.2. Le Mi-Pro®	93
D. La caractérisation des microbilles	96
D.1. L'analyse granulométrique.....	96
D.2. La microscopie électronique à balayage.....	97
D.3. Le dosage des principes actifs incorporés dans les microbilles	97
D.4. Les tests de dissolution in vitro	98
D.5. L'évaluation de la stabilité des microbilles	99
III.2.3. Résultats et discussion.....	100
A. Les microbilles fabriquées en utilisant le Pellmix P/L 1/8.....	100
A.1. La formulation adoptée et les conditions de fabrication	100
A.2. Analyses par microscopie électronique à balayage	103
A.3. Analyses granulométriques des microbilles par tamisage.....	106
A.4. Essais de dissolution in vitro	109
B. La mise au point de microbilles à libération prolongée en utilisant le mélangeur granulateur Mi-Pro®	110
B.1. Analyses granulométriques des microbilles par tamisage	121
B.2. Analyses par microscopie électronique à balayage	123
B.3. Analyses par microscopie électronique couplée à la diffraction RX (microscopie-RX).....	125
B.4. Essais de dissolution in vitro	128
B.4.1. Essais de dissolution relatifs aux microbilles contenant du chlorhydrate de phényléphrine	128

B.4.2. Développement de microbilles lipidiques de chlorhydrate de ciprofloxacine, de kétoprofène et de théophylline	130
B.4.3. Transposition d'échelle : essai effectué sur un mélangeur granulateur d'une capacité de 25 l.....	134
B.4.4. L'effet des sels biliaires et de la lipase sur les profils de libération de principes actifs incorporés dans les microbilles lipidiques	135
C. Les études de stabilité menées sur les microbilles	138
C.1. Etudes de la stabilité des microbilles contenant du chlorhydrate de phényléphrine	138
C.2. Etudes de la stabilité des microbilles contenant du chlorhydrate de ciprofloxacine.....	147
III.2.4. Conclusion.....	152
III.3 Essais de Mise au Point et Évaluation d'une Forme Divisée Flottante.....	156
III.3.1. Introduction	156
III.3.2. Matériels et méthodes.....	158
A. Produits utilisés	158
B. Le mélangeur granulateur à haute vitesse	158
C. L'appréciation de la flottabilité des microbilles.....	159
C.1. Le poids résultant.....	159
C.2. Le comptage des microbilles	164
D. La microscopie électronique à balayage	164
E. Les tests de dissolution in vitro	164
III.3.3. Résultats et discussion.....	165
A. Les conditions de fabrication des microbilles	165
B. Le récapitulatif des essais d'orientation	166
B.1. Essais impliquant une augmentation de la quantité de corps gras dans la formulation	167
B.2. Essais impliquant l'incorporation d'un polymère cellulosique dans la formulation	168
C. Les formulations retenues	177
C.1. Comparaison des résultats obtenus à partir de la formulation placebo (Flott 16) et de la formulation au chlorhydrate de ciprofloxacine (Flott 17)	182
C.2. Les microbilles flottantes de chlorhydrate de tétracycline (Flott 18 et 19) et de théophylline (Flott 20)	186

D.	Evaluation in vitro et in vivo de microbilles flottantes de riboflavine.....	193
D.1.	Introduction	193
D.2.	Les formulations à base de riboflavine.....	194
D.3.	Les résultats de dissolution in vitro des formulations RFF et RFNF	196
D.4.	L'estimation de la capacité de flottabilité des microbilles in vitro	198
D.5.	L'estimation de la flottabilité des microbilles in vivo.....	200
D.5.1.	Protocole expérimental.....	200
D.5.2.	Résultats et discussion.....	203
D.5.3.	Conclusion.....	210
III.3.4.	Conclusion.....	211
IV.	Conclusion Générale	213
V.	Bibliographie.....	217
VI.	Annexes.....	231

I. Résumé

L'étude des caractéristiques physico-chimiques du Compritol® (béhénate de glycérol) et du Précirol® (palmito-stéarate de glycérol) a été effectuée. Les méthodes d'évaluation consistaient en la calorimétrie différentielle à balayage, la microscopie sur platine chauffante et la rhéologie dans un rhéomètre capillaire à pression variable. Cette étude a montré une évolution de la structure cristalline de ces deux corps gras en fonction du temps et de la température de stockage. En effet, ces composés, après fusion et refroidissement, « recristallisent » sous une structure partiellement amorphe, qui évolue avec le temps en structure cristalline. Il est également ressorti de cette évaluation que ces deux excipients lipidiques présentent des plages de fusion bien distinctes. Cette caractéristique est conservée lorsqu'ils sont en mélanges binaires. Enfin, ces corps gras se déforment sous l'action de fortes forces de cisaillement à des températures inférieures à leurs plages de fusion.

L'utilisation du Compritol® et du Précirol® comme corps gras lipophiles pour former des microbilles à libération prolongée a alors été envisagée. Nous avons procédé moyennant une technique de fabrication simple et rapide appelée « la pelletisation thermoplastique ». Il s'agit d'un procédé en une étape qui met à profit le pouvoir liant des corps gras facilement fusibles et se passe ainsi de l'usage de l'eau ou de solvants organiques. L'appareillage utilisé est de type mélangeur granulateur à haute vitesse.

Nous nous sommes basés sur les renseignements fournis par l'étude de préformulation afin d'optimiser les conditions de fabrication des microbilles. Le contrôle de la température du mélange est très important pour la réussite du procédé de pelletisation thermoplastique. La vitesse du bras du mélangeur, la température de la double paroi et le temps de sphéronisation constituent les paramètres clés pour réussir la pelletisation du mélange. Nous avons mis au point des formulations contenant 15% (m/m) de Précirol® et une quantité croissante de Compritol® variant de 3 à 65 % (m/m). La libération du chlorhydrate de phényléphrine, employé comme agent traceur, a déjà été ralentie pour les formulations contenant 25 % (m/m) de corps gras. Face à ces résultats encourageants, nous avons mis au point des formulations contenant 75 % (m/m) de différents principes actifs (chlorhydrate de ciprofloxacine, théophylline et kétoprofène) et 25 % (m/m) de corps gras. Ces formulations ont abouti à la fabrication de microbilles à libération prolongée. Une étude de stabilité menée sur certaines

des formes finies a montré la stabilité des microbilles lipidiques pour autant que le principe actif incorporé dedans ne soit par lui-même facilement dégradable.

Afin d'élargir le champ d'application du procédé de fabrication, nous avons mis au point des microbilles flottantes à libération prolongée. Les formulations proposées contiennent comme excipients : les deux corps gras, un mélange effervescent (bicarbonate sodique/ acide tartrique) et du Methocel K100. Leur flottabilité a été prouvée *in vitro* sur une période de plus de huit heures et *In vivo* par administration de microbilles de riboflavine flottantes *versus* non flottantes à des volontaires humains sains.

II. Introduction

L'évolution de la technologie pharmaceutique a mis à la disposition du formulateur des techniques plus ou moins sophistiquées lui permettant d'aboutir à des formes à libération prolongée ou mieux encore, contrôlée, moyennant des procédés de fabrication de plus en plus simples et rapides.

Le contrôle de la libération d'un principe actif incorporé dans une forme galénique stimule l'imagination des chercheurs depuis une trentaine d'années. Ainsi différentes formes galéniques ont été mises au point, à commencer par les systèmes matriciels polymériques, les systèmes matriciels lipophiles, les systèmes osmotiques en passant par les systèmes flottants ou encore les systèmes bioadhésifs (Buri et col. 1985).

Un tel foisonnement de formulations à libération contrôlée et/ou prolongée s'est nécessairement accompagné d'un développement des techniques de fabrication.

Nous avons été séduits lors du choix de ce sujet de recherche par une technique que nous nommerons : la pelletisation thermoplastique. Cette technique, simple et rapide, nous a permis de mettre au point, en une étape, des microbilles à libération prolongée. Nous avons par la suite tenté de développer par cette même technique des microbilles flottantes à libération prolongée.

Mais avant la mise au point de ces formes, une étude de pré-formulation fut menée afin d'évaluer au mieux les caractéristiques physico-chimiques des excipients lipidiques utilisés, de manière à optimiser le procédé de fabrication et les cinétiques de libération des principes actifs étudiés.

Cette partie introductive commencera par rappeler l'intérêt des formes divisées à libération prolongée ainsi que celui des formes flottantes ; elle se terminera par l'abord du principe de fabrication des microbilles par le procédé de la pelletisation thermoplastique.

II.1 Les Formes Divisées à Libération Prolongée

II.1.1. Généralités sur les formes à libération prolongée

Les formes à libération prolongée intéressent les chercheurs depuis de nombreuses années. L'utilisation de ces systèmes qui ne relâchent pas immédiatement leur contenu, permet d'optimiser la délivrance de certains principes actifs dans l'organisme. En effet, si l'absorption du médicament est contrôlée par sa vitesse de libération à partir de la forme galénique, il est possible d'obtenir une concentration plasmatique constante en principe actif. En effet, si la valeur de la constante de vitesse de libération k_r du principe actif à partir de la forme est inférieure à la valeur de la constante d'absorption k_A au niveau du tractus gastro-intestinal (TGI), on peut dire que les concentrations plasmatiques obtenues sont directement déterminées par les caractéristiques de libération imposées par la forme galénique. Ce raisonnement est illustré par la figure 1.

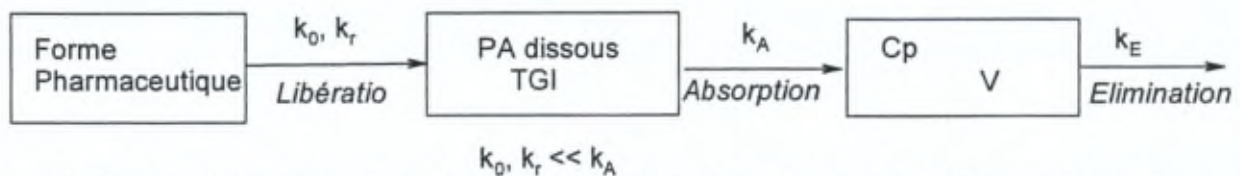


Figure 1 : Représentation schématique de la cinétique de libération d'un principe actif incorporé dans une forme pharmaceutique. k_0 : constante de vitesse de libération suivant une cinétique d'ordre zéro ; k_r : constante de vitesse de libération selon une cinétique d'ordre 1 ; k_A : constante de vitesse d'absorption ; C_p : concentration plasmatique en principe actif ; V : volume de distribution ; k_E : constante d'élimination (Moës, 1989 ; Chiao et Robinson, 1995)

Ainsi, une libération immédiate à partir de la forme pharmaceutique implique que k_0 ou $k_r \gg k_A$, à ce moment, c'est l'absorption à travers la membrane biologique (l'épithélium intestinal par exemple) qui constitue l'étape limitante. Dès lors, ce type de forme conventionnelle à libération rapide nécessite l'administration de doses répétées à intervalles de temps réguliers. On obtient alors des taux plasmatiques en principe actif variables pouvant osciller entre des concentrations toxiques et des valeurs inefficaces.

Par contre, pour une forme à libération prolongée où $k_0, k_r \ll k_A$, c'est la cinétique de libération du principe actif à partir de la forme qui constitue l'étape limitante. Une forme à

libération prolongée offre dès lors la possibilité de maintenir un taux plasmatique en substance active constant et entrant dans l'index thérapeutique de la substance. D'autres avantages non négligeables consistent en la suppression des pics plasmatiques, ce qui réduit sensiblement les effets secondaires indésirables, mais aussi en la diminution du nombre de prises journalières, ce qui permet d'améliorer la compliance du patient.

Il est toutefois important de souligner que la durée d'action d'un principe actif dépend essentiellement d'un certain nombre de paramètres pharmacocinétiques et pharmacologiques qui sont propres à la molécule (Gueurten, 1982 ; Silber et col., 1987 ; Welling et Dobrinska, 1987). Les formes à libération prolongée se destinent à :

- ✓ Des molécules à courte demi-vie plasmatique : elle doit être inférieure à six heures. Les médicaments dont le temps de demi-vie est supérieur à 10-12 h n'ont aucune raison d'être placés dans une forme à libération prolongée.
- ✓ Des molécules ne nécessitant pas l'administration de fortes doses. En effet, certaines molécules à temps de demi-vie court nécessitent une dose thérapeutique unitaire élevée. Or, étant donné que la quantité de médicament contenue dans une forme à libération prolongée est généralement deux à trois fois supérieure à la dose correspondante pour une forme à libération rapide. On aboutit alors à une forme trop volumineuse difficilement ingérable par le patient.
- ✓ Des molécules solubles dans l'eau. En effet, les molécules à faible solubilité aqueuse seront écartées de ce type de formulation puisque la diffusion constitue le mécanisme de libération majeur de ces formes. Or la dissolution de la molécule constitue une étape indispensable avant sa diffusion à travers la forme pharmaceutique. Les molécules utilisées le seront donc sous forme de sels ou d'esters solubles dans l'eau.
- ✓ Des molécules dont la résorption ne se limite pas aux portions supérieures du TGI : ce type de molécules verraient alors leur biodisponibilité réduite puisque le passage à travers la zone d'absorption optimale risquerait d'être trop bref. Pour ce type de produits, un système à rétention gastrique serait plus approprié.
- ✓ Des molécules dont l'effet de premier passage hépatique est limité. En effet, cette métabolisation s'effectuant essentiellement selon un processus enzymatique saturable, un ralentissement de la libération du principe actif peut conduire à une réduction de sa biodisponibilité.

Parmi les systèmes à libération prolongée destinés à la voie orale, nous nous limiterons à citer les systèmes matriciels étant donné que c'est ce type de matrice qui nous intéresse particulièrement d'un point de vue expérimental. Un système matriciel implique l'inclusion du principe actif dans une matrice. Celle-ci peut être une matrice hydrophile, lipophile ou inerte.

- ❖ Les matrices hydrophiles : comme leur nom l'indique, ce sont des matrices constituées de principes actifs et d'excipients hydrophiles (hydrocolloïdes). Comme des polymères cellulosiques, des gommes hydrophiles ou encore des polymères de l'acide acrylique. Ce sont les polymères cellulosiques de type hydroxypropylméthylcellulose qui sont les plus utilisés. Grâce à leur pouvoir gélifiant, ils gonflent au contact des liquides du TGI. Au fur et à mesure de la pénétration du liquide à travers la matrice, nous assistons d'une part à une dissolution du principe actif et d'autre part au gonflement du polymère hydrophile. Le principe actif est libéré par diffusion à travers la barrière gélifiée.
- ❖ Les matrices lipidiques : ce sont des matrices constituées d'excipients lipophiles (corps gras). De nombreux excipients entrent dans cette catégorie. Citons les glycérides (mono, di ou triglycérides), les esters d'acides gras et de glycérol (dont font partie les excipients utilisés dans notre développement), les cires, les alcools gras et les huiles (huile de ricin hydrogénée). Le mécanisme de libération du principe actif est généralement admis comme étant la diffusion. Cependant, il n'est pas exclu que d'autres mécanismes puissent également intervenir, comme l'érosion progressive de la matrice sous l'action d'enzymes digestives ou encore la saponification des acides gras en milieu intestinal.
- ❖ Les matrices inertes : ce sont des matrices utilisant des polymères insolubles, insensibles au pH et aux enzymes présentes dans le tube digestif. Citons à titre d'exemples les dérivés du polyéthylène, de l'éthylcellulose, les copolymères d'esters méthacryliques ou encore le chlorure de polyvinyle. Ces matrices sont indéformables et la libération du principe actif s'effectue par diffusion à travers un réseau de canalicules qui s'intensifie au cours de la dissolution du principe actif.

La libération du principe actif contenu dans les systèmes matriciels décrits ci-dessus s'effectue essentiellement par diffusion. Comme nous l'avons évoqué précédemment, à ce

phénomène de diffusion peut s'ajouter un phénomène d'érosion pour les matrices lipidiques. La figure 2 montre de manière schématique la libération d'un principe actif incorporé dans un système matriciel par *diffusion* et *érosion*.

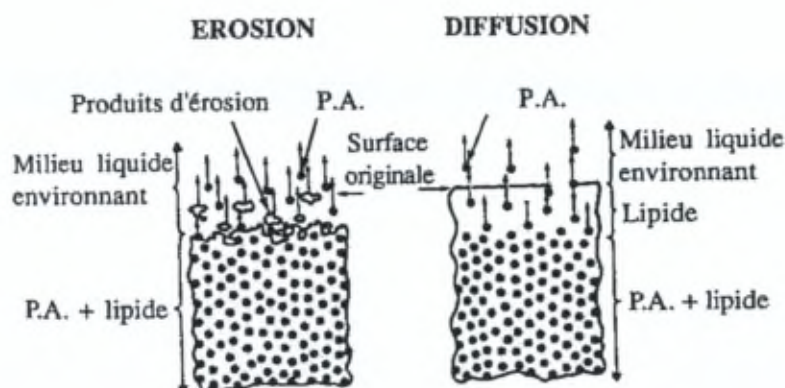


Figure 2 : Représentation schématique de la libération d'un principe actif (P.A) incorporé dans un système matriciel par un mécanisme d'érosion et de diffusion (Dandelot, 1990)

Dans le cas où les excipients incorporés dans la matrice grasse sont peu sensibles à l'érosion, la libération du principe actif sera uniquement régie par la diffusion. L'équation d'Higuchi peut alors être d'application :

$$Q = [(D \cdot \varepsilon / \tau) \times (2 A - \varepsilon C_s) \cdot C_s \cdot t]^{1/2}$$

Q : la quantité de principe actif libérée après un temps t, par unité de surface exposée

A : la concentration en principe actif dans la matrice

D : le coefficient de diffusion dans le milieu de libération

τ : la tortuosité de la matrice

ε : la porosité de la matrice

C_s : la solubilité du principe actif dans le milieu

Les excipients lipidiques que nous avons utilisés lors de la fabrication de nos microbilles sont des esters d'acide gras et de glycérol à longues chaînes carbonées ; ils libèrent le principe actif essentiellement par diffusion (Bidah et col. 1992 ; Aïnaoui et col. 1997 ; Aïnaoui et col. 1998).

II.1.2. L'intérêt des formes divisées à libération prolongée

Les formes divisées à libération prolongée connaissent un intérêt croissant pour les avantages qu'elles présentent par rapport aux formes monolithiques et aux formes à libération immédiate. On observe ainsi :

- une diminution du risque de présence en grande concentration du principe actif dans une région particulière du tractus gastro-intestinal (TGI), diminuant ainsi une irritation potentielle de celle-ci ;
- une diminution des variabilités inter et intra-individuelles des temps de résidence gastrique et de transit gastro-intestinal ;
- une diminution de l'influence de l'état nutritionnel du patient sur la biodisponibilité du principe actif ;
- comme pour toute forme à libération prolongée, un maintien des taux plasmatiques désirés en principe actif pendant une période prolongée. Ceci permettant de diminuer à la fois le nombre de prises journalières et les effets secondaires dus aux pics plasmatiques, et de favoriser la compliance.

De tous ces points, c'est sans doute la diminution des variabilités inter et intra-individuelles des temps de résidence gastrique et de transit gastro-intestinal qui constitue un avantage remarquable des formes divisées comparativement aux formes unitaires. L'utilisation des méthodes non invasives d'investigation, basées sur le marquage des formes pharmaceutiques par des radioéléments de courte demi-vie et l'emploi de la scintigraphie gamma ont permis de comparer le cheminement des formes pharmaceutiques divisées et unitaires le long du TGI.

Cette technique a permis de tirer les informations suivantes concernant le transit des formes pharmaceutiques le long du TGI. Comme nous le verrons dans le chapitre II.2.2, l'état nutritionnel du sujet, ainsi que la nature du repas (apport calorique, volume) ont une grande influence sur la vidange gastrique des formes unitaires et dans une moindre mesure sur celle des formes divisées. (Hunter et col., 1982 ; Davis et col., 1984a ; Davis 1986, Moës, 1989 ; Follonier et Doelker, 1992) :

- A jeun : la durée de transit gastrique d'une forme monolithique est variable et tout à fait imprévisible (15 à 200 min).
- La prise d'un repas influe grandement sur la durée de transit gastrique d'une forme monolithique ; celle-ci peut séjourner jusqu'à 10 h dans l'estomac lorsqu'elle est administrée à la suite d'un repas consistant (figure 3).
- A jeun : les solutions et les microbilles (diamètre : 0,8 à 1,5 mm) sont rapidement vidangées de l'estomac. Les microbilles sortent groupées de l'estomac (en bolus) ; leur dispersion est faible durant leur transit dans l'intestin grêle ; elle s'accroît après le passage de la valve iléo-caecale.
- Les microbilles et les autres formes divisées de taille inférieure à 5 mm administrées après un repas voient leur temps de vidange gastrique différé ($t_{50\%}$ avoisinant les 80 min) mais non bloqué. Dans ces conditions, une dispersion de ces formes divisées s'effectue dans l'intestin grêle puis dans le colon.
- Le transit dans l'intestin grêle est constant et indépendant du type de formes pharmaceutiques administrées ainsi que de l'état nutritionnel du patient (à jeun ou non). La durée moyenne de ce transit est estimée à $3 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$.
- Les formes monolithiques non délitées peuvent stationner pendant de longues périodes (4 à 12 h) au niveau de la valve iléo-caecale avant de pénétrer dans le colon.

La physiologie du tractus gastro-intestinal et en particulier la vidange gastrique ont une grande influence sur l'absorption des principes actifs et par là même leur biodisponibilité. Nous aborderons ces éléments dans la section suivante relative aux formes à libération contrôlée de type formes flottantes.

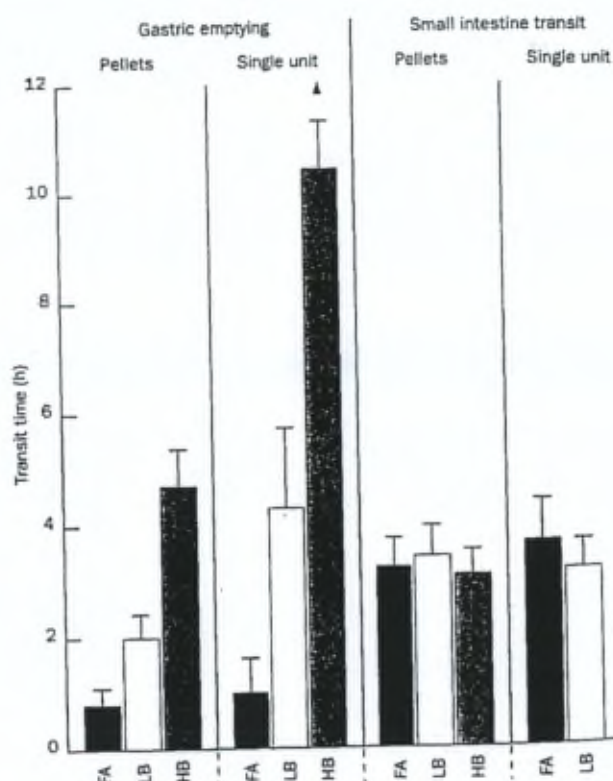


Figure 3 : Influence de l'état nutritionnel du sujet sur la vidange gastrique et le transit dans l'intestin grêle des formes divisées (pellets) et unitaires (single unit). FA : « fasted » à jeun ; LB : « light breakfast » petit déjeuner léger ; HB : « heavy breakfast » petit déjeuner consistant (Davis, 1986)

Si l'avantage des formes divisées comparativement aux formes monolithiques est largement admis, les techniques de fabrication des formes divisées sont souvent fastidieuses et coûteuses. Actuellement, les microbilles sont généralement fabriquées par la technique d'extrusion/sphéronisation, suivie par des étapes d'enrobage et de séchage. Cela implique la multiplication des étapes de fabrication avec l'impact financier supposé pour l'industrie pharmaceutique. C'est la raison pour laquelle nous avons investigué une nouvelle voie qui se dessine depuis quelques années dans la fabrication des microbilles, à savoir la voie de la pelletisation thermoplastique.

II.2 Les Formes Divisées Flottantes

II.2.1. Historique

Les formes orales à libération prolongée ont connu un essor et un développement importants durant les trente dernières années mais elles ne se destinent pas à toutes les molécules médicamenteuses. Ainsi, ces formes galéniques ne répondent particulièrement pas aux exigences de résorption des molécules présentant une fenêtre d'absorption étroite située dans la partie supérieure du tractus gastro-intestinal (TGI). Ces médicaments, à cause d'un temps de séjour réduit dans ce segment du TGI, voient leur résorption fâcheusement diminuée. C'est l'une des raisons majeures qui fut à l'origine de la conception de formes pharmaceutiques à rétention gastrique (FRG) ou en anglais : « Gastroretentive Dosage Forms ». Plusieurs types de molécules médicamenteuses peuvent profiter de ce concept ; notamment, celles présentant les caractéristiques suivantes :

- Les médicaments ayant une action locale au niveau stomacal : les anti-acides, le misoprostol, analogue des prostaglandines E1 comme cytoprotecteur de la muqueuse gastrique (Oth et col., 1992) , les antibiotiques destinés à l'éradication de *l'Helicobacter pylori* dans le cadre du traitement de l'ulcère gastrique. Citons à titre d'exemple : la tétracycline, l'amoxicilline, la clarithromycine (Burton et col. ; 1995 ; Patel et col., 1996 ; Whitehead. 1998a).
- Les médicaments dont l'absorption débute au niveau de l'estomac comme l'albuterol (Moës, 1993).
- Les médicaments dont la solubilité est accrue en milieu acide, comme les bases faibles ; ex. : le chlordiazepoxide, la cinnarizine (Moës, 1993).
- Les médicaments présentant une fenêtre d'absorption étroite située au niveau de la partie supérieure de l'intestin (duodénum, jéjunum), comme le furosémide (Chungi et col. 1979), la riboflavine (Ingani, 1987a ; Hoffman et col., 2004) ou la lévodopa (Seth et Tossounian., 1984 ; Hoffman et col., 2004).
- Les médicaments qui se dégradent au niveau du colon comme le métoprolol (Moës, 1993).

Par contre, il va sans dire que les molécules médicamenteuses irritantes pour l'estomac ou dégradables en milieu acide ne se destinent pas à une FRG.

Différentes approches ont été proposées dans le concept des FRG (Moës, 1993 ; Hwang et col., 1998 ; Singh et col., 2000, Soppimath et col., 2001). Nous citerons à titre d'exemples :

- ❖ Des systèmes flottants à faible densité : ces systèmes ont une densité inférieure à celle du liquide gastrique, c'est-à-dire inférieure à 1,004, ce qui leur permet de flotter au-dessus du contenu stomacal et d'augmenter ainsi leur temps de résidence gastrique.
- ❖ Des formes expansibles : ce sont des formes qui, du fait de leur grande taille, ne passent pas le sphincter pylorique reliant l'estomac au duodénum. Ces systèmes acquièrent leur taille définitive en gonflant ou en se dépliant *in situ*.
- ❖ Des systèmes à haute densité : ils se logent dans l'antré de l'estomac, échappant ainsi à la vidange gastrique ; ils contiennent généralement des substances inertes de haute densité comme le sulfate de baryum, l'oxyde de zinc ou le dioxyde de titane.
- ❖ Des systèmes muco-adhésifs : ils se composent de polymères (ex. : polymères de l'acide acrylique) capables d'adhérer à la surface des cellules épithéliales du système gastro-intestinal (GI). Cette adhésion est basée sur l'établissement de liaisons hydrogènes et électrostatiques entre le polymère et le réseau glycoprotéinique du mucus ; elle est favorisée par l'hydratation du polymère au niveau muco-épithélial.

De tous ces concepts, c'est celui des formes flottantes qui a retenu particulièrement l'attention des chercheurs, les autres concepts ayant montré davantage d'inconvénients. En effet, les formes muco-adhésives se révèlent être irritantes ; elles peuvent provoquer une ulcération des cellules épithéliales gastriques. De plus, ces formes ont montré une efficacité limitée pour prolonger le temps de résidence gastrique. Elles sont actuellement réservées à d'autres voies d'administration comme la voie buccale, nasale ou vaginale. Pour ce qui est des formes à haute densité, seules les formes multiples nommées « microbilles lourdes » ou « heavy pellets » parviennent à rester logées de façon durable dans l'antré stomacal et pas les formes monolithiques. De plus, il n'y a pas eu suffisamment de publications vantant les mérites de leur efficacité comme FRG. Enfin, les formes expansibles présentent des temps de résidence gastrique longs (jusqu'à 24 h), si bien qu'il peut arriver que plusieurs unités se retrouvent simultanément dans l'estomac avec un risque de surdosage pour le patient. (Moës, 1993, Klausner et col., 2003).

Le concept des formes flottantes semble avoir vu le jour à la fin des années 60 (Singh et col., 2000) lorsque Davis, en 1968, proposa les premières pilules qui gonflent dans un milieu

aqueux et présentent une densité inférieure à 1,0 g/ml de manière à favoriser leur flottabilité à la surface de l'eau. Depuis, de nombreuses approches se sont développées dans l'optique de mettre au point un système flottant « idéal ». C'est à la fin des années 70 que des concepts concrets et efficaces de formes flottantes, qui de plus offraient une possibilité de libération prolongée du principe actif, furent relatés dans la littérature. Le mérite en revient essentiellement à l'équipe de Seth et Tossounian qui déposa plusieurs brevets à ce propos (Seth et Tossounian, 1975 ; Seth et Tossounian, 1979). La flottabilité des formes élaborées par cette équipe repose sur l'incorporation d'un polymère hydrophile en mélange homogène avec le principe actif. Les polymères généralement employés sont de nature cellulosique (méthylcellulose, hydroxypropylméthylcellulose, hydroxypropylcellulose). Au contact du liquide gastrique, les particules d'hydrocolloïde de la partie externe du comprimé s'hydratent et forment une barrière gélifiée qui d'une part, diminue la densité du comprimé et d'autre part, libère progressivement le médicament au fur et à mesure de sa dissolution. D'autres approches furent également tentées afin de diminuer la densité de ces formes. Des chercheurs ont ainsi proposé divers systèmes dont la plupart acquièrent leur faible densité *in situ* grâce à un système de microréservoirs d'air ou de gaz, jouant le rôle de « flotteur » (Buri et col., 1985). Cependant, c'est l'approche basée sur l'incorporation de polymères hydrophiles dans la formulation qui rencontra le plus de succès, aboutissant même à l'application de ce principe à des gélules et à la commercialisation de celles-ci sous la dénomination de gélules HBS pour « Hydrodynamically Balanced System ». Ainsi, des gélules HBS de lévodopa, associée au bensérazide, existent encore sur le marché ; elles sont commercialisées par la firme Roche sous le nom déposé de Prolopa® HBS 125.

II.2.2. Quelques rappels sur la physiologie du tractus gastro-intestinal et la vidange gastrique

Si la voie orale reste la voie de prédilection pour l'acheminement des substances actives médicamenteuses vers la circulation systémique, de manière simple et à la portée de tout un chacun, ce mode d'administration est fort dépendant de la physiologie du TGI. C'est cette relation que nous tenterons d'exposer dans la section suivante.

A. Le tractus gastro-intestinal

Une description schématique du tractus gastro-intestinal est reprise par la figure 4. La capacité plus ou moins grande d'absorption des différents segments du TGI y est représentée par la graduation des nuances de gris. Plus foncée est la région, plus grandes sont ses capacités de résorption du principe actif. La partie proximale de l'intestin grêle apparaît dès lors comme étant une zone de forte absorption, justifiant par là même l'intérêt porté aux formes à rétention gastrique.

L'intestin grêle est un organe qui mesure en moyenne 2,5 cm de diamètre et environ 6,35 m de longueur. Il prend naissance au sphincter pylorique, s'enroule dans la partie centrale et inférieure de la cavité abdominale et s'ouvre sur le gros intestin. Cet organe peut être considéré comme étant **le site d'absorption** par excellence de l'eau, des ions, des nutriments et d'un grand nombre de substances médicamenteuses. En effet, près de 90 % de toute l'absorption a lieu en cet organe grâce à la présence de *microvillosités*, de *villosités* et de *valvules conniventes* qui accroissent considérablement sa surface d'absorption. Celle-ci dépasse les 100 m², alors que la surface de résorption totale du colon est d'environ 1 m². L'intestin grêle est divisé en trois segments : le duodénum ($\pm$ 25 cm de longueur), le jéjunum ($\pm$ 2,5 m de longueur) et l'iléon ($\pm$ 3,6 m de longueur). Comme nous pouvons l'observer dans la figure 4, la plus grande capacité d'absorption est située au niveau du duodénum et du jéjunum, car la taille des valvules conniventes et des villosités diminue au fur et à mesure que l'on tend vers l'extrémité distale de l'iléon.

Le colon représente un faible site d'absorption comparé à l'intestin grêle ; seuls l'eau, les électrolytes et certaines substances comme les peptides y sont résorbés. Quant à l'estomac, il est plutôt considéré comme étant l'organe de digestion par excellence ; sa paroi est en effet imperméable au passage de la plupart des substances dans le sang.

Cependant, il participe à l'absorption d'une certaine quantité d'eau, d'électrolytes, de l'alcool et de certains médicaments comme l'acide acétylsalicylique (Tortora et Grabowski, 1994 ; Mayersohn, 2002 ; Klausner et col., 2003).

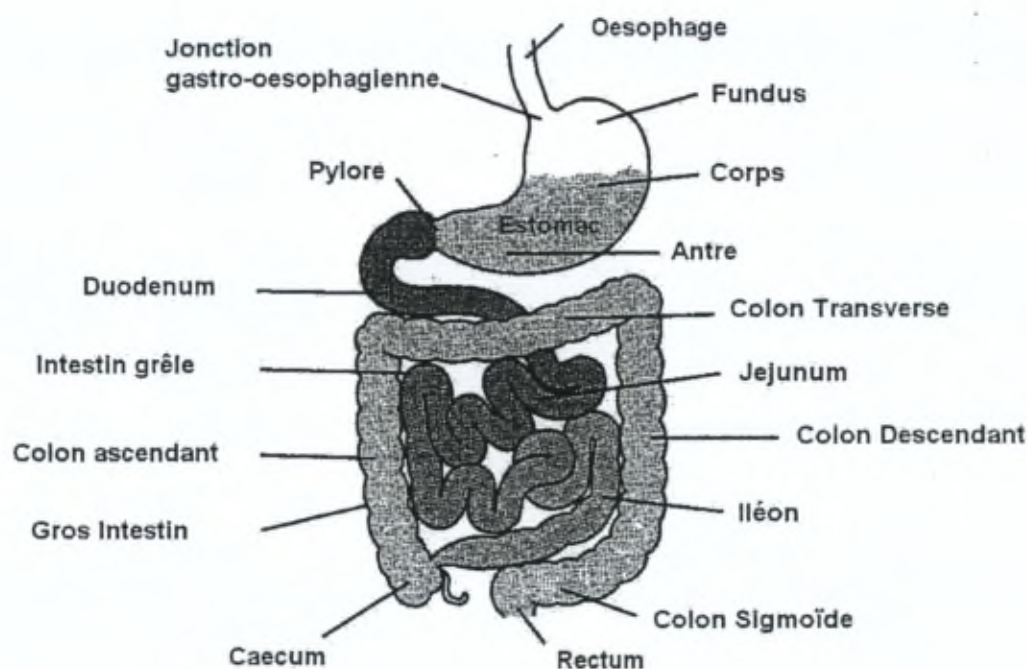


Figure 4 : Représentation du tractus gastro-intestinal chez l'Homme (Hwang et col., 1998)

L'une des caractéristiques du TGI est que la nourriture ingérée par un sujet séjournera dans chaque segment de celui-ci pendant une durée variable. Le tableau 1 reprend des données estimant ces différents temps de séjour. Le tableau 2 résume la fonction et la morphologie de chacune des zones citées du TGI. Il est à noter que le transit gastro-intestinal des formes pharmaceutiques est semblable à celui des aliments, en ce sens que c'est l'estomac et non l'intestin grêle qui effectue la discrimination entre les liquides et les solides de taille supérieure à environ 5 mm (Moës, 1989 ; Moës, 1993).

Tableau 1 : Le temps de transit estimé des aliments dans chaque segment de tractus gastro-intestinal (Hwang et col., 1998)

Segment	Type de nourriture	
	Liquide	Solide
Estomac	10 min à 30 min	1 h à 3 h
Intestin grêle	3 h $\pm$ 1,5 h	4 h $\pm$ 1,5 h
Colon		20 h à 50 h

Tableau 2 : La fonction, la morphologie et la physiologie du tractus gastro-intestinal (Hwang et col., 1998 ; Kim et Singh, 2002 ; Mayersohn, 2002)

Segment	Fonction	Taille diamètre x longueur (cm)	Surface d'absorption (m ²)	pH à jeun	pH après repas
Estomac	Digestion des aliments	15 x 20	0,1	1,5 à 3	2 à 5
Duodenum	Neutralisation des acides	3-5 x 20-30	0,1	5,5	5,0
Jejunum	Absorption des nutriments	3-5 x 240	60	6	Ne change pas
Iléon	Absorption des nutriments	3-5 x 360	60	7 à 8	Ne change pas
Colon	Absorption d'eau et d'ions (Na et Cl)	3-9 x 90-125	0,25	8,0	Ne change pas

En corrélant les données des tableaux 1 et 2 à la figure 4, nous constatons que la durée totale effective de l'absorption d'un médicament varie de 3 à 8 h et que la capacité d'absorption de beaucoup de médicaments ira forcément en décroissant au fur et à mesure de leur cheminement le long du TGI. Cela implique de nombreuses prises journalières pour les principes actifs à faible temps de demi-vie plasmatique. De plus, une forme libérant le principe actif sur une durée de 20 h, ne présente pas tellement d'intérêt si elle ne séjourne que quelques heures dans la partie du TGI favorable à son absorption.

A l'instar de la variation physiologique de la capacité d'absorption des différentes parties du TGI, d'autres facteurs interviennent au niveau de la résorption : les variations de pH

(tableau 2) entre les différentes zones influenceront la résorption de molécules médicamenteuses facilement ionisables ; la taille de la forme pharmaceutique et l'état nutritionnel du sujet (à jeun ou non) jouent également un rôle prépondérant sur la vitesse de transit GI du médicament et par là même sur la vitesse de sa résorption.

Ainsi, le Professeur Moës, dans ses publications sur les formes orales à libération contrôlée et les formes à rétention gastrique, présente un bon récapitulatif des corrélations à effectuer entre la physiologie du TGI et le développement de telles formes (Moës, 1989 ; Moës, 1993). Ces revues se basent essentiellement sur les travaux de l'équipe de Davis (Davis, 1986) qui, grâce au marquage des formes pharmaceutiques par des radioéléments de courte vie et l'emploi de la scintigraphie gamma, a pu visualiser et dégager des observations fort intéressantes concernant le cheminement des formes pharmaceutiques dans le tractus gastro-intestinal. Plus récemment, l'équipe de Davis a publié une étude intéressante sur le rôle apporté par la scintigraphie gamma dans la compréhension de la délivrance du principe actif par les formes destinées à la voie orale (Wilding et col., 2001). Cette méthode permet de visualiser de manière claire la forme pharmaceutique marquée au niveau de l'estomac, ce qui favorise le suivi de la vidange gastrique. Par contre, cette visualisation est moins aisée au niveau de l'intestin grêle, à cause de la morphologie de celui-ci qui présente de nombreuses circonvolutions. Son suivi redevient plus aisé au niveau du caecum. Le temps de transit au niveau de l'intestin grêle est dès lors estimé en effectuant la différence entre le temps d'arrivée au caecum et le temps où la forme quitte l'estomac. Pour les formes divisées, on parle d'un temps $t_{50\%}$: temps au bout duquel 50% des microbilles ont par exemple quitté l'estomac (Wilding et col., 2001).

B. La vidange gastrique

L'une des fonctions de l'estomac consiste en la digestion de la nourriture et la libération du chyme vers l'intestin lors de la vidange gastrique. Cette vidange apparaît comme la résultante de la motilité gastrique qui a lieu sous forme de cycles. Les formes pharmaceutiques orales y sont soumises au même titre que les aliments ingérés. C'est pourquoi il est important de comprendre comment la vidange gastrique d'une forme pharmaceutique orale est corrélée à la motilité gastrique. La motilité gastrique est conditionnée par la nature du contenu stomacal. On distingue ainsi la vidange gastrique des liquides de celle des solides digestibles et des solides non digestibles (Moës, 1989 ; Moës, 1993 ; Hwang et col., 1998 ; Singh et col., 2000) :

- ❖ **Les liquides** quittent l'estomac à la suite d'une augmentation de la pression intragastrique, générée par de faibles contractions de la partie supérieure de l'estomac. Cette vidange suit une cinétique d'ordre 1, en ce sens que le volume de liquide vidangé par unité de temps est directement proportionnel au volume restant dans l'estomac.
- ❖ **Les solides digestibles** ne quittent l'estomac qu'après leur transformation en chyme. Une onde péristaltique en est à l'origine, entraînant la contraction de la partie distale de l'estomac, mixant et broyant la nourriture pour permettre sa vidange. La figure 5 montre une séquence de ces contractions gastriques, responsables de la vidange de solides digestibles de l'estomac. Lorsque cette onde atteint l'antrum stomacal, le pylore se ferme et les particules solides volumineuses (taille > 5 mm) sont retenues dans l'estomac. Les solides digestibles ou non, de taille inférieure à 5 mm peuvent être vidangés pendant cette période digestible. Fermé, le sphincter pylorique a un diamètre d'environ 3 mm, ouvert il atteint les 12 mm.
- ❖ **Les solides non digestibles** de taille importante (ex. : les comprimés monolithiques de taille supérieure à 5 mm) ne sont vidangés qu'en période interdigestive. Cette période fait intervenir un complexe nommé IMMC « Interdigestive Migrating Motor Complex » destiné à débarrasser les muqueuses des particules solides qui pourraient y stagner. Ce complexe se décompose en quatre phases (figure 6) : la phase 1, dite phase de repos absolu (phase quiescente), dure 45 à 60 minutes ; la phase 2 est une phase de faibles contractions, irrégulières et non coordonnées, elle dure de 30 à 45 minutes ; la phase 3 connaît des contractions puissantes, régulières et bien coordonnées, d'une durée de 5 à 15 minutes et enfin la phase 4 est une phase de transition entre les phases 3 et 1, d'une durée de ± 5 minutes. La phase 3 est répétée toutes les 80 min à 2 h.

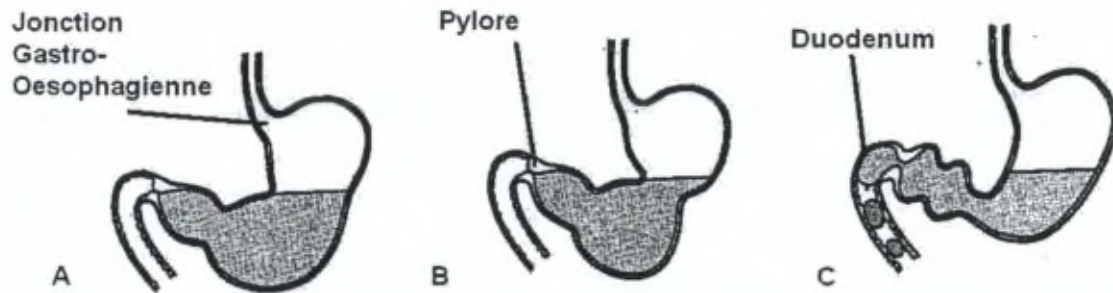


Figure 5 : Représentation d'une séquence de contractions gastriques durant la période digestive. A : la nourriture est mélangée au suc gastrique et est transformée en chyme. B : les ondes péristaltiques, qui sont plus marquées au niveau de la partie inférieure de l'estomac, entraînent le chyme. C : le sphincter pylorique s'ouvre comme une valve, laissant passer peu à peu la nourriture vers le duodénum (Hwang et col., 1998)

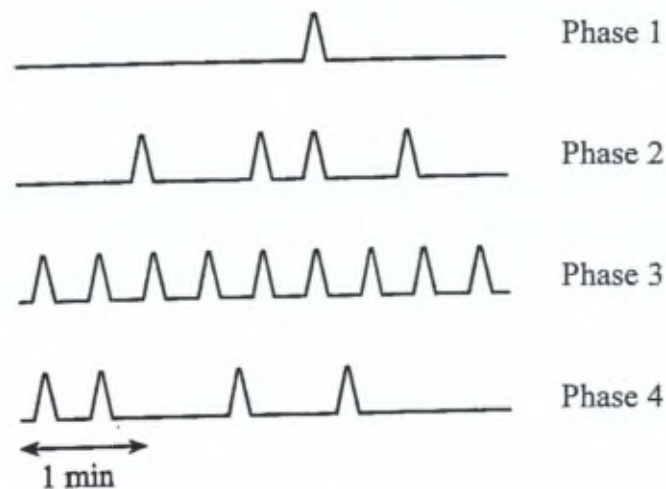


Figure 6 : Les 4 phases du complexe myoélectrique migrant interdigestif (IMMC) (Hwang et col., 1998)

Enfin, la vidange gastrique dépend d'une série d'autres facteurs, comme l'âge du patient ou son genre. Ainsi, les femmes montrent un temps de résidence gastrique pour les solides

non digestibles et les liquides supérieur à celui des hommes. De même, ce temps est plus important chez les personnes âgées. Il est également intéressant de souligner que la vidange gastrique est soumise à un cycle circadien, elle est ralentie l'après midi et accélérée le matin. Par ailleurs, le stress, les pathologies du TGI et la nature du repas influencent le temps de résidence gastrique ; les repas riches en graisses, de même que le stress ralentissent la vidange gastrique (Wilson et col., 2002).

Les travaux de Davis (Davis et col. 1984a et 1984b) ont souligné l'influence de l'apport calorique d'un repas sur le TRG d'une forme monolithique non digestible. En effet, ce temps peut varier de 10 h lorsque la forme est administrée après un repas riche (3600 kJ) à 0,5 h lorsque la forme est administrée après un léger repas (1500 kJ). La vidange gastrique des formes divisées est également influencée par la nature du repas. Cette influence est certainement inférieure à celle observée pour les formes unitaires, mais elle est tout de même présente. Davis et col. 1987 ont montré que chez le même sujet, le $t_{50\%}$ moyen de microbilles d'acide tiprofénique passe de 78 min lorsqu'elles sont administrées après un léger repas (1500 kJ) à 170 min lorsqu'elles sont administrées après un repas calorique (3600 kJ).

Les formes à rétention gastriques ne sont pas non plus exemptes de l'influence du repas sur leur vidange gastrique. Ainsi ; la fréquence des repas influence le temps de résidence gastrique d'une forme flottante. L'ingestion d'une succession de repas après la prise de la forme, augmente le temps de résidence gastrique de celle-ci par rapport à la prise d'un repas unique. Enfin, la position du sujet influe sur la vidange gastrique de la forme flottante. Lorsqu'un sujet debout ingère une forme flottante, celle-ci se maintient dans la partie supérieure de l'estomac. Lorsque le sujet ingère la forme et se met en position couchée sur le côté gauche, son pylore se trouve alors au dessus du corps de l'estomac et est donc proche de la forme flottante, sa vidange s'en trouve alors favorisée (Moës, 1993 ; Klausner et col., 2003). Il est dès lors conseillé d'administrer une forme flottante après le repas et de conseiller au patient d'éviter de se mettre en position couchée dans les heures qui suivent la prise.

II.2.3. Les différentes approches des formes flottantes

A. Les formes monolithiques flottantes

Les premières formes flottantes relatées dans la littérature concernaient des formes monolithiques. Cependant, ces dernières années de plus en plus de formes divisées flottantes sont décrites dans la littérature. Nous nous limiterons dans cette section à relater brièvement quelques approches rencontrées dans la littérature et qui concernent la mise au point de formes unitaires flottantes. Nous aborderons d'une manière plus détaillée les approches concernant les formes divisées flottantes, puisque notre développement expérimental a porté sur ce type de forme.

Les systèmes HBS (Seth et Tossounian, 1984) comptent parmi les premières formes monolithiques flottantes mises au point avec succès. Ces systèmes s'appliquent aussi bien à des gélules qu'à des comprimés. Les formes flottent à la surface de l'estomac grâce à leur faible densité procurée par l'incorporation d'hydrocolloïdes au sein de la formulation. La figure 7 montre le mode d'action d'une gélule HBS. L'hydrocolloïde (ex.: hydroxypropylméthylcellulose) se gélifie au contact du liquide gastrique, formant une barrière à la surface de la gélule. Le principe actif est libéré par diffusion et érosion progressive de la barrière formée par l'hydrogel (Moës, 1993).

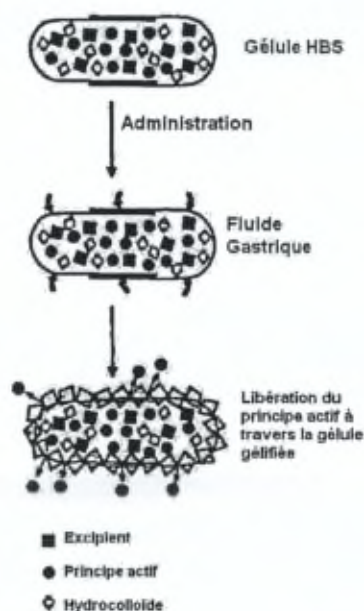


Figure 7 : Exemple d'un système HBS (Moës, 1993)

Les polymères cellulosiques de haut poids moléculaire entrent souvent dans la composition des formes flottantes (Rouge et col. 1997). Il en est de même pour toute une série d'excipients permettant de réduire la densité de la forme comme l'agar agar, les polyacrylates, l'alginate sodique, les corps gras, les gommes (gomme guar, gomme arabique) ou encore les polysaccharides (Baumgartner et col., 2000 ; Singh et col., 2000 ; Streubel et col., 2003). Par ailleurs, une autre approche intéressante est basée sur l'incorporation d'un mélange effervescent (bicarbonate sodique/acide citrique) dans la formulation. Des comprimés flottants multi-couches sont rapportés dans la littérature (Ingani et col. 1987b ; Yang et Fassihi, 1996 ; Yang et col. 1999). Au contact du liquide gastrique, la forme génère du CO₂ ; celui-ci est ensuite emprisonné dans une barrière gélifiée à base d'hydrocolloïde permettant ainsi la flottabilité de la forme.

B. Les formes divisées flottantes

Partant du principe de flottabilité des microbilles à la surface du contenu GI, deux approches peuvent être distinguées : les systèmes non effervescent et les systèmes effervescent.

B.1. Les systèmes basés sur l'utilisation d'agents non-effervescents

Ces systèmes sont basés sur la fabrication de microbilles de faible densité (densité < 1,004) de manière à favoriser leur flottabilité au contact du liquide gastro-intestinal. Les formes les plus souvent relatées dans la littérature sont les microsphères creuses et les microbilles de grande porosité d'alginate calcique. La densité de ces formes n'est pas diminuée *in situ*, par une quelconque réaction ; c'est bien le procédé de fabrication qui leur confère leur légèreté.

Kawachima et col. (1992) ont préparé des **microsphères creuses** par une méthode d'émulsification-diffusion de solvant. Le principe actif utilisé (l'ibuprofène) et un polymère entérique (l'Eudragit S : copolymère de l'acide méthacrylique) sont dissous à température ambiante dans un mélange éthanol : dichlorométhane (1:1 v/v). Cette solution est additionnée progressivement, sous agitation, à une solution aqueuse contenant un surfactif pour émulsification (émulsion de type huile dans eau) et la température est portée à 40°C. La diffusion de l'éthanol (qui est un bon solvant pour l'Eudragit S) à partir des gouttelettes émulsionnées commence et précède celle du dichlorométhane (qui a un faible pouvoir solvant par rapport à l'Eudragit S). Le polymère se retrouve alors dans un environnement où sa faible solubilité conduit à la formation d'un film gélifié à la surface des gouttelettes. L'évaporation

du dichlorométhane libère une cavité creuse qui se remplira progressivement avec de l'eau. Les microsphères sont ensuite lavées à l'eau, filtrées et séchées. A la fin du séchage, une cavité creuse est formée à l'intérieur des microsphère permettant leur flottaison. Ces microsphères ont une taille comprise entre 500 et 1000 μm . La figure 8 permet d'illustrer ce procédé de fabrication.

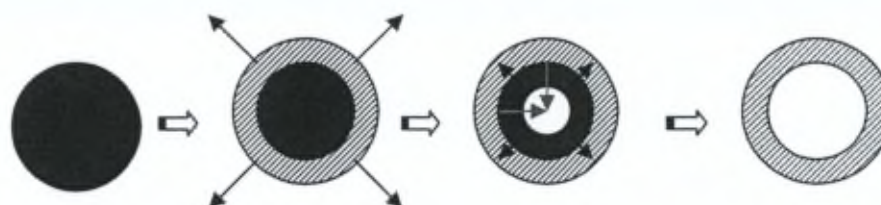


Figure 8 : Procédure de fabrication des microsphères creuses, partant d'une émulsion du principe actif et de l'Eudragit S, dissous dans un mélange éthanol/dichlorométhane (Kawachima et col. 1992).

Ces microsphères creuses flottent de façon continue dans une solution acide contenant du polysorbate 20 sous agitation magnétique pendant plus de douze heures. La présence du polymère entérique freine la libération du principe actif au niveau stomacal. La libération est accélérée lorsque les microsphères arrivent au niveau des parties distales de l'intestin grêle. Les auteurs proposent cette forme lorsqu'un effet retard est recherché. D'autres auteurs (Thanoo et col., 1993 ; Joseph et col., 2002 ; Choi et Kim, 1996) développèrent des microsphères creuses de polycarbonate. Le principe est toujours basé sur un processus de diffusion/évaporation de solvant à partir de la dispersion d'une solution du polymère/principe actif, dans du dichlorométhane.

Une autre approche pour assurer la flottabilité des microbilles consiste en l'utilisation d'hydrocolloïdes. Whitehead proposa (Whitehead, 1998a et Whitehead et col., 2000) une méthode pour la préparation de **microbilles d'alginate calcique** formées par lyophilisation. L'alginate sodique est réticulé lorsqu'il est additionné sous forme de gouttelettes à une solution de chlorure de calcium. La taille des perles obtenues après lyophilisation est fonction de la taille des gouttelettes d'alginate sodique et donc du diamètre des aiguilles utilisées. Ces dernières sont calibrées afin de maintenir une taille homogène des perles d'alginate (figure 9). Ces microbilles possèdent une excellente flottabilité, mais à cause de leur grande porosité,

elles libèrent trop rapidement le principe actif qui y est incorporé. En l'occurrence, dans ce cas-ci, près de 60% de la quantité initiale en amoxicilline contenue dans la forme est libérée en une heure.

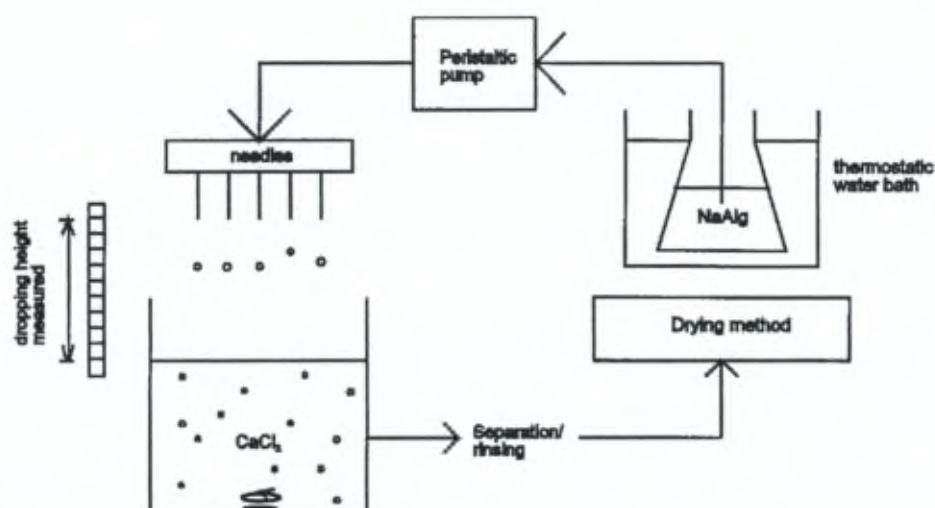


Figure 9 : Méthode de préparation de « perles » flottantes d'alginate calcique (Whitehead., 1998a)

D'autres auteurs (Iannuccelli et col., 1998a ; Iannuccelli et col., 1998b ; Murata et col., 2000) s'intéressèrent également à l'élaboration de microbilles flottantes à base d'alginate calcique seul ou en mélange avec d'autres produits : polyvinylalcool (PVA), chitosan ou encore des huiles végétales. Iannuccelli (1998a et 1998b) développa avec son équipe un système à unités multiples composé d'un cœur d'alginate calcique formé, là aussi, par dispersion goutte à goutte d'une solution d'alginate sodique dans un mélange composé de n-heptane, chlorure de calcium et de polysorbate 20. Les particules formées sont rincées à l'eau et au diéthyléther, avant leur incorporation à une solution d'alginate sodique ou d'un mélange alginate sodique / PVA. Les microbilles, ainsi enrobées, sont ensuite séchées sous vide ce qui libère un compartiment d'air entre la membrane externe et le corps de la microbille, à cause du rétrécissement du corps hydraté d'alginate calcique (figure 10). Les résultats *in vitro* ont montré une flottabilité améliorée suite à l'incorporation de 5% de PVA à haut poids moléculaire (PVA 100 000) à la solution d'enrobage.



Figure 10 : Représentation schématique d'une microbille d'alginate calcique à compartiment d'air
Iannuccelli et col., 1998a

Enfin, l'utilisation du chitosan a également été envisagée comme « agent de flottaison » par plusieurs auteurs (Hou et col., 1985 ; El Gibaly, 2002 ; Torrado et col., 2004). Le chitosan est un polysaccharide naturel qui peut gonfler graduellement et flotter au contact du liquide gastrique. Cependant, le procédé de fabrication, comme pour les microbilles d'alginate calcique, met en jeu plusieurs étapes ne simplifiant pas sa transposition à l'échelle industrielle.

B.2. Les systèmes basés sur l'utilisation d'agents effervescents

A côté des systèmes décrits ci-dessus, des systèmes basés sur la génération de gaz ont également été explorés. Ces systèmes ont pour principe de base l'utilisation du bicarbonate sodique pour enclencher la production de CO_2 *in situ*, lequel, en restant emprisonné au sein de la forme grâce à un enrobage, diminue la densité et favorise la flottabilité de la forme. Ichikawa et col. (1991) ont développé un système de microbilles flottantes par génération de CO_2 au sein de la forme. Un noyau contenant le principe actif est enrobé successivement par une première couche permettant la génération de gaz (dépôts successifs de bicarbonate sodique et d'acide tartrique) et une seconde couche constituée d'un mélange acétate de polyvinyle/shellac purifiée qui constitue la membrane (gonflable) externe de la microbille. La membrane polymérique gonfle au contact du liquide gastrique et permet de maintenir la flottaison des microbilles en emprisonnant le CO_2 dégagé.

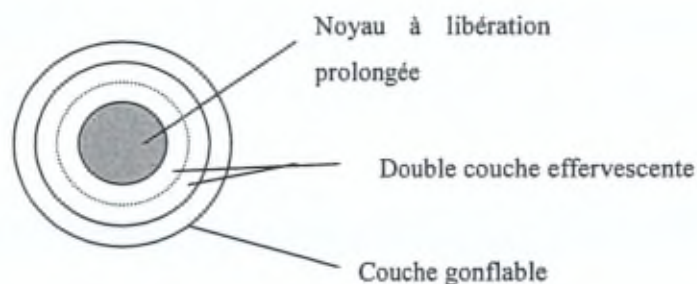


Figure 11 : Représentation schématique du système effervescent décrit par Ichikawa et col. (1991)

D'autres approches de systèmes effervescents existent. La plupart sont basées sur le même principe que celui décrit ci-dessus, avec des variantes quant à la nature de la couche gonflable. Atyabi et col. (1996) développèrent un système flottant à libération prolongée utilisant des résines échangeuses d'ions. Ce système est constitué de billes de résine chargées de bicarbonate sodique et d'un principe actif cationique attaché à la résine (formation d'un complexe résine / principe actif). Les billes sont ensuite enrobées d'une membrane semi-perméable constituée d'Eudragit RS.

II.2.4. L'approche retenue

Cette brève revue de la littérature souligne la multiplicité des possibilités décrites pour aboutir à une forme divisée flottante. Cependant, plusieurs des approches proposées sont lourdes en terme d'étapes de fabrication et limitées en terme de capacité à freiner la libération du principe actif. Notre choix fut guidé vers le concept qui était le plus apte à être appliqué à une méthode de fabrication des microbilles par pelletisation thermoplastique. C'est donc le système basé sur la génération de CO₂ au sein de la matrice que nous avons retenu comme moyen d'aboutir à une forme flottante.

En effet, le système basé sur l'utilisation d'agents effervescents est le plus apte à être appliqué à notre technique de fabrication basée sur la granulation/sphéronisation d'un mélange de poudres sans recourir à des étapes de séchage pour l'élimination des solvants.

Nous détaillerons ce développement dans le chapitre III.3. Soulignons que nous avons procédé dans l'optique d'aboutir à une forme divisée flottante par une technique simple, rapide, facilement transposable à l'échelle industrielle et n'impliquant pas l'utilisation d'eau ou de solvants organiques.

II.3 La Pelletisation Thermoplastique

II.3.1. Historique

Le développement de la technologie relative à la granulation découle historiquement de l'invention de la compression par W. Brockedon en 1843. Si la compression directe représente la voie d'accès la plus simple à une forme finie de type comprimé, cette technique reste néanmoins limitée par un certain nombre de conditions inhérentes au mélange de poudres à comprimer. En effet, ce n'est que lorsque la substance médicamenteuse, additionnée de ses divers adjuvants, est caractérisée par une bonne comprimabilité, qu'elle peut subir une compression directe sans traitement préalable. Pour ce faire, la poudre doit réunir trois conditions : être compressible, s'écouler librement et contenir un principe actif possédant une surface suffisamment mouillable par les liquides du tractus gastro-intestinal (TGI). Malheureusement, dans la majorité des cas ces trois conditions ne sont pas réunies et la poudre nécessite la mise sous forme de fins granulés avant sa compression. Lorsque seules les propriétés d'écoulement de la poudre font défaut, on a recours à la granulation sèche. Lorsque aucune des trois conditions précitées n'est respectée, on effectue une granulation humide. C'est cette dernière technique qui est la plus largement répandue.

C'est au cours des années 70, avec l'apparition de comprimeuses à haute cadence que la demande de développement des procédés de granulation par l'industrie pharmaceutique commença à être pressante. Dans un processus de granulation humide, le mélange de poudres est empâté par addition d'une solution liante-agglutinante, il est ensuite granulé et séché avant le calibrage des grains. L'opération de granulation a pour buts :

- ✓ d'améliorer la distribution du principe actif au sein du mélange de poudres ;
- ✓ de densifier la poudre et d'obtenir des granulés qui se laissent facilement consolider ;
- ✓ d'améliorer l'écoulement des poudres en augmentant la taille des particules ;
- ✓ d'hydrophiliser la surface des poudres hydrophobes.

Différents types de granulateurs virent le jour comme les granulateurs oscillants ou les granulateurs en V, mais ce sont les mélangeurs granulateurs à haute vitesse et les granulateurs à lit d'air fluidisé qui se sont le plus développés et perfectionnés pour la reproductibilité des essais qu'ils assurent et la possibilité de combiner les étapes de granulation et de séchage au sein d'un même appareil (Rudnic, 1995 ; Parikh, 1997).

Comme nous le constatons, bien que largement utilisée par l'industrie pharmaceutique, la granulation humide implique plusieurs étapes avec les répercussions en terme de coût de production et de risques de contaminations que cela suppose. Aussi, dans les années 80, une nouvelle forme de granulation, la granulation thermoplastique, obtient de plus en plus la faveur des chercheurs (Rubinstein et Musikabhumma, 1980 ; Mc Taggart et col., 1984 ; Flanders et col. 1987 ; Schaefer et col. 1990 ; Evrard et Delattre, 1992). Cette technique ne nécessite ni eau ni solvants organiques, mettant à profit le pouvoir liant d'excipients facilement fusibles. L'étape de séchage ainsi que les risques liés à l'utilisation de solvants s'en trouvent alors éliminés.

II.3.2. De la granulation à la pelletisation thermoplastique

La granulation thermoplastique est un procédé au cours duquel l'agglomération des poudres pour former des granulés est obtenue grâce à l'addition d'un agent liant qui peut se trouver soit à l'état fondu, soit à l'état solide et fondre progressivement durant le processus de granulation, ce dernier cas étant le plus répandu. Les agents liants sur lesquels s'est porté notre choix pour ce travail de pelletisation thermoplastique entrent dans cette catégorie de liants solides facilement fusibles. L'énergie nécessaire à la fusion de l'agent liant est principalement générée par un apport externe de l'équipement (de type mélangeur granulateur à haute vitesse) et/ou par la chaleur induite par la friction des particules. Le liant fondu a une action similaire à celle des liants (sous forme de solutions aqueuses ou organiques) utilisés en granulation humide (Schaefer, 1996a).

Afin de faciliter la compréhension de la granulation thermoplastique, il est intéressant de rappeler en quelques mots la théorie se rapportant à la granulation humide. Les étapes que met en jeu un processus de granulation humide impliquent : (1) le mélange des poudres, (2) l'addition du liquide mouillant, (3) la granulation humide, (4) le séchage et (5) le tamisage et le calibrage des grains. Ces étapes ont été décrites par de nombreux auteurs, Augsburger et Vuppala (1997) en présentent un bon récapitulatif. Ils soulignent ainsi que l'ajout d'un liquide à une poudre représente une opération délicate en ce sens que l'on peut alors passer par quatre états, en fonction de la quantité de liquide ajoutée (figure 12) : *pendulaire*, *funiculaire*, *capillaire* et *goutte*. Idéalement on tend à atteindre l'état *funiculaire*, c'est-à-dire l'état où la quantité de liquide est suffisante pour former des grains, sans être excessive et entraîner un

collage des particules entre elles à cause d'un phénomène de surmouillage, phénomène rencontré dans les états *capillaire* et *goutte* (figure 12).

La figure 12a décrit les étapes possibles lors d'une granulation humide dans des dispositifs à faible vitesse d'agitation comme les granulateurs en lit d'air fluidisé. Par contre, dans un mélangeur granulateur à haute vitesse, une densification importante des agglomérats a lieu au fur et à mesure de l'addition du liquide. Aussi, l'évolution due à la saturation en liquide mouillant peut être décrite par une combinaison des représentations reprises dans les figures 12a et 12b avec une prédominance du cas décrit par la figure 12b. C'est pourquoi la quantité de liquide liant requise est moindre dans un mélangeur granulateur à haute vitesse comparativement à d'autres équipements. Nous pouvons effectuer un parallélisme avec la granulation thermoplastique : lors d'une granulation thermoplastique dans un mélangeur granulateur à haute vitesse, l'agent liant se trouve généralement à l'état solide dans le mélange de poudres et il fond progressivement lors du processus. Dès lors, c'est plutôt la figure 12b qui représente le mieux les ponts interparticulaires qui se forment suite à l'action de l'agent liant (Schaefer, 1996a). En présence d'une grande quantité de liant en fusion, nous pouvons également assister à un phénomène de « surmouillage », ce terme étant employé dans ce cas par analogie à la granulation humide. Le phénomène de « surmouillage » se traduit là aussi par les états *capillaire* et *goutte* (figure 12b) qui sont à éviter si l'on souhaite aboutir à la formation de grains.

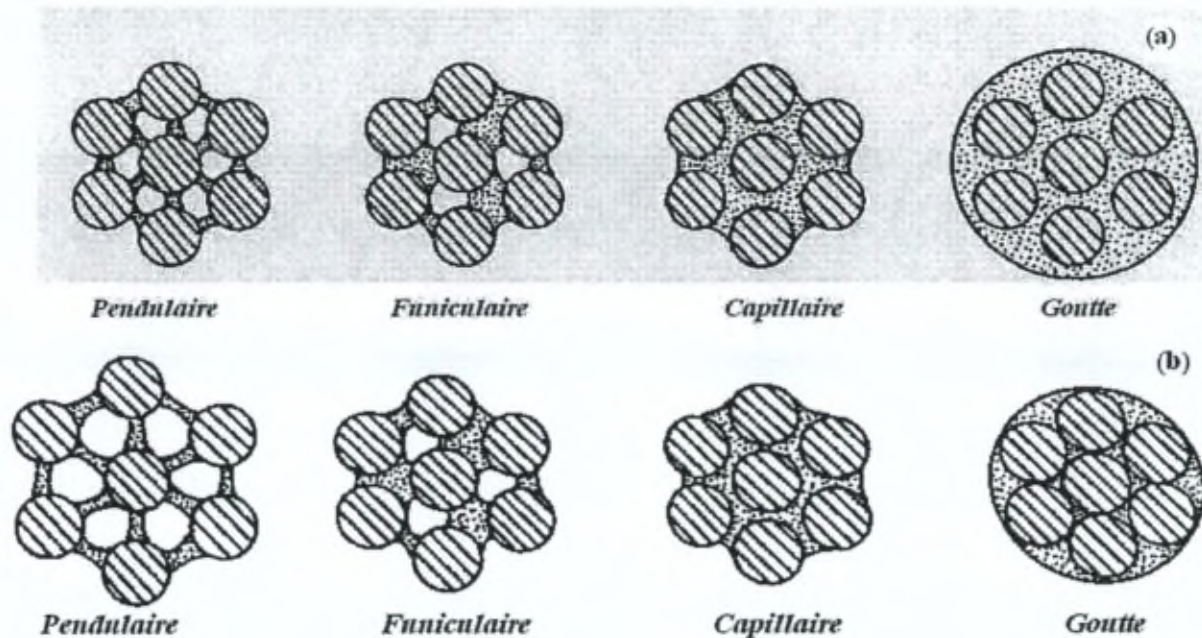


Figure 12 : (a) l'évolution des ponts interparticulaires suite à l'addition d'un liant liquide (granulateurs à faible vitesse) , (b) l'évolution des ponts interparticulaires causée par la densification des agglomérats (granulateurs à haute vitesse) (Schaefer, 1996a)

Par ailleurs, la **granulation humide** est également caractérisée par deux étapes lors de la formation de granulés: la *nucléation* et la *coalescence*. La *nucléation* est l'étape pendant laquelle les particules sont rassemblées entre elles pour former de petits noyaux. Les ponts liquides responsables de cette agglomération sont de nature *pendulaire*. La *coalescence* est l'étape d'accroissement de la taille de ces petits noyaux grâce aux collisions entre les particules ; l'efficacité de ces collisions est assurée lorsque les noyaux possèdent une légère pellicule de liquide mouillant en surface.

En **granulation thermoplastique** dans un mélangeur granulateur à haute vitesse, la phase de *nucléation* se caractérise par deux phénomènes : la *distribution* et l'*immersion* (figure 13). La distribution de l'agent liant à la surface des particules de poudre a lieu lorsque les gouttelettes de l'agent liant en fusion ont une taille inférieure ou égale à celle des particules de poudre. A partir de ce moment, les particules « humectées » peuvent facilement s'assembler par *coalescence* (figure 13a). Il faut entendre par le terme *coalescence* la croissance par agglomération des particules. Le phénomène d'immersion s'observe lorsque les gouttelettes de liquide en fusion ont une taille largement supérieure à celle des particules solides de poudre, entraînant l'immersion de celles-ci dans les gouttelettes du liant (figure 13b).

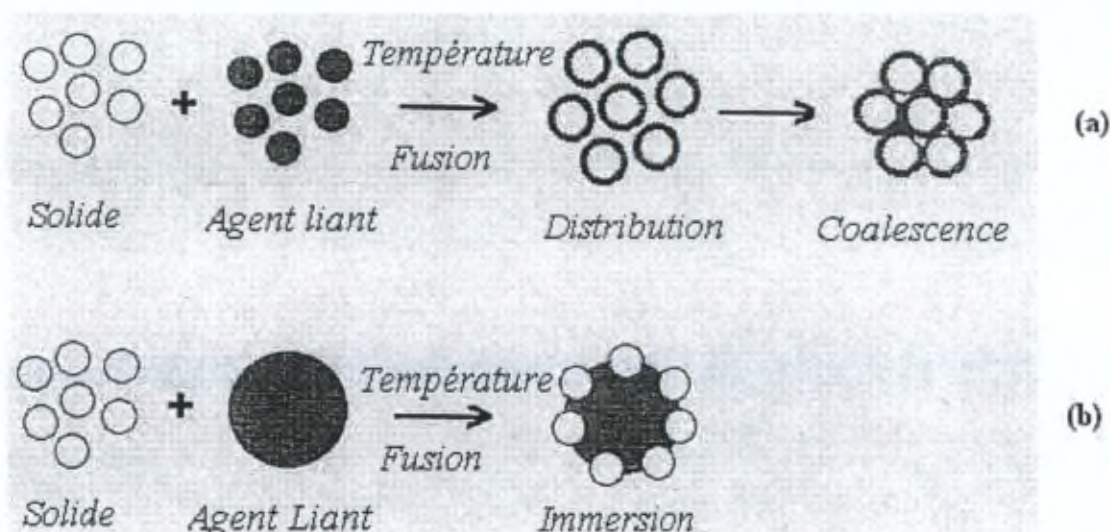


Figure 13 : Le procédé d'agglomération en granulation thermoplastique, décrivant (a) le phénomène de distribution et (b) le phénomène d'immersion (Schaefer, 1996a)

Généralement, l'un de ces deux phénomènes, *distribution* ou *immersion*, est prédominant en fonction des propriétés de l'agent liant et des conditions opératoires adoptées. En présence d'un agent liant solide de faible granulométrie, à faible viscosité, subissant des forces d'agitation élevées dues à une grande vitesse d'agitation du bras du mélangeur, c'est le phénomène de *distribution* qui prévaut. Par contre, l'*immersion* domine lorsque l'agent liant se présente sous forme de pastilles, ayant une viscosité élevée et lorsqu'une faible vitesse d'agitation est adoptée. De la même manière, si lors de l'essai, l'agent liant ne se trouve pas à l'état fondu mais est simplement ramolli, les particules solides de poudre vont adhérer à la surface des particules d'agent liant et l'agglomération aura lieu uniquement par *immersion*. Dans ce cas les particules d'agent liant doivent présenter la plus faible granulométrie possible de manière à prévenir l'apparition de gros agglomérats (Schaefer, 1996a ; Seo et Schaefer, 2001). Les corps gras que nous avons choisis comme agents liants et qui seront largement discutés dans la suite de ce travail (chapitre III.1), se présentent sous forme de poudres finement atomisées, ils favorisent donc la croissance des particules par *distribution*.

A ce stade, force est de constater l'importance de la viscosité et de la granulométrie de l'agent liant dans le phénomène d'agglomération en granulation thermoplastique. Or, la théorie de base décrivant l'agglomération des particules aux états funiculaire et capillaire, développée par Rumpf en 1962, considère que la tension des ponts liquides reliant les particules entre elles est statique (Schaefer, 1996a). La force existant dans ces ponts statiques

dépend essentiellement de la tension superficielle du liquide liant et est indépendante de sa viscosité. Cependant, lors d'un procédé de granulation, surtout en mélangeur granulateur à haute vitesse, les particules sont soumises à une forte agitation. Les ponts établis par le liquide liant ne peuvent dès lors qu'être dynamiques. La théorie de Rumpf selon laquelle les ponts interparticulaires sont de nature statique devient dès lors inadaptée. Un autre modèle, tenant compte de la viscosité du liquide mouillant a été développé par Ennis et col. 1991 ; il permet une meilleure compréhension du phénomène de *coalescence*. Ce modèle inclu le **nombre de Stokes**: St_v , décrit par l'équation 1, nombre qui tient compte de la viscosité de l'agent liant:

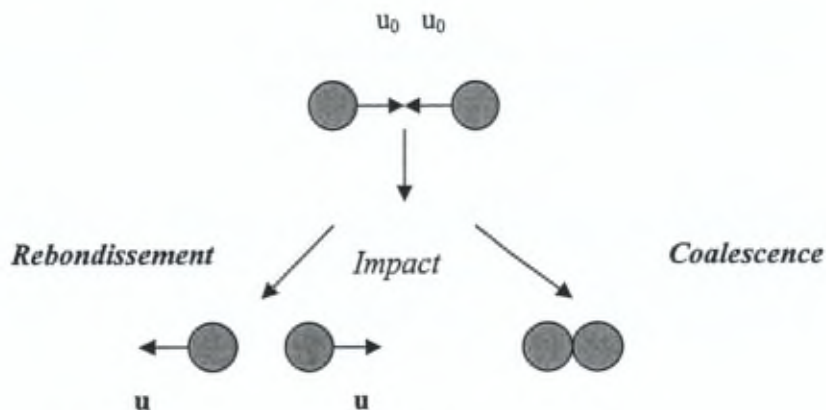
$$St_v = 8 \rho u_0 r / 9 \eta \quad [1]$$

ρ : masse volumique de la particule/agglomérat (Kg/m^3)

u_0 : vitesse de la collision entre les particules (m/s)

r : rayon de la particule (m)

η : viscosité du liant (Pa s).



Quand $u < u_0$: perte d'énergie cinétique

Figure 14 : Le résultat de la collision entre deux particules : rebondissement ou *coalescence* (Schaefer, 1996a)

Dans les mélangeurs granulateurs, u_0 est estimée égale au produit $r \times \omega$, ω étant la vitesse d'agitation du bras du mélangeur (1/s). L'équation 1 devient alors :

$$St_v = 8 \rho r^2 \omega / 9 \eta \quad [2]$$

Comme le montre la figure 14, de la collision entre les particules/agglomérats peut résulter une *coalescence* ou un *rebondissement* de celles-ci. Lorsque la collision conduit à une perte d'énergie cinétique, u est alors inférieure à u_0 et il en résulte la *coalescence* des particules/agglomérats, par contre celles-ci rebondissent dans le cas contraire, où u est supérieure à u_0 . On estime que la *coalescence* a lieu lorsque St_v est inférieur à une valeur critique St_v^* donnée par l'équation 3 :

$$St_v^* = (1+1/e) \ln (h/h_a) \quad [3]$$

e : est le coefficient de restitution de la particule/agglomérat, il est égal à 1 lorsque la particule/agglomérat est rigide et est inférieur à 1 lorsqu'elle est déformable.

h : est l'épaisseur de la couche de liquide à la surface des particules/agglomérats en collision (m).

h_a : caractérise les aspérités de la surface de la particule/agglomérat (m).

La *coalescence* est donc favorisée par une faible valeur de St_v et une valeur de St_v^* la plus grand possible. A l'examen des équations 2 et 3, il découle que théoriquement la *coalescence* est favorisée par :

- ✓ une faible masse volumique des particules/agglomérats (ρ)
- ✓ une faible vitesse de rotation du bras du mélangeur (ω)
- ✓ des particules de faible granulométrie (r)
- ✓ un agent liant de grande viscosité (η)
- ✓ des particules/agglomérats facilement déformables (e)
- ✓ une couche d'agent liant adhérent aux particules assez grande (h)
- ✓ des particules/agglomérats présentant la surface la plus lisse possible (h_a).

En pratique, le contrôle simultané de l'ensemble de ces paramètres de manière à remplir toutes ces conditions est très compliqué. D'autant que certains paramètres comme h_a sont difficiles à évaluer et que d'autres changent durant le processus, comme e et h qui varient en fonction du « mouillage » des particules/agglomérats par le liant (Schaefer, 1996a ; Schaefer et Mathiesen, 1996b ; Eliassen et col., 1998). Dès lors, deux paramètres seront retenus par ces auteurs comme étant essentiels à prendre en considération afin d'assurer le phénomène de

coalescence lors d'une granulation thermoplastique: **la viscosité de l'agent liant et la vitesse du bras du mélangeur**. Ces paramètres sont quant à eux, parfaitement maîtrisables.

Il est à noter que l'influence de ces deux facteurs est beaucoup plus complexe que ne le laissent paraître les équations 2 et 3, étant donné qu'ils affectent aussi bien St_v que St_v^* . En effet, si une augmentation de la vitesse du bras du mélangeur et une diminution de la viscosité de l'agent liant semblent dommageables à la coalescence au vue de l'équation 2 ($St_v \uparrow$), la tendance s'inverse en considérant l'équation 3. Ceci s'explique par le fait que la déformabilité ($e \rightarrow 0$) ainsi que l'épaisseur de la couche de l'agent liant (h) augmentent simultanément, St_v^* se voit alors augmenter, ce qui devient favorable à la coalescence. C'est donc bien **le rapport St_v / St_v^*** qu'il faut considérer et plus celui-ci est faible, meilleure sera la coalescence.

L'importance de la vitesse du bras du mélangeur et de la viscosité de l'agent liant a été largement illustrée par les travaux de Schaefer (Schaefer, 1996a). Cependant, celui-ci a utilisé comme agents liants essentiellement des PEG de haut poids moléculaire présentant à l'état fondu, une grande viscosité allant jusqu'à 26 500 mPa s. Les agglomérats formés étaient donc assez solides et difficilement assujettis à l'effritement. Par contre, comme l'ont souligné Eliassen et col. (1999) dans leurs travaux, l'utilisation d'agents liants peu visqueux comme les corps gras ou l'acide stéarique dans un mélangeur granulateur à haute vitesse peut conduire à l'effritement des agglomérats et à l'apparition de fines particules. Ces auteurs ont ainsi montré toute l'importance que revêt un bon contrôle de la vitesse de rotation du bras du mélangeur, mettant l'accent sur le fait qu'en présence d'agents liants peu visqueux, de faibles variations de la vitesse du bras du mélangeur peuvent affecter grandement le processus d'agglomération des poudres.

Nombreux sont les agents liants utilisés en granulation thermoplastique, leur quantité dans la formulation est généralement limitée aux environs de 20 % (m/m). Citons à titre d'exemple les cires (Mc Taggart et col., 1984 ; Zhou et col., 1996 ; Zhou et col., 1997), les huiles (Pommier et col., 1988 ; Ozdemir et Agabeyoglu, 1990 ; Evrard, 1996), les polyéthylèneglycols (PEG) (Kinget et Kemel, 1985 ; Schaefer et col., 1990 ; Voinovich et col., 1999), l'acide stéarique (Eliassen et col., 1999 ; Voinovich et col., 2000 ; Perissutti et col., 2002) ainsi que les corps gras, les esters d'acides et d'alcools gras et les glycérides (Thies et Kleinebudde, 1999 ; Thies et Kleinebudde, 2000). Le recours à des sels d'acide gras et de principe actif est également décrit dans la littérature comme moyen d'améliorer les propriétés de dissolution du principe actif. Le sel d'acide gras et du principe actif joue alors le rôle de l'agent liant dans un processus de granulation thermoplastique (Crowley et col., 2000).

L'utilisation de PEG comme agents liants pour la granulation thermoplastique a été introduite par Rubinstein en 1976, des PEG de masse moléculaire comprise entre 1500 et 20000 et de point de fusion compris entre 40°C et 60°C ont été largement utilisés par l'équipe de Schaefer (Schaefer, 1996a ; Schaefer et Mathiesen, 1996b ; Schaefer, 2004). Les PEG sont des substances solubles dans l'eau et par là même ne permettant pas le ralentissement de la libération des principes actifs incorporés dans la forme. Ils sont employés comme agents liants pour des formes à libération rapide (Perissutti et col., 2003). Les poloxamers qui constituent des polymères de polyoxyéthylène-polyoxypropylène-polyoxyéthylène (POE-POP-POE) ont également été décrits comme agents liants hydrophiles pour améliorer les propriétés de dissolution de principes actifs faiblement hydrosolubles (Passerini et col., 2002). Par contre, le recours à des agents liants lipophiles (esters d'acides gras et de glycérol à longues chaînes carbonées) tels qu'employés dans le présent travail, permet d'aboutir à des granulés ou à des microbilles à libération prolongée (Thomsen et col. 1994).

En pelletisation thermoplastique, le choix de l'agent liant se fera en fonction de sa plage de fusion, qui doit être assez basse et de sa nature hydrophile ou lipophile en fonction des propriétés de libération souhaitées. Par contre le choix de l'agent diluant et/ou des principes actifs à incorporer dans la formulation sera lui guidé par la granulométrie des poudres. Celle-ci doit être la plus fine possible afin de multiplier les liens interparticulaires et de favoriser la granulation du mélange avant sa sphéronisation.

Dans le contexte pharmaceutique, un procédé permettant l'agglomération des particules et aboutissant à la production de granulés présentant une large distribution de taille, à savoir de 0,1 à 2,0 mm, est nommé granulation. En prolongeant le procédé de granulation, nous pouvons, moyennant le contrôle d'un certain nombre de paramètres (qui seront abordés dans le chapitre III.2), aboutir à la formation de microbilles sphériques ou encore de « pellets ». Le passage se fait alors de la granulation vers la « pelletisation » thermoplastique. Les particules formées présentent une distribution de taille plus étroite variant de 0,5 à 2,0 mm (Schaefer, 1996a).

Comme moyen d'aboutir à la formation de microbilles, la pelletisation thermoplastique s'avère être une technique avantageuse par rapport à la pelletisation par extrusion-sphéronisation. C'est en effet une technique très rapide, se faisant en une seule étape au sein d'un même appareil. Elle ne nécessite pas d'étape de séchage apportant ainsi un gain considérable en terme de temps et d'énergie. De plus, comme nous l'avons mentionné ci-

dessus, en choisissant des agents liants lipophiles, cette technique permet d'aboutir à la formation de microbilles à libération prolongée sans avoir recours à un quelconque enrobage. Enfin, en présence de principes actifs hydrolysables, la pelletisation thermoplastique est une bonne alternative à l'utilisation de solvants organiques nocifs pour l'homme et son environnement. D'autant que la recherche de traces éventuelles de solvants organiques dans la forme finie, implique une étape supplémentaire et coûteuse dans le processus de fabrication.

Les limites de la pelletisation thermoplastique sont connues comme étant un risque de dégradation de principes actifs thermolabiles et une production de microbilles présentant une large distribution de la taille des particules, comparativement à celles produites par extrusion-sphéronisation (Kleinebudde et Nymo, 1995). De plus, les caractéristiques physico-chimiques et thermiques du matériau de départ affectent la pelletisation thermoplastique dans un mélangeur granulateur à haute vitesse. Que ce soit la taille des particules des poudres à granuler, leur conductivité thermique ou encore la viscosité de l'agent liant et sa plage de fusion.

Enfin, au même titre que la granulation humide, le contrôle de paramètres relevant cette fois-ci de l'appareillage même, revêt une grande importance dans la réussite d'un procédé de pelletisation thermoplastique. Une attention particulière devra ainsi être portée à la forme géométrique et à la capacité de la cuve du mélangeur granulateur, à la vitesse de rotation du bras du mélangeur (IS), à la vitesse de rotation du chopper (CS) et au temps ou durée de sphéronisation (TS) (Thomsen et col., 1993).

II.3.3. Equipements

Les mélangeurs granulateurs à haute vitesse (High Shear mixers) sont utilisés par l'industrie pharmaceutique depuis les années 1970. Leur évolution s'est faite dans l'optique du développement d'un même appareil pour les étapes de mélange, de granulation humide et de séchage en recourant à des systèmes de séchage micro-ondes ou sous vide. Les mélangeurs granulateurs à haute vitesse sont aussi bien utilisés pour la granulation humide et la granulation thermoplastique que pour la pelletisation. Ils sont généralement équipés d'un système de contrôle et de suivi des données (Holm, 1997).

La figure 15 montre une représentation schématique d'un mélangeur granulateur à haute vitesse spécialement conçu pour la pelletisation thermoplastique.

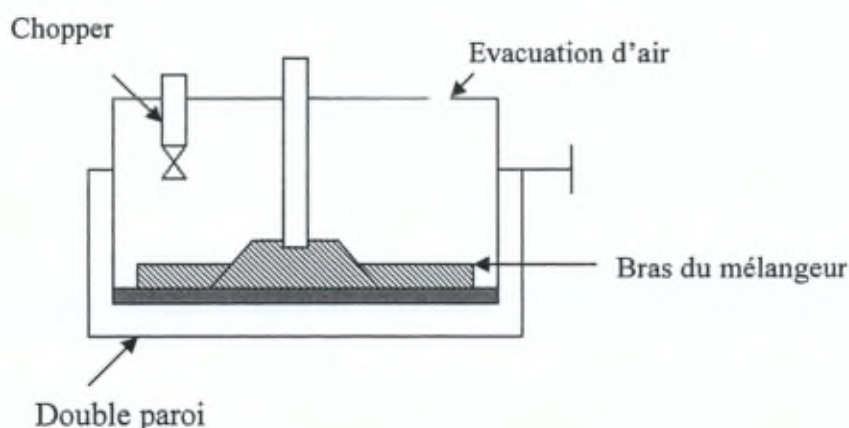


Figure 15 : Représentation schématique d'un mélangeur granulateur vertical à haute vitesse (Schaefer, 1996a)

Un mélangeur granulateur à haute vitesse destiné à la granulation ou à la pelletisation thermoplastique est doté des éléments suivants :

- ✓ **Un bras mélangeur ou « impeller »** : ce bras principal tourne autour d'un axe central, il existe plusieurs types de bras de mélangeurs, différant essentiellement par l'angle d'inclinaison des pales, celui-ci pouvant varier de 30° à 50°
- ✓ **Un chopper** : c'est une sorte de couteau dont le rôle principal est de casser les agglomérats. Selon le type de mélangeur il peut être vertical ou horizontal
- ✓ **Une cuve** : sa capacité peut varier de 1-10 l à 1000-3000 l, dans les mélangeurs granulateurs verticaux, ce qui correspond à des lots variants de 300 g à 500-1500 kg. Les mélangeurs horizontaux produisent des lots encore plus grands. Les cuves sont généralement en acier inoxydable, leur paroi interne peut être recouverte de téflon pour réduire l'adhésion de la masse de poudre. Pour un procédé de granulation ou de pelletisation thermoplastique, il est important que la cuve soit munie d'une **double paroi** dans laquelle circule un liquide caloporteur, afin de faciliter la fusion de l'agent liant. La double paroi peut également chauffer moyennant un système électrique, l'inconvénient dans ce cas étant l'impossibilité de refroidir la masse à granuler en cas de besoin.

- ✓ **Un système d'évacuation d'air** : ce système permet l'évacuation de l'air au cours du processus pour ne pas avoir de surpression à l'intérieur de la cuve. Il doit être muni d'un filtre.

Quelle peut être l'influence de ces différents paramètres sur un processus de granulation ou de pelletisation thermoplastique ?

A. Influence du bras du mélangeur et du chopper

Le bras du mélangeur « impeller », de par sa taille et son mouvement rotatoire, brasse la masse de poudre. Le volume de poudre brassé par seconde peut être calculé sur base de la vitesse de rotation du bras, du nombre et des dimensions des pales. Le volume relatif brassé permet de comparer des mélangeurs verticaux de différentes tailles. Il est obtenu en effectuant le rapport du volume brassé par seconde sur le volume du bol du mélangeur. Il a été établi que ce volume relatif brassé devait être au moins égal à 3 afin d'assurer la production de microbilles dans un mélangeur granulateur à haute vitesse (Schaefer, 1996a). Par ailleurs, ce volume relatif brassé augmente lorsque l'angle d'inclinaison des pales augmente (tableau 3), (Holm, 1997). La figure 16 montre différentes pales interchangeables qui peuvent être utilisées pour un même mélangeur granulateur à haute vitesse (Fielder PMA 25).

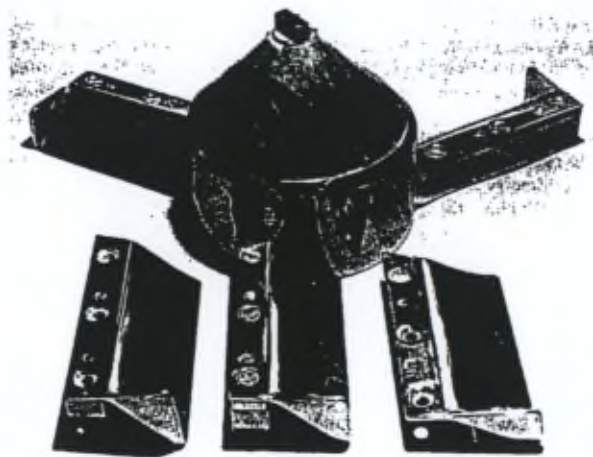


Figure 16 : Illustration de différentes pales interchangeables pour un même mélangeur granulateur haute vitesse (Fielder PMA 25) (Holm, 1997)

Tableau 3 : Le volume relatif brassé pour différentes configurations du bras du mélangeur (Fielder PMA 25). Temps de granulation : 6 min. La vitesse du bras du mélangeur : 400 rpm (Holm, 1997)

Angle du bras du mélangeur (°)	Volume relatif brassé (s ⁻¹)	Augmentation de la température (°C)
30	2,20	24,8
40	2,82	31,3
50	3,36	38,0

On estime que l'énergie importante qui découle d'un grand volume relatif brassé favorise la génération de chaleur au sein de la masse, conduisant ainsi à une densification des agglomérats et à une distribution étroite de la taille des particules finales. Par ailleurs, la courbure des pales s'est avérée être importante en granulation thermoplastique pour ce qui est de la distribution de la taille des particules. Une distribution plus étroite est obtenue avec des pales courbées, les pales planes ou à faible angle d'inclinaison (20°) donnent des agglomérats irréguliers avec une large distribution de leur taille et qui n'évoluent pas en microbilles.

Nous en concluons que la forme du bras du mélangeur, ainsi que sa vitesse de rotation seront déterminantes dans la génération d'énergie au sein de la masse, énergie indispensable à la fusion de l'agent liant dans le processus de granulation/pelletisation thermoplastique. De plus, la fusion rapide de l'agent liant permet un gain considérable en terme de temps de granulation/pelletisation. La formation ou non de microbilles, au sein du mélangeur granulateur à haute vitesse par pelletisation thermoplastique, sera ainsi fortement influencée par ces deux paramètres relatifs au bras du mélangeur, à savoir : le choix de pales ayant un angle d'inclinaison d'au moins 30° et l'adoption d'une vitesse du bras du mélangeur élevée (Schaefer et col.,1993 ; Schaefer, 1996a ; Holm, 1997 ; Voinovich, 2001). Cependant, si une vitesse importante du bras du mélangeur favorise une bonne distribution de la taille des particules et une meilleure sphéronisation des microbilles, la maintenir longtemps est bien souvent synonyme d'un accroissement incontrôlé de la taille des microbilles conduisant à une prise en masse du mélange. Il est dès lors recommandé d'adopter **une vitesse du bras du mélangeur élevée en début de processus**, afin d'assurer une distribution uniforme de l'agent liant solide au sein du mélange et de générer une énergie suffisante à sa fusion, puis de **diminuer cette vitesse lors de la sphéronisation des particules** (Schaefer et col.,1993; Schaefer, 1996a ; Eliassen et col., 1999 ; Heng et col 2000).

Le chopper (couteau) a pour rôle principal de casser les agglomérats formés lors de la granulation/pelletisation. L'influence du chopper (sa taille et sa vitesse de rotation) sur la qualité des granulés formés a essentiellement été étudiée lors de processus de granulation humide ; les résultats relatés dans la littérature sont contradictoires. Nous rencontrons aussi bien des résultats ne relevant aucune influence du chopper sur la croissance des granulés et la distribution de leur taille que d'autres montrant une influence de celui-ci. Ces études ont souvent été menées dans des mélangeurs granulateurs différents (Fielder-25, Lödige FM50 horizontal, Diosna-25 et Graal 300) ; la position du chopper au sein du granulateur ainsi que sa taille et sa forme peuvent expliquer cette divergence de résultats. Pour ce qui est du « design » du chopper, il est admis que les choppers « multidentés » sont plus efficaces à casser les agglomérats que les choppers à deux pales (figure 17) (Holm, 1997).

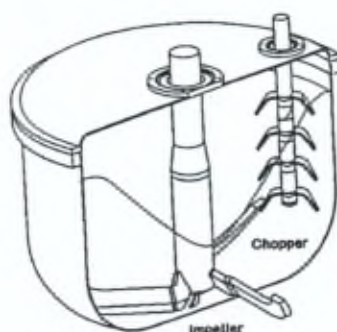


Figure 17 : Représentation montrant un chopper multidentés vertical et un bras du mélangeur (impeller) d'un granulateur à haute vitesse (machine Colette, Gral 1200-L), (Holm, 1997)

La vitesse de rotation du chopper est généralement supérieure à celle du bras du mélangeur, elle varie souvent entre 1000 et 3000 rpm. En granulation thermoplastique, une vitesse élevée du chopper contribue à la formation de granulés ayant une distribution de taille étroite et présentant de faibles agglomérats. Les travaux de Schaefer (Schaefer et col. 1992a et Schaefer, 1996a) ont également rapporté un léger effet du chopper sur la température de la masse à granuler. L'utilisation du chopper à une grande vitesse de rotation, a de manière surprenante, conduit à une faible augmentation de la température au sein de la masse, ce qui peut s'expliquer par le fait que le chopper perturbe le mouvement induit par le bras du mélangeur, réduisant ainsi la friction entre les particules.

B. Influence de la double paroi

La double paroi de la cuve est indispensable lors d'un processus de granulation/pelletisation thermoplastique. Cette double paroi doit de préférence permettre la circulation d'un liquide offrant, selon les besoins, la possibilité de chauffage ou de refroidissement de la masse.

Le chauffage offert par la double paroi fournit une énergie supplémentaire à celle procurée par la rotation du bras du mélangeur, favorisant la fusion de l'agent liant en un laps de temps très court. La croissance des particules est ainsi favorisée et il en résulte des microbilles sphériques et assez lisses. Par contre, un chauffage excessif peut conduire non seulement à un phénomène de « surmouillage » avec une forte agglomération des grains, mais il peut également être responsable de la détérioration du principe actif ou de certains excipients par perte de l'eau de cristallisation. A titre d'exemple, l'évaporation de l'eau de cristallisation du lactose monohydraté conduit à une augmentation de la porosité intra-granulaire avec pour conséquence la fragilisation des agglomérats et leur cassure (Schaefer, 1996c).

II.3.4. Conclusion

En guise de conclusion, nous pouvons dire que la granulation thermoplastique présente un avantage certain en terme de gain de temps, d'étapes de fabrication et d'énergie par rapport à la granulation humide. La pelletisation thermoplastique est un procédé à peine plus long que la granulation thermoplastique, mais offrant la possibilité de produire en une seule étape un produit fini, prêt à être conditionné en gélules et qui plus est, grâce à un choix approprié des excipients, peut même libérer de manière prolongée les principes actifs incorporés dans la forme finie.

Le tableau 4 représente un récapitulatif de ces différentes techniques, en mettant l'accent sur les avantages et les inconvénients de chacune, ainsi que sur les points clés à contrôler afin d'assurer le succès du procédé de fabrication. Une attention particulière a été apportée au procédé par pelletisation thermoplastique, puisque c'est ce dernier qui nous intéresse dans le cadre de ce travail.

Tableau 4 : Comparaison des différentes étapes intervenant dans la granulation humide et la pelletisation thermoplastique dans un mélangeur granulateur à haute vitesse

Les différentes opérations	Les étapes	Les points critiques
<i>Granulation humide</i>		
Pesée des constituants : pa + excipients	I	Contrôle des quantités, précautions contre les contaminations
Mélange des poudres à l'état sec	II	Vitesse du bras du mélangeur, durée du mélange, degré de remplissage de la cuve
Addition du liquide mouillant et granulation humide	III	Addition contrôlée afin d'atteindre un état funiculaire et éviter tout surmouillage, vitesse du bras du mélangeur et du chopper
Séchage	IV	Contrôle de la durée et de la température du séchage. Il doit être suffisant pour éliminer toute trace de liquide mouillant, sans être excessif
Tamissage/calibrage des grains	V	Taille des mailles
<i>Granulation thermoplastique</i>		
Pesée des constituants : pa + agent(s) liant(s) + autres excipients	I	Contrôle des quantités, précautions contre les contaminations
Granulation	II	Température de la double paroi, vitesse du bras du mélangeur, durée du mélange, température de la masse à granuler, vitesse du chopper
Tamissage/calibrage des grains	III	Taille des mailles
<i>Pelletisation thermoplastique</i>		
Pesée des constituants : pa + agent(s) liant(s) + autres excipients	I	Contrôle des quantités, précautions contre les contaminations
Granulation	II	Température de la double paroi, vitesse du bras du mélangeur, durée du mélange, température de la masse à granuler, vitesse du chopper
Sphéronisation	III	Vitesse du bras du mélangeur et du chopper, contrôle de la température du produit, durée de sphéronisation
Tamissage/calibrage des microbilles	IV	Taille des mailles

III. Partie Expérimentale

III.1 Caractérisation Physico-Chimique des Corps Gras Utilisés

III.1.1. Introduction

Les glycérides appartiennent à une famille d'excipients suscitant un vif intérêt dans la régulation de la libération des principes actifs par voie orale, dermique ou rectale. Ce sont des esters d'acides gras et de glycérol, dont la formule de base est la suivante :

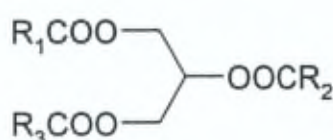


Figure 1 : La formule de base des glycérides

Lorsque les groupes de substitution R_1 , R_2 et R_3 ont des chaînes d'hydrocarbures d'acides gras, nous avons un triglycéride ; lorsqu'un ou deux groupements hydroxyles sont substitués, nous avons respectivement, un monoglycéride ou un diglycéride.

Les Gélucires représentent une large classe d'excipients composés de mélanges de glycérides, d'esters d'acides gras et de polyéthylèneglycols (PEG) (Sutananta et col., 1995a). Ils sont obtenus soit par alcoololyse partielle d'huiles végétales hydrogénées au moyen de PEG de masse moléculaire relative comprise entre 200 et 2000, soit par estérification d'acides gras saturés au moyen de ces mêmes PEG et du glycérol. La nature et les proportions de ces composants détermineront l'hydrophilie ou la lipophilie du Gélucire obtenu et se traduiront par sa balance hydrophile-lipophile (valeur HLB). Les Gélucires contiennent le plus souvent un ou plusieurs des cinq constituants suivants (Ratsimbazafy et Brossard, 1991 ; Craig, 1996):

- Triglycérides : $1 < \text{HLB} < 2$
- Diglycérides : $2 < \text{HLB} < 3$
- Monoglycérides : $3 < \text{HLB} < 4$
- Diesters de PEG : $6 < \text{HLB} < 15$
- Monoesters de PEG : $10 < \text{HLB} < 17$

Les triglycérides, diglycérides et monoglycérides sont digérés, métabolisés et assimilés comme des lipides alimentaires. Les esters de polyglycols subissent une hydrolyse enzymatique libérant les acides gras qui sont ensuite également métabolisés et assimilés. Les polyglycols ne sont ni métabolisés ni assimilés mais rejetés en l'état (Ratsimbazafy et Brossard, 1991).

La nature plutôt hydrophile ou lipophile de ces excipients en fera des agents promouvant la libération et améliorant la biodisponibilité de principes actifs hydrophobes dans le premier cas, ou ralentissant la libération de principes actifs hydrophiles dans le second cas (Akiyama et col. 1993).

Le Compritol® ou le béhénate de glycérol et le Précirol® ou le palmitostéarate de glycérol peuvent être utilisés pour la préparation de formes orales à libération prolongée (Saraiya et Bolton, 1990). En effet, l'estérification du glycérol par de longues chaînes d'acides gras et l'absence d'esters de PEG leur confèrent un caractère hydrophobe exprimé par une valeur HLB égale à 2. Ces deux composés sont de plus considérés comme non toxiques par la FDA (Food and Drug Administration, Etats-Unis) ; la valeur de la LD₅₀ du Compritol® (chez les souris par voie orale) est de 5g/Kg, celle du Précirol® (chez le rat par voie orale) est de 6g/kg (Rowe et col., 2003). La structure chimique du Compritol® est renseignée par la figure 2.

Le Précirol® est constitué d'un mélange de mono-, di- et triglycérides d'acides gras en C16 et C18. Quelques possibilités d'arrangement moléculaire sont proposées, à titre d'exemple, dans la figure 3 (Rowe et col. 2003).

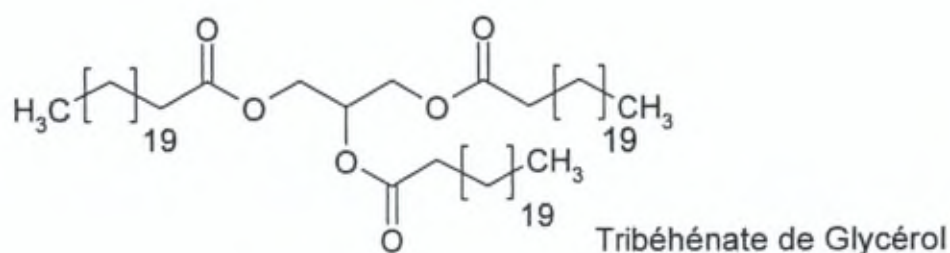


Figure 2 : La structure chimique du Compritol®

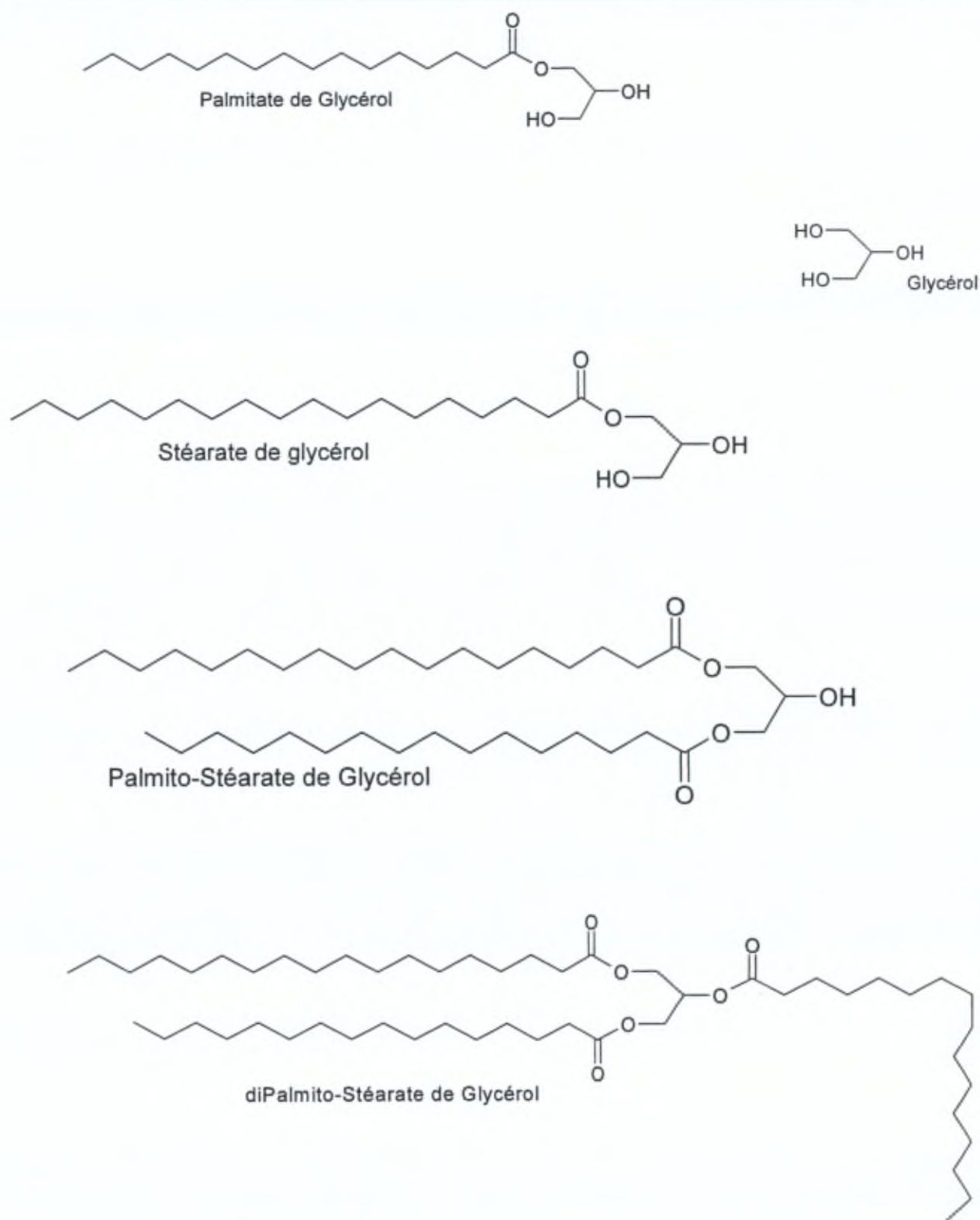


Figure 3 : Exemple de composition chimique du Précirol®

Différentes techniques utilisent cette famille de glycérides pour aboutir à des formes à libération prolongée. Citons à titre d'exemple la granulation thermoplastique ou « melt granulation » (Saraiya et Bolton, 1990), une technique d'enrobage appelée « hot-melt coating » (Barthelemy et col., 1999 ; Faham et col., 2000) ou encore une technique d'extrusion nommée « hot-melt extrusion » (Liu et col., 2001).

Dans le cadre de ce travail, nous avons eu recours à la pelletisation thermoplastique pour développer une forme divisée à libération prolongée. Cette technique sera détaillée par le chapitre III.2. Mais avant cela, nous allons nous pencher dans le présent chapitre sur la caractérisation physico-chimique du Compritol® et du Précirol®. En effet, eu égard à la complexité de leur structure chimique, illustrée par les figures 2 et 3, ces excipients lipidiques sont susceptibles de montrer un comportement thermique complexe avec le risque de voir leurs propriétés thermiques évoluer au cours du stockage. Cette évolution peut se traduire, à titre d'exemple, par une modification de leur plage de fusion. Or, les propriétés thermiques et rhéologiques de ces excipients sont des points clés dans la compréhension approfondie et la maîtrise d'un processus de fabrication thermoplastique. De plus, l'évolution des propriétés physiques et/ou chimiques de ces excipients est primordiale dans la définition des conditions de conservation de la forme finie. Par ailleurs, la littérature relate plusieurs études soulignant l'importance de considérer la composition chimique et la structure physique des glycérides afin d'interpréter correctement les courbes de dissolution *in vitro* des principes actifs incorporés dans ces formes (Laine et col., 1988 ; Sutananta et col., 1994, Sutananta et col., 1995b).

Cependant, les méthodes facilement accessibles et permettant l'étude de ce type de structure complexe, sont limitées (Craig, 1996). Nous en avons sélectionné quatre : la calorimétrie différentielle à balayage (« differential scanning calorimetry » ou DSC), la microscopie sur platine chauffante (« hot stage microscopy » ou HSM), la diffraction aux rayons X et la rhéologie à l'aide d'un rhéomètre capillaire à pression variable.

III.1.2. Matériels et méthodes

A. Les produits utilisés

<i>Produit</i>	<i>Fournisseur</i>	<i>Quelques caractéristiques</i>
<i>Compritol® 888 ATO</i> <i>Béhénate de glycérol</i>	Gattefossé (France)	Indice Acide <4.0 Valeur HLB = 2 Plage du fusion : 69-74 °C Poudre fine atomisée Applications : lubrifiant inerte, agent liant, excipient pour libération prolongée *
<i>Précirrol® ATO 5</i> <i>Palmito-stéarate de glycérol</i>	Gattefossé (France)	Indice Acide <6.0 Valeur HLB = 2 Plage du fusion : 53-57 °C Poudre fine atomisée Applications : lubrifiant inerte, agent liant, excipient pour libération prolongée*
<i>Chlorhydrate de</i> <i>phényléphrine</i>	Fédéra (Belgique)	Point de fusion : 140-145°C** Temps de demi-vie plasmatique ($t_{1/2}$)*** = 2 à 3 h
<i>Chlorhydrate de</i> <i>ciprofloxacine</i>	Siris (Inde)	Point de fusion : 318-320°C** Temps de demi-vie plasmatique ($t_{1/2}$)*** = 3 à 4 h
<i>Kétoprofène</i>	Sochibo (France)	Point de fusion : 94°C** Temps de demi-vie plasmatique ($t_{1/2}$)*** = 1 à 3 h
<i>Théophylline anhydre</i>	Ludeco (Belgique)	L'index Merck renseigne le point de fusion de la théophylline monohydratée : 270-274°C Temps de demi-vie plasmatique ($t_{1/2}$)*** = 1,4 à 12,8 h

* Gattefossé, 1998 ; **Merck, 1996 ; *** Dollery, 1999.

Le choix des principes actifs repris par le tableau ci-dessus, a essentiellement été dicté par l'étroitesse de leur temps de demi-vie plasmatique qui en fait de bons candidats au développement d'une forme à libération prolongée. Par ailleurs, en raison de sa grande

hydrosolubilité ($>1\text{g/ml}$), le chlorhydrate de phényléphrine a été retenu comme traceur pour les essais de développement d'une forme orale divisée, à libération prolongée, à base des excipients lipophiles.

B. Préparation des échantillons

Trois types d'échantillons ont été préparés pour l'évaluation des propriétés physiques de ces glycérides :

- **Les échantillons tels quels (TQ)** : ce sont les substances pures telles quelles, sans aucun traitement préalable.
- **Les échantillons fraîchement recristallisés ou échantillons frais (F)** on distingue :
 - « **F** » : ce sont des échantillons qui ont été préparés par fusion du corps gras TQ, à une température de 10°C supérieure à son point de fusion, recristallisés à température ambiante, puis conservés 10 h au réfrigérateur à 4°C . Ce traitement permet d'effacer le passé thermique des échantillons et éviter ainsi la détection de phénomènes thermiques consécutifs aux éventuels changements qu'ils auraient subis durant leur conservation.
 - « **F-N2** » : ce sont des échantillons TQ qui ont été fondus à une température de 10°C supérieure à leur point de fusion, recristallisés brutalement dans l'azote liquide puis analysés immédiatement après.
 - « **F 5°C/min** » : ce sont des échantillons qui ont été traités par DSC de la façon suivante : échantillon fondu à une vitesse de 5°C/min , recristallisé à la même vitesse et refondu toujours à la même vitesse.
 - « **F 10°C/min** » : ce sont des échantillons qui ont été traités par DSC de la façon suivante : échantillon fondu à une vitesse de 5°C/min puis recristallisé à une vitesse de 10°C/min ; de la même manière, en fonction de la vitesse de refroidissement appliquée nous aurons les échantillons : « **F 20°C/min** », « **F 50°C/min** » ou encore « **F 150°C/min** ». Ces échantillons recristallisés au sein de l'appareil, sont refondus à une vitesse de 5°C/min .

- **Les échantillons vieillis (V)** : ce sont des échantillons frais (F) ayant subi un vieillissement durant 1 mois à 40°C ou à 50°C de manière à détecter la présence d'éventuelles formes polymorphes. En effet, la conservation des échantillons à ces températures favorise l'évolution des formes métastables vers les formes les plus stables.

Le comportement thermique de mélanges binaires de Précirrol® et de Compritol® dans les proportions envisagées pour la fabrication des microbilles, a également été évalué (tableau 1). Cette évaluation nous a notamment renseigné la température de travail lors de la fabrication des microbilles lipidiques à libération prolongée. Ce développement est largement discuté au niveau du chapitre III.2.

Enfin la compatibilité des excipients lipidiques avec les principes actifs a été évaluée en analysant par DSC des mélanges binaires 50/50 (m/m) Précirrol®/principe actif et Compritol®/principe actif.

Tableau 1 : Les mélanges binaires de Compritol® (C) et de Précirrol® (P) utilisés lors des études par DSC et des études du comportement rhéologique des corps gras

Formulation utilisée pour les microbilles	Compritol® (C) (%, m/m)	Précirrol® (P) (%, m/m)	Proportion du mélange C-P destiné à l'analyse
25% de corps gras	10	15	4-6
40% de corps gras	25	15	6-4
80% de corps gras	65	15	8-2

C. Analyses par calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

L'analyse calorimétrique différentielle à balayage (ou en anglais DSC: Differential Scanning Calorimetry) est une technique permettant d'étudier les transitions thermiques d'un composé donné à la suite d'une modification de sa température. Cette modification peut être exothermique ou endothermique. L'analyse thermique par DSC couplée à d'autres techniques occupe une place privilégiée dans les études de préformulation, notamment dans l'évaluation

du polymorphisme d'une substance pharmaceutique et dans l'étude de la compatibilité des ingrédients présents dans les formes solides (Ford et Timmins, 1989).

En cas de polymorphisme, le matériau cristallise sous plusieurs formes, avec une organisation moléculaire différente au sein de chacune de ces formes. Cette différence dans l'organisation interne de la structure moléculaire du solide fait que les formes polymorphes peuvent différer en leur point de fusion, solubilité, réactivité ou stabilité. Ce phénomène a un impact sur certaines propriétés pharmaceutiques du matériau, comme la vitesse de dissolution et la biodisponibilité (Brittain, 2002). En pratique, une vitesse de chauffage lente (de 2°C à 5°C/min) doit être appliquée car elle s'avère être importante pour la détection de polymorphes. Ceci s'explique par le fait qu'une vitesse lente permet aux formes polymorphiques les moins stables ayant les plages de fusion les plus faibles, de se manifester sous la forme de pics additionnels, avant de voir apparaître l'endotherme de fusion correspondant à la forme la plus stable (Ford et Timmins, 1989).

L'étude de la compatibilité d'un principe actif avec différents excipients peut également être conduite par DSC. Cette étude permet dans bien des cas de détecter des interactions chimiques et/ou physiques. Parmi les interactions susceptibles d'être rencontrées, citons : la formation de complexes, des interactions acide/base ou la formation d'un eutectique. L'observation de l'un ou de plusieurs des phénomènes suivants doit attirer l'attention sur un problème de compatibilité des mélanges (Ford et Timmins, 1989) :

- L'apparition d'un nouveau pic endo- ou exothermique
- La disparition d'un pic endo- ou exothermique préexistant
- Un déplacement de la plage de fusion
- Un changement dans l'enthalpie de fusion

Par contre, une modification de l'allure des pics ne signifie pas pour autant une incompatibilité entre le principe actif et l'excipient. En effet, un élargissement des premiers pics (augmentation de leur aire, modification de « l'Onset » ou le point marquant le début du phénomène thermique) peut parfois être observé et s'explique tout simplement par le fait même de mélanger différents produits entre eux (effet de dilution). Si tel est le cas et que par

ailleurs toutes les caractéristiques thermiques de l'échantillon demeurent, la compatibilité peut être acceptée.

Nous avons utilisé un appareillage Perkin-Elmer DSC-7 (Perkin Elmer Instruments, USA) muni d'un dispositif d'analyse thermique TAC-7, d'un système de refroidissement Intracooler-2 qui permet d'effectuer des mesures à des températures sub-ambiantes et d'un logiciel informatique Pyris pour le traitement des données.

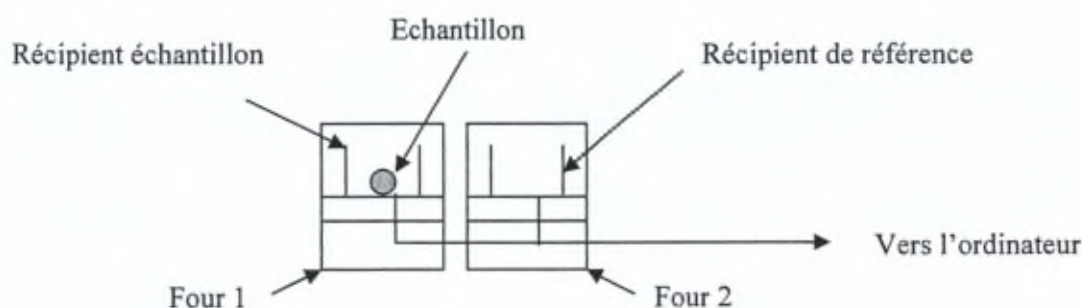


Figure 4 : Représentation simplifiée d'un calorimètre différentiel à balayage (Clas et col., 2002)

Ce dispositif est équipé de deux fours (figure 4), l'un destiné à l'échantillon et l'autre à la référence, chacun d'eux possède son propre système de chauffage. Un échantillon de quelques milligrammes est pesé précisément (au 0,01 mg près) dans une cupule en aluminium non perforée, de 50 μ l avant de la sceller. Une cupule identique, mais vide, joue le rôle de référence. Un système de régulation automatique maintient égales, à tout moment de l'analyse, les températures des deux compartiments (échantillon et référence). Chacun de ces deux compartiments contient un thermocouple relié au logiciel informatique. Ce dernier compense la différence entre la température de l'échantillon et celle de la référence et les convertit en flux de chaleur. Pour un phénomène de fusion par exemple, la mesure renseignée est celle de la quantité de chaleur supplémentaire à fournir au récipient échantillon afin de maintenir les deux compartiments à la même température.

La régulation de la température s'effectue sous un balayage des deux fours par un flux d'azote. La vitesse de chauffage et de refroidissement adoptée pour la majorité de nos essais était de 5°C/min.

La courbe DSC (thermogramme) obtenue traduit le flux de chaleur en fonction de la température. Le signal renseigné en ordonnée (en mW) est proportionnel au rapport dq/dt , correspondant à la différence de la quantité de chaleur (dq en J) fournie par les deux systèmes de chauffage au niveau des deux compartiments en fonction du temps (dt en s), la quantité de chaleur étant le produit de la capacité de chaleur (C_p) par la température (T). En effet, le flux de chaleur est la différence de la quantité de chaleur à fournir par unité de temps aux deux récipients afin de maintenir leurs températures égales.

Ainsi, à une température donnée, le flux de chaleur peut être exprimé par le rapport [1] :

$$\begin{aligned} \text{Flux de chaleur} &= \text{différence de quantité de chaleur} / \text{différence de temps} \\ &= C_p \times dT/dt \\ &= dq/dt \text{ (J/s)} \end{aligned} \quad [1]$$

La vitesse de chauffage est exprimée par la relation [2] :

$$\text{Vitesse de chauffage} = \text{Augmentation de la température} / \text{temps} = dT/dt \text{ (°C/s)} \quad [2]$$

La capacité de chaleur est le résultat du rapport de ces deux paramètres, d'où l'équation [3]:

$$\begin{aligned} \text{Capacité de chaleur} &= \text{flux de chaleur} / \text{vitesse de chauffage} \\ &= dq/dT = C_p \text{ (J/°C)} \end{aligned} \quad [3]$$

L'analyse par DSC permet également de renseigner l'enthalpie (ΔH en J/g) des modifications thermiques. Celles-ci se manifestent au niveau du thermogramme par une modification de la ligne de base, dont l'intensité et la direction dépendront de l'intensité et de la nature exo- ou endothermique de la transition.

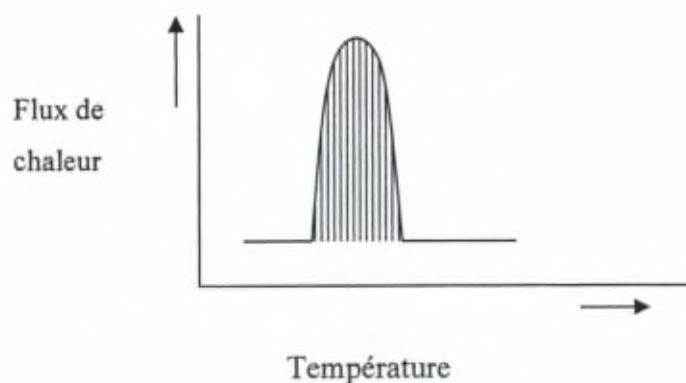


Figure 5 : Un endotherme de fusion

La mesure de l'enthalpie de fusion d'un composé donné se fait de la façon suivante :

L'aire du pic endothermique de fusion représentée par la figure 5 peut être calculée en chaque point de la courbe par le produit suivant :

$$\text{Aire} = \text{flux de chaleur} \times \text{la température (J.}^{\circ}\text{C/s)} \quad [4]$$

Si l'on ramène cette aire à la vitesse de chauffage imposée à l'appareil et à la quantité d'échantillon utilisée, on trouve l'expression de l'enthalpie:

$$\text{Enthalpie} = \text{Aire} / (\text{Vitesse de chauffage} \times \text{masse}) \quad (\text{J/g}) \quad [5]$$

Connaissant avec précision la quantité d'échantillon analysée, on peut en déduire la quantité de chaleur nécessaire à la fusion du composé étudié.

Enfin, avant d'effectuer une série d'analyses par DSC, il est important d'étalonner l'appareil. L'étalonnage en température et en chaleur a été effectué par comparaison avec la fusion d'une masse connue d'Indium et de cyclohexane de haute pureté. Leurs températures de fusion sont respectivement de 156,60°C et de 6,54°C. L'enthalpie de fusion de l'Indium est de 28,45 J/g, celle du cyclohexane est de 31,25 J/g. Une fois ce calibrage effectué, les différents types d'échantillons (F, V et TQ) de Compritol® et de Précirol® sont analysés, ainsi que les différents mélanges binaires décrits dans la section précédente.

D. Analyses par microscopie sur platine chauffante (HSM)

La microscopie sur platine chauffante ou en anglais : HSM pour « Hot Stage Microscopy », est une technique rassemblant les avantages de la microscopie, notamment en terme d'observation des phénomènes et de l'analyse thermique. Le dispositif utilisé est composé d'une platine chauffante Linkam THMS 600 hot stage, combinée à un régulateur de la température Linkam LNP/ TMS 94 (Royaume Uni) ; l'ensemble est raccordé à un microscope Olympus-BX 60 (Japon) équipé d'une caméra vidéo couleurs, qui permet l'acquisition des images en temps réel.

Les échantillons (F, V et TQ) de Compritol® et de Précirol® ont été observés en adoptant une vitesse de chauffage puis de refroidissement de 1°C/min. L'évolution de la morphologie de l'échantillon (fusion, cristallisation) fut notée en fonction de la température. Les données étaient directement transmises à l'ordinateur, permettant ainsi une observation et un suivi des phénomènes sur écran en temps réel ainsi qu'un enregistrement direct de ces données ; leur traitement a été effectué par le logiciel « Olympus Microimage version 4.0 ».

En pratique, quelques milligrammes d'échantillon sont placés sur une lame porte-objet résistante aux variations de température. Celle-ci est elle-même déposée au sein de la platine chauffante. Une arrivée d'azote liquide est prévue afin de permettre le refroidissement de l'échantillon et la visualisation de la recristallisation des corps gras. La figure 6 montre une vue globale de l'appareillage. Une représentation schématique de l'appareil (Steele, 2001) est reproduite au niveau de la figure 7.



Figure 6: Dispositif de la Microscopie sur Platine Chauffante (Linkam)

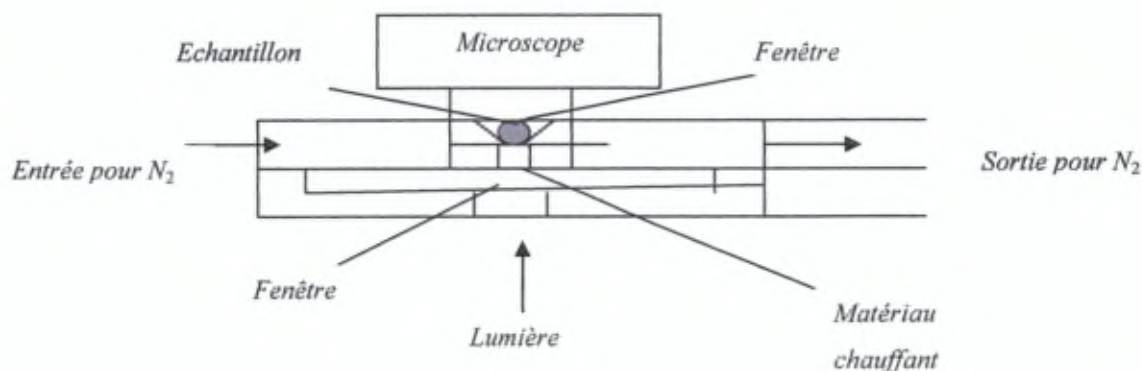


Figure 7 : Représentation schématique d'une platine chauffante

La microscopie sur platine chauffante fait partie d'un quatuor de techniques complémentaires dans la caractérisation d'un composé donné lors d'une étude de préformulation. Les trois autres sont : l'analyse par DSC, la diffraction aux rayons X (exposée ci-dessous) et l'analyse par thermogravimétrie (TGA). Tant la diffraction aux rayons X est essentielle pour rendre compte de l'état physique (cristallin ou amorphe) de la substance, tant la DSC est importante pour déterminer les propriétés thermiques de celle-ci. La TGA, elle, permet de confirmer des événements thermiques transitoires tels que la décomposition ou la volatilisation d'une substance alors que la HSM permet de visualiser des transitions thermiques tels les phénomènes de fusion et de cristallisation (Vitez et col. 1998). Dans la mesure où l'étude de la décomposition ou de la volatilisation d'une substance ne relevait pas des phénomènes auxquels nous avons été confrontés, nous avons opté pour les trois autres techniques et nous les avons complétées par une étude des propriétés rhéologiques des corps gras.

E. Analyses par diffraction aux rayons X (DRX)

Les rayons X sont des rayonnements électromagnétiques dont le spectre d'émission se situe entre l'ultraviolet et les rayons gamma. Ils émettent à une longueur d'onde comprise entre 0,01 et 100 Å. Ces rayonnements trouvent une application pharmaceutique dans la détermination de l'état de cristallisation d'un principe actif par DRX. L'état amorphe ou cristallin d'un principe actif a une grande implication sur les propriétés de dissolution de celui-ci et par là même sur sa biodisponibilité. Cette méthode est non destructive et nécessite une faible quantité d'échantillon (Suryanarayanan et Rastogi, 2002).

En considérant qu'un cristal est constitué de plans atomiques séparés d'une distance d , la **loi de Bragg** (équation 6) exprime la condition permettant d'observer la diffraction par un réseau cristallin d'une onde électromagnétique incidente de longueur d'onde λ .

$$2 d \sin \theta = n \lambda \quad [6]$$

n étant l'ordre de la réflexion (c'est un nombre entier généralement = 1) et 2θ l'angle entre la direction des rayons incidents et celle des rayons diffractés (figure 8).

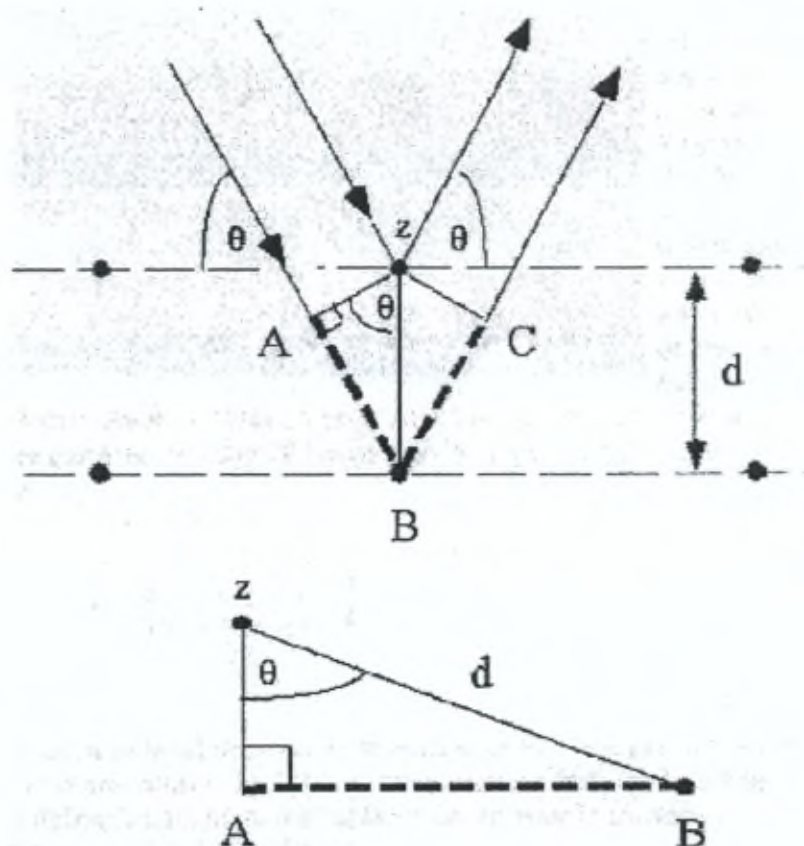


Figure 8 : Schéma permettant l'interprétation de l'équation de Bragg

(www.phy.ulaval.ca/gb/17323/XRD.html, 2004)

Ainsi, pour un type de plan donné représenté schématiquement ci-dessus (plan ABC de la figure 8), la diffraction du rayonnement n'aura lieu qu'à un certain angle θ , déterminé par la longueur d'onde λ du rayonnement incident et la distance d entre les plans réticulaires parallèles du cristal.

La diffraction aura lieu si les ondes diffractées par deux plans successifs sont en phase ; ces ondes sont alors additives. En reprenant la figure 8, nous pouvons aboutir à l'équation de Bragg de la façon suivante (Huart-Oth, 1987) :

$$\text{Soit } AB + BC = n \lambda \quad [7]$$

$$\text{or : } \sin \theta = AB/d = BC/d \quad [8]$$

$$\text{Et donc : } 2d \sin \theta = n \lambda \quad [9]$$

Les échantillons analysés sont sous forme de poudre, les spectres de diffraction obtenus sont caractéristiques de la substance et de son état physique.

Nos analyses par diffraction RX ont été effectuées sur des échantillons de Compritol® et de Précirol® frais, vieillis et tels quels (F, V, TQ). L'échantillon sous forme de poudre est introduit dans un porte-échantillon et est soumis à la raie $K\alpha$ de cuivre, radiation monochromatique ($\lambda = 1,540 \text{ \AA}$). Le diffractomètre (Siemens D 5000, Allemagne) est équipé d'un montage en réflexion dit de Bragg-Brentano, relié au monochromateur et à une chaîne de programmes DiffracPlus. Les mesures furent déterminées à 40 KV, 40 mA, dans une plage angulaire 2θ allant de 5° à 60° , à des pas de $0,02^\circ$ en adoptant une vitesse de comptage de 1,2 sec par pas et une vitesse de rotation de l'échantillon de 15 rpm.

F. Etude des caractéristiques rhéologiques du Compritol® et du Précirol® en fonction de la température

Les propriétés rhéologiques des corps gras (Compritol® et Précirol®) avaient fait l'objet d'une étude à laquelle a participé notre service (Evrard et col., 1999) et dont les résultats nous ont été fort utiles. Nous les avons complétés par l'étude des propriétés rhéologiques de mélanges de Compritol® et de Précirol® dans les proportions utilisées lors de la fabrication des microbilles et qui sont reprises par le tableau 1. En effet, l'étude du comportement rhéologique (déformation, écoulement) d'un corps gras en fonction de la température revêt une grande importance dans la compréhension et la maîtrise du procédé de fabrication des microbilles par la technique de pelletisation thermoplastique. Ce procédé met en jeu à la fois une augmentation de la température et de fortes forces de cisaillement dues aux mouvements du bras du mélangeur granulateur à haute vitesse ainsi qu'à ceux du chopper (chapitre III.2.).

L'évaluation des propriétés rhéologiques des corps gras non fondus a été effectuée à l'aide d'un rhéomètre capillaire à pression variable « Rheograph 2002 » (Göttfert, Buchen, Allemagne) représenté par la figure 9a.

L'échantillon est introduit dans la partie supérieure du rhéomètre (figure 9 b) et subit une pression permettant son passage dans le capillaire à un débit préprogrammé (Q). La résistance opposée par l'échantillon à son écoulement à travers ce capillaire est traduite par une décroissance de la pression entre les points I et II.

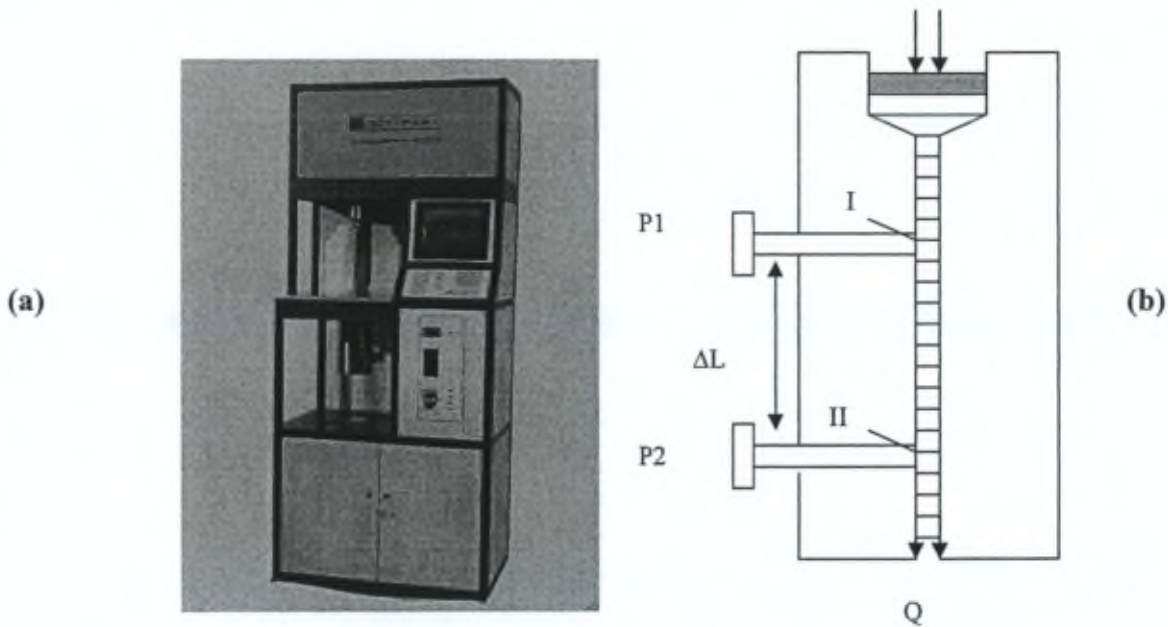


Figure 9 : (a) Rheograph 2002 Göttert, (b) représentation schématique d'un rhéomètre capillaire à pression variable (http://www.lrccp.net/public/htmls/competences/fr_ut1_3.htm, 2005)

Ces points sont distants d'une longueur ΔL et doivent être suffisamment éloignés de l'entrée et de la sortie du capillaire de manière à assurer un écoulement laminaire dans ce tronçon. Ces points sont reliés à deux chambres P1 et P2, au niveau desquels la pression est mesurée. On mesure ainsi la différence de pression $\Delta P = P1 - P2$. La **viscosité apparente** (η_{app}) de l'échantillon est obtenue en reliant ΔP (Pa) à Q (cm^3/s) (Schramm, 1981):

$$\eta_{app} = k \times \Delta P / Q \text{ (Pa.s)} \quad [10]$$

En effet le **taux de cisaillement** (τ) s'exprime ainsi :

$$\tau = (R / 2 \times \Delta L) \Delta P = C_1 \times \Delta P \text{ (Pa)} \quad [11]$$

R est le rayon du capillaire et $C_1 (= R / 2 \times \Delta L)$ est une constante relative aux dimensions du capillaire.

La **vitesse de cisaillement (D)** s'exprime de la façon suivante :

$$D = (4 / \pi \times R^3) \times Q = C_2 \times Q \text{ (s}^{-1}\text{)} \quad [12]$$

$C_2 = (4 / \pi \times R^3)$ est une constante relative aux dimensions du capillaire s'exprimant en cm^{-3} (Schramm, 1981).

Des pressions allant jusqu'à $2 \times 10^8 \text{ N.m}^{-2}$ ($\pm 2000 \text{ bar}$) ont été exercées afin de maintenir un flux constant de ces corps gras à travers le capillaire. Ce dernier, en acier inoxydable, avait un diamètre interne de 1,0 mm et une longueur de 20 mm. Des vitesses de cisaillement allant de 4000 à 10 s^{-1} ont été imposées au système. La viscosité apparente (η_{app} , Pa.s) a été déterminée à différentes températures allant de 45°C à 75°C.

III.1.3. Résultats et discussion

L'évaluation des caractéristiques physico-chimiques des excipients gras utilisés a débuté par une série d'analyses thermiques par DSC. La figure 10 montre les thermogrammes de fusion obtenus pour des échantillons frais (F 5°C/min), vieillis (V) (1 semaine à 40°C) et tels quels (TQ) de Précirol® et de Compritol®. Pour chacun d'eux, une pesée précise de l'ordre de 5 mg de corps gras a été traitée à trois reprises à des vitesses de chauffage et de refroidissement de 5°C/min, sous une atmosphère d'azote. Pour rappel, le mode de préparation des échantillons est décrit au niveau du chapitre III.1.2.B *Préparation des échantillons*.

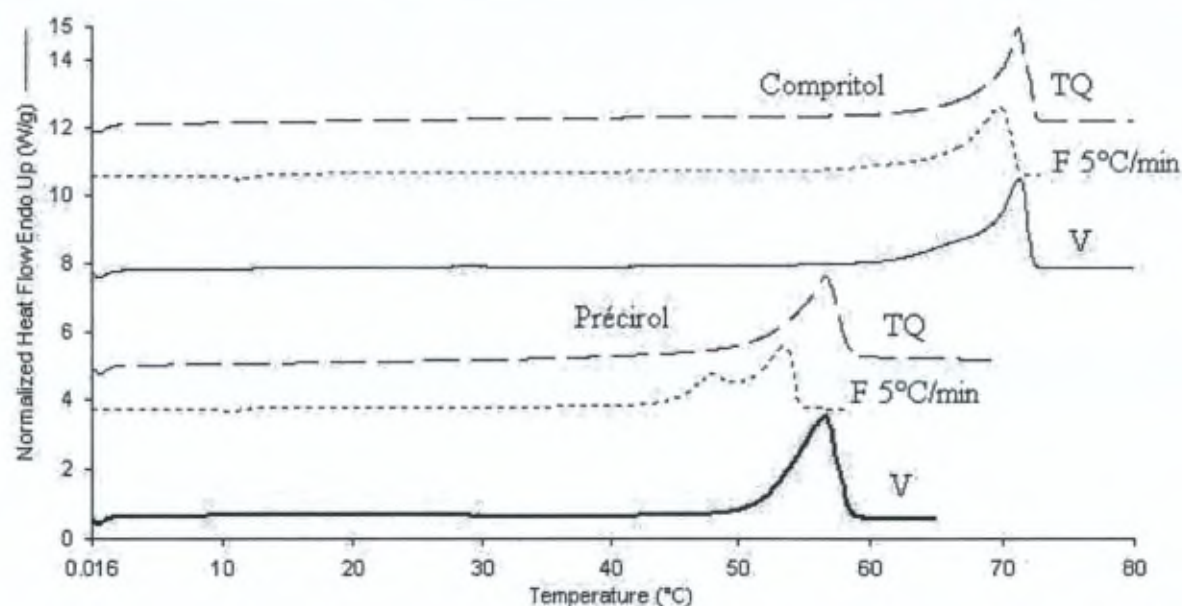


Figure 10: Courbes DSC de fusion d'échantillons de Précirol® et de Compritol®, tel quels (TQ), frais (F 5°C/min) et vieillis (V)

On relève qu'en fonction du traitement subi (F, V ou TQ), l'échantillon de Précirol® connaît des changements perceptibles au niveau de ses courbes en DSC. La comparaison du thermogramme obtenu à partir de l'échantillon frais à celui obtenu à partir de l'échantillon vieilli, permet de soupçonner la présence d'au moins deux formes polymorphes. En effet, seul l'échantillon frais montre deux pics de fusion. De ces deux pics, celui ayant le point de fusion le plus bas disparaît lors du vieillissement et est absent de l'échantillon TQ. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Evrard et col. (1999). Nous avons également effectué des analyses par DSC, en imposant des vitesses de refroidissement différentes. Ces essais ont été effectués sur un échantillon TQ qui a été chauffé à 5°C/min puis refroidi à 10, 20, 50 ou 150 °C/min. Les thermogrammes de fusion obtenus après avoir recristallisé l'échantillon en adoptant ces différentes vitesses de refroidissement sont tout à fait semblables à celui de l'échantillon frais qui a été refroidi à 5°C/min. Ils présentent tous deux pics de fusion comme le montre la figure 11. La variation de la vitesse de refroidissement n'a donc pas été révélatrice de nouveaux pics de fusion qui indiqueraient la présence de plus de deux polymorphes pour ce corps gras.

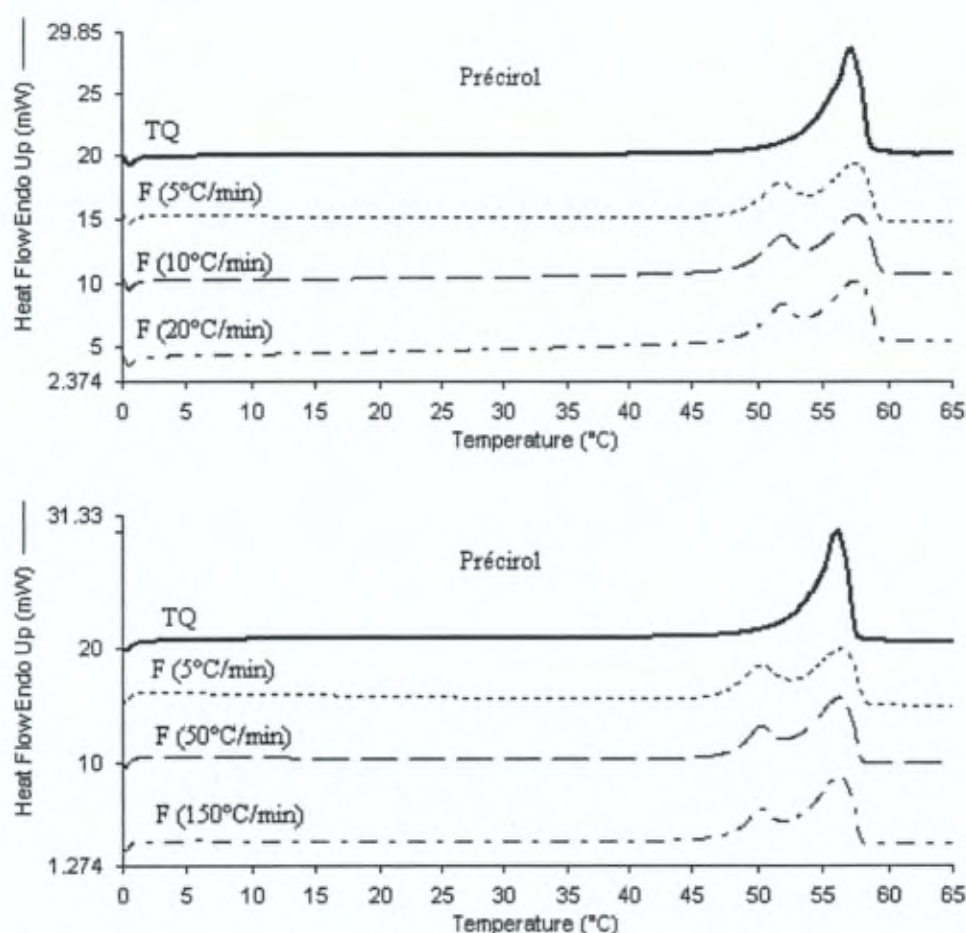


Figure 11 : Thermogrammes représentant l'influence de différentes vitesses de refroidissement sur la recrystallisation du Préciról®

Par ailleurs, la comparaison des thermogrammes de fusion d'un échantillon de Préciról F (échantillon TQ, fondu, recrystallisé à température ambiante et conservé 10 h à 4°C), d'un échantillon F 5°C/min et d'un échantillon F-N2 (pour rappel, c'est un échantillon TQ fondu et refroidi brutalement dans l'azote liquide juste avant son analyse), montre que seul un échantillon de Préciról® ayant été fondu par DSC, recrystallisé puis immédiatement refondu lors de la même analyse, permet la visualisation de deux pics de fusion et ce quelle que soit la vitesse de refroidissement adoptée (figures 11 et 12). Bien que les échantillons F et F-N2 montrent l'ébauche d'un second pic, celui-ci est loin de se distinguer du premier. Ces constatations nous mènent à supposer que le Préciról® recrystallise sous deux formes cristallines, dont l'une est fortement instable. Cette dernière, évoluant immédiatement vers

une forme plus stable, ne présente plus qu'un seul pic de fusion pour les échantillons TQ, F, F N-2 et V. Ce constat est renforcé à l'examen du thermogramme obtenu à partir de l'échantillon F-N₂ (5°C/min), où tout comme le thermogramme de l'échantillon F(5°C/min) nous retrouvons les deux pics de fusion des deux formes cristallines du Précirrol®. Ces résultats nous ont montré la nécessité de recourir à une technique rendant compte de l'état cristallin des solides comme la diffraction RX.

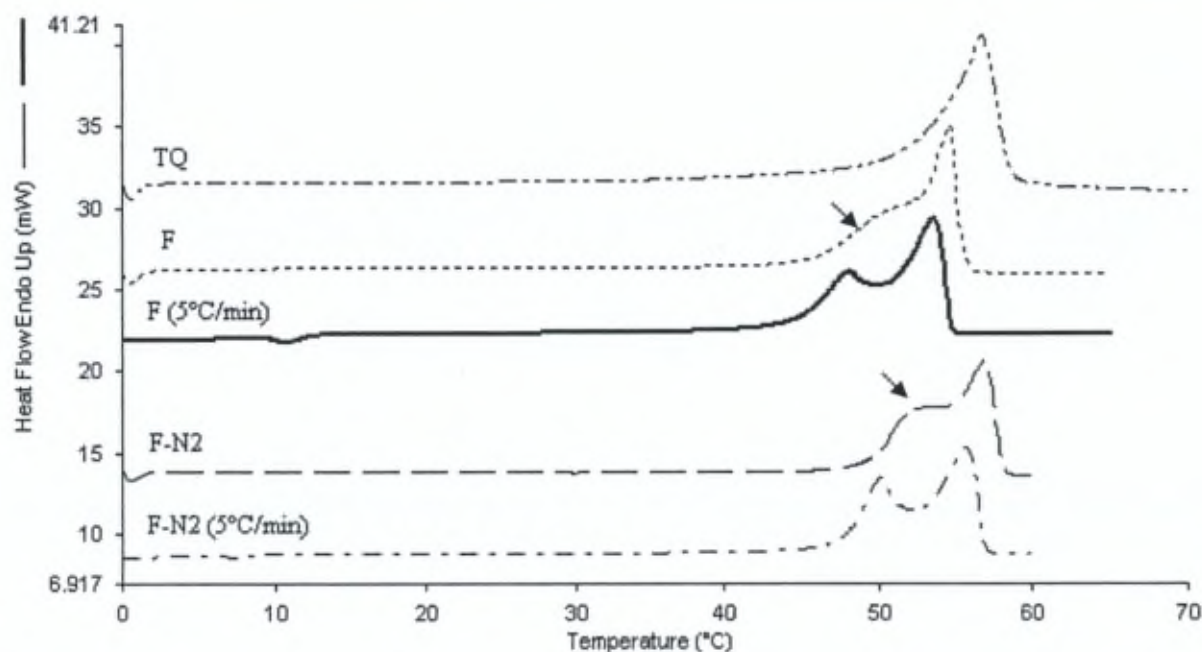


Figure 12 : Thermogrammes d'échantillons de Précirrol® TQ, puis chauffé et refroidi : à température ambiante (F), à 5°C/min F(5°C/min), ou dans l'azote liquide (F-N₂). F-N₂ (5°C/min) correspond lui à l'échantillon F-N₂ qui a été fondu et recristallisé à une vitesse de 5°C/min

Enfin, dans le but de visualiser les thermogrammes de fusion et de recristallisation des corps gras et d'évaluer l'impact d'une vitesse de refroidissement lente sur leur comportement thermique, des échantillons TQ de Précirrol® et de Compritol® ayant subi un chauffage, un refroidissement et un second chauffage, sont repris par les figures 13 et 14. Les différents traitements thermiques repris par la figure 13 montrent que la recristallisation du Précirrol® a lieu à une température assez proche de son point de fusion ; il recristallise aux environs de 49°C et fond aux environs de 54°C.

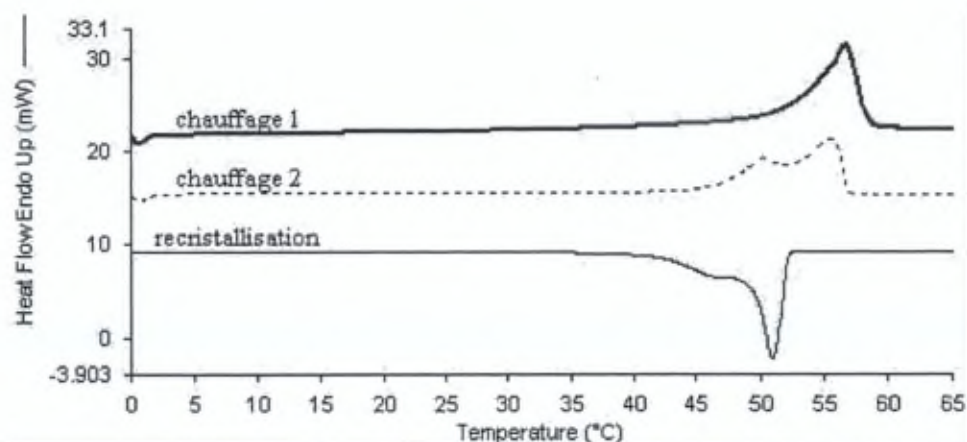


Figure 13 : Thermogrammes représentant l'ensemble des traitements subis par un échantillon tel quel (TQ) de Précirrol® : 1^{er} chauffage, refroidissement et 2^{ème} chauffage, les vitesses de chauffage et de refroidissement sont de 5°C/min

Concernant le Compritol®, les thermogrammes de fusion de ce corps gras correspondant aux échantillons F, V et TQ (figure 10) ne laissent par contre pas présager un tel phénomène de polymorphisme pour ce corps gras, dans la mesure où les courbes obtenues montrent toutes un endotherme de fusion étroit, présentant un seul pic aux environs de 70°C. La recristallisation (figure 14) du Compritol® a lieu à une température assez proche de sa fusion, il recristallise aux environs de 66°C et fond aux environs de 70°C. La recristallisation de ces deux corps gras à une température proche de leur plage de fusion constitue un avantage pour la fabrication des microbilles. En effet, nous pouvons présager qu'une fois formées les microbilles acquièrent leur structure définitive rapidement sans nécessiter une longue étape de refroidissement. Enfin, l'examen attentif de la figure 10, montre un léger déplacement des plages de fusion des échantillons F de Compritol® et de Précirrol® vers des températures inférieures à celles obtenues pour la fusion des échantillons V et TQ.

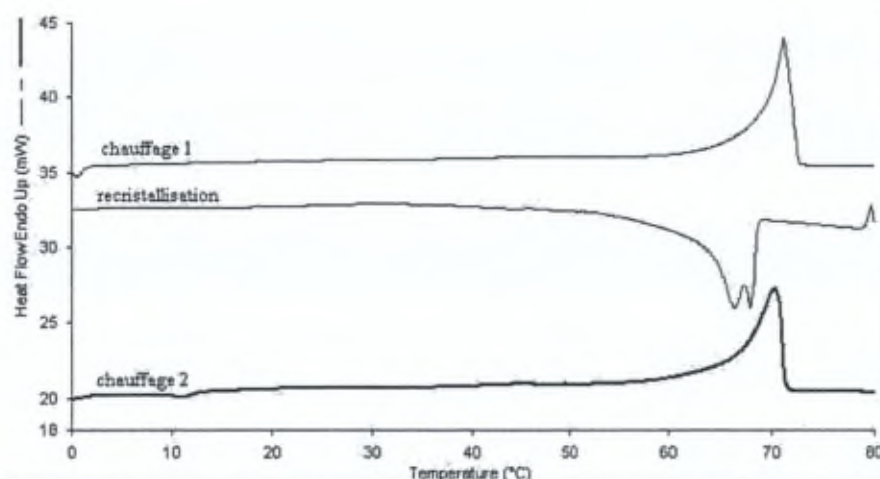


Figure 14 : Thermogrammes représentant l'ensemble des traitements subis par un échantillon tel quel (TQ) de Compritol® : 1^{er} chauffage, refroidissement et 2^{ème} chauffage, la vitesse de chauffage et de refroidissement est de 5°C/min

La diffraction RX comme technique rendant compte de la structure cristalline s'est révélée fort utile dans la mise en évidence des formes polymorphes suspectées lors des analyses par DSC.

Les figures 15 à 18 permettent non seulement de confirmer les changements structuraux qui ont lieu à la suite du vieillissement du Précirol® mais également de mettre en évidence une évolution de la structure du Compritol® en fonction de la température et de la durée du vieillissement. Des échantillons F de Compritol® et de Précirol® ont été suivis durant une période de vieillissement de cinq semaines à 40°C et à 50°C. On constate qu'il n'y a pas de superposition entre les courbes de diffraction des échantillons frais et vieillis du Précirol® (figure 15). La courbe de l'échantillon frais (échantillon fondu et recristallisé à température ambiante) montre un seul pic étroit présentant son maximum à un angle 2θ de 21,5°, tandis que les courbes des deux échantillons vieillis (2 semaines à 40°C et 24 h à 50°C) mettent en évidence trois pics dont les maxima correspondent à des angles 2θ de 19,5° ; 21,5° et 23,5°. Une évolution similaire des courbes de diffraction RX en fonction du vieillissement a été observée pour les échantillons de Compritol® (figure 16). L'examen des courbes de diffraction RX de ce corps gras révèle des courbes présentant deux pics à des valeurs de 2θ de 21° et 23° pour les échantillons F et V (2 semaines à 40°C), cependant les échantillons conservés à 50°C font exception. En effet, la courbe relative à l'échantillon V (2 semaines à

50°C) laisse apparaître un petit pic additionnel à un angle 2θ de 19,5°. Celui-ci s'accroît lors du vieillissement de l'échantillon.

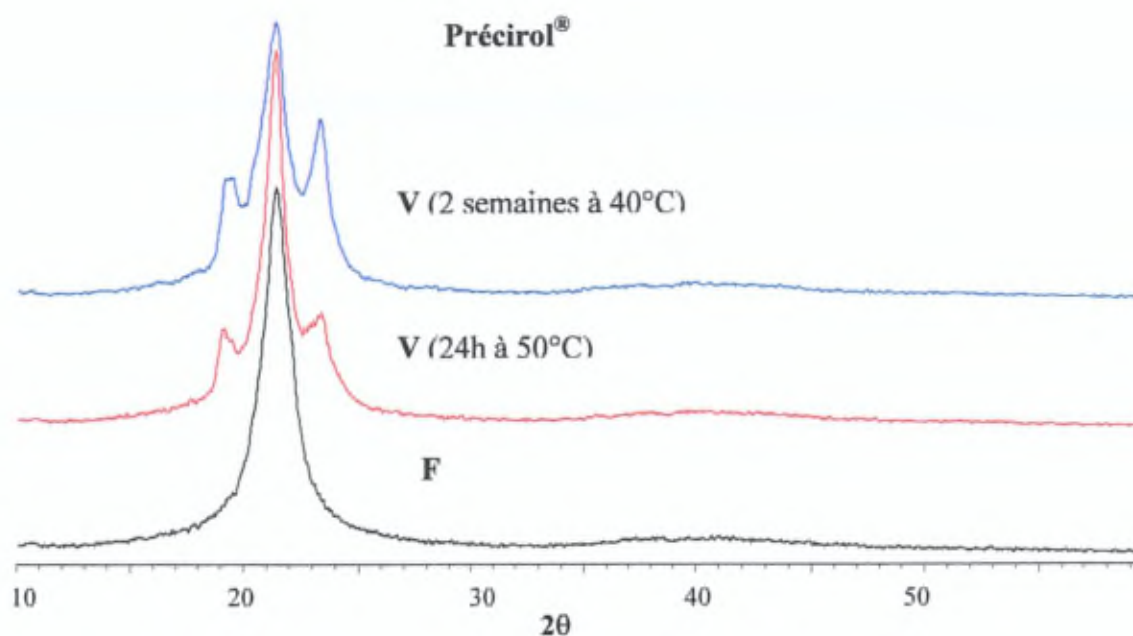


Figure 15 : Courbes de diffraction RX d'échantillons de Précitol® F et V (conservés 2 semaines à 40°C ou 24h à 50°C)

Nous obtenons ainsi après cinq semaines de conservation du Compritol® à 50°C, une courbe de diffraction RX à trois pics qui correspondent à des angles 2θ de 19,2°; 21° et 23,5°. Cette courbe présente donc une allure similaire à celle observée pour le Précitol® après sa conservation pendant 24 h à 50°C.

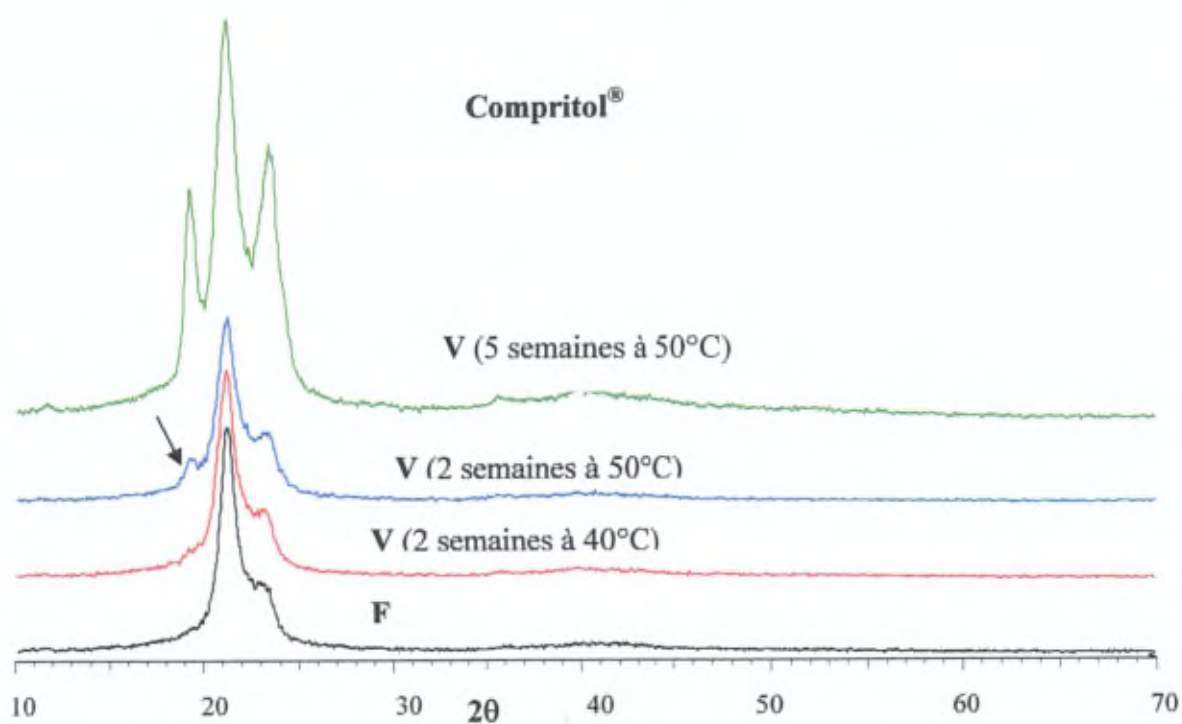


Figure 16 : Courbes de diffraction RX d'échantillons de Compritol® F et V (conservés 2 semaines à 40°C ou à 50°C , ou 5 semaines à 50°C)

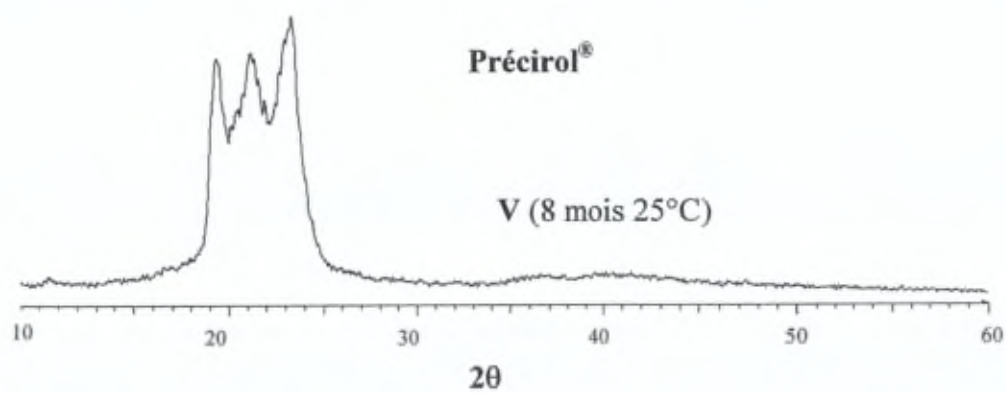


Figure 17 : Courbe de diffraction RX d'un échantillon de Précirol® conservé durant 8 mois à 25°C

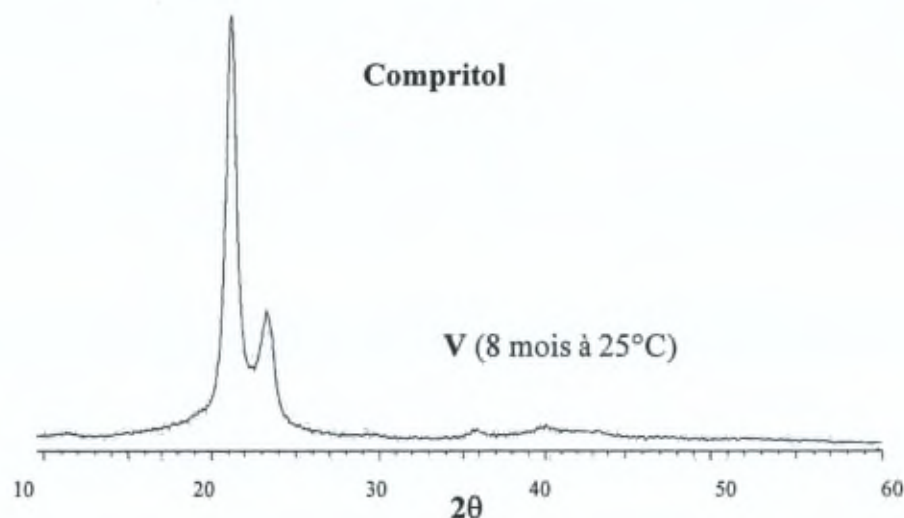


Figure 18 : Courbe de diffraction RX d'un échantillon de Compritol® conservé durant 8 mois à 25°C.

Laine et col. (1988) ont décrit des modifications similaires rencontrées lors de l'étude du vieillissement de triglycérides (tricaproate, trimyrystate, trilaurate et tripalmitate de glycérol). Ils ont interprété ces changements par le fait que ces glycérides, en se solidifiant, adoptent une structure en couches partiellement amorphe « layered amorphous structure » qui s'ordonne avec le temps en une structure cristalline stable. De plus, ils ont relevé un lien entre la vitesse de cristallisation et la taille des molécules de triglycérides : plus longues sont les chaînes d'acides gras de substitution sur le glycérol, plus lente sera l'évolution de la forme amorphe vers la forme cristalline. Par ailleurs, ils ont observé une accélération de l'évolution de cette structure amorphe en couches vers une structure cristalline, en fonction de l'accroissement de la température. En effet, la température, en augmentant l'énergie cinétique des molécules, facilite leurs mouvements et les possibilités de réarrangements moléculaires et d'évolution vers une forme cristalline plus stable.

Dans notre cas, nous constatons une évolution de la structure cristalline des corps gras avec le vieillissement. Cette évolution étant comparable à ce qui a été décrit par l'équipe de Laine et col. (1988), nous pouvons dès lors émettre l'hypothèse selon laquelle la recristallisation du Compritol® et du Précirol® donne lieu à une forme cristalline en mélange avec une forme amorphe, cette dernière évoluant avec le temps vers une ou des structures plus stables qui se manifestent par l'apparition en diffraction RX de pics étroits supplémentaires (figures 15 et 16). De plus, nous constatons que cette évolution est beaucoup plus lente pour le Compritol® qui est un béhénate de glycérol. Le glycérol est donc estérifié par un acide gras

en C₂₂ tandis que pour le Précir[®], qui est un palmito-stéarate de glycérol, le glycérol est estérifié par des acides gras en C₁₆-C₁₈. Il suffit en effet de conserver un échantillon de Précir[®] fraîchement recristallisé pendant 24 h à 50°C pour tendre vers sa forme cristalline définitive. Par contre, dans le cas d'un échantillon fraîchement recristallisé de Compritol[®], cinq semaines de conservation à 50°C sont nécessaires afin de permettre cette évolution cristalline.

Outre la taille du composé, les conditions de température adoptées durant le vieillissement expliquent également cette différence entre la vitesse de l'évolution de la structure du Compritol[®] et celle du Précir[®]. En conservant les échantillons à 50°C, nous sommes loin du pic de fusion du Compritol[®] (72°C) ; par contre, nous nous trouvons très proches de celui du Précir[®] (54°C). Or, comme nous l'avons vu ci-dessus, la température, combinée au fait d'être en présence de composés en fusion partielle, favorise les mouvements moléculaires et donc, la restructuration des composés avec l'apparition de nouvelles formes cristallines qui se traduisent par l'apparition de nouveaux pics en diffraction RX. Dans la même optique, nous constatons que la conservation d'échantillons F de Précir[®] et de Compritol[®] à 25°C durant huit mois révèle une lente évolution du Précir[®] (figure 17) vers sa structure cristalline finale qui se traduit par trois pics en diffraction RX et que nous avons observé après un vieillissement accéléré de 24 h à 50°C. Par contre, la conservation à cette température modérée ne permet pas l'évolution de la structure du Compritol[®] (figure 18).

Enfin, dans un souci de vérification du caractère réversible de ces transformations et pour s'assurer de l'absence de modifications chimiques notables, nous avons refondu les échantillons vieillis, puis analysé par diffraction RX. Le protocole suivi lors de la préparation des échantillons a été le même que celui observé pour les échantillons frais. A savoir : fusion du corps gras vieilli à une température de 10°C supérieure à son pic de fusion et refroidissement à température ambiante. Nous avons ainsi obtenu des échantillons recristallisés (Compritol[®] R et Précir[®] R, figure 19).

L'observation des courbes de diffraction RX de la figure 19 montre que l'échantillon recristallisé (R) retrouve une structure cristalline comparable aussi bien à celle de l'échantillon de départ non traité (TQ) qu'à celle présentée par l'échantillon fraîchement recristallisé F (figures 15 et 16). Nous pouvons dès lors conclure qu'aucune dégradation et/ou transformation définitive n'atteint ces corps gras lors de leur conservation dans les conditions de température précitées. Par ailleurs, la figure 19 nous renseigne sur le fait que la structure « cristalline » du Précir[®] et du Compritol[®] TQ est également une structure en partie amorphe tout à fait comparable à la structure des échantillons fraîchement recristallisés,

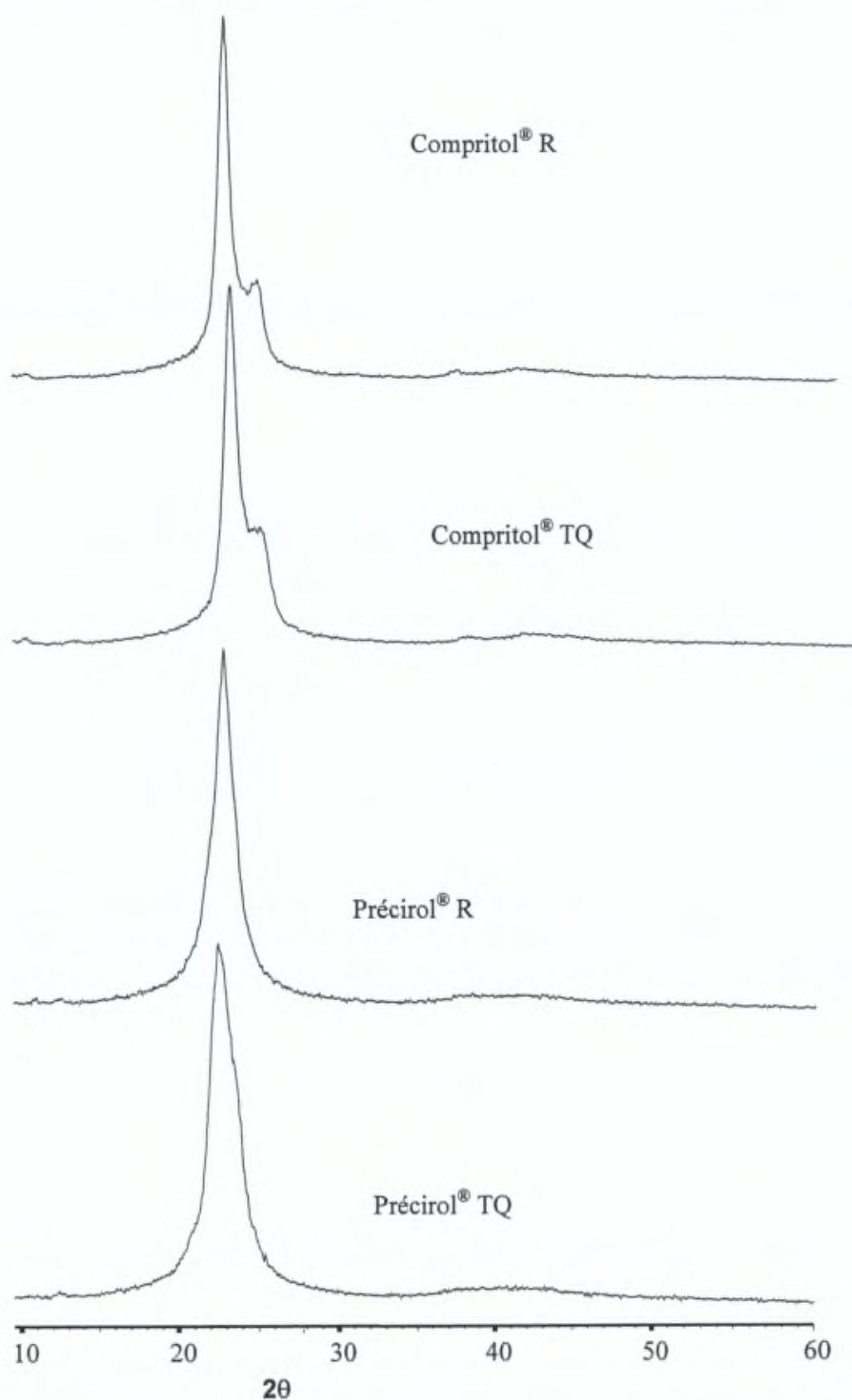


Figure 19 : Courbes de diffraction RX d'échantillons tel quel (TQ) et recristallisés (R) de Compritol® et de Précirol®

caractérisée par un seul pic en diffraction RX. Ceci s'explique par le mode même de production industrielle de ces corps gras, qui se fait par atomisation du produit dans une chambre froide « spray congealing ». Leur conservation dans les conditions préconisées par le fabricant, à savoir au frais à une température inférieure à 18°C, assure la non-évolution de la structure de ces corps gras au cours du temps.

En achevant cette discussion, il apparaît important de souligner au lecteur la corrélation entre les résultats obtenus par DSC et ceux obtenus par diffraction RX. En effet, les thermogrammes des échantillons TQ donnent un seul pic de fusion aussi bien pour le Précirrol[®] que pour le Compritol[®] (figure 10). Par contre les échantillons fraîchement recristallisés, au sein même de l'appareil, montrent tous deux pics de fusion pour le Précirrol[®], et ce quelle que soit la vitesse de refroidissement adoptée (de 5°C/ min à 150°C/ min, figures 11 et 12). Par ailleurs, les analyses par diffraction RX effectuées sur les échantillons de Précirrol[®], montrent un seul pic de diffraction aussi bien pour les échantillons F que TQ, ce qui paraît être en contradiction avec les résultats obtenus par DSC, montrant deux pics de fusion pour les échantillons F-5°C/min à F-150°C/min. L'explication viendrait du fait que l'une des deux formes polymorphiques perçues après la recristallisation de ce corps gras à une vitesse contrôlée suite à sa seconde fusion (2^{ème} chauffage, figure 13) est une forme tellement instable qu'elle évolue rapidement en une forme plus stable, caractérisée par un seul pic de fusion. Ceci est corroboré par le fait qu'un seul pic de fusion est perçu lorsque l'échantillon de Précirrol[®] est fondu, recristallisé à température ambiante puis conservé 10 h à 4°C avant son analyse (échantillon F, figure 12). Cette période serait largement suffisante à une telle évolution, d'autant plus que même l'échantillon F-N2, qui a été refroidi dans l'azote liquide et analysé immédiatement après par DSC, montre un profil de fusion avec un seul pic bien distinct (figure 12). Etant donné qu'en analyse par diffraction RX, il n'est pas possible de chauffer et de refroidir les échantillons tout en les analysant, cette forme instable n'est pas révélée par les courbes de diffraction RX des échantillons F, TQ et F-N-2 (figures 15, 19 et 20).

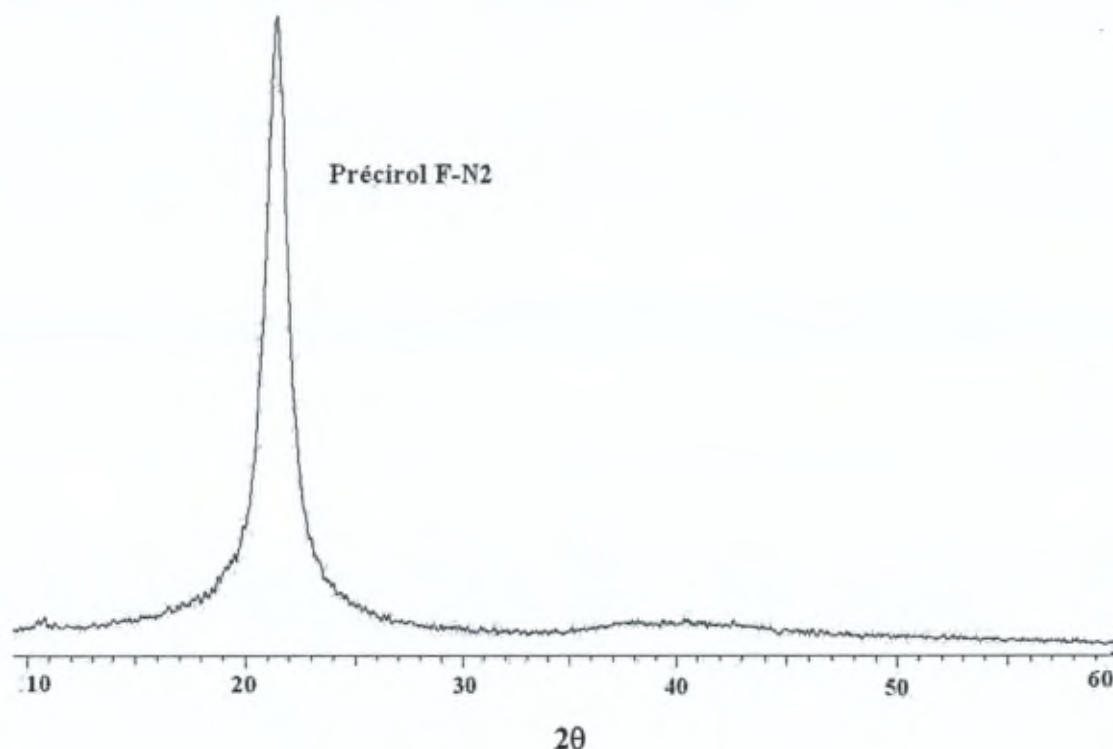


Figure 20 : Courbe de diffraction RX d'un échantillon de Precirol[®], fondu puis refroidi brutalement dans l'azote liquide (Precirol[®] F-N2)

L'utilisation des glycérides comme excipients suppose donc la prise en compte de l'évolution de leur structure cristalline dans le temps suivant les conditions de conservation (température). Il apparaît cependant de façon claire que les glycérides à longues chaînes d'acides gras et à point de fusion élevé sont beaucoup moins sensibles à ces changements physiques (Craig, 1996 ; Sutananta et col., 1995b).

Les équipes de Sutananta (1994) et de Craig (1996) proposèrent une théorie selon laquelle l'évolution de la structure cristalline de produits complexes comme les Gélucires pouvait être attribuée à la séparation des glycérides à faible et à haut poids moléculaire en différentes régions microscopiques. Chacune de ces régions est composée d'un des multiples arrangements chimiques possibles présents dans la molécule (mono, di ou tri-glycérides par exemple). Leurs études concluent ainsi à une séparation ou réorganisation des constituants moléculaires des Gélucires au cours du vieillissement.

Prenant en compte ces considérations et bien que les Gélucires que nous avons étudiés soient beaucoup moins complexes que ceux considérés par ces auteurs (Gélucires 43/01,

50/02, 54/02 et 50/13), nous avons eu recours à la microscopie sur platine chauffante (HSM) afin de tenter de visualiser la présence de ces micro-régions. Cette méthode semi-quantitative permet l'observation directe de l'échantillon lors de sa fusion et de sa recristallisation selon une vitesse de chauffage ou de refroidissement donnée. Les figures 21 et 22 reprennent les photographies obtenues à partir d'échantillons, tels quels (figures 21a et 22a) frais (figures 21b et 22b) et vieillis (figures 21c et 22c) de Précirrol® et de Compritol®, respectivement.

- Un échantillon tel quel (TQ) est un échantillon du corps gras tel qu'il a été reçu du fabricant, sans traitement préalable
- Un échantillon frais (F) est un échantillon du corps gras TQ, fondu, recristallisé (5°C/min) puis refondu, à une vitesse de 1°C/min sur la platine chauffante
- Un échantillon vieilli (V) est un échantillon du corps gras TQ, fondu à une température de 10°C supérieure à son point de fusion, puis recristallisé à température ambiante, avant sa conservation pendant 2 semaines à 40°C pour l'échantillon de Précirrol® et 5 semaines à 50°C pour l'échantillon de Compritol®.

Concernant les échantillons de Précirrol®, ces photographies ont été prises au moment où leur température était comprise entre 42°C et 58°C, par application d'une vitesse de chauffage de 1°C/min. L'échantillon (TQ) (figure 21a) apparaît majoritairement à l'état fondu à 55°C avec la persistance de quelques petites régions non encore fondues. Par contre, à 50°C les particules de ce corps gras ne montrent pas de changements morphologiques indiquant une fusion. Par ailleurs, lorsqu'on chauffe un échantillon de Précirrol® fraîchement recristallisé (échantillon frais), on constate un élargissement de la plage de fusion, puisque des modifications de l'aspect de l'échantillon sont déjà visibles à partir de 45°C (figure 21b). A 58°C, la totalité des échantillons frais comme tels quels, apparaît comme étant complètement fondue.

L'examen des photographies obtenues par HSM des échantillons tels quels (figure 22a) et frais (figure 22b) de Compritol® permet de confirmer l'étroitesse de la plage de fusion de ce composé, puisqu'aussi bien pour l'échantillon frais que tel quel, le produit commence à peine à se déformer à 71°C, avant de fondre complètement à 73°C.

Ces résultats sont à mettre en corrélation avec ceux obtenus par les analyses par DSC (figure 10), qui montrent une plage de fusion beaucoup plus étroite pour le Compritol® que pour le Précirrol®. De plus, la présence de ces micro-régions cristallines, observées par HSM

pour l'échantillon fraîchement recristallisé de Précirrol[®], expliquerait l'apparition de plus d'un endotherme de fusion lors de l'analyse par DSC de ce même type d'échantillon (voir figures 10, 21a et 21b). Ces endothermes correspondraient à la fusion de régions cristallines différentes au sein du même échantillon. Leur observation n'est révélée qu'en employant des techniques qui suivent la fusion et la recristallisation immédiate du Précirrol[®] (la DSC ou la HSM) puisque, comme nous l'avons expliqué ci-dessus, une au moins de ces formes cristallines est très instable et évolue immédiatement en une forme plus stable ne donnant qu'un seul pic de fusion en DSC.

Une autre corrélation à effectuer entre les résultats obtenus par ces deux techniques concerne le déplacement de la plage de fusion des échantillons vieillis, de Compritol[®] comme de Précirrol[®], vers des températures supérieures par rapport à la plage de fusion des échantillons frais (figures 10, 21c, et 22c). On relève ainsi la présence de cristaux non fondus à des valeurs de températures proches de 55°C pour les échantillons frais ainsi que de 56°C et pour les échantillons vieillis, de Précirrol[®]. De même, le pic de fusion du Compritol[®] se déplace de 72°C pour l'échantillon frais pour atteindre 73°C pour l'échantillon vieilli.

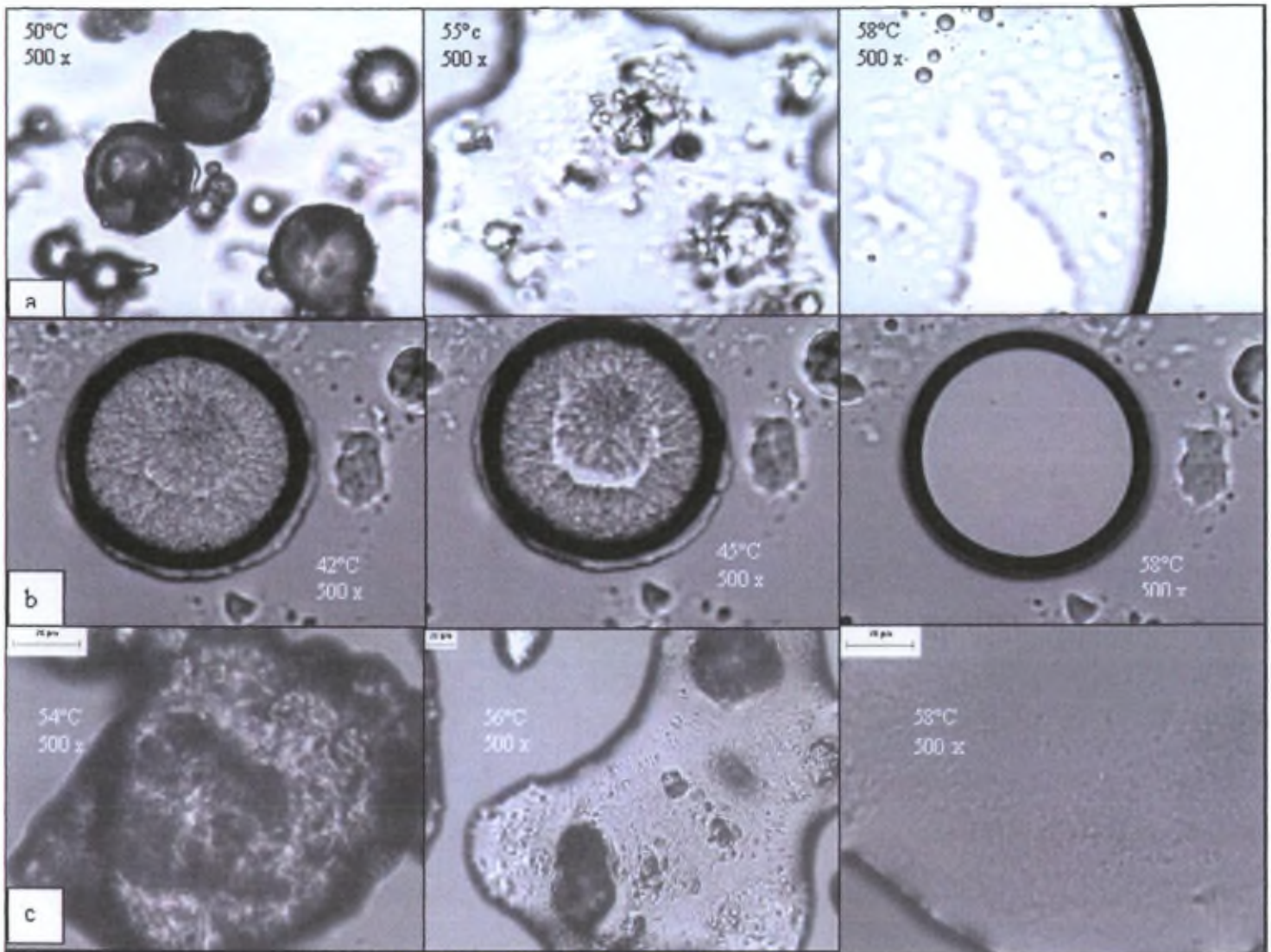


Figure 21 : Photographies de Préciröl® obtenues par HSM (grossissement de 500 X) à partir d'échantillons TQ (a), F (b) et V (c) (conservé 2 semaines à 40°C)

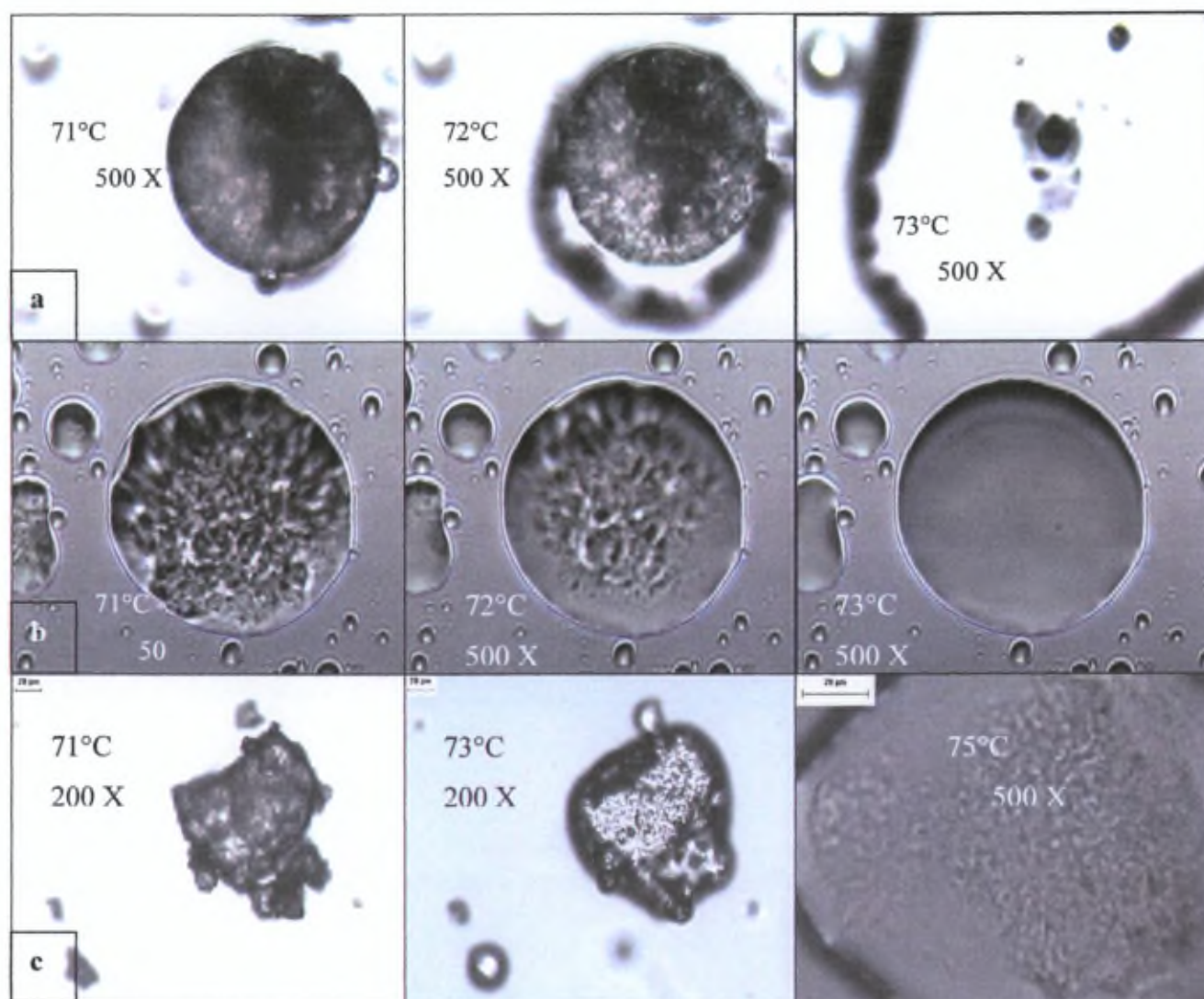


Figure 22 : Photographies de Compritol® obtenues par HSM (grossissement de 200 X ou 500 X) à partir d'échantillons TQ (a), F (b) et V (c) (conservé 5 semaines à 50°C)

Le but final de ce travail de préformulation étant l'approfondissement de la connaissance des propriétés physico-chimiques de ces corps gras afin d'optimiser leur utilisation comme excipients pour la pelletisation thermoplastique, l'étude de leur capacité de déformation sous l'action de contraintes de forte intensité, se révélait nécessaire. Cette étude s'est concrétisée par l'évaluation du comportement rhéologique du Compritol® et du Précirol® en fonction de la température et des forces de cisaillement en utilisant un rhéomètre capillaire à pression variable. Cette évaluation a été effectuée sur les échantillons à l'état solide à des températures proches de leurs plages de fusion.

Le tableau 2 montre les résultats de viscosité apparente (η_{app}) obtenus en appliquant une vitesse de cisaillement de 40 s^{-1} pour les mélanges de Précirol® et de Compritol®. Les mélanges envisagés sont dans des proportions semblables à celles employées pour la fabrication des microbilles à libération prolongée (tableau 1). Ces résultats ont été complétés par ceux obtenus lors de l'évaluation du comportement rhéologique de ces deux corps gras purs par l'équipe d'Evrard et col. (1999).

Nous constatons que la η_{app} peut être déterminée à des températures inférieures aux points de fusion des corps gras, températures auxquelles les corps gras se trouvent à l'état ramolli ou partiellement fondu. Ainsi, une mesure de la η_{app} est obtenue à 45°C pour le Précirol®, alors que son pic de fusion se situe à $\pm 54^\circ\text{C}$, et à 60°C pour le Compritol®, alors que son pic de fusion a lieu à $\pm 72^\circ\text{C}$. Cette évaluation est importante car elle rend compte de la déformation et de l'écoulement du matériau sous l'action de forces de cisaillement élevées. Or, de telles forces sont présentes dans le mélangeur granulateur à haute vitesse utilisé pour la fabrication des microbilles. On constate par ailleurs que la η_{app} diminue lorsque la température augmente, mais il n'y a pas de corrélation linéaire entre ces deux paramètres.

L'écoulement de ces corps gras est de type pseudoplastique puisque les rhéogrammes $\log \eta_{app}$ en fonction de $\log$ de D (la vitesse de cisaillement) repris par la figure 23 sont linéaires, avec des coefficients de régression linéaire : $R^2 = 0,9903$ pour le mélange C-P 4-6, $R^2 = 0,9964$ pour le mélange C-P 6-4 et $R^2 = 0,9965$ pour le mélange C-P 8-2.

Le modèle mathématique d'application est le suivant :

$$\tau = K \cdot D^n \quad [13]$$

τ : la contrainte de cisaillement

K : la consistance (Pa s^n)

D : la vitesse de cisaillement (s^{-1})

n : « power law index » ($n < 1$ pour les liquides pseudoplastiques, $n = 1$ pour les liquides newtoniens et $n > 1$ pour les liquides dilatants)

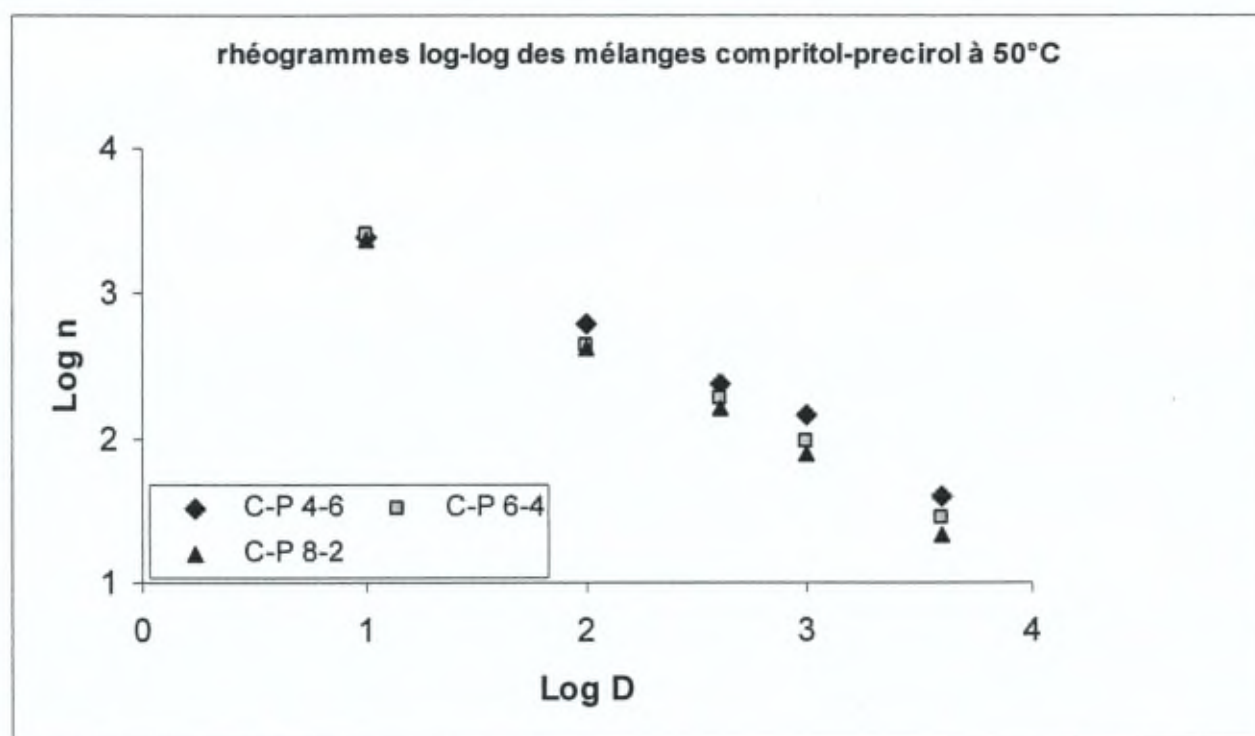


Figure 23 : Les rhéogrammes log-log de mélanges de Compritol® et de Précirrol® à 50°C

Par ailleurs, les données relatées par le tableau 2 permettent la comparaison de la η_{app} des corps gras purs à celle de ces corps gras en mélange ; ces mélanges sont décrits par le tableau 1. Nous relevons ainsi qu'à 50°C, la mesure de la η_{app} peut être effectuée pour tous les mélanges Compritol®-Précirrol® (C-P 4-6, C-P 6-4 et C-P 8-2). Les valeurs de viscosité obtenues pour ces mélanges sont légèrement supérieures à la η_{app} obtenue pour le Précirrol® seul et inférieures à la viscosité obtenue pour le Compritol® seul. A 50°C, le Compritol® ne subit aucune déformation, il est trop dur pour être extrudé à travers le capillaire. Au-delà de cette température (entre 55°C et 60°C), l'échantillon de Précirrol® ainsi que le mélange C-P 4-6, qui représente le mélange contenant la plus grande proportion en Précirrol®, se trouvent à l'état complètement fondu, rendant ainsi leur mesure de viscosité impossible avec le type d'équipement employé. Quant aux autres mélanges, grâce à la présence majoritaire du

Compritol® (point de fusion aux environs de 72°C), leur mesure de η_{app} a pu être effectuée dans une plus large gamme de température.

Tableau 2 : Les valeurs de viscosité apparente η_{app} (Pa s) obtenues à une vitesse de cisaillement de 40 s⁻¹ pour le Compritol®, le Précirol® et leurs mélanges binaires à différentes températures

Corps gras	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C	70°C	75°C
Précirol®	5196	665	*				
Mélange C-P 4-6		965	*				
Mélange C-P 6-4		773	302	49,6	*		
Mélange C-P 8-2		743	282	127	*		
Compritol®	**	**	**	5537	1677	19,4	*

* corps gras en fusion ; ** corps gras solide

Cette étude rhéologique des mélanges de Compritol® et de Précirol® a été complétée par des analyses thermiques par DSC. Les thermogrammes de fusion des mélanges binaires C-P 4-6, C-P 6-4 et C-P 8-2 fraîchement recristallisés sont montrés par la figure 24. Ces mélanges ont été effectués à fusion à 80°C, puis refroidis à température ambiante avant leur analyse par DSC. On y distingue les pics de fusion relatifs à chacun des deux corps gras. On relève par ailleurs un déplacement de la plage de fusion du Compritol® vers des températures plus faibles lorsque la quantité de Précirol® est importante dans le mélange. Ainsi, la plage de fusion du mélange C-P 8-2 a lieu entre 45°C et 69°C, alors que celle du mélange C-P 4-6 se situe entre 45°C et 64°C.

Ces résultats nous fournissent un élément clé dans le développement des microbilles à libération prolongée par la technique de la pelletisation thermoplastique, à savoir que les excipients lipidiques qui nous intéressent présentent des plages de fusion bien distinctes et que cette propriété est de surcroît conservée pour ces corps gras en mélange. Il nous est dès lors possible d'envisager l'utilisation de mélanges de Compritol® et de Précirol®, même en forte proportion, comme excipients gras pour ralentir la libération de principes actifs hydrophiles sans risquer d'assister à un phénomène de « surmouillage » (voir chapitre III.2). Cette étude rhéologique met donc l'accent sur le ramollissement des mélanges des corps gras à partir de 50°C, présageant l'existence d'une zone critique lors du processus de fabrication, aux environs de cette température.

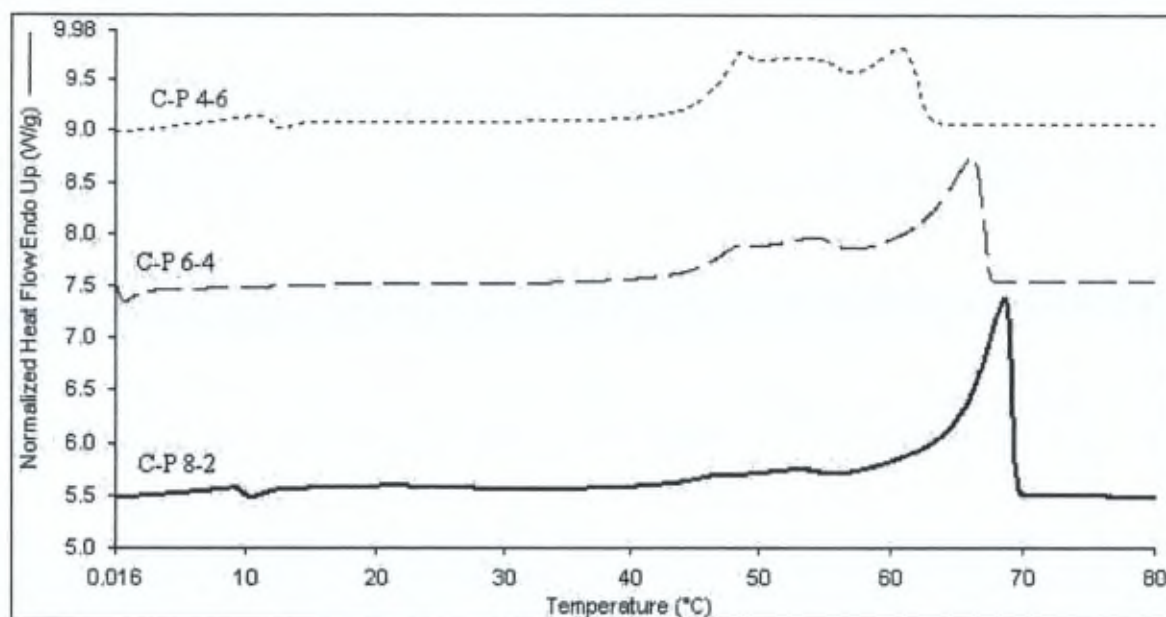


Figure 24 : Les courbes de fusion obtenues par DSC pour les mélanges de Compritol® et de Precirol® (C-P 4-6, C-P 6-4 et C-P 8-2) à partir d'échantillons fraîchement recristallisés (F)

Nous terminerons cette étude de préformulation en abordant la question de la compatibilité du Compritol® et du Precirol® avec différents principes actifs. Nous avons utilisé à cette fin la méthode DSC. L'analyse thermique a d'abord porté sur les principes actifs seuls, puis sur des mélanges binaires (50/50, m/m) excipient lipidique/principe actif. Ces mélanges ont été effectués par dispersion du principe actif solide au sein du corps gras à l'état fondu. Une fois le mélange obtenu et refroidi, il est broyé au mortier avant d'en prélever un échantillon destiné à l'analyse.

Différents principes actifs ont été envisagés : le chlorhydrate de phényléphrine, la théophylline anhydre, le kétoprofène et le chlorhydrate de ciprofloxacine. Les résultats obtenus n'ont pu mettre en évidence la moindre interaction entre les excipients lipidiques et ces différents principes actifs, dans la mesure où il n'y a pas eu d'apparition ou de disparition de pics de fusion des composés. Les plages de fusion des corps gras et des principes actifs n'ont pas subi de transformation. Par contre, le mélange contenant le chlorhydrate de ciprofloxacine montre une décomposition de ce produit lors de sa fusion. Mais celle-ci a bien lieu à une température correspondant au point de fusion théorique de ce produit (Merck.

1996). Les courbes de fusion correspondant à ces mélanges sont reprises par les figures 25 et 26.

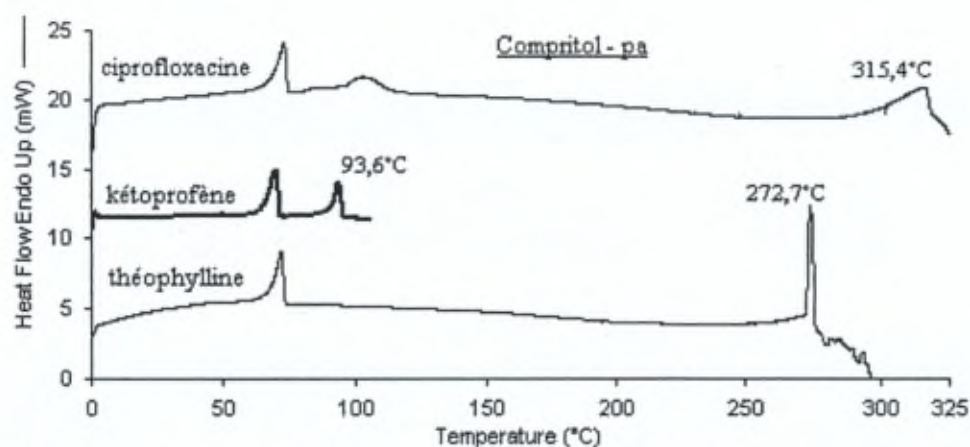


Figure 25 : Les courbes de fusion obtenues par DSC pour des mélanges binaires de Compritol® avec différents principes actifs. Le pic de fusion obtenu pour chacun de ces principes actifs est renseigné

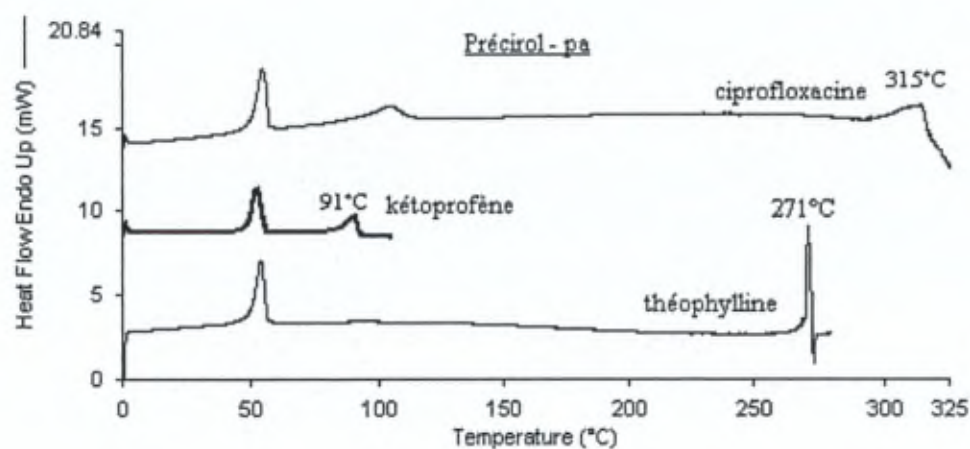


Figure 26 : Les courbes de fusion obtenues par DSC pour des mélanges binaires de Précirol® avec différents principes actifs. Le pic de fusion obtenu pour chacun de ces principes actifs est renseigné

III.1.4. Conclusion

Cette étude physico-chimique, aura permis d'accréditer l'hypothèse selon laquelle le Compritol® et le Précirol® joueraient parfaitement le rôle d'excipients lipidiques dans un processus de pelletisation thermoplastique. Ces deux corps gras possèdent des points de fusion fort distincts (72°C pour le Compritol® et 54°C pour le Précirol®) et leur mélange conserve cette caractéristique. Cette propriété sera mise à profit pour incorporer une quantité importante de ces corps gras hydrophobes lors de la fabrication des microbilles afin d'assurer une libération prolongée à des principes actifs hydrophiles. Cependant, il apparaît de façon claire que le contrôle de la température lors de ce procédé de fabrication sera une étape clé du développement des microbilles. Les analyses thermiques (par DSC) ainsi que les études rhéologiques nous ont révélé qu'à 50°C les mélanges de ces corps gras sont suffisamment ramollis pour subir une déformation leur permettant de jouer le rôle d'agent liant. Nous obtenons ainsi la valeur de température qui peut se révéler critique lors du processus de fabrication des microbilles à libération prolongée.

Il ressort également de l'examen des propriétés physico-chimiques de ces corps gras qu'à cause de la complexité de leur structure, ces composés « recristallisent » sous une structure en couches, partiellement amorphe, qui évolue avec le temps en structure cristalline. La vitesse avec laquelle le composé évolue vers cette structure cristalline est beaucoup plus rapide pour le Précirol® que pour le Compritol®. Cette différence s'explique par le fait que le Précirol® est constitué de chaînes d'acides gras plus courtes (chaînes en C₁₆-C₁₈) que le Compritol® (chaîne en C₂₂) et fond à des températures inférieures. Cette évolution cristalline est mise en évidence grâce aux conditions de conservation de ces corps gras (température) : plus la température de conservation se rapproche du point de fusion du glycéride, plus rapide sera cette évolution. Par ailleurs, les analyses par DSC ont révélé la présence d'un phénomène de polymorphisme pour le Précirol®, ce composé une fois fondu, recristallise sous deux formes dont l'une est hautement instable. Cette dernière évolue très rapidement vers la forme stable. Nous en déduisons qu'une étude de la stabilité en fonction des conditions de conservation (température) des formes finies (microbilles) sera nécessaire dans la suite de ce travail.

Enfin, les analyses, effectuées par DSC, n'ont pas révélé la présence d'interactions entre les excipients lipidiques et les différents principes actifs testés (chlorhydrate de phényléphrine, théophylline anhydre, kétoprofène et chlorhydrate de ciprofloxacine).

III.2 Mise au Point d'une Forme Divisée à Libération Prolongée par la Méthode de la Pelletisation Thermoplastique

III.2.1. Introduction

L'étude de certaines des caractéristiques physico-chimiques du Compritol® et du Précirol® est détaillée dans le chapitre précédent. Elle nous aura en partie éclairés sur le comportement thermique de ces corps gras seuls et en mélanges, et rassurés quant à l'absence d'interactions entre ces excipients et différents principes actifs que nous pourrions envisager comme traceurs ou médicaments pour le développement d'une forme à libération prolongée. Cette étude a également révélé une évolution de la structure cristalline de ces corps gras en fonction des conditions de conservation et l'importance que revêt dès lors une étude de stabilité portant sur la forme finie.

Le chapitre présent est quant à lui consacré au cheminement parcouru afin d'aboutir à une forme divisée à libération prolongée par la technique de la pelletisation thermoplastique, en recourant au Précirol® et au Compritol® comme excipients lipidiques. La connaissance des propriétés physico-chimiques de ces excipients est utile d'un point de vue technologique pour l'optimisation des conditions de fabrication des microbilles, alors que la nature hydrophobe de ces excipients peut être responsable du contrôle de la cinétique de libération du principe actif qui y est incorporé. De même, la granulométrie des poudres utilisées (excipients comme principes actifs) sera déterminante pour la réussite du procédé d'agglomération des particules en granulés puis en microbilles lors des étapes successives de granulation et de sphéronisation que connaît le procédé de pelletisation thermoplastique.

Ce chapitre débutera donc par une brève description de la diffraction laser comme technique de détermination de la taille des particules de poudres utilisées ; suivront une présentation des mélangeurs granulateurs utilisés (Pellmix PL 1/8 et Mi-Pro®) et les avantages d'un équipement par rapport à l'autre. Nous aborderons ensuite la fabrication même des microbilles (formulations, conditions opératoires) pour terminer par la caractérisation de ces microbilles. Celle-ci portera aussi bien sur la forme et la taille des pellets (analyses granulométriques par tamisage, microscopie électronique à balayage) que sur les propriétés de libération du principe actif à partir de la matrice lipidique. Enfin, une étude de stabilité (tests de dissolution *in vitro*, chromatographie liquide haute performance) de ces formes finies

viendra terminer cette partie consacrée au développement d'une forme orale divisée à libération prolongée.

III.2.2. Matériels et méthodes

A. *Produits utilisés*

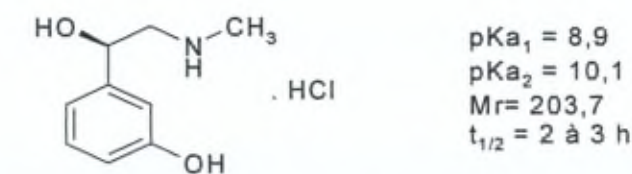
Le tableau 1 reprend les produits que nous avons employés lors de la pelletisation thermoplastique, ainsi que, de manière synthétique, certaines de leurs caractéristiques physico-chimiques. Parmi celles-ci, nous retrouvons la plage de fusion des corps gras utilisés renseignée par le fournisseur (Gattefossé, France), qui de plus a été confirmée par des analyses par DSC, largement discutées au niveau du chapitre III.1. Ce tableau donne également une indication sur la taille des particules ; cette dernière a été déterminée par diffraction laser et est renseignée par le diamètre volume moyen : D[4,3]. Le tableau 2, renseigne les différents produits chimiques utilisés pour les tests de dissolution et pour les analyses par chromatographie liquide (CLHP).

Tableau 1 : Les caractéristiques des produits entrant dans la composition des microbilles

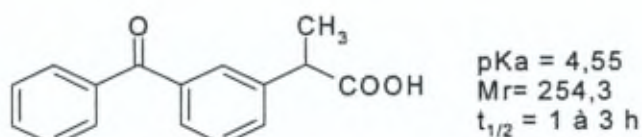
Produits	Fournisseur	D[4,3] (µm)	Solubilité* (mg/ml)	Plage ou point de fusion (°C)	Temps de Demi-vie plasmatique $t_{1/2}$ (h)**
Préciorol®	Gattefossé (France)	31,3 ± 1,9	-	46-54	
Compritol®	Gattefossé (France)	31,7 ± 2,0	-	67-72	
Lactose 450 Me	DMV International (Pays-Bas)	21,4 ± 2,4	200 ^c	-	
Lactose 200 Me	DMV International (Pays-Bas)	64,3 ± 2,6	200 ^c		
Ciprofloxacine. HCl	Siris (Inde)	12,4 ± 2,7	4 ^a , 9 ^b	313	3 à 4 h
Kétoprofène	Sochibo (France)	11,3 ± 2,5	300 ^a	97	1 à 3 h
Phényléphrine. HCl	Fédéra (Belgique)	147,8 ± 3,4	> 1000 ^c	144	2 à 3 h
Théophylline	Ludeco (Belgique)	47,0 ± 3,8	8 ^c	273	1,4 à 12,8 h

(a) solubilité à pH = 7,0 ; (b) solubilité à pH = 1,5 ; (c) solubilité dans l'eau ; ** Dollery, 1999 ; *Merck . 1996 ; *Rowe et col., 2003.

Les structures chimiques des différents principes actifs utilisés sont reprises au niveau de la figure1.



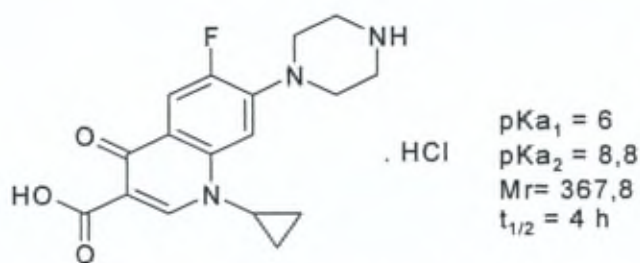
Chlorhydrate de Phényléphrine



Kétoprofène



Théophylline



Chlorhydrate de Ciprofloxacine

Figure 1 : Les structures chimiques des différentes molécules actives employées lors de la fabrication des microbilles.

Tableau 2 : Les produits employés dans les différents tests (test de dissolution, CLHP)

Produits	Origine
Polysorbate 20	Fédéra (Belgique)
Lécithine	Lipoid. GmbH (Allemagne)
K ₂ HPO ₄	Merck (Allemagne)
KH ₂ PO ₄	Merck (Allemagne)
HCl 37 %	Carlo Erba (France)
Acide phosphorique 85%	Riedel-de Haën (Allemagne)
Acide acétique glacial	Riedel-de Haën (Allemagne)
Acétonitrile (qualité CLHP)	Riedel-de Haën (Allemagne)
Méthanol (qualité CLHP)	Riedel-de Haën (Allemagne)
NaOH (pastilles)	Merck (Allemagne)
Taurocholate sodique	Sigma (Belgique)
Lipase pancréatique	Sigma (Belgique)
KCl	Sigma (Belgique)

B. La diffraction laser

La diffraction laser est une technique directe et rapide, ne nécessitant aucun étalonnage. Elle permet la détermination de la taille et de la distribution de taille des particules. Les mesures peuvent s'appliquer à une large gamme granulométrique allant de quelques dizaines de nanomètres à quelques millimètres. D'une manière générale, un appareil à diffraction laser est muni d'une source lumineuse principale (laser) qui envoie des rayons monochromatiques et parallèles (I), d'un dispositif de transport des particules (air ou liquide), d'un système de lentilles, d'un ensemble de 16 à 32 détecteurs photosensibles et d'un logiciel informatique analysant les résultats. La figure 2 (IOS, 1996) montre un schéma théorique du fonctionnement d'un appareil à diffraction laser.

Lorsque la particule passe devant le rayon laser, elle le dévie d'un angle θ . Les détecteurs reçoivent l'intensité finale (I_r) du rayonnement dévié. Plus les particules sont petites, plus l'angle de déviation θ est élevé et plus I_r est faible. Cette technique est donc basée sur le principe qu'une particule traversant un rayon lumineux disperse la lumière dans toutes les directions de l'espace, avec une intensité dépendant de sa taille.

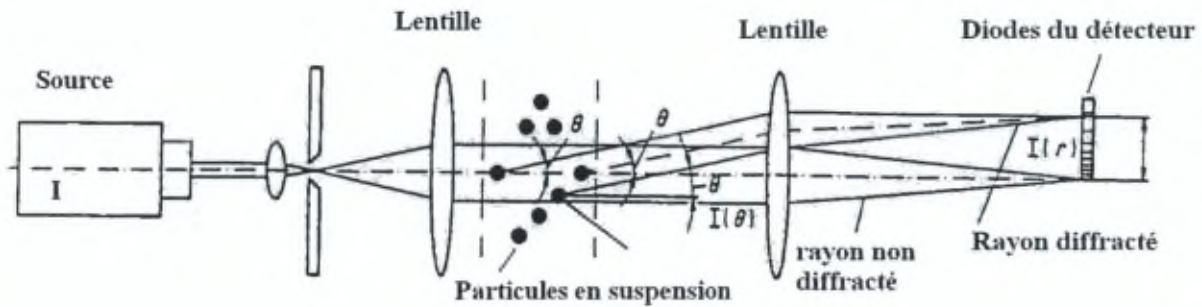


Figure 2 : Exemple du fonctionnement d'un appareil à diffraction laser

Les particules sont supposées être sphériques, mais en réalité, rares sont les échantillons présentant des particules parfaitement sphériques. C'est la raison pour laquelle des chercheurs, notamment ceux travaillant dans des sociétés spécialisées dans ce type d'appareillage, comme « Malvern, Angleterre » (Rawle., 2004) proposent l'utilisation de la théorie de la « sphère équivalente » afin de déterminer les caractéristiques de taille des particules. Il s'agit de considérer le diamètre d'une sphère théorique produisant la même réponse que la particule considérée. Autant la caractérisation d'une sphère parfaite peut se faire moyennant une dimension unique, à savoir son diamètre, autant celle d'une particule irrégulière peut difficilement être évaluée sans tenir compte de la composante tridimensionnelle de celle-ci. Une série de « diamètres équivalents » faisant intervenir d'autres dimensions, incluant des paramètres comme la surface, le volume ou la masse de la particule peuvent ainsi être proposés. Le diamètre équivalent le plus couramment utilisé est le $D[4,3]$; qui est le diamètre moyen équivalent en volume ou en masse. Il est calculé par un logiciel informatique sur base de la formule suivante :

$$D[4,3] = \sum d^4 / \sum d^3 \quad [1]$$

Le d étant le diamètre théorique mesuré par l'appareil, selon la déviation de l'angle θ provoquée par la particule.

La diffraction laser peut s'appliquer aussi bien à la voie sèche (directement sur la poudre) qu'à la voie humide, sur une dispersion des particules dans un solvant où elles sont très faiblement solubles (c'est le cas des émulsions par exemple). Nos analyses ont été effectuées par voie sèche, dans un appareillage de type « Malvern Mastersizer 2000 » (Malvern, Angleterre) équipé d'une unité de dispersion pour les poudres sèches « Scirocco 2000 ». Le détecteur ne percevant pas la différence entre une particule isolée et un amas de particules, ce système de dispersion comporte un panier vibrant, garni de petites billes métalliques

permettant la cassure des agglomérats et leur individualisation en particules, avant la mesure. La source lumineuse est un faisceau laser He/Ne, $\lambda = 63 \text{ nm}$. Les particules sont transportées sous l'action d'une pression de 2 à 4 bars, en l'espace d'un temps d'aspiration de 20 secondes. Les mesures sont répétées trois fois ($n=3$).

C. Les équipements de granulation

Nous avons eu recours à deux types de granulateurs mélangeurs à haute vitesse. Nos premiers essais furent menés dans un mélangeur granulateur Pellmix de type PL 1/8 (Niro A/S, Danemark), pour ensuite adopter le Mi-Pro® (Pro-C-epT, Belgique) qui est un petit mélangeur granulateur à paroi en verre transparente. Le choix d'un appareil aux dépens de l'autre fut dicté par les avantages qu'offrait le Mi-Pro® en terme de suivi du processus de granulation et de contrôle de la température au cours du procédé de fabrication.

C.1. Le Pellmix P/L 1/8

Le mélangeur granulateur vertical à haute vitesse Pellmix PL 1/8 est constitué d'une cuve en acier inoxydable d'une capacité de 8 litres, dont l'intérieur est recouvert de téflon. Il permet la production de lots d'un kilogramme. Le fond de la cuve est muni d'un bras de mélangeur dont la vitesse de rotation peut être modulée dans une gamme allant de 0 à 1600 rotations par minute (rpm), il n'est par contre pas équipé de chopper (ou couteau).

Le mélangeur granulateur est muni d'une double paroi où peut circuler un liquide caloporteur. Aussi peut-on choisir de travailler en chauffant cette double paroi, en la laissant à température ambiante ou encore en la refroidissant. Enfin, tout au long du procédé de fabrication des microbilles, la température du produit ainsi que la puissance consommée par le moteur (en Kw) du mélangeur sont suivies en fonction du temps. Ceci permet la détection du phénomène de la prise en masse du mélange et le suivi de l'évolution de la formation et de la croissance des microbilles. La figure 3 montre une vue transversale du Pellmix 1/8.

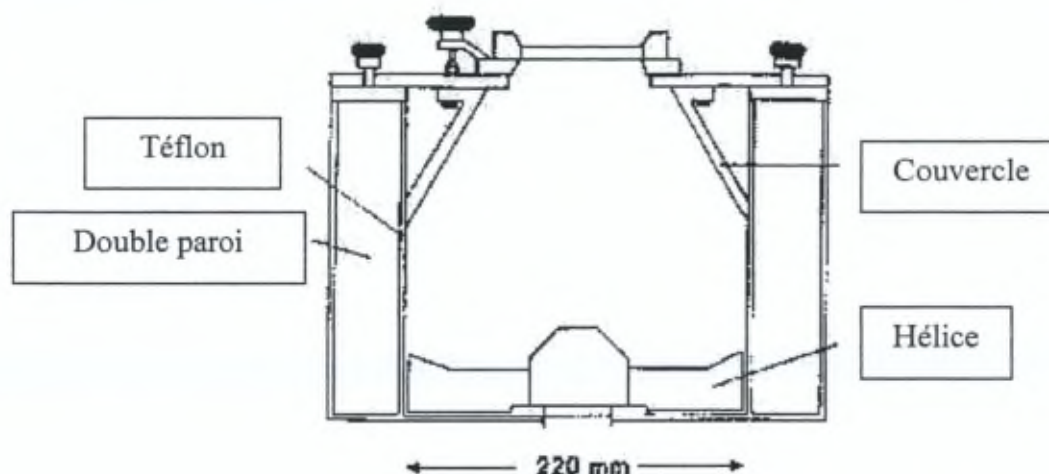


Figure 3 : Vue transversale du Pellmix 1/8 (Evrard, 1995)

C.2. Le Mi-Pro®

Le Mi-Pro® est un petit mélangeur granulateur vertical à haute vitesse, constitué d'une cuve en verre transparente, permettant le suivi visuel du procédé de granulation et de pelletisation. Cette cuve est également munie d'une double paroi, où peut circuler un liquide caloporteur. Le volume de la cuve est de 1700 ml, permettant la production de lots de 200 g à 300 g. La vitesse de rotation des bras verticaux : bras du mélangeur « impeller » et chopper peut varier entre 0 - 1800 rpm et entre 0 - 4000 rpm respectivement.

La figure 4 présente une photographie du Mi-Pro®. Tout au long du procédé, les mesures de la température du mélange en degré Celsius (sonde infra-rouge), de la vitesse du bras du mélangeur (IS) et de celle du chopper (CS), ainsi que la mesure du moment de torsion du bras du mélangeur ou le « torque » en Nm, sont suivies et enregistrées en fonction du temps par un logiciel informatique. Le moment de torsion maximal qui peut être supporté par le bras du mélangeur est de 2 Nm.

Notre choix en définitive s'est arrêté sur ce petit mélangeur granulateur car il présente plusieurs avantages en comparaison au Pellmix 1/8. En effet, sa petite taille est avantageuse d'un point de vue économique, les quantités d'excipients et de principes actifs à utiliser sont moindres par rapport au Pellmix. La présence du chopper permet la cassure des agglomérats et diminue l'adhésion de la poudre à la paroi de la cuve.

Le suivi et l'enregistrement des courbes de température et du « torque » en fonction du temps, offrent la possibilité de contrôler la granulation et la pelletisation de la masse. De plus, la transparence de la cuve permet la visualisation directe de tous ces phénomènes. Enfin, le

« torque », par la mesure directe de la résistance opposée par le produit à la rotation du bras du mélangeur, constitue un moyen très fiable pour le suivi d'un procédé de granulation et la détermination de son point final. Cette mesure du torque est d'ailleurs considérée comme étant plus fiable que la mesure de la puissance consommée par le moteur (Kopcha et col. 1992).

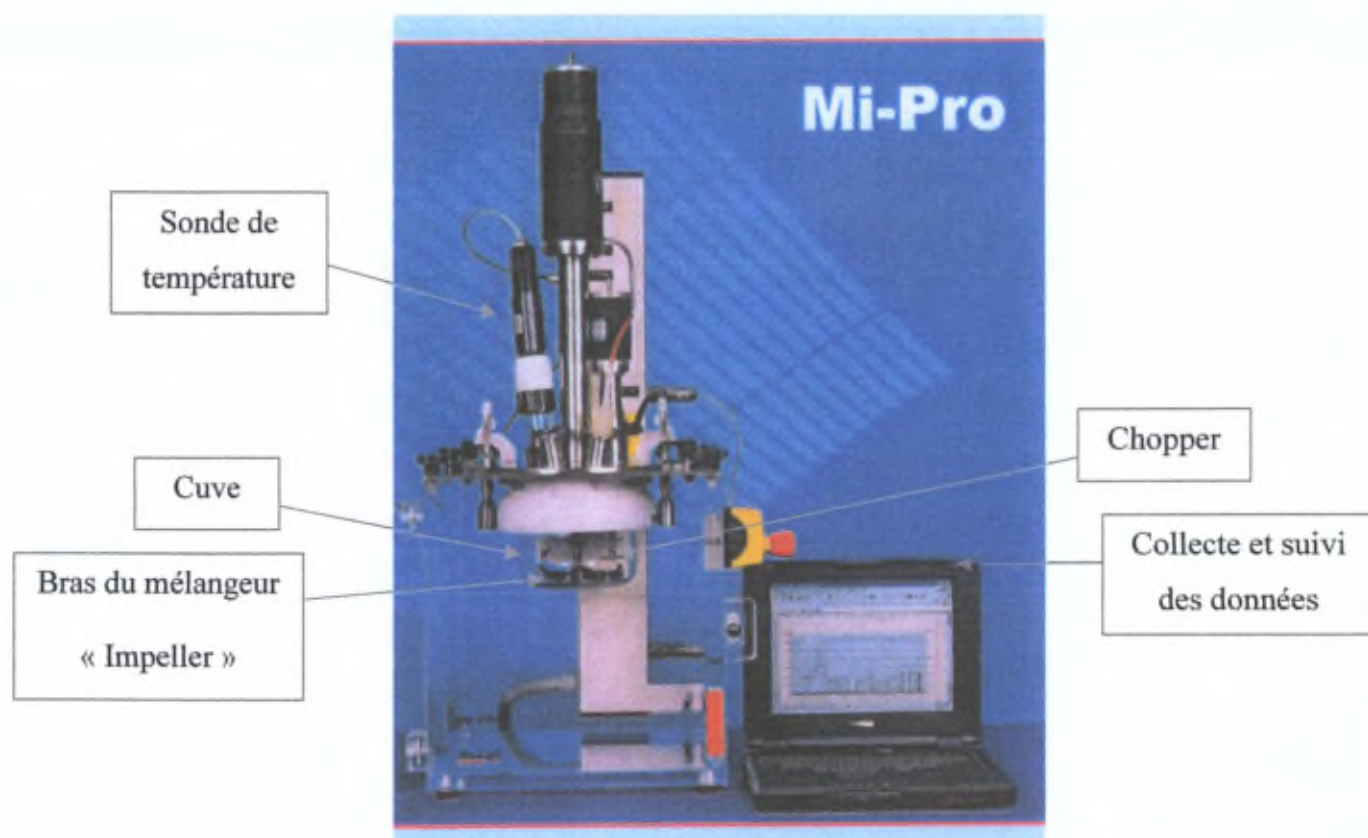


Figure 4 : Photographie du mélangeur granulateur Mi-Pro® (Pro-C-epT)

Le « torque », ou moment de torsion, découle de la théorie de la contrainte de cisaillement. Le cisaillement est défini comme étant le glissement parallèle des couches du matériau les unes sur les autres par rapport à un plan fixe, après l'application d'une contrainte tangentielle sur la première couche. Kane et col. (1997) représentent ceci de façon didactique, en imaginant un livre qu'on soumettrait à une force de cisaillement F , la couverture supérieure de ce livre subirait alors un déplacement δ par rapport à sa couverture inférieure, le dos du livre faisant un angle α avec la verticale comme le montre la figure 5.

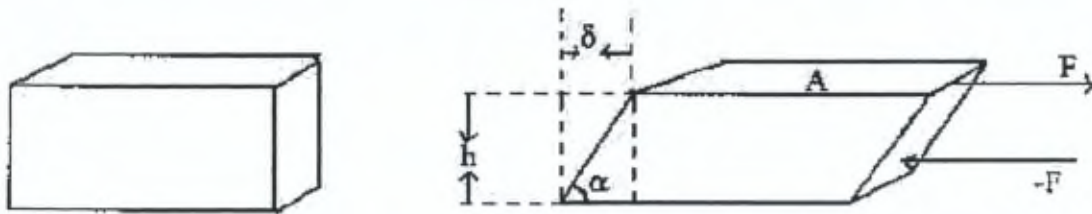


Figure 5 : Représentation schématique des forces de cisaillement (Kane et col., 1997)

Sont définis ainsi :

$$\text{L'effort de cisaillement : } \sigma = F/A \text{ [N/m}^2\text{]} \quad [2]$$

$$\text{La déformation causée par le cisaillement : } \varepsilon = \delta/h \quad [3]$$

$$\text{Le module de cisaillement : } G = \sigma/\varepsilon \text{ [N/m}^2\text{]} \quad [4]$$

Si l'on applique cette théorie au bras du mélangeur représenté schématiquement par un cylindre au niveau de la figure 6, nous pouvons considérer que ce cylindre est fixe au niveau d'une extrémité et que son autre extrémité est soumise à des forces qui produisent une torsion suivant un axe central. Ce cylindre est soumis à une force de rotation F_2 qui lui est imposée ; la force F_1 représente la résistance rencontrée par le cylindre à son mouvement rotatoire et, qui dans notre cas, peut être représentative du ramollissement des corps gras. En se ramollissant les corps gras permettent la granulation du mélange.

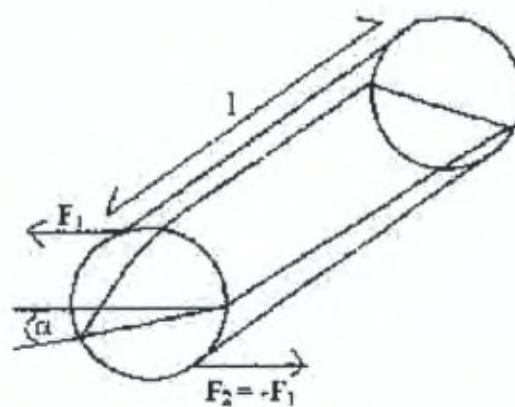


Figure 6 : Application de la théorie de cisaillement au bras du mélangeur représenté par un cylindre (Kane et col., 1997)

C'est ainsi que plus F_1 est grande, plus l'angle de déformation α sera grand. L'équation 5 nous renseigne sur les paramètres intervenant dans le « torque » ou moment de torsion T :

$$T = G (\pi.r^4 / 2) (\alpha / l) \quad [5]$$

T : le moment de torsion [N.m]

α : la déformation en radians (plus on s'éloigne de l'axe central, plus les couches adjacentes sont déformées et plus α est grand)

r : le rayon du bras du mélangeur [m]

l : la longueur du bras du mélangeur [m]

G : le module de cisaillement [N/m^2]

En pratique, lors du suivi des différents paramètres intervenant dans le procédé de pelletisation thermoplastique en fonction du temps, un saut du torque marque la granulation du mélange de poudres. En effet, du fait de sa granulation, la masse de poudre opposera une force de résistance plus élevée à la rotation du bras du mélange que la poudre « libre » ou non granulée. Cette force est la force F_1 (figure 6) ; or, comme le montre l'équation 5, plus cette force est importante, plus l'angle de déformation α est grand, et plus α augmente, plus le moment de torsion augmente. Cette augmentation du « torque » nous est renseignée par un saut au niveau de la courbe d'enregistrement. Ce saut fait partie des étapes-clés du procédé de pelletisation thermoplastique puisqu'il permet de différencier l'étape de *granulation* de l'étape de *sphéronisation*, comme nous le verrons ultérieurement.

D. La caractérisation des microbilles

D.1. L'analyse granulométrique

Après refroidissement, les microbilles ont été tamisées sur un tamis de 2 mm, afin d'écarter les agglomérats et les particules de taille supérieure à 2 mm. L'analyse granulométrique des microbilles a été effectuée par tamisage, en utilisant un appareil à tamis superposés Rhewum (Allemagne). L'évaluation du refus pondéral de chaque tamis a permis de déterminer la granulométrie des microbilles. Le diamètre moyen géométrique ($d_{géo}$) ainsi que la déviation standard géométrique ($s_{géo}$) ont été déterminés sur des échantillons de 50 g.

D.2. La microscopie électronique à balayage

Les premières microbilles que nous avons fabriquées avec le mélangeur granulateur Pellmix 1/8 ont été analysées par microscopie électronique à balayage environnementale (ESEM), « Environmental Scanning Electron Microscopy System », (Electroscan 2020, Etats-Unis). Cette méthode permet la visualisation de la forme et de l'aspect des microbilles dans leur environnement « naturel », c'est-à-dire, sans aucun traitement préalable, par leur simple déposition sur un support en carbone. Par contre, les coupes réalisées sur ces microbilles ont été effectuées après leur fixation dans une résine polymérique.

L'analyse de la forme et de la microstructure des microbilles que nous avons fabriquées par la suite au sein du mélangeur granulateur Mi-Pro[®], a été effectuée par une microscopie électronique à balayage (SEM). Aussi bien les microbilles entières que leurs coupes ont été déposées sur un support en carbone, puis recouvertes d'une fine couche d'or ou de platine avant leur observation. L'appareillage utilisé est un « JSM- Scanning Electron Microscope », (JEOL, Japon). Cet appareillage offre la possibilité de coupler la microscopie électronique à balayage à la diffraction aux rayons X, c'est ce que l'on appelle la microscopie RX, permettant par là même l'identification et la localisation d'atomes de Cl, de Na, de S ou autres à la surface des microbilles. Nous avons employé cette technique lors de l'étude de la répartition d'un principe actif contenant l'un des éléments précités au sein des microbilles. Les échantillons ont été analysés moyennant un agrandissement allant de 50 à 300 fois.

D.3. Le dosage des principes actifs incorporés dans les microbilles

La détermination de la teneur en substance active incorporée dans les microbilles a été effectuée par spectrophotométrie UV (n= 3) grâce à un spectrophotomètre HP 8453 UV/visible 8453 (Agilent, Etats-Unis). Les microbilles sont d'abord broyées dans un mortier, puis une quantité précise de poudre est transférée dans un matras jaugé de 500,0 ml contenant de l'eau distillée. L'échantillon est alors mis dans un bain à ultrasons pendant 30 min afin de garantir la solubilisation complète du principe actif. La mesure d'absorbance est ensuite effectuée après filtration de l'échantillon (filtre HP pour dissolution, 0,45 µm de porosité). Les mesures ont été effectuées respectivement pour le chlorhydrate de phényléphrine, le chlorhydrate de ciprofloxacine, la théophylline et le kétoprofène aux longueurs d'ondes suivantes : 275, 276, 272 et 260 nm. Les quantités de principe actif présentes dans les échantillons ont été extrapolées par rapport à des droites d'étalonnage du principe actif dans de l'eau distillée.

D.4. Les tests de dissolution *in vitro*

Ces tests de dissolution *in vitro* nous ont servi à évaluer les propriétés de libération des médicaments incorporés dans les microbilles dans différents milieux de dissolution (tampon phosphate 0,05 M à pH 7,0 ; HCl 0,1 N ; milieux mimant le fluide intestinal). Nous les avons également employés dans l'évaluation des propriétés de libération des principes actifs après la conservation des microbilles dans différentes conditions de température et d'humidité relative, lors de l'étude de la stabilité de la forme finie.

Nos essais ont été effectués à l'aide d'un appareillage de dissolution à palettes, Pharmacopée Européenne 4^{ième} Edition, « Distek 2100C » (Distek, Etats-Unis). L'appareil est muni de 6 bains de dissolution thermostatisés par un thermostat « Distek TCSS 0200C ». La vitesse d'agitation des pales a été réglée à 60 rpm et le volume des bains fixé à 600 ml ou à 900 ml. Nous avons utilisé comme liquide d'épreuve un tampon phosphate - acétate (0,05 M ; pH 7,0) additionné de 0,05% de Polysorbate 20 et porté à 37°C. Seules les microbilles de ciprofloxacine ont nécessité le recours à un milieu acide à pH 1,5 (tampon phosphate - acétate 0,05 M ou de l'HCl 0,1 N) ; ce principe actif présente en effet une meilleure solubilité dans un milieu à pH acide que dans un milieu à pH neutre. Une pompe péristaltique HP 89092 A (Agilent, Etats-Unis) a permis d'effectuer des prélèvements dans chacun des bains. La teneur en principe actif a été respectivement mesurée à 275, 276, 272 et 260 nm pour le chlorhydrate de phényléphrine, le chlorhydrate de ciprofloxacine, la théophylline et le kétoprofène à l'aide d'un spectrophotomètre HP 8453 UV/visible 8453 (Agilent, Etats-Unis). Le pourcentage libéré en traceur utilisé a été mesuré à des temps préprogrammés (n = 5). Seules les microbilles ayant une granulométrie comprise entre 700 et 1500 µm ont été utilisées lors de ces essais.

Des tests de dissolution ont également été menés sur des microbilles de ciprofloxacine en dose thérapeutique (250 mg de principe actif), la longueur d'onde adoptée était alors de 317 nm et le volume d'épreuve de 900 ml. Ces essais ont été effectués dans un milieu acide (HCl 0,1 N additionné de 0,05% (m/v) de Polysorbate 20) ainsi que dans des milieux indicatifs de l'influence des sels biliaires sur la libération du principe actif. Les milieux que nous avons employés étaient basés sur des travaux décrits dans la littérature (Galia et col., 1998 ; Ausseur et Col., 1998 ; Dandelot, 1990), leur composition est reprise par le tableau 3.

Enfin, l'influence de la lipase (milieu mimant le fluide intestinal décrit par la pharmacopée américaine : Intestinal Simulated Fluid, USP 24) sur la libération du principe actif incorporé dans ces microbilles lipidiques a également été testée sur les microbilles de théophylline en dose thérapeutique (200 mg) à une longueur d'onde de 243 nm dans un volume d'épreuve de 900 ml.

Tableau 3 : Les milieux d'épreuve contenant les sels biliaires (Galia et col., 1998)

Milieu à jeun ou milieu « FASSIF »		Milieu après un repas ou milieu « FESSIF »	
Taurocholate Sodique	1,6 g	Taurocholate Sodique	8,1 g
Lécithine	0,6 g	Lécithine	3,0 g
KH ₂ PO ₄	3,9 g	Acide acétique glacial	8,9 g
KCl	7,7 g	KCl	15,2 g
NaOH q.s.	pH = 6,5	NaOH q.s.	pH = 5,0
Eau désionisée	ad 1,0 l	Eau désionisée	ad 1,0 l

D.5. L'évaluation de la stabilité des microbilles

L'évaluation de la stabilité des microbilles a été effectuée sur des microbilles de phényléphrine.HCl et de ciprofloxacine.HCl, après leur conservation dans différentes conditions de température et d'humidité relative (HR). A savoir, 4°C ± 2°C (réfrigérateur), 25°C ± 2°C – 60% HR, 30°C ± 2°C - 60% HR pendant 1 an et 40°C ± 2°C – 75% HR pendant 6 mois, ces conditions tiennent compte des recommandations de la Conférence Internationale d'Harmonisation (ICH). La libération du principe actif à partir des microbilles vieilles a été estimée par des tests de dissolution *in vitro* et sa stabilité évaluée par chromatographie liquide. A cet effet, nous avons utilisé comme appareillage une chaîne CLHP HP 1100 (Agilent, Etats-Unis), combinée à un détecteur UV-Visible (G 1314).

Les microbilles destinées à l'analyse par chromatographie liquide ont d'abord été broyées dans un mortier, puis une quantité précise de poudre a été transférée dans un matras jaugé de 500,0 ml contenant de l'eau distillée. L'échantillon a ensuite été introduit dans un bain à ultrasons pendant 30 min afin de garantir la solubilisation complète du principe actif.

Les conditions adoptées pour les essais de chromatographie liquide relatifs aux microbilles de **chlorhydrate de phényléphrine** ont été adaptées de la littérature (Erk et col., 1998) : à savoir une phase mobile composée d'un mélange méthanol : tampon phosphate (70 :

30). Le tampon phosphate est obtenu en additionnant à 50,0 ml d'une solution 0,2 N de KH_2PO_4 : 34,7 ml de NaOH 0,2 M, le pH est ajusté à pH 7,2 à l'aide d'acide phosphorique. Nous avons utilisé une colonne Alltech, Alltima C 18 (5 μm , 15 cm x 4,6 mm). Le débit choisi était de 1 ml/min, la longueur d'onde à 275 nm. La phase mobile a préalablement été filtrée sur filtre millipore 0,45 μm et dégazée pendant 15 min dans un bain à ultrasons.

Les essais relatifs aux microbilles de **chlorhydrate de ciprofloxacine** ont également été conduits en suivant des conditions adaptées de la littérature (Kraemer et col., 1997). Nous avons utilisé la même colonne que pour les essais de phényléphrine. La phase mobile était constituée d'un mélange composé de 79 % (v/v) de tampon phosphate 0,01 M (ajusté à pH 3.0 par de l'acide phosphorique 85%), 15% (v/v) d'acétonitrile et 6% (v/v) de méthanol. Le débit de 1 ml/min et la longueur d'onde de 276 nm. La phase mobile a été filtrée sur filtre millipore 0,45 μm et dégazée pendant 15 min dans un bain à ultrasons.

III.2.3. Résultats et discussion

A. Les microbilles fabriquées en utilisant le Pellmix P/L 1/8

A.1. La formulation adoptée et les conditions de fabrication

Nos premiers essais de pelletisation thermoplastique ont été conduits dans un mélangeur granulateur à haute vitesse Pellmix P/L 1/8 ; nous avons alors utilisé le Compritol® comme agent liant. La teneur de ce corps gras dans les formulations testées variait de 8 à 22% (m/m). Lors de ces essais, nous avons constaté que pour des teneurs en agent liant inférieures à 12% (m/m), la taille des granules obtenus était très petite (liaisons déficientes entre les particules). Par contre, pour des teneurs en agent liant supérieures à 18 %, on assistait à un phénomène de « surmouillage », avec apparition de très gros grains à cause de la présence d'un excès d'agent liant. En effet, l'absence d'un contrôle efficace de la température du mélange au cours du procédé de fabrication induisait la fusion de la totalité du corps gras et, lorsque la quantité de celui-ci dépassait les 18% m/m, le « surmouillage » des particules survenait rapidement rendant le procédé de fabrication incontrôlable. La température atteignait alors, sous l'action de la friction du bras du mélangeur, des valeurs dépassant les 90 °C. Nous avons alors conclu que l'utilisation de formulations contenant 18 % de Compritol® permettait d'obtenir, de manière reproductible, des microbilles de taille appropriée, et cela, sans l'utilisation d'un

système de refroidissement pour contrôler la température de la masse lors du procédé de fabrication. La température est en effet un paramètre critique qui joue un rôle important dans la granulation thermoplastique puisqu'elle influence la fusion et la viscosité des corps gras (Schaefer, 1996c).

Lors de ce développement, nous avons utilisé le chlorhydrate de phényléphrine comme agent traceur. Ce principe actif est très hydrosoluble ; sa solubilité dans l'eau à 25°C est en effet supérieure à 1 g /ml. Cette propriété en fait un bon traceur pour le développement d'une forme à libération prolongée. La formulation retenue après plusieurs essais d'orientation fut la suivante :

Phényléphrine HCl	2% (m/m)
Compritol®	18% (m/m)
Lactose 450 Me	ad 1000,0 g

Nous avons évalué l'influence de la vitesse du bras du mélangeur ainsi que celle de la durée du malaxage sur la formation des microbilles en adoptant un plan expérimental factoriel, comportant 9 conditions expérimentales. Ce plan a été établi en s'inspirant des travaux de Thomsen et col.(1993).

Les expériences se sont déroulées après le chauffage de la double paroi du mélangeur à 65°C et sans le chauffage de celle-ci. Toutes ces expériences ont débuté avec une vitesse du bras du mélangeur de 1300 rpm, jusqu'à la prise en masse du mélange (sa granulation), ensuite, trois niveaux pour la vitesse du bras du mélangeur et le temps de sphéronisation (TS) ont été suivis, soit respectivement 600 rpm, 800 rpm ou 1000 rpm et 9 min, 12 min ou 15 min. Nous nous sommes limités comme maxima à 1000 rpm pour la rotation du bras du mélangeur et à 15 min comme temps de sphéronisation, étant donné que des essais préliminaires nous avaient montré qu'au-delà de ces valeurs, la température de la masse augmentait tellement qu'on assistait rapidement à la formation de gros agglomérats et le procédé devenait alors incontrôlable. Ces essais préliminaires nous ont également renseignés 600 rpm comme vitesse minimale du bras du mélangeur ; une vitesse de 400 rpm fut testée sans succès, le mélange restant à l'état de granulés.

La figure 7 montre un exemple des courbes tracées en vue d'observer l'évolution de la puissance consommée par le moteur et celle de la température du mélange en fonction du temps, en adoptant 1300 rpm puis 800 rpm comme vitesses du bras du mélangeur.



Une forte vitesse d'agitation est préconisée jusqu'à la granulation du mélange de poudres ; les forces de friction des particules qui découlent de cette vitesse élevée du bras du mélangeur dégagent une énergie thermique suffisante à la fusion du Compritol®. Celui-ci joue alors le rôle d'agent liant conduisant ainsi à la granulation du mélange. Cette dernière est visualisée au niveau de la figure 7, par le saut de la courbe de puissance consommée par le moteur du granulateur. Ce saut survient lorsque la température de la masse avoisine les 60°C - 70°C, températures auxquelles le Compritol® se trouve à l'état ramolli puis fondu. Cette augmentation de la puissance survient assez rapidement, à savoir après une vingtaine de minutes pour les tests menés à froid et après une dizaine de minutes pour les tests effectués en chauffant la double paroi à 65°C. Quant à la température de la masse, elle augmente fortement à la granulation du mélange et plus la vitesse du bras du mélangeur est élevée, plus la température de la masse à sphéroniser est grande. Elle atteint ainsi les 80°C pour une vitesse de 600 rpm, 90°C pour une vitesse de 800 rpm et 110°C pour une vitesse de 1000 rpm.

Une fois les microbilles fabriquées, leur aspect et leur granulométrie ont été évalués après refroidissement à température ambiante, par microscopie électronique à balayage et par tamisage. Cependant, avant même d'effectuer ces essais, nous pouvions constater que l'adoption d'une vitesse du bras du mélangeur égale à 1000 rpm lors de la sphéronisation induisait une température dépassant les 100°C au sein du mélange, ce qui est préjudiciable pour la stabilité des molécules contenant de l'eau de cristallisation. Cette condition apparaît ainsi déjà comme étant moins privilégiée que les autres.

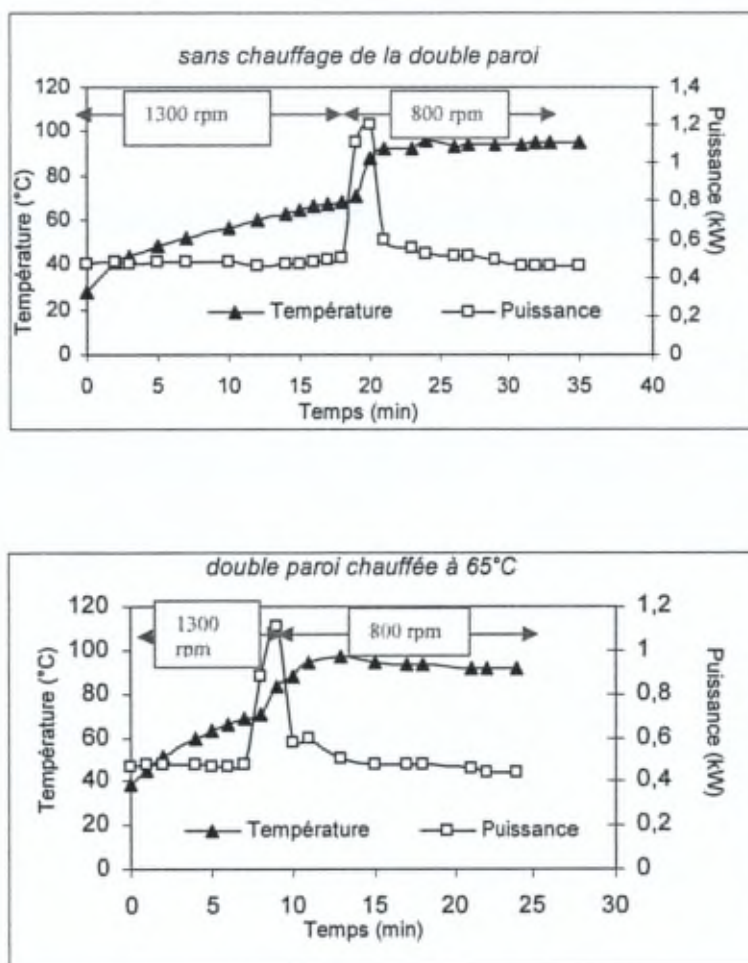


Figure 7 : Courbes d'enregistrement de la température du mélange et de la puissance consommée par le moteur en fonction du temps.

A.2. Analyses par microscopie électronique à balayage

L'observation des microbilles par microscopie électronique à balayage environnemental ESEM (figure 8) permet le suivi de l'évolution de leur forme en fonction de la vitesse du bras du mélangeur et de la durée de sphéronisation ; on voit ainsi les microbilles croître et s'arrondir, pour atteindre une forme sphérique après 15 min de TS. Nous avons par ailleurs constaté la présence de gros cristaux de chlorhydrate de phényléphrine (figure 8a) visibles à la surface des microbilles. Leur présence nous a conduit à broyer les cristaux de ce principe actif

avant leur incorporation dans le mélange. Après broyage, leur taille a été évaluée par diffraction laser, $D[4,3] = 147,8 \mu\text{m} \pm 3,4$.

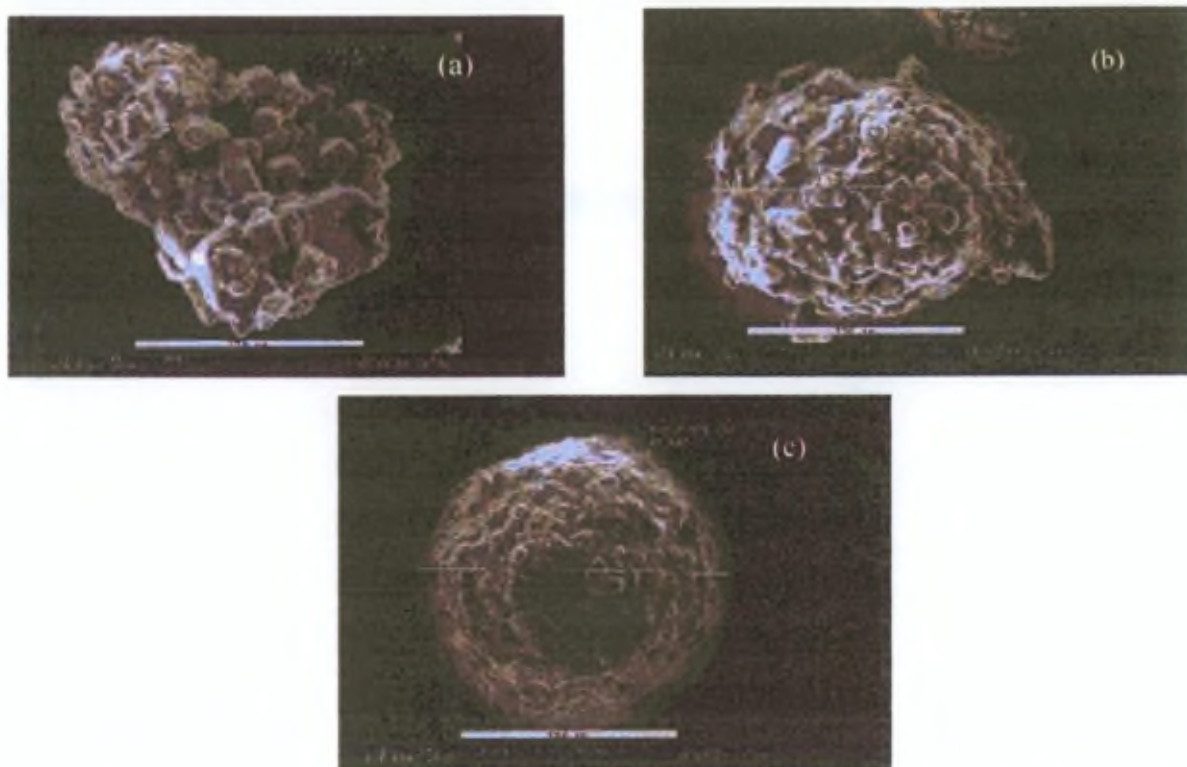


Figure 8 : Microphotographies réalisées sur des microbilles obtenues après différents temps de sphéronisation (4 min (a), 9 min (b) et 15 min (c)), IS : 800 rpm, agrandissement de 90 à 100 X

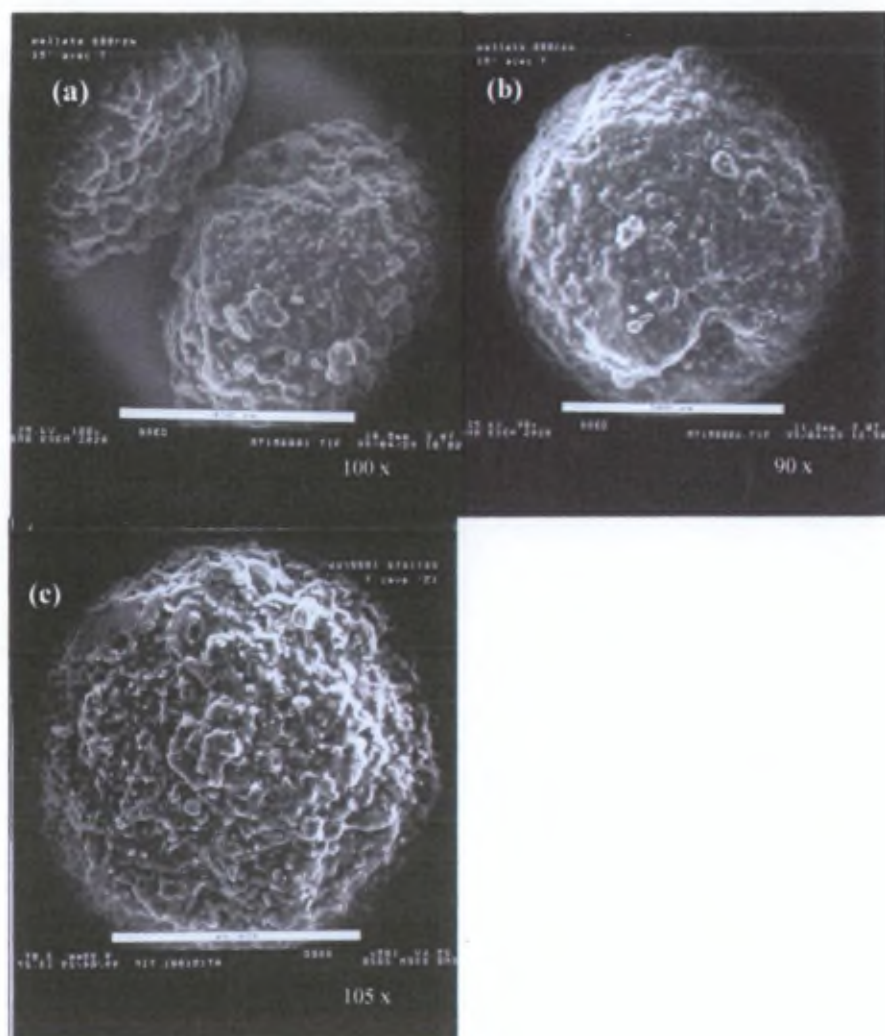


Figure 9 : Microphotographies réalisées sur des microbilles formées après l'application de différentes vitesses du bras du mélangeur (600 rpm (a), 800 rpm (b) et 1000 rpm (c)), TS : 15 min, agrandissement de 90 à 100 X

Les microphotographies de la figure 9, réalisées sur les microbilles formées à la suite de l'adoption de différentes vitesses du bras du mélangeur, montrent que :

- Figure 9a : l'application d'une vitesse de 600 rpm, conduit à la formation de petites microbilles irrégulières dont la taille moyenne ne dépasse pas les 760 μm .
- figures 9b et 9c : l'adoption d'une vitesse de 800 rpm ou de 1000 rpm donne des microbilles sphériques de taille moyenne comprise entre 935 μm et 1174 μm .

Enfin, des coupes ont également été réalisées sur les microbilles après leur fixation dans une résine polymérique. Les microbilles montrent une structure interne continue et homogène, figure 10.

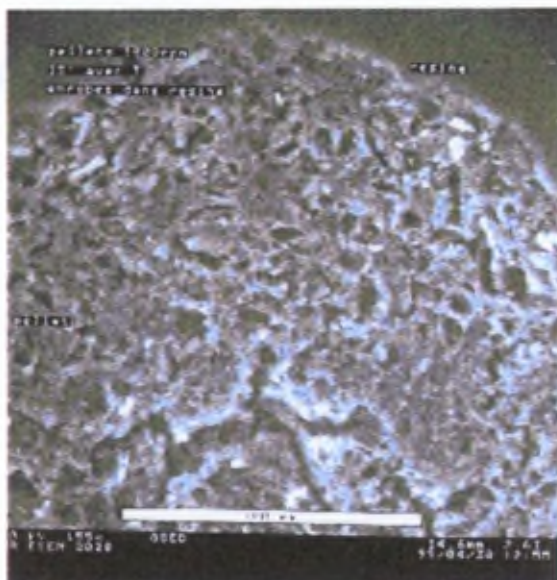


Figure 10 : Microphotographie montrant une coupe d'une microbille (TS : 15 min, IS : 1000 rpm, double paroi 65°C), agrandissement 155 x

A.3. Analyses granulométriques des microbilles par tamisage

Une fois fabriquées, les microbilles sont refroidies à température ambiante, l'analyse granulométrique est ensuite effectuée par tamisage, après le rejet des agglomérats et des particules de taille supérieure à 2500 μm . Les tableaux 4 et 5 reprennent les caractéristiques granulométriques obtenues pour les différents lots issus des conditions appliquées.

Tableau 4. L'effet de la vitesse du bras du mélangeur et de la durée du malaxage sur les caractéristiques granulométriques des microbilles (double paroi à température ambiante).

IS (rpm)	TS (min)	$d_{géo}$ (μm)	$s_{géo}$	% < 500 μm	Fraction comprise entre 1400 et 2000 μm	Rendement (%) : la fraction comprise entre 500 et 1400 μm
600	9	722	1,7	8,0	3,1	58,9
	12	778	1,7	6,7	7,1	56,2
	15	760	1,0	6,1	3,9	60,0
800	9	935	1,3	0,8	5,9	80,5
	12	1069	1,3	1,2	7,7	78,3
	15	1174	1,4	1,0	14,8	71,4
1000	9	967	1,4	1,7	6,2	81,9
	12	972	1,4	2,4	6,1	81,3
	15	964	1,4	2,2	7,4	80,2

Tableau 5 : L'effet de la vitesse du bras du mélangeur et de la durée de la sphéronisation sur les caractéristiques granulométriques des microbilles (double paroi à 65°C).

IS (rpm)	TS (min)	$d_{géo}$ (μm)	$s_{géo}$	% < 500 μm	Fraction comprise entre 1400 et 2000 μm	Rendement (%) : la fraction comprise entre 500 et 1400 μm
600	9	625	2,1	12,4	3,7	38,6
	12	692	1,8	6,4	2,4	45,9
	15	719	1,7	4,3	2,4	48,0
800	9	913	1,4	1,8	7,3	77,3
	12	1060	1,3	0,8	13,5	72,2
	15	1125	1,3	1,0	13,5	72,0
1000	9	892	1,4	1,3	4,3	61,9
	12	934	1,5	2,5	4,1	60,9
	15	898	1,5	2,7	7,2	57,6

L'examen de ces tableaux nous révèle que la majeure partie des particules formées ont un diamètre géométrique proche de 1 mm, avec une faible déviation standard géométrique.

Néanmoins, les pertes par dépôt sur les parois du mélangeur se sont révélées importantes, elles atteignent même les 40% (m/m) pour les essais effectués à 600 rpm comme vitesse du bras du mélangeur (IS). L'augmentation de la vitesse du bras du mélangeur à 800 rpm ou à 1000 rpm a permis de diminuer ces pertes par collage aux parois du mélangeur. Par contre, le chauffage de la double paroi n'a pas diminué les pertes par dépôt. Le revêtement interne de la cuve en téflon était également sensé diminuer l'adhésion de la masse (Holm., 1997), mais dans notre cas, cet effet bénéfique n'a pas été constaté. C'est la raison pour laquelle nous avons envisagé pour la suite de ce développement l'utilisation d'un autre appareillage.

En guise de récapitulatif, si l'on prend en considération l'ensemble des résultats détaillés ci-dessus, nous pouvons dire que :

- ✓ Nous ne constatons pas de différences granulométriques importantes entre les lots fabriqués en chauffant la double paroi et ceux fabriqués à froid. Cependant, le chauffage de la double paroi permet d'atteindre plus rapidement la granulation du mélange (9 min au lieu de 20 min), permettant un gain de temps au niveau du procédé de fabrication.
- ✓ Les résultats de l'analyse granulométrique, en accord avec ceux de la microscopie, montrent que les microbilles présentant les caractéristiques granulométriques les plus satisfaisantes, à savoir une faible déviation standard géométrique et une forte proportion de particules entrant dans la fourchette granulométrique : 500 μm -1400 μm , sont obtenues après 15 min de temps de sphéronisation et pour une vitesse (IS) de 800 rpm.

Enfin, nous avons testé l'influence de la granulométrie du lactose utilisé sur les caractéristiques des microbilles. A cet effet, nous avons remplacé le lactose 450 Me ($D[4,3] = 21,4 \pm 2,4 \mu\text{m}$) par du lactose 200 Me ($D[4,3] = 64,3 \pm 2,6 \mu\text{m}$). La formulation testée était la même que celle exposée ci-dessus (formulation contenant 18% m/m de Compritol®). Elle a été testée à froid, en adoptant une vitesse du bras du mélangeur de 1300 rpm lors de la granulation et de 800 rpm lors de la sphéronisation. Les microbilles obtenues après 15 min de sphéronisation sont de plus petite taille que celles obtenues avec le lactose 450 Me ; leur diamètre géométrique est de 852 μm ($s_{\text{géo}} = 2,0$), au lieu de 1174 μm . Par ailleurs, le rendement, exprimé par la fraction granulométrique 500 μm -1400 μm , est également inférieur dans le cas des microbilles fabriquées avec du lactose 200 Me ; il est de 58% au lieu de 72%. Ceci s'explique par le fait que le lactose 450 Me, de par la finesse de ses particules, forme,

lors de la granulation, des liens interparticulaires plus nombreux que le lactose 450 Me. Ces liens favorisent la formation de microbilles plus solides, moins sujettes à l'effritement face à la rotation du chopper et à celle du bras du mélangeur (Schaefer, 1992b).

A.4. Essais de dissolution in vitro

Le test de dissolution effectué sur les microbilles obtenues dans les conditions suivantes : TS = 15 min, IS = 800 rpm et double paroi chauffée à 65°C, montre une libération rapide du chlorhydrate de phényléphrine (figure 11). Ceci s'explique par le fait qu'une quantité de 18% (m/m) de corps gras hydrophobe dans le mélange ne suffit pas pour ralentir la libération d'un principe actif très hydrosoluble comme le chlorhydrate de phényléphrine.

La tentative d'augmentation de la quantité de corps gras dans le mélange s'est soldée par un échec à cause de l'impossibilité du contrôle de la température du mélange, avec pour conséquence un « surmouillage » et une prise en masse du mélange.

Pour pallier ce problème, nous avons eu recours à un autre mélangeur granulateur à haute vitesse ; ce développement est décrit dans la section qui suit.

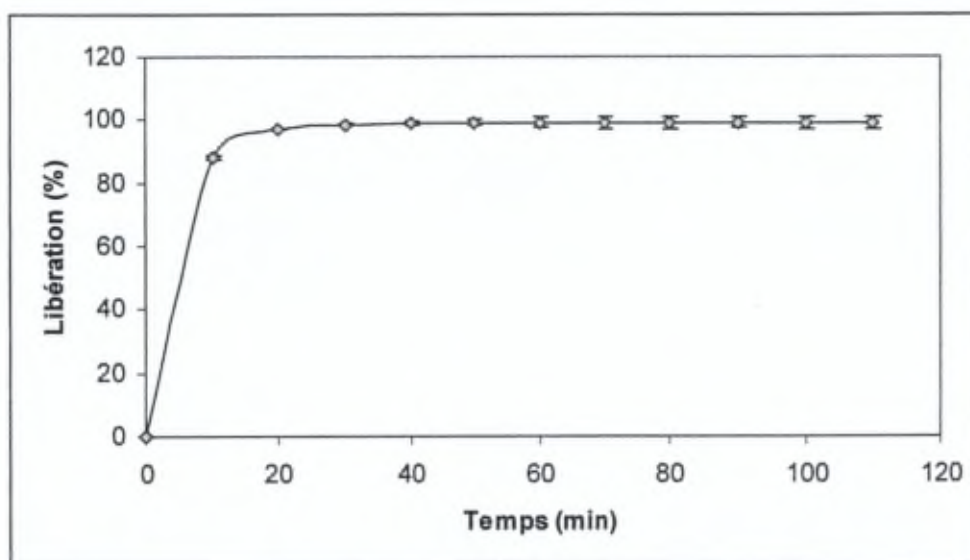


Figure 11 : Courbe de dissolution du chlorhydrate de phényléphrine ($m \pm SD$, $n = 5$), formulation à 18% de corps gras

B. La mise au point de microbilles à libération prolongée en utilisant le mélangeur granulateur Mi-Pro®.

Le petit mélangeur granulateur à haute vitesse Mi-Pro® a été utilisé avec succès pour des formulations contenant une forte proportion en corps gras (jusqu'à 80% m/m). Ce succès a pu être obtenu grâce à une série de facteurs :

- ✓ Le Mi-Pro® est équipé d'un chopper ; or celui-ci, comme nous l'avions expliqué dans la partie introductive de ce travail (chapitre II.3.3. A), permet non seulement la cassure des gros agglomérats évitant ainsi une prise en masse rapide du mélange, mais il contribue également à un meilleur contrôle de la température du mélange durant le procédé de pelletisation. Cette dernière caractéristique peut s'expliquer par le fait qu'en perturbant le mouvement induit par le bras du mélangeur, le chopper réduit les frictions entre les particules et par là même l'augmentation de la température de la masse (Schaefer, 1996a).
- ✓ Une légère adaptation de l'appareil, qui consiste à y incorporer une arrivée d'air comprimé (à température ambiante) au niveau de la masse du mélange, a favorisé le refroidissement de celle-ci en cas de besoin et contribué à un meilleur contrôle de la température, prévenant par là même tout risque de « surmouillage ».
- ✓ Enfin si les deux paramètres précédents permettent de mieux contrôler la température de la cuve, c'est dans le but de développer des formulations contenant une forte proportion de corps gras. Dans cette optique, l'idée intéressante a consisté en l'utilisation de mélanges de deux corps gras à faible valeur HLB, afin de garantir un caractère hydrophobe marqué. Mais ces corps gras présentaient des plages de fusion bien distinctes, l'un fondant à une température inférieure à l'autre. Ainsi, grâce à un contrôle efficient de la température, nous pouvions atteindre la fusion du corps gras présentant la plage de fusion la plus basse, celui-ci jouait alors le rôle d'agent liant, tout en maintenant le second corps gras à l'état non fondu, afin d'éviter tout phénomène de « surmouillage ». C'est ainsi que nous sommes parvenus à incorporer une forte proportion d'excipients lipidiques dans le mélange

(jusqu'à 80% m/m) et à ralentir la libération de principes actifs très hydrosolubles.

Nous avons utilisé comme excipients lipidiques des mélanges de Compritol® et de Précirol®, en incorporant des quantités croissantes en corps gras dans le mélange (18%, 25%, 40%, 60% et 80% m/m).

Tableau 6 : La composition des formulations étudiées à base de chlorhydrate de phényléphrine.

Formulation	Phényléphrine.HCl (% m/m)	Compritol® (% m/m)	Précirol® (% m/m)	Lactose 450 Me (g)
18% Corps gras	2	3	15	Ad 250
25% Corps gras	2	10	15	Ad 250
40% Corps gras	2	25	15	Ad 250
60% Corps gras	2	45	15	Ad 250
80% Corps gras	2	65	15	Ad 250

Le chlorhydrate de phényléphrine qui est une molécule très hydrophile, a été utilisé comme traceur à raison de 2% ou de 10% (m/m). Les formulations sont reprises au niveau du tableau 6. La quantité du corps gras présentant le plus faible point de fusion à savoir le Précirol® (pf = 54°C) a été fixée à 15% (m/m). C'est donc la quantité de Compritol® (pf = 72°C) qui a été augmentée de 3 % à 65% (m/m), de manière à assurer un ralentissement de la libération du chlorhydrate de phényléphrine. Nous avons fixé le pourcentage de Précirol® contenu dans les formulations à 15 % (m/m) sur base d'essais préliminaires. En effet, en deçà de cette proportion, la quantité d'agent liant dans le mélange est insuffisante pour assurer la bonne cohésion des particules, avec pour conséquence la formation de microbilles de très petite taille et la présence d'une forte proportion (> 30%) de particules de diamètre géométrique inférieur à 500 µm. Au dessus de cette proportion en Précirol®, nous assistons à un « surmouillage » des particules.

Durant tout le processus de fabrication, la température du mélange au sein du granulateur a été maintenue en dessous de 50°C. En effet, l'étude de préformulation que nous avons effectuée (chapitre III.1) nous avait montré qu'aux environs de 50°C, seul le Précirol® est

suffisamment ramolli pour jouer le rôle d'agent liant. Dans ces conditions, le Compritol® se trouve à l'état solide ; il jouera le rôle d'excipient hydrophobe permettant le ralentissement de la libération du chlorhydrate de phényléphrine. C'est ainsi que nous sommes parvenus à incorporer une quantité importante de corps gras au sein de nos formulations sans voir s'agglomérer les particules à cause d'une quantité excessive de liant.

La procédure expérimentale a été standardisée sur base d'essais préliminaires. Là aussi, comme lors des essais effectués en utilisant le granulateur Pellmix P/L 1/8, nous avons testé les effets de la vitesse du bras du mélangeur (IS), les effets de la vitesse de rotation du chopper (CS) ainsi que ceux du temps de sphéronisation (TS) sur les propriétés des microbilles (granulométrie, forme...). C'est la formulation contenant 2% (m/m) de chlorhydrate de phényléphrine et 60% (m/m) de corps gras qui a été choisie pour déterminer les conditions optimales de fabrication (tableau 6).

Les conditions expérimentales adoptées sont les suivantes :

Durant l'étape de **granulation du mélange** :

- La double paroi est chauffée à 45°C
- La vitesse du bras du mélangeur est maintenue à 1800 rpm
- La vitesse du chopper est maintenue à 130 rpm

Ces conditions expérimentales permettent d'atteindre rapidement (en 10 min environ) une température proche de la plage de fusion du Précirol®, favorisant ainsi un ramollissement suffisant de ce corps gras afin de granuler le mélange. Cette étape nous est signalée par un saut du torque qui indique la phase de granulation du mélange (figures 12 et 13).

Lors de l'étape de **sphéronisation**, assurer la croissance des granulés en microbilles se fera moyennant le maintien de la température la plus stable possible (46 à 50°C), de manière à accroître et à sphéroniser les particules tout en diminuant le risque de les voir s'agglomérer exagérément. Dans cette optique, la vitesse du bras du mélangeur sera diminuée afin de réduire les forces de frottement entre le bras du mélangeur et la masse à granuler ; ces frottements sont en effet responsables du réchauffement de celle-ci. De plus, la vitesse de rotation du « chopper » sera augmentée. En effet, la rotation du « chopper » à haute vitesse permet de casser les agglomérats et favorise une distribution étroite de la taille des particules. Elle contribue également à une meilleure stabilisation de la température du produit en

diminuant les frictions entre les particules, réduisant ainsi la génération de la chaleur due aux forces de frottement (Schaefer 1996a ; Schaefer et col. 1992a). Toujours dans l'optique d'offrir un contrôle efficient de la température durant la sphéronisation des particules, une arrivée d'air à température ambiante (source d'air comprimé à débit contrôlé) est actionnée en cas de besoin vers la masse, de manière à maintenir la température du mélange aux environs de 50°C. Enfin, la température de la double paroi du mélangeur est maintenue à 45°C durant la sphéronisation afin de diminuer les pertes par collage à la paroi en verre du mélangeur. Ce collage pourrait être induit par la recristallisation des corps gras ramollis ou partiellement fondus au contact d'une paroi froide.

A la lumière de ces données, **les conditions testées lors de la sphéronisation** sont:

- La double paroi est maintenue à 45°C ;
- Quatre vitesses du bras du mélangeur ont été testées (IS) : 400, 600, 800 ou 1000 rpm ;
- Deux vitesses du chopper (CS) : 130 ou 4000 rpm ;
- Trois temps de sphéronisation (TS) : 6, 8 ou 15 min ;
- Un balayage de la masse par un courant d'air froid en cas de besoin (de 2 à 4 m³/h).

Nous avons ainsi estimé l'influence du chopper, de la vitesse du bras du mélangeur ainsi que celle de la durée de sphéronisation. L'influence de chacun de ces paramètres a été évaluée séparément en maintenant les autres constants.

Les figures 12 et 13 montrent le suivi des courbes d'enregistrement des différents paramètres expérimentaux enregistrés en fonction du temps (température du produit, « torque », vitesse du bras du mélangeur et du chopper), obtenus pour le mélange choisi pour effectuer ce développement, à savoir le mélange contenant 60% de corps gras (tableau 6).

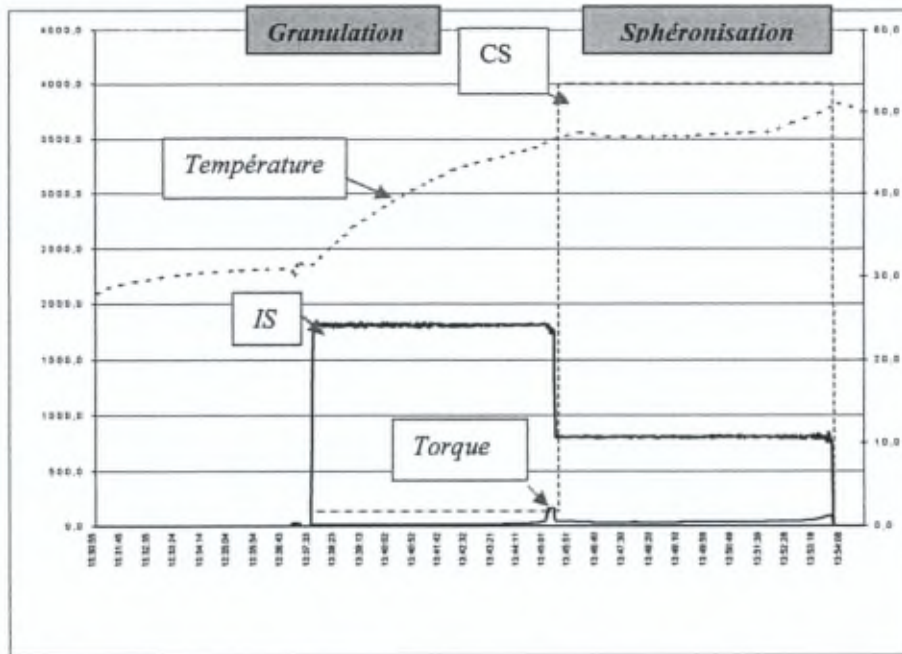


Figure 12 : Exemple d'une courbe d'enregistrement complète du processus de granulation pour le mélange comprenant 60 % de corps gras (conditions : IS 800 rpm, CS : 4000 rpm, TS : 8 min)

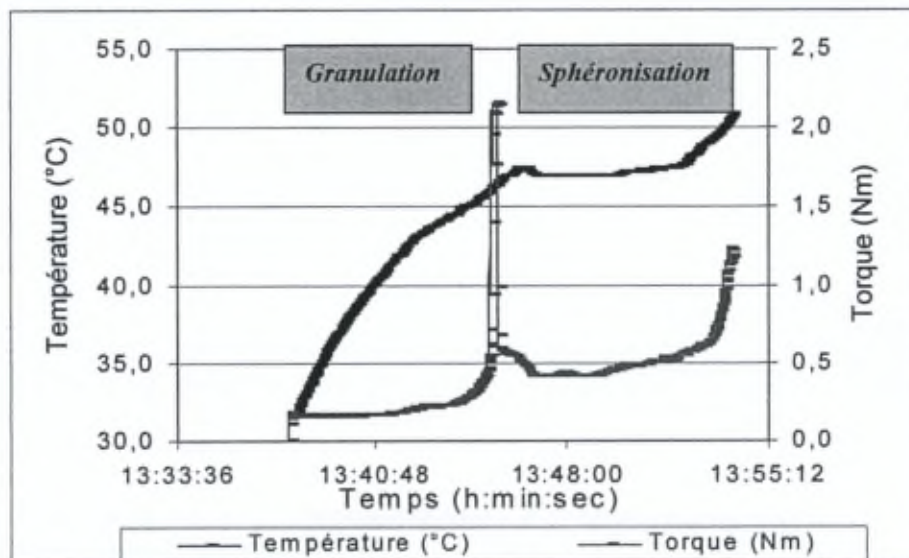


Figure 13 : Représentation des valeurs obtenues pour le torque et la température en fonction du temps (60% CG, IS : 800 rpm, CS : 4000 rpm, TS : 8 min).

L'examen de ces courbes permet de résumer le processus de pelletisation thermoplastique en trois étapes. Au cours de la première, la température augmente grâce à l'adoption d'une vitesse élevée du bras du mélangeur (1800 rpm) et à la circulation d'eau portée à 45°C dans la double paroi ; pendant ce temps la valeur du torque reste quant à elle assez constante. La deuxième étape est atteinte lorsque la température du mélange avoisine les 46°C-50°C. On assiste alors à un ramollissement et à une fusion partielle du Préciröl®, avec pour conséquence la granulation du mélange signalée par une augmentation brutale du torque. A ce stade, la diminution de la vitesse du bras du mélangeur et l'application d'un courant d'air froid vont entraîner d'une part la diminution immédiate de la valeur du torque et d'autre part, la stabilisation plus ou moins rapide de la température du mélange. Enfin, la troisième étape est celle qui marque l'accroissement de la taille des granulés et leur sphéronisation grâce au mouvement rotatoire imposé par le bras du mélangeur.

Durant cette dernière étape, le torque a une valeur plus ou moins constante tant que la température de la masse est maintenue en dessous de 50°C. Si on stoppe l'arrivée d'air comprimé, la température de la masse augmente et on assiste à une croissance exagérée de la taille des microbilles ainsi qu'à leur agglomération ; celle-ci se traduit par une nouvelle augmentation du torque. C'est ce qui est illustré par la partie finale des tracés de la figure 13. Ainsi, en accord avec les propriétés thermiques et rhéologiques du Compritol® et du Préciröl®, que nous avons largement discutées au niveau du chapitre III.1 et qui sont en partie relatées dans la littérature (Evrard et col. 1999), le contrôle de la température révèle ici toute l'importance qu'on lui soupçonnait dans la maîtrise de ce procédé de fabrication.

Cette allure générale des courbes de la figure 13, décrivant le processus de pelletisation sur base du suivi du torque et de la température en fonction du temps sera globalement retrouvée après l'application des différentes conditions de vitesse du bras du mélangeur (400 , 600, 800 et 1000 rpm), vitesse du chopper (130 et 4000 rpm) et temps de sphéronisation (6, 8 et 15 min). Les figures 14 à 16 représentent les courbes d'enregistrement des deux paramètres suivis (torque et température) pour ces différentes conditions expérimentales.

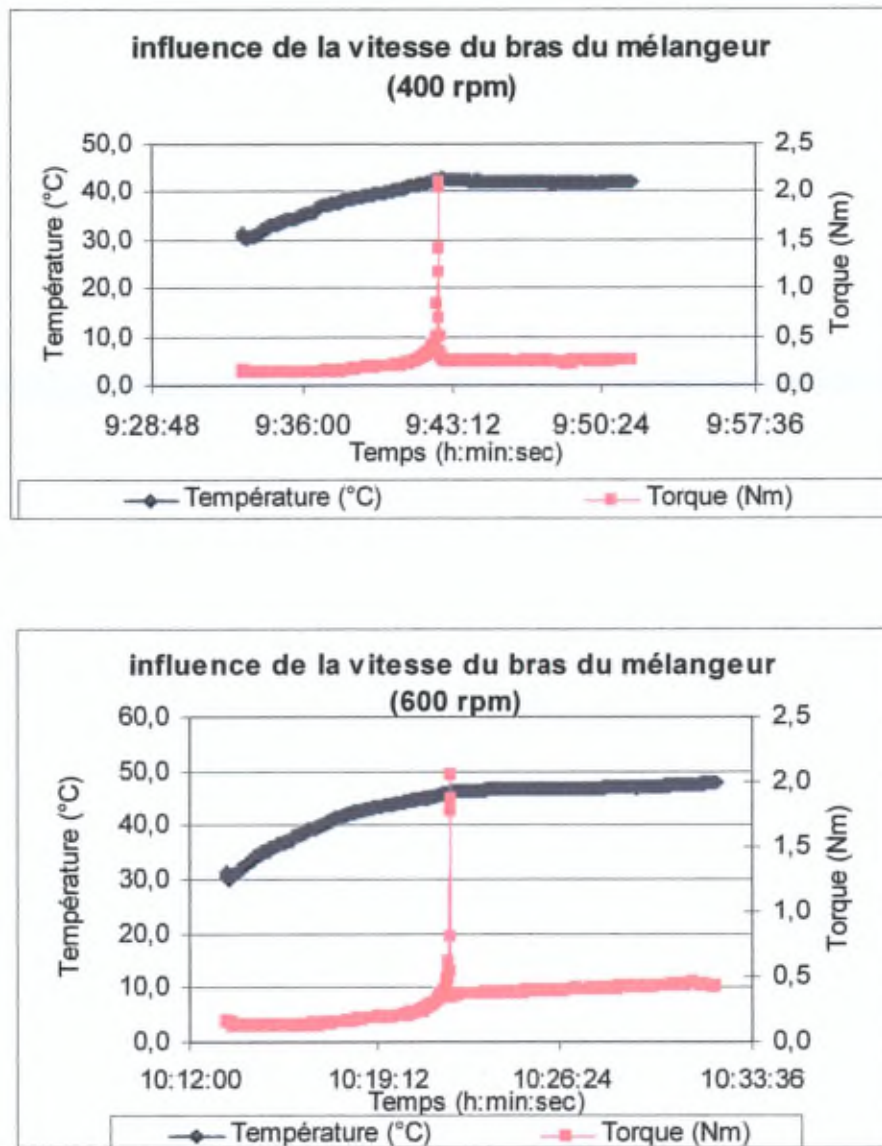


Figure 14a : Influence de la vitesse de rotation du bras du mélangeur (IS : 400 et 600 rpm) sur les courbes d'enregistrement du torque et de la température en fonction du temps (CS : 4000 rpm, TS : 15 min, air comprimé : 0 m³/h)

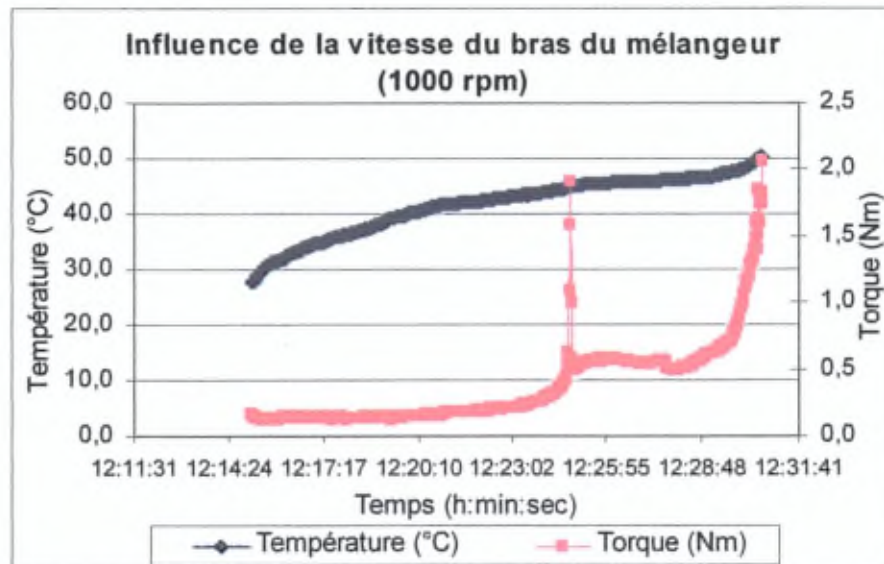
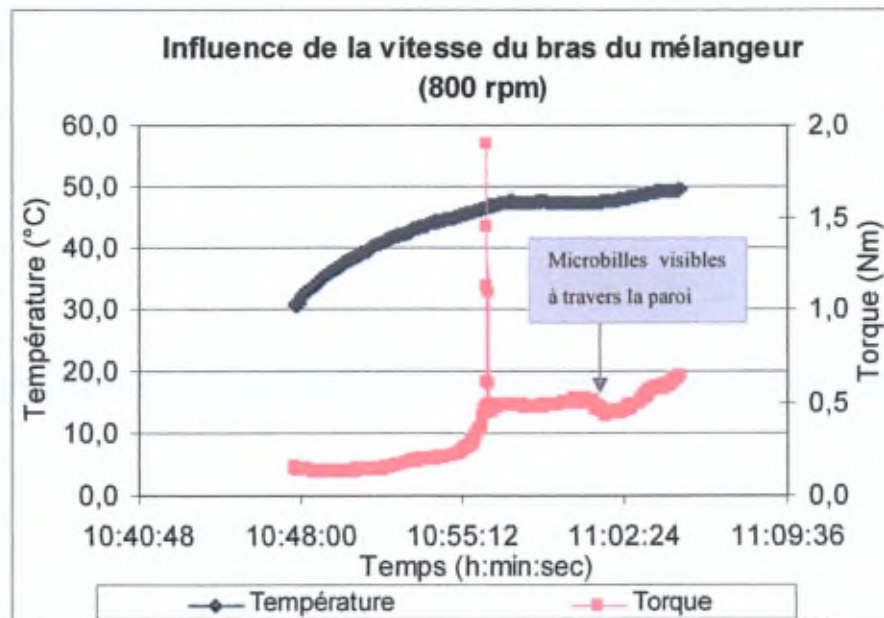


Figure 14b : Influence de la vitesse de rotation du bras du mélangeur (IS : 800 et 1000 rpm) sur les courbes d'enregistrement du torque et de la température en fonction du temps (CS : 4000 rpm, TS : 15 min, air comprimé : de 2 à 4m³/h)

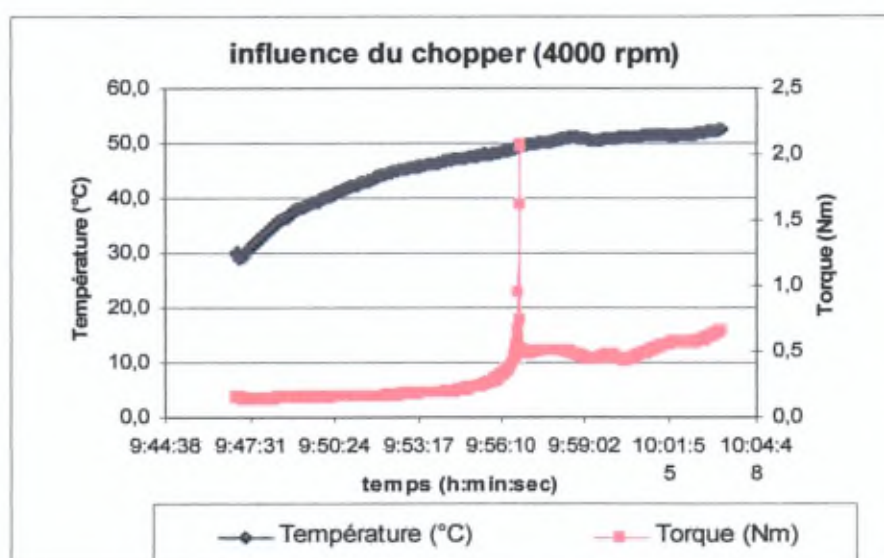
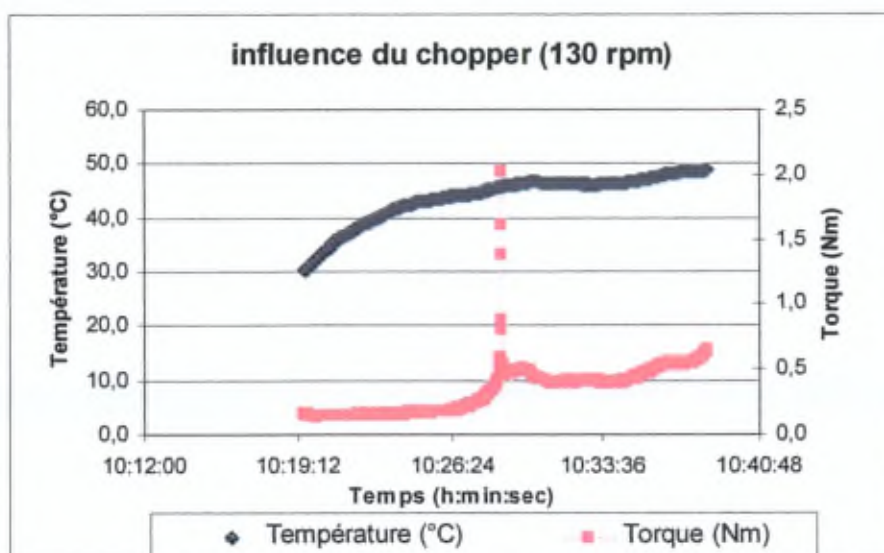


Figure 15 : Influence du chopper sur les courbes d'enregistrement du torque et de la température en fonction du temps (IS : 800 rpm, TS : 15 min, Débit d'air : de 0 à 2 m³/h)

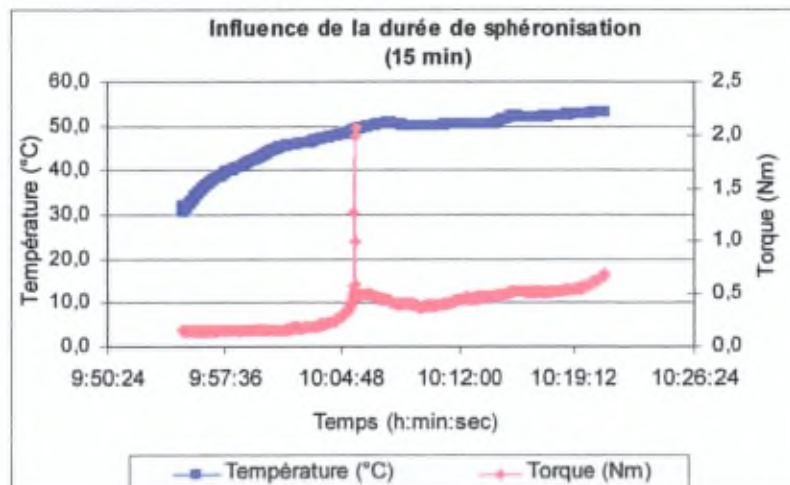
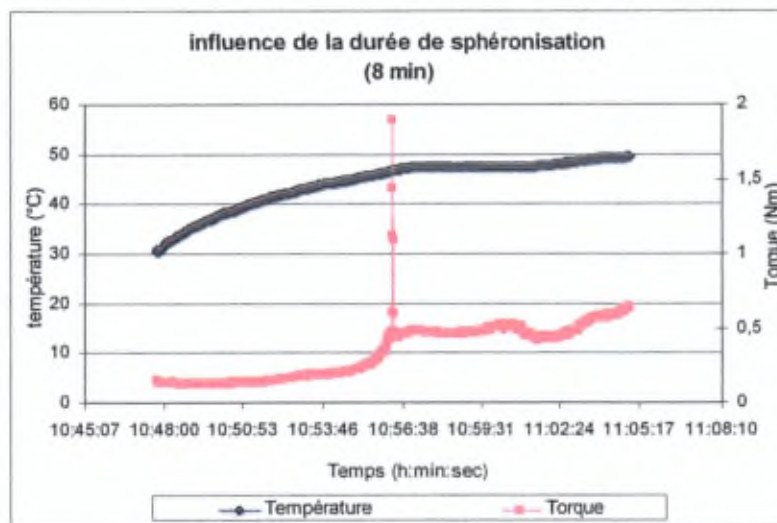
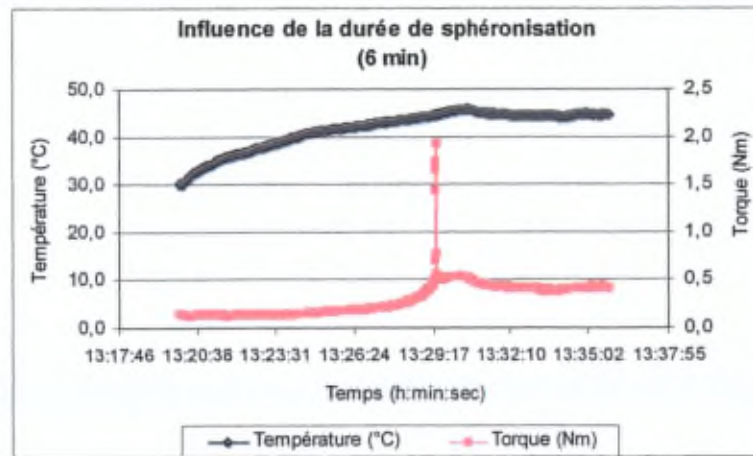


Figure 16 : Influence de la durée de sphéronisation (6 min, 8 min et 15 min) sur les courbes d'enregistrement du torque et de la température en fonction du temps (IS : 800 rpm, CS : 4000 rpm, air comprimé : de 0 à 2 m³/h)

Quelle est l'influence de chaque condition de fabrication sur les courbes d'enregistrement du torque et de la température en fonction du temps représentées par les figures 14 à 16 ?

Dans toutes ces figures, le suivi de la courbe du torque en fonction du temps est très intéressant tant pour marquer la granulation du mélange, comme nous l'avions évoqué précédemment, que pour révéler la croissance des microbilles. En effet, comme nous le soulignons dans la figure 14b, des variations de la courbe du torque en fonction du temps surviennent lorsque les microbilles sont visibles à travers la paroi en verre du mélangeur granulateur. L'augmentation du torque devient par ailleurs incontrôlée lorsqu'une forte vitesse IS est adoptée (1000 rpm). A l'opposé, les courbes d'enregistrement du torque restent assez plates pour les faibles IS (figure 14a), la croissance des microbilles n'est pas favorisée à ces faibles vitesses du bras du mélangeur.

A l'examen de ces courbes d'enregistrement du torque et de la température en fonction du temps, nous constatons que ce sont les courbes des figures 14a et b correspondant aux essais relatifs à l'étude de l'influence de la **vitesse de rotation du bras du mélangeur (IS)** qui sont les plus explicites. On relève ainsi qu'en adoptant une faible vitesse du bras du mélangeur (IS de 400 rpm ou 600 rpm, figure 14a) durant l'étape de sphéronisation, la chaleur dégagée par la friction des particules n'est pas suffisante pour maintenir la température du produit proche de la plage de ramollissement/fusion du Préciról® (46-50°C). La croissance des granulés s'en trouve alors entravée et les particules formées après 8 min de temps de sphéronisation présentent une granulométrie trop faible pour être assimilées à des microbilles (tableau 8). Par contre, à 800 rpm comme IS, l'énergie dégagée par les forces de friction est suffisante pour maintenir le Préciról® à l'état ramolli, permettant ainsi la croissance des granulés et leur sphéronisation en microbilles. A une vitesse de 1000 rpm, on assiste à une augmentation brutale du « torque » traduisant une prise en masse du mélange en l'espace de 5 min de TS.

Pour ce qui est de l'influence de la **vitesse de rotation du chopper (CS)** (figure 15), nous n'avons pas observé l'effet positif décrit dans la littérature d'une vitesse de chopper élevée sur le contrôle de la température (Schaefer 1996a). Par contre, en terme de granulométrie des pellets et en accord avec la littérature (Schaefer et col. 1992a, Schaefer 1996a), l'adoption d'une vitesse élevée du chopper améliore le rendement du procédé puisque la fraction granulométrique désirée (700 – 1500 µm) est plus importante pour une vitesse du chopper de 4000 rpm que pour 130 rpm (tableau 7). Enfin, pour ce qui est de **l'influence de la durée de**

sphéronisation (TS) représentée par les courbes de la figure 16, on observe que durant les cinq à six premières minutes de sphéronisation, les tracés du torque en fonction du temps restent assez constants ; ce n'est qu'après qu'une légère augmentation du torque survient, synonyme de l'accroissement de la taille des microbilles.

Une fois fabriquées, les microbilles sont étalées sur une surface plane et refroidies à température ambiante. Leur caractérisation peut alors être effectuée. Cette caractérisation a porté sur des lots de microbilles obtenus après l'application des différentes conditions expérimentales détaillées ci-dessus (influence de la vitesse du bras du mélangeur, de celle du chopper et du temps de sphéronisation).

B.1. Analyses granulométriques des microbilles par tamisage

Les microbilles refroidies à température ambiante sont passées sur un tamis d'ouverture de maille égale à 2500 μm afin d'éliminer les grosses particules et les agglomérats. L'adhésion au bol du mélangeur a été estimée en faisant la différence entre la quantité de poudre contenue dans le bol du mélangeur au départ et la quantité de microbilles récupérée. Les pertes par adhésion à la paroi du Mi-Pro[®] se sont révélées être inférieures à celles observées lors de la fabrication des microbilles dans le granulateur Pellmix. Elles sont de l'ordre de 5 % (m/m) dans le Mi-Pro[®], alors qu'elles dépassaient les 10% (m/m) lorsque nous avons employé Pellmix comme mélangeur granulateur.

Tableau 7 : Influence de la vitesse du chopper (IS : 800 rpm, TS : 8 min)

CS(rpm)	$d_{\text{géo}}$ (μm)	$s_{\text{géo}}$	Fraction (%) <700 μm	Fraction (%) 1500-2000 μm	Rendement (%) Fraction 700-1500 μm
130	1480	1,6	0,8	34,5	44
4000	1240	1,5	3,4	19,9	68,8

Tableau 8 : Influence de la vitesse du bras du mélangeur (CS : 4000 rpm, TS : 8 min)

IS (rpm)	d _{géo} (μm)	s _{géo}	Fraction (%) <700 μm	Fraction (%) 1500-2000 μm	Rendement (%) Fraction 700-1500 μm
400	230	4,7	94,6	1,6	3,6
600	210	4,8	94,6	1,6	3,6
800	1240	1,4	3,4	19,9	68,8
1000*	-	-	-	-	-

* agglomération des particules

Tableau 9 : Influence de la durée de sphéronisation (CS : 4000 rpm, IS : 800 rpm)

TS (min)	d _{géo} (μm)	s _{géo}	Fraction (%) <700 μm	Fraction (%) 1500-2000 μm	Rendement (%) Fraction 700-1500 μm
6	210	4,9	97,8	0,2	1,8
8	1240	1,5	3,4	19,9	68,8
15	1370	1,7	4,8	30,3	30,5

A l'examen de ces tableaux, il apparaît que l'analyse granulométrique des microbilles fabriquées au Mi-Pro[®] renseigne les conditions : 800 rpm comme IS et de 4000 rpm comme CS lors de la sphéronisation, comme étant les vitesses optimales pour améliorer le rendement de fabrication. Celui-ci est exprimé par la fourchette granulométrique 700-1500 μm. Par ailleurs, une durée de sphéronisation (TS) minimale de 8 min s'impose afin d'accroître la taille des granules et les sphéroniser en microbilles, sans toutefois dépasser les 15 min avec le risque d'assister à un accroissement indésirable de leur taille. En adoptant ces conditions de sphéronisation qui semblent être optimales : **IS = 800 rpm, CS = 4000 rpm et TS = 8 min**, le diamètre géométrique des microbilles obtenues est de 1240 μm.

Afin de tester la reproductibilité de ces conditions de fabrication, deux autres lots de microbilles ont été fabriqués suivant cette même formulation (la formulation contenant 60% (m/m) de corps gras du tableau 6) et en adoptant les conditions optimales de fabrication que

nous venons de décrire. Les courbes d'enregistrement sont comparables à celle montrée par la figure 14b (IS = 800 rpm). Les résultats après analyses granulométriques nous donnent comme moyenne des trois essais un diamètre géométrique de $1261 \mu\text{m} \pm 38 \mu\text{m}$. Par ailleurs, le rendement exprimé par le pourcentage de microbilles entrant dans la fourchette granulométrique 700 – 1500 μm est de $72 \% \pm 5 \%$.

B.2. Analyses par microscopie électronique à balayage

L'observation à l'œil nu des microbilles après leur fabrication nous indiquait déjà que les microbilles fabriquées dans les conditions de sphéronisation : IS 800 rpm, CS 4000 rpm et TS 8 min, étaient les plus sphériques. Afin de confirmer cette observation, nous avons observé les microbilles issues des différentes conditions de fabrication par microscopie électronique à balayage.

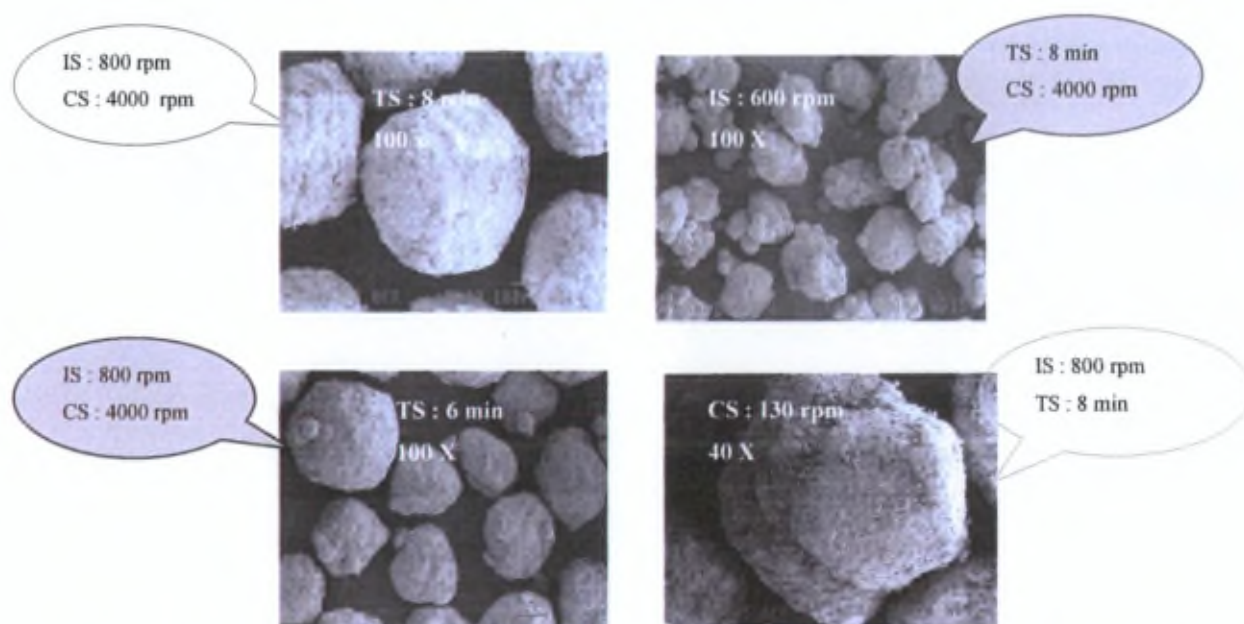


Figure 17 : Microphotographies illustrant les microbilles obtenues après l'application de différentes conditions de fabrication

De l'examen de ces photographies (figure 17) nous pouvons retenir que :

- L'adoption de 600 rpm comme vitesse de rotation du bras du mélangeur ne fournit pas suffisamment d'énergie pour permettre la croissance des microbilles ; trop de fines particules demeurent. Celles-ci sont bien visibles sur la microphotographie. L'analyse granulométrique (tableau 8) confirme cette observation puisque près de 95% des microbilles obtenues ont une taille inférieure à 700 μm . Nous pouvions d'ailleurs nous attendre à ce résultat au moment même de la fabrication de ce lot de microbilles, puisque l'allure de la courbe du torque en fonction du temps (figure 14a) ne présentait pas de variations du torque lors de la sphéronisation. Or ce sont ces variations qui traduisent la croissance de la taille des microbilles.
- 800 rpm comme vitesse du bras du mélangeur semble être une bonne condition pour aboutir à des microbilles de forme bien sphérique. Leur taille est également appropriée ($d_{\text{géo}} = 1240 \mu\text{m}$), avec une proportion importante (69%) entrant dans la fourchette granulométrique désirée (700-1500 μm).
- La durée de sphéronisation doit avoisiner les 8 min au minimum, de manière à permettre la croissance des microbilles. Les microbilles récoltées après 6 min de sphéronisation sont de très petite taille ($d_{\text{géo}} = 210 \mu\text{m}$) et assimilables plutôt à des granulés qu'à des microbilles.
- Le maintien de 130 rpm comme vitesse de chopper (CS) ne permet pas une bonne cassure des agglomérats et mène à la formation de microbilles de grande taille ($d_{\text{géo}} = 1480 \mu\text{m}$).

Nous pouvons dès lors dire en guise de conclusion à ces essais, que les conditions de fabrication optimales pour la formulation testée (la formulation à 60% (m/m) de CG du tableau 6) sont les suivantes :

Durant l'**étape de granulation** du mélange :

- La double paroi est chauffée à 45°C
- La vitesse du bras du mélangeur est maintenue à 1800 rpm
- La vitesse du chopper est maintenue à 130 rpm

Durant l'étape de sphéronisation des particules :

- La double paroi est maintenue à 45°C
- La vitesse du bras du mélangeur est fixée à 800 rpm
- La vitesse du chopper est portée à 4000 rpm
- La durée de sphéronisation est de 8 min
- Un balayage de la masse par un courant d'air à température ambiante (2 m³/h)

Une fois ces conditions opératoires établies, nous nous en sommes servis comme « conditions de base » lors de la fabrication de microbilles utilisant des formulations contenant différents principes actifs (théophylline, kétoprofène, chlorhydrate de ciprofloxacine). Il nous apparaît important de souligner ici que ces conditions sont à considérer comme des **lignes directrices** sujettes à modifications. En effet, compte tenu de la granulométrie et de la conductivité thermique des principes actifs utilisés en grandes quantités, une légère augmentation de la température de la double paroi et/ou de la durée de sphéronisation peut se révéler nécessaire afin d'optimiser le procédé de fabrication des microbilles (écourter le procédé de fabrication, fabriquer des microbilles de taille appropriée).

B.3. Analyses par microscopie électronique couplée à la diffraction RX (microscopie-RX)

L'analyse de la composition chimique de la surface et de la section des microbilles a été réalisée par microscopie électronique couplée à la diffraction aux Rayons X. Cette technique nous a permis de rechercher certains éléments constitutifs des microbilles (C, Cl et O). En l'occurrence, la localisation des chlorures est fort utile dans la détermination de la répartition du traceur : le chlorhydrate de phényléphrine au sein des microbilles. Les figures 18 et 19 montrent une distribution homogène des différents éléments recherchés. Ainsi, la distribution homogène des chlorures est indicatrice d'une répartition homogène du chlorhydrate de phényléphrine au sein de la matrice. Nous devons cette répartition homogène du traceur au sein des microbilles fabriquées, à la forte agitation que subit la masse à granuler puis à sphéroniser, sous l'action des mouvements du bras du mélangeur et du chopper dans le mélangeur granulateur à haute vitesse.

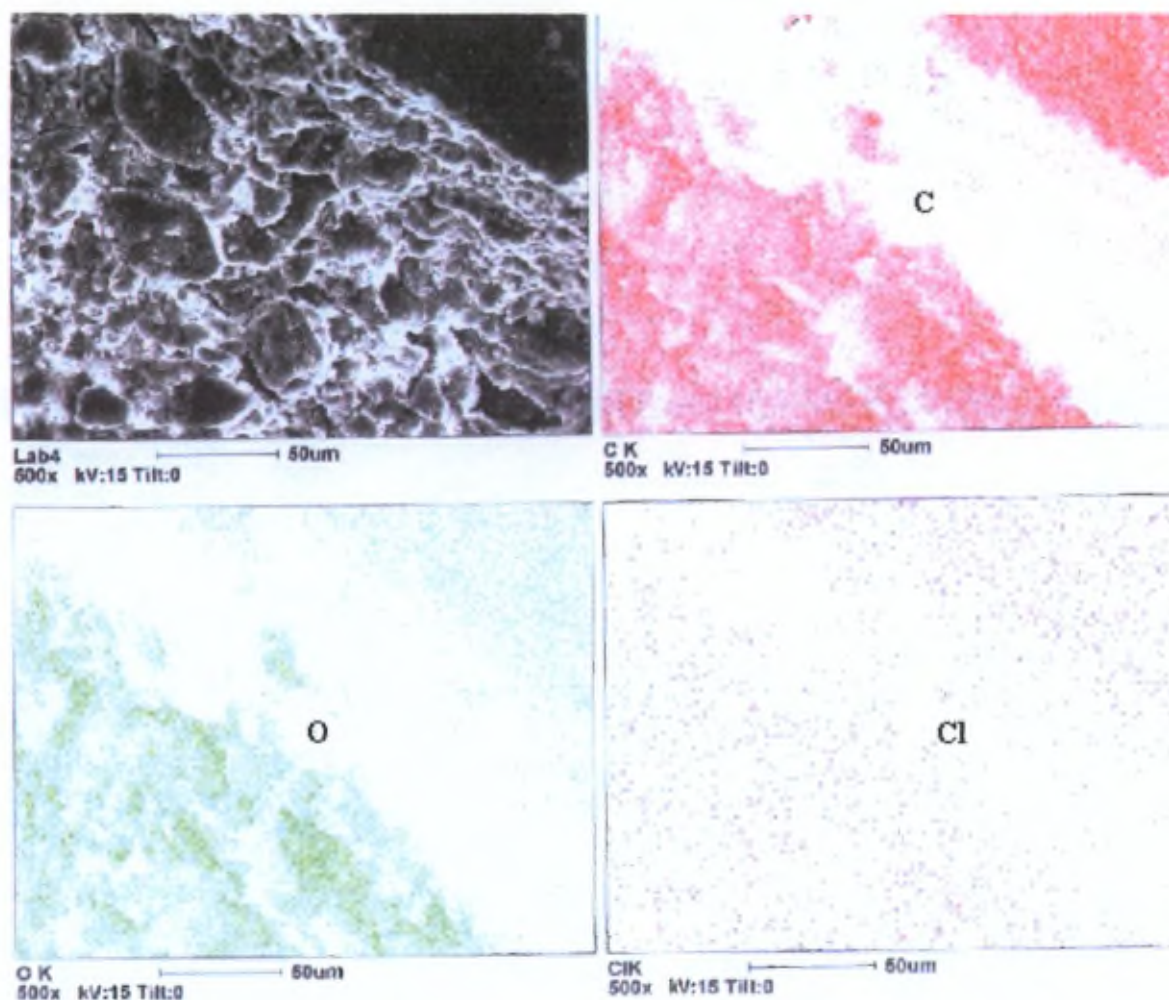


Figure 18 : Microphotographies obtenues par microscopie-RX, représentant la répartition des atomes de C, O et Cl, au sein d'une coupe de microbille

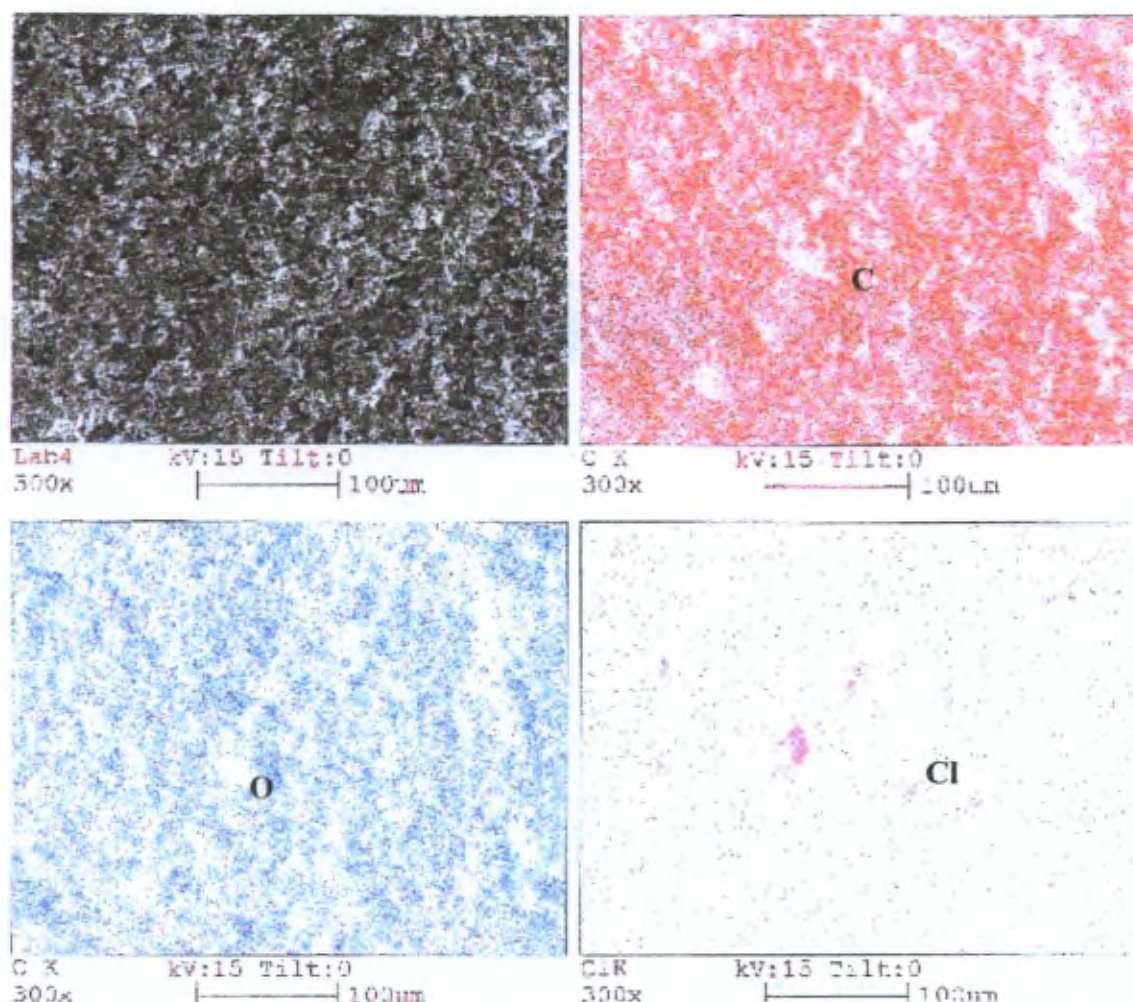


Figure 19 : Microphotographies obtenues par microscopie-RX, représentant la répartition des atomes de C, O et Cl, présents en surface d'une microbille

Les tests que nous venons de décrire visent à estimer la qualité de fabrication des microbilles pour ce qui est de leur granulométrie, leur aspect, la répartition homogène du traceur. Une fois effectués, nous devons nous pencher sur les caractéristiques de libération du chlorhydrate de phényléphrine à partir des différentes formulations proposées (tableau 6) dans l'optique d'aboutir à une forme à libération prolongée.

B.4. Essais de dissolution in vitro**B.4.1. Essais de dissolution relatifs aux microbilles contenant du chlorhydrate de phényléphrine**

Les propriétés de dissolution des microbilles de chlorhydrate de phényléphrine ont été évaluées sur des lots de microbilles contenant des quantités croissantes de corps gras allant de 18 à 80% (m/m), ces différentes formulations sont détaillées dans le tableau 6.

Cette évaluation a été précédée par une détermination de la teneur en chlorhydrate de phényléphrine dans les microbilles par spectrophotométrie UV à 275 nm. Des échantillons de microbilles (n=3) provenant des différents lots (différentes teneurs en CG) ont été finement broyés au mortier, le principe actif a ensuite été dosé après sa dissolution dans de l'eau désionisée et passage aux ultrasons pendant 15 min puis filtration. L'étalonnage en chlorhydrate de phényléphrine a également été établi dans de l'eau désionisée en utilisant des concentrations allant de 5 µg/ml à 100 µg/ml. Le tableau 10 récapitule les résultats obtenus. Nous constatons que, d'une manière générale, la quantité de chlorhydrate de phényléphrine incorporée dans la formulation de départ, à savoir 2% (m/m), se retrouve dans la forme finie. Ceci rejoint les résultats obtenus par microscopie-RX concernant la répartition homogène du chlorhydrate de phényléphrine au sein des microbilles fabriquées (figures 18 et 19).

Tableau 10: Détermination de la teneur en chlorhydrate de phényléphrine dans les microbilles

Lot de microbilles	Concentration moyenne $\pm$ SD (n=3) en phényléphrine HCl en % (m/m)
18% CG	1,96 $\pm$ 0,02
25% CG	2,1 $\pm$ 0,3
40% CG	1,9 $\pm$ 0,1
60% CG	1,8 $\pm$ 0,1
80% CG	1,8 $\pm$ 0,1

L'examen des profils de libération obtenus pour ces différentes formulations (figure 20) permet l'observation d'un net ralentissement de la libération du principe actif au fur et à mesure de l'augmentation de la teneur en corps gras dans le mélange. En effet, on note que 94% de phényléphrine.HCl sont libérés en 2 heures de test pour la formulation contenant 18% (m/m) de CG, alors que seulement 58% de principe actif sont libérés après 12 heures de test pour la formulation contenant 80% (m/m) de CG. Nous constatons par ailleurs que l'incorporation de 25% (m/m) de corps gras dans la formulation permet déjà un ralentissement intéressant de la libération du chlorhydrate de phényléphrine (95 % libéré après 12h). Il va de soi que les formulations contenant des quantités plus importantes en CG, 40 à 80% (m/m), ralentissent d'avantage cette libération, mais ces dernières ne montrent pas de différences considérables entre elles. Nous pouvons dès lors admettre que pour un principe actif très hydrosoluble comme le chlorhydrate de phényléphrine, une formulation à libération prolongée peut déjà être obtenue en y incorporant 25 % (m/m) du mélange Compritol® - Précirol® dans les proportions précédemment établies (tableau 6).

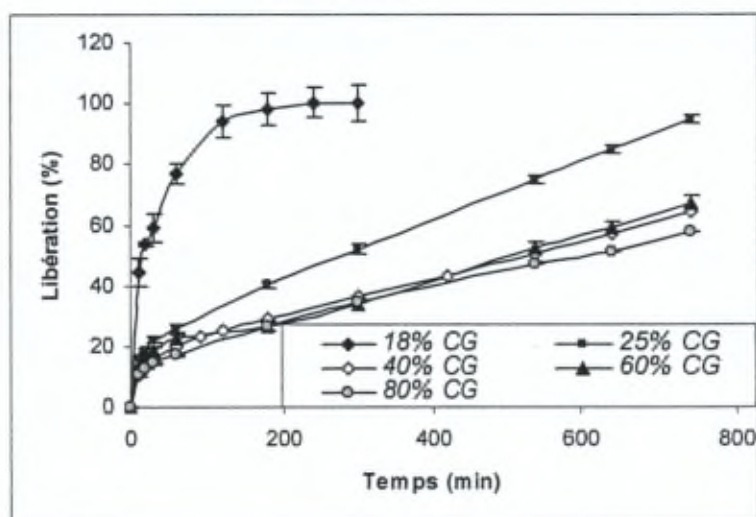


Figure 20 : Les profils de libération du chlorhydrate de phényléphrine ($m \pm SD$, $n=5$) à partir de microbilles contenant différents pourcentages en corps gras (tampon phosphate 0,05 M - pH= 7). Les microbilles appartiennent à la fraction granulométrique 700 – 1500 μm

Alors que la littérature relate plusieurs travaux de pelletisation thermoplastique qui ont été conduits en employant des quantités de CG de l'ordre de 20% (m/m) dans le mélange (Schaefer, 1996a ; Thies and Kleinebudde, 2000), nos travaux montrent que si cette quantité de CG liants suffit pour la formation de microbilles, elle reste cependant insuffisante pour

conférer un caractère hydrophobe à la matrice et ralentir la libération d'une molécule très hydrosoluble comme le chlorhydrate de phényléphrine. Ainsi, le recours à un mélange adéquat de Compritol® et de Précirol®, composés ayant des propriétés thermiques bien distinctes, ainsi que l'utilisation d'un mélangeur granulateur à haute vitesse offrant un contrôle efficient de la température durant le processus de fabrication, ont permis l'incorporation d'une forte proportion en corps gras, tout en évitant les phénomènes de « surmouillage » et d'agglomération des grains. De cette manière des formulations contenant jusqu'à 80 % (m/m) de CG, ont été mises au point et ont montré leur efficacité en ralentissant fortement la libération du chlorhydrate de phényléphrine. Pour ce qui est des cinétiques de libération des formulations contenant 25 à 80 % (m/m) de CG, nous constatons qu'après un léger « burst effect », la phényléphrine est libérée selon une cinétique d'ordre 0. Une fois passées les 30 premières minutes (burst effect), la relation entre le pourcentage de libération de la phényléphrine et le temps est linéaire. A titre d'exemple, les coefficient de corrélation R^2 est de 0,999 pour la formulation contenant 25 % (m/m).

B.4.2. Développement de microbilles lipidiques de chlorhydrate de ciprofloxacine, de kétoprofène et de théophylline

Sur base des formulations développées contenant du chlorhydrate de phényléphrine comme agent traceur, nous avons étudié la possibilité de mettre au point des microbilles à libération prolongée par le procédé de pelletisation thermoplastique, en incorporant d'autres substances actives. Nous en avons testé trois, un antibiotique de la famille des quinolones : le chlorhydrate de ciprofloxacine, un anti-inflammatoire non stéroïdien: le kétoprofène et un bronchodilatateur : la théophylline. Ces substances justifient le développement d'une forme à libération prolongée, dans la mesure où leurs temps de demi-vie plasmatique sont assez courts (tableau 1). Par ailleurs, nous avons envisagé ce développement avec l'optique d'incorporer dans les formulations une forte proportion en principe actif ; nous avons ainsi mis au point des formulations contenant : 75% de principe actif et 25% de corps gras. Les formulations ainsi que les conditions opératoires adoptées pour la fabrication des microbilles sont détaillées par le tableau 11.

Tableau 11 : Formulations testées et conditions opératoires

Principe actif	Formulation 25%CG	Conditions opératoires
Théophylline	PA : 75 Précirol® : 15 Compritol® : 10	<u>Granulation :</u> <i>IS : 1800 rpm</i> <i>CS : 130 rpm</i> <i>Double paroi : 55°C</i> <u>Sphéronisation :</u> <i>IS : 800 rpm</i> <i>CS : 4000 rpm</i> <i>Double paroi : 55°C</i> <i>TS: ± 15 min</i> <i>Débit d'air comprimé: 2 à 3 m³/h</i>
Kétoprofène	PA : 75 Précirol® : 15 Compritol® : 10	<u>Granulation :</u> <i>IS : 1800 rpm</i> <i>CS : 130 rpm</i> <i>Double paroi : 50°C</i> <u>Sphéronisation :</u> <i>IS : 800 rpm</i> <i>CS : 4000 rpm</i> <i>Double paroi : 50°C</i> <i>TS: ± 12 min</i> <i>Débit d'air comprimé: 2 à 3 m³/h</i>
Chlorhydrate de ciprofloxacine	PA : 75 Précirol® : 15 Compritol® : 10	<u>Granulation :</u> <i>IS : 1800 rpm</i> <i>CS : 130 rpm</i> <i>Double paroi : 55°C</i> <u>Sphéronisation :</u> <i>IS : 800 rpm</i> <i>CS : 4000 rpm</i> <i>Double paroi : 55°C</i> <i>TS: ± 22 min</i> <i>Débit d'air comprimé: 2 à 3 m³/h</i>

La mise au point des conditions de fabrication décrites par le tableau 11 avait essentiellement pour but d'allier une taille appropriée des microbilles avec un temps de fabrication réduit. C'est ainsi qu'il n'a pas été jugé utile de faire varier l'IS et le CS alors que de faibles adaptations de la température de la double paroi et de la durée de sphéronisation ont

permis d'atteindre facilement ces objectifs. Par exemple, nous avons dû augmenter la température de la double paroi de 45°C (microbilles au chlorhydrate de phényléphrine) à 50 ou 55°C (microbilles à la théophylline, kétoprofène et ciprofloxacine) afin d'accélérer la granulation du mélange. Cette augmentation de la température de la double paroi nous a alors permis de maintenir un temps de granulation d'environ 10 min. En suivant ces modifications nous avons obtenu des microbilles de taille comparable à celles contenant le chlorhydrate de phényléphrine (tableau 12). Par ailleurs, nous pensons que ces adaptations se sont révélées nécessaires à cause de la disparité des propriétés des différents principes actifs utilisés (granulométrie, conductivité thermique).

Tableau 12 : $d_{\text{géo}}$ des microbilles fabriquées avec la théophylline, le kétoprofène et la ciprofloxacine

Principes Actifs	$d_{\text{géo}} (\mu\text{m}) \pm s_{\text{géo}}$	Rendement (% , m/m)
		$700 \mu\text{m} < d_{\text{géo}} < 1500 \mu\text{m}$
Phényléphrine, HCl	$1240 \pm 1,5$	68,8
Théophylline	$1240 \pm 1,3$	77,6
Kétoprofène	$1245 \pm 1,3$	72,3
Ciprofloxacine.HCl	$1312 \pm 1,4$	75,4

Pour ce qui est des propriétés de libération de ces principes actifs, la figure 21 montre les profils de dissolution obtenus pour les formulations contenant 25 % (m/m) en CG et 75 % de principe actif. Les essais de dissolution ($n=5$) ont été effectués dans un milieu tamponné à pH 7,0 (tampon phosphate 0,05 M). La dissolution du chlorhydrate de ciprofloxacine a également été testée dans un milieu à pH acide (tampon phosphate 0,05 M à pH 1,5), à cause de la faible solubilité de ce principe actif à pH 7,0 (cf. tableau 1). Cette figure permet de constater que les profils de libération des différents principes actifs sont dépendants des propriétés intrinsèques du médicament et notamment de leur solubilité dans le milieu d'épreuve. Ainsi, à un pH de 7,0 ; le kétoprofène présente la libération la plus rapide, or sa solubilité dans l'eau à ce pH ($s = 300 \text{ mg/ml}$) est largement supérieure à celle de la théophylline ($s = 11 \text{ mg/ml}$) ou encore à

celle de la ciprofloxacine ($s = 4$ mg/ml). Comme nous l'avons souligné ci-dessus, les microbilles de ciprofloxacine montrent un profil de libération beaucoup plus rapide à pH 1,5 ($s = 9$ mg/ml). La faible solubilité de ce principe actif en milieu aqueux à un pH proche de 7,0 peut expliquer les problèmes de biodisponibilité relatés dans la littérature, pour les formulations à libération prolongée contenant cette molécule (Louis-Helm et col., 2001). Le site d'absorption de la ciprofloxacine est situé au niveau de la partie proximale de l'intestin grêle (Harder et col., 1990 ; Rouge et col., 1996). Cette donnée nous a d'ailleurs orienté vers le développement d'une forme divisée flottante pour ce principe actif ; la discussion concernant ce développement sera abordée dans le chapitre III.3.

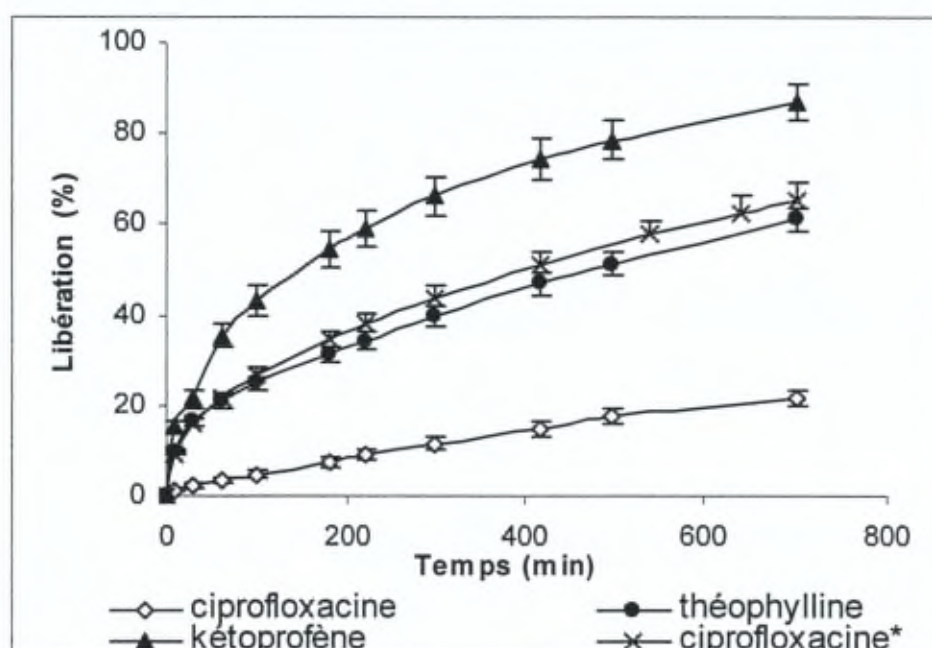


Figure 21 : Courbes de dissolution ($m \pm SD$, $n = 5$) dans un tampon phosphate 0,05 M à pH 7,0 obtenues à partir de microbilles contenant 75% m/m de principe actif (ciprofloxacine, kétoprofène ou théophylline) et 25% m/m de CG. Les microbilles de ciprofloxacine ont également été testées dans un tampon phosphate 0,05 M à pH 1,5 (ciprofloxacine*). Les microbilles appartiennent à la fraction granulométrique 700 – 1500 μm .

Quant aux cinétiques de libération de ces différents principes actifs à partir des microbilles lipidiques, nous constatons à l'examen de la figure 21 que la libération de la théophylline (à pH 7,0) ainsi que de la ciprofloxacine (à pH 1,5) suivent une cinétique de libération d'ordre $\frac{1}{2}$. La linéarité de la relation reliant le pourcentage de libéré en principe actif à la racine carrée

du temps ($t^{0,5}$) a été prouvée par le test de linéarité appliqué à des données continues (le test a été effectué sur l'ensemble des points des courbes ($n = 5$)). Nous avons obtenu pour la théophylline $R^2 = 0,998$; $p < 0,05$ et pour la ciprofloxacine $R^2 = 0,999$; $p < 0,05$.

Par contre pour le kétoprofène, l'allure de la courbe est proche d'une cinétique d'ordre $\frac{1}{2}$, cependant, probablement à cause de l'importance du « burst effect », la relation entre le pourcentage de principe actif libéré et $t^{0,5}$ n'est pas linéaire. Nous obtenons une relation linéaire en écartant les points correspondant aux 60 premières minutes du test de dissolution ($R^2 = 0,987$; $p < 0,05$).

B.4.3. Transposition d'échelle : essai effectué sur un mélangeur granulateur d'une capacité de 25 l

Dans le cadre de notre participation au travail d'encadrement d'une étudiante stagiaire en DES de Pharmacien d'industrie (Kambou, 2001), nous avons testé la faisabilité de la fabrication de microbilles lipidiques à une plus grande échelle. Pour ce faire, nous avons transposé sur un mélangeur granulateur de 25 l la fabrication d'un lot de microbilles de théophylline contenant 25% (m/m) de CG. Le mélangeur utilisé est l'Ultima[®] 25 l de la société Colette (GEA-Niro, Danemark). Il s'agit d'un mélangeur granulateur à haute vitesse, muni d'un bras du mélangeur dont la vitesse varie de 30 à 425 rpm, d'un chopper pouvant tourner à une vitesse allant de 600 à 3000 rpm et d'une double paroi. Cet appareil a été choisi pour les similitudes géométriques qu'il offrait avec le Mi-Pro[®] (mélangeur à haute vitesse de type vertical, même type de bras de mélangeur). Par ailleurs, les facteurs de distortion verticaux et horizontaux de ces deux mélangeurs granulateurs sont similaires, la transposition d'échelle est donc envisageable entre les deux équipements.

La formulation testée est une formulation contenant de la théophylline et 25% (m/m) du mélange Compritol[®]/Précirol[®] (10% de Compritol[®] et 15 % de Préciorol[®]). Quant aux conditions opératoires lors des procédés de fabrication, elles sont décrites par le tableau 13.

Tableau 13 : Les paramètres de fabrication suivis au sein du Mi-Pro® et de l'Ultima®

Conditions opératoires	Mi-Pro® (capacité 1,7 l)		Ultima® (capacité 25 l)	
	<i>Granulation</i>	<i>Sphéronisation</i>	<i>Granulation</i>	<i>Sphéronisation</i>
IS (rpm)	1800	800	420	160
CS (rpm)	130	4000	1500	1500
Température de la double paroi (°C)	55	55	55	55
Débit d'air (m³/h)	2,4	2,4	*	*

* une arrivée d'air au sein de la cuve fut aménagée, ne disposant pas d'un débitmètre le réglage a été effectué de manière à maintenir la température du produit aux environs de 50°C.

A l'examen du tableau 13, nous relevons que lors de la fabrication des microbilles avec l'Ultima®, une vitesse importante du chopper a dû être adoptée lors de la phase de granulation du mélange. En effet, il s'est avéré que la rotation du chopper contribuait à l'apport énergétique nécessaire à la fusion des liants. Ces conditions permettent d'atteindre en ± 15 min le saut du torque indicatif de la granulation du mélange. Les microbilles obtenues dans l'Ultima® présentaient une granulométrie comparable à celle des microbilles fabriquées dans le Mi-Pro®, avec un $d_{géo} = 1294 \mu m$; $s_{géo} = 1,4 \mu m$.

B.4.4. L'effet des sels biliaires et de la lipase sur les profils de libération de principes actifs incorporés dans les microbilles lipidiques

Du fait de la nature lipidique du Compritol® et du Précirol®, il était utile d'évaluer l'effet des sels biliaires sur la libération d'un principe actif incorporé dans ces microbilles lipidiques. Nous avons ainsi testé l'effet des sels biliaires sur la libération du chlorhydrate de ciprofloxacine. Nous avons choisi comme milieux d'épreuve les milieux « FaSSIF » et « FeSSIF », décrits par les travaux de Galia et col. 1998.

Le milieu « FaSSIF » est un milieu mimant la quantité de sels biliaries présente dans l'intestin grêle à jeun « Fasted Simulated Small Intestinal Fluid » et le milieu « FeSSIF » est un milieu mimant la quantité de sels biliaries présente dans l'intestin grêle après la consommation d'un repas « Fed Simulated Small Intestinal Fluid », la composition de ces milieux est reprise au niveau du tableau 3. Le milieu « FaSSIF » est un milieu à pH 6,5 contenant 3 mM de Taurocholate Sodique et 0,75 mM de lécithine, le milieu « FeSSIF » a un pH de 5,0 et contient lui 15 mM de Taurocholate Sodique et 3,75 mM de lécithine.

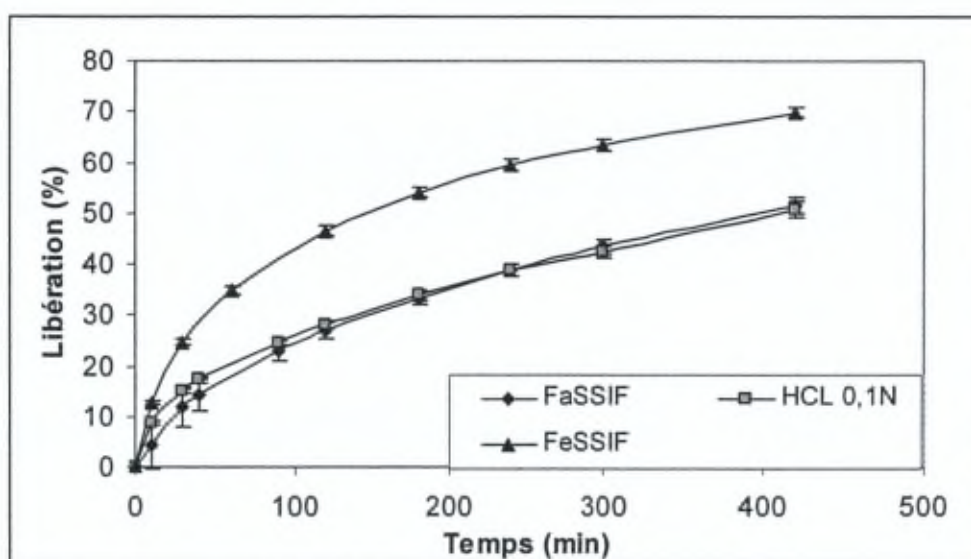


Figure 22 : Influence des sels biliaries sur la libération du chlorhydrate de ciprofloxacine ($m \pm SD$, $n=5$) à partir des microbilles lipidiques. Les microbilles appartiennent à la fraction granulométrique 700 – 1500 μm .

A jeun, la faible quantité de sels biliaries présente dans l'intestin ne semble pas avoir d'influence sur la libération du principe actif, la courbe de dissolution obtenue dans le milieu FaSSIF se superpose à celle obtenue dans l'HCL 0,1 N additionné de 0,05 % de Polysorbate 20 (figure 22). Par contre, cette influence est clairement perçue lorsque la quantité de sels biliaries augmente (milieu FeSSIF). Nous constatons alors une accélération de la libération du chlorhydrate de ciprofloxacine, surtout au cours des 200 premières minutes, où l'on passe en effet de 33 % et 34 % de principe actif libéré après 180 min de test respectivement dans le milieu FaSSIF et dans l'HCL 0,1 N, à 54 % de principe actif libéré dans le milieu FeSSIF. Cependant, le profil de libération reste prolongé.

Nous ne sommes par contre pas parvenus à tester l'influence de la lipase sur la libération de ce principe actif, à cause du pH de stabilité de cette enzyme qui est aux environs de pH 7,4 ; or, comme nous l'avons souligné précédemment, le chlorhydrate de ciprofloxacine présente une faible solubilité à ce pH. Cependant, au vu de la nature lipidique de nos microbilles, il est important de tester l'influence de la lipase sur les propriétés de libération d'un autre principe actif. Nous avons dès lors choisi de tester l'influence de la lipase sur les microbilles de théophylline.

La formulation relative aux microbilles de théophylline utilisées pour ces tests est reprise dans le tableau 11. Nous avons choisi comme source de lipase le milieu mimant le fluide intestinal décrit par la pharmacopée américaine (Intestinal Fluid Simulated, USP 24). Ce milieu utilise la pancréatine comme source de lipase pancréatique à raison de 10 g par litre de milieu de dissolution, ce qui correspond à 80000 unités de lipase saturée en colipase (Danderlot 1990). Le pH du milieu est de 6,8. La courbe de dissolution obtenue a été comparée à celles obtenues pour des microbilles de théophylline ayant séjourné dans un tampon phosphate 0,05 M à pH 7,0 additionné de 0,05 % m/v de polysorbate 20 ainsi que dans un milieu FaSSIF.

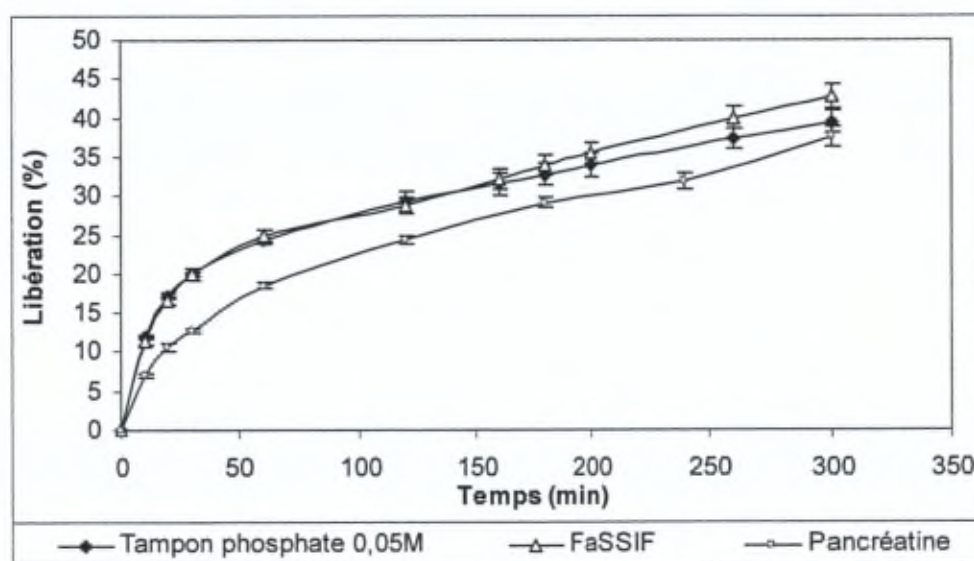


Figure 23 : Influence de la lipase et des sels biliaires sur la libération de la théophylline ($m \pm SD$, $n=5$). Les microbilles appartiennent à la fraction granulométrique 700 – 1500 μm

La figure 23 montre un faible ralentissement de la libération de la théophylline en présence de pancréatine. Nous pouvions nous attendre à l'effet inverse, puisqu'une éventuelle lipolyse des esters d'acides gras et du glycérol que sont le Compritol® et le Précirol®, aurait dû augmenter la vitesse de libération du principe actif. Dans ses travaux, Danderlot (1990) a testé l'influence de la lipase pancréatique et gastrique sur trois triglycérides : la trilaurine, la trimyristine et la tripalmitine. Elle corrobore l'hypothèse annoncée par d'autres auteurs (Brockhoff, 1974) selon laquelle la vitesse de lipolyse dépend de la longueur des chaînes d'acides gras. Plus ces chaînes sont longues, plus la vitesse d'hydrolyse par la lipase diminue. Des trois glycérides étudiés par Danderlot, celui présentant la chaîne la plus longue (C16) n'a pas subi d'hydrolyse, et ce même lorsque les tests étaient effectués en présence concomitante de la lipase pancréatique, de la colipase et du Taurocholate sodique à raison de 4 mM comme sel biliaire. De même, en présence de la lipase gastrique, la tripalmitine n'a pas été hydrolysée contrairement à la trilaurine et la trimyristine. Etant donné que le Précirol® et le Compritol® sont respectivement des esters d'acides gras en C₁₆-C₁₈ et C₂₂, nous pouvons estimer que leurs acides gras à longues chaînes les protègent contre une lipolyse par les lipases gastriques et intestinales.

C. Les études de stabilité menées sur les microbilles

C.1. Etudes de la stabilité des microbilles contenant du chlorhydrate de phényléphrine

Lors de l'étude des caractéristiques physico-chimiques du Compritol® et du Précirol® (Chapitre III.1), nous avons souligné l'importance de conduire une étude de stabilité sur la forme finie contenant ces corps gras. Cette étude de stabilité a d'abord porté sur des microbilles contenant du chlorhydrate de phényléphrine. Le tableau 14 reprend la formulation des microbilles ainsi que les conditions de leur fabrication.

Tableau 14 : La formulation et les paramètres de fabrication des microbilles de chlorhydrate de phényléphrine destinées aux essais de stabilité (TS = 8 min)

	Paramètres de fabrication		Formulation	
	<i>Granulation</i>	<i>Sphéronisation</i>	<i>Produit</i>	<i>Quantité</i>
IS (rpm)	1800	800	Phényléphrine.HCl	10
CS (rpm)	130	4000	Compritol®	45
Température de la double paroi (°C)	45	45	Précirol®	15
Débit d'air (m ³ /h)	2,4	2,4	Lactose 450 ME	ad 100

Des microbilles appartenant à la fourchette granulométrique 700-1500 µm ont été placées dans les conditions suivantes (conditions conseillées par l'ICH):

- 25°C ± 2°C, 60% HR pendant 1 an (vieillessement en temps réel)
- 30°C ± 2°C, 60% HR (condition intermédiaire)
- 40°C ± 2°C, 75% HR pendant 6 mois (vieillessement accéléré)
- 4°C ± 2°C

Un test de dissolution a été effectué sur des microbilles prélevées après différents temps de conservation ; dans ces conditions, les résultats obtenus ont été comparés à ceux correspondant aux microbilles au temps 0 (temps initial). La figure 24 montre les résultats obtenus après 6 semaines de conservation des microbilles dans les conditions précitées. Nous constatons une influence marquée des conditions de conservation sur le profil de libération du chlorhydrate de phényléphrine. Ainsi, nous relevons que les microbilles conservées à 40°C et 75% HR ont perdu leur propriété de libération prolongée. Les microbilles conservées en conditions de vieillissement réel, à savoir à 25°C et 60% d'humidité relative et intermédiaire (30°C-60% HR), montrent les unes comme les autres une diminution faible mais néanmoins significative du pourcentage de phényléphrine.HCl libéré entre les microbilles initiales et celles conservées pendant 6 semaines sous cette condition ($p < 0,05$ test t de Student sur

échantillons non paires appliqué au dernier prélèvement du test de dissolution ($n=5$)). Cette tendance se confirme pour les lots de microbilles conservées pendant 12, 26, 38 et 51 semaines à 25°C-60% HR (figure 25). Cependant, nous ne relevons pas de différence significative ($p > 0,05$) entre les échantillons conservés pendant 51 semaines et ceux conservés pendant 38 semaines sous cette condition. De la même manière, nous n'observons pas de différence significative ($p > 0,05$, test t de Student sur échantillons non paires appliqué sur les derniers prélèvements du test de dissolution ($n=5$)) entre l'échantillon initial (temps 0) et les échantillons conservés durant 38 semaines à 4°C (figure 26).

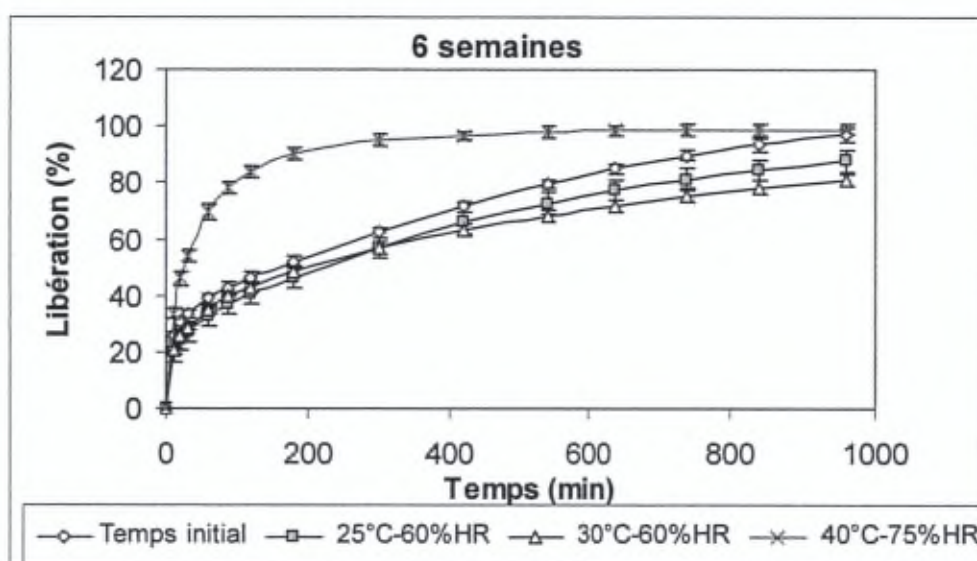


Figure 24 : Courbes de dissolution (tampon phosphate 0,05 M ; pH 7,0) du chlorhydrate de phényléphrine après la conservation des microbilles durant 6 semaines dans différentes conditions de température et d'humidité relative. Les microbilles appartiennent à la fraction granulométrique 700 – 1500 μm . ($m \pm \text{SD}$, $n=5$)

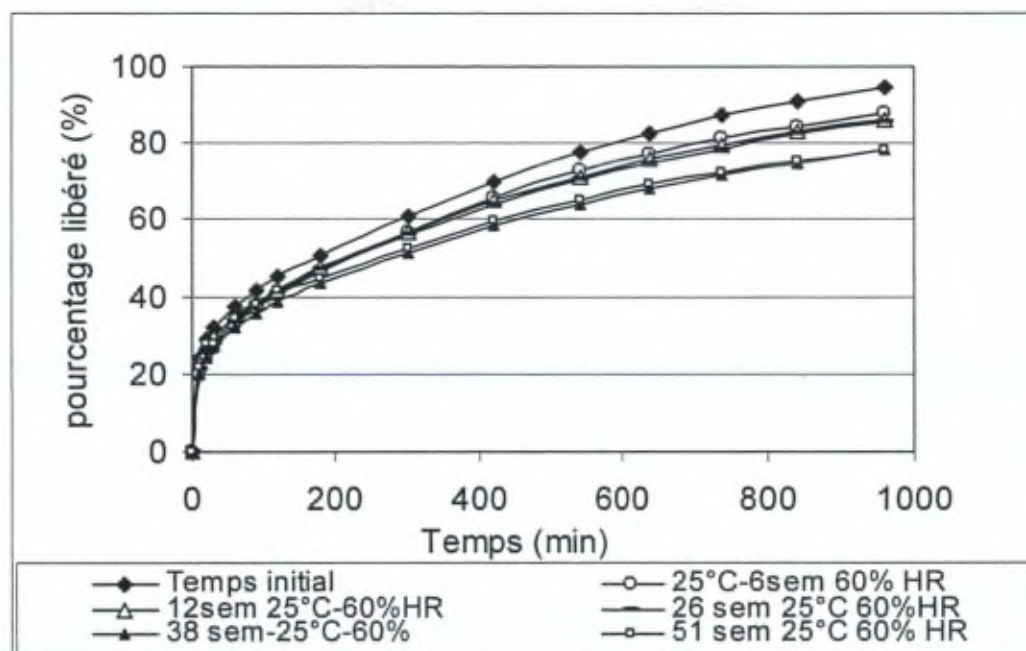


Figure 25: Influence de la durée de conservation des microbilles à 25°C-60% HR sur les cinétiques de libération du chlorhydrate de phényléphrine (tampon phosphate 0,05 M ; pH 7,0). Les microbilles appartiennent à la fraction granulométrique 700 – 1500 μm . (n= 5)

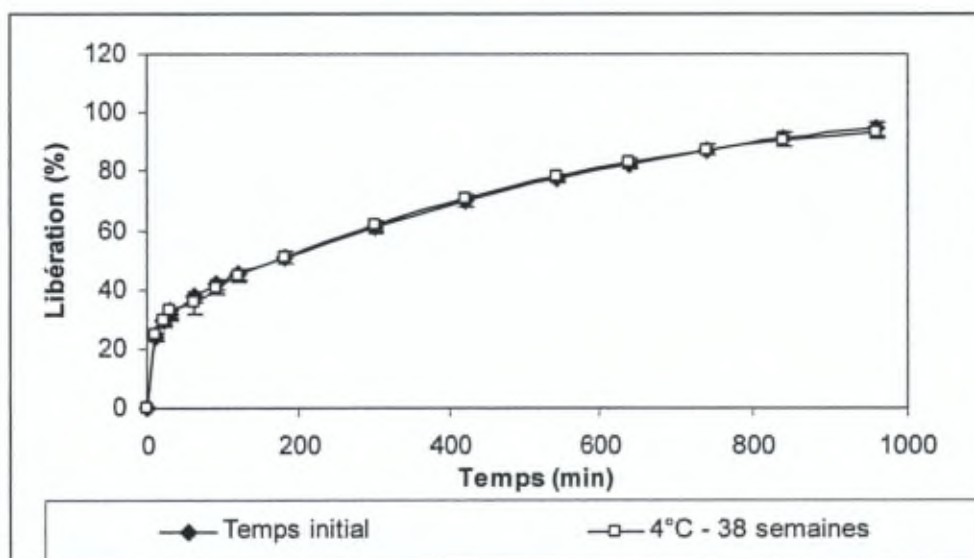


Figure 26: Comparaison des courbes de dissolution (tampon phosphate 0,05 M ; pH 7,0) de chlorhydrate de phényléphrine au temps 0 et après la conservation des microbilles durant 38 semaines à 4°C. Les microbilles appartiennent à la fraction granulométrique 700 – 1500 μm . (m $\pm$ SD, n= 5)

Au vu de ces résultats, une étude par chromatographie liquide (CLHP) s'imposait afin de vérifier si ce sont des changements au niveau de la matrice grasse qui sont responsables de cette modification de la libération du chlorhydrate de phényléphrine, ou si c'est l'instabilité elle-même de cette molécule qui en serait la cause. Rappelons que notre étude des propriétés physico-chimiques des excipients lipidiques a révélé une évolution de la structure cristalline de ces excipients avec le temps. Cette étude a également montré le caractère accélérateur de la température sur cette évolution. Par ailleurs, nous sommes en présence du chlorhydrate de phényléphrine comme principe actif, or celui-ci est une molécule facilement oxydable (Millard et col., 1973 ; Gaglia, 1974) et sa conservation dans des conditions extrêmes de température et d'HR pourrait accélérer sa dégradation. Il apparaît donc important de savoir si c'est la dégradation du principe actif qui est responsable du changement de la cinétique de libération du principe actif après la conservation des microbilles à 40°C-75% HR ou si c'est le vieillissement des excipients lipidiques qui est en cause.

Les conditions de chromatographie liquide adoptées pour la mise en évidence d'une éventuelle dégradation du chlorhydrate de phényléphrine lors de la conservation des microbilles furent celles utilisées par (Erk et col., 1998).

Le chromatogramme de référence est celui obtenu après l'injection d'un échantillon de chlorhydrate de phényléphrine pur (ER). Ce chromatogramme (figure 27) présente un pic principal à un temps de rétention (TR) de 1,8 min et un pic secondaire à un TR de 2 min. Ce dernier pourrait correspondre à un produit de dégradation de la phényléphrine.HCl, probablement par oxydation.

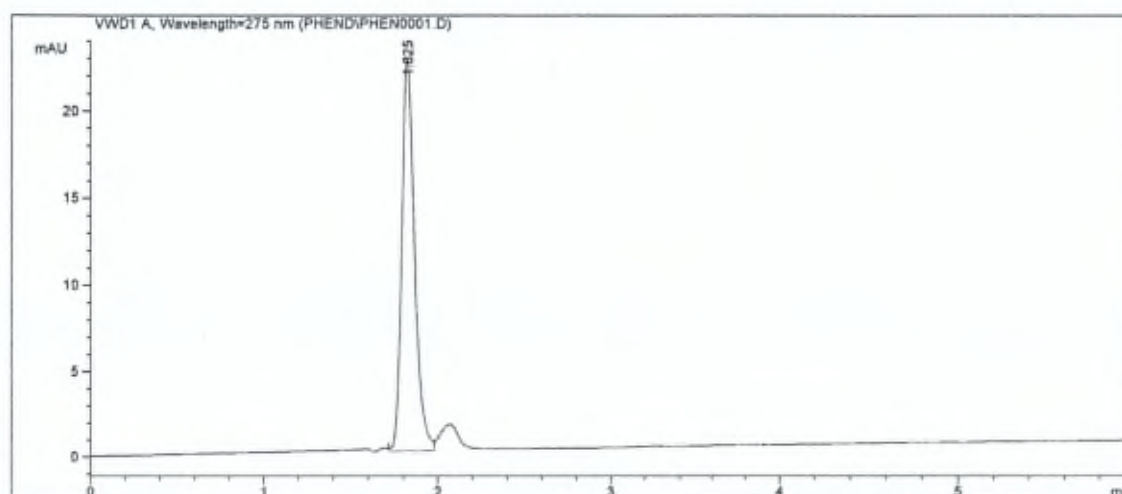


Figure 27 : Chromatogramme du chlorhydrate de phényléphrine pur

Ce chromatogramme a ensuite été comparé à ceux obtenus pour les échantillons suivants :

- E1 : un échantillon de microbilles analysé le lendemain de sa fabrication (après sa conservation à 4°C)
- E2 : un échantillon de microbilles analysé 3 ans après sa conservation à 4°C
- E3 : un échantillon de microbilles analysé après 1 an de conservation à 30°C-60% HR
- E4 : un échantillon de microbilles analysé après 2 ans de conservation à 25°C-60% HR
- E5 : un échantillon de microbilles analysé après 6 semaines de conservation à 40°C-75% H

Tableau 15 : moyenne (n=3) des aires obtenues par mg de phényléphrine.HCl pour les différents échantillons de microbilles

Echantillon	Pic 1 (TR = 1,8 min)	Pic 2 (TR = 2 min)
ER	399 ± 2	41 ± 1
E1	364 ± 18	46 ± 4
E2	255 ± 8	116 ± 7
E3	140 ± 3	274 ± 6
E4	85 ± 8	335 ± 24
E5	63 ± 12	327 ± 37

Le tableau 15 reprend les valeurs des aires obtenues ($n = 3$) pour chacun de ces échantillons (ER, E1, E2, E3, E4 et E5). Nous relevons une dégradation du chlorhydrate du phényléphrine avec le temps et les conditions de conservation. Celle-ci est exprimée par une exacerbation du pic 2 au détriment du pic 1, montrée par les chromatogrammes des figures 27 et 29 à 33. Cette dégradation est accentuée par l'augmentation de la température et du degré d'humidité relative lors de la conservation. En effet, la dégradation du chlorhydrate de phényléphrine a souvent été évoquée dans la littérature (Millard., 1973 ; Ossman, 1980). Si l'on exclut les voies de dégradation par le peroxyde d'hydrogène et sous les rayons UV décrites par ces auteurs, la dégradation de cette molécule se résumerait alors à la formation de dérivés de la N-méthyl-isoquinoléine (figure 28) (Millard., 1973).

Pour rappel, nos échantillons étaient conservés dans des étuves, à l'abri de la lumière mais au contact de l'air. L'échantillon qui a été le plus rapidement dégradé est celui conservé à 40°C et 75% d'HR. L'examen des chromatogrammes confirme le caractère instable du chlorhydrate de phényléphrine. Il est intéressant de noter que le procédé de fabrication en lui-même n'est pas responsable de la dégradation de ce produit (figure 29), par contre les conditions de conservation le sont. Les microbilles à base de ce principe actif devraient être conservées sous blister, à l'abri de la lumière et à une température inférieure à 25°C.

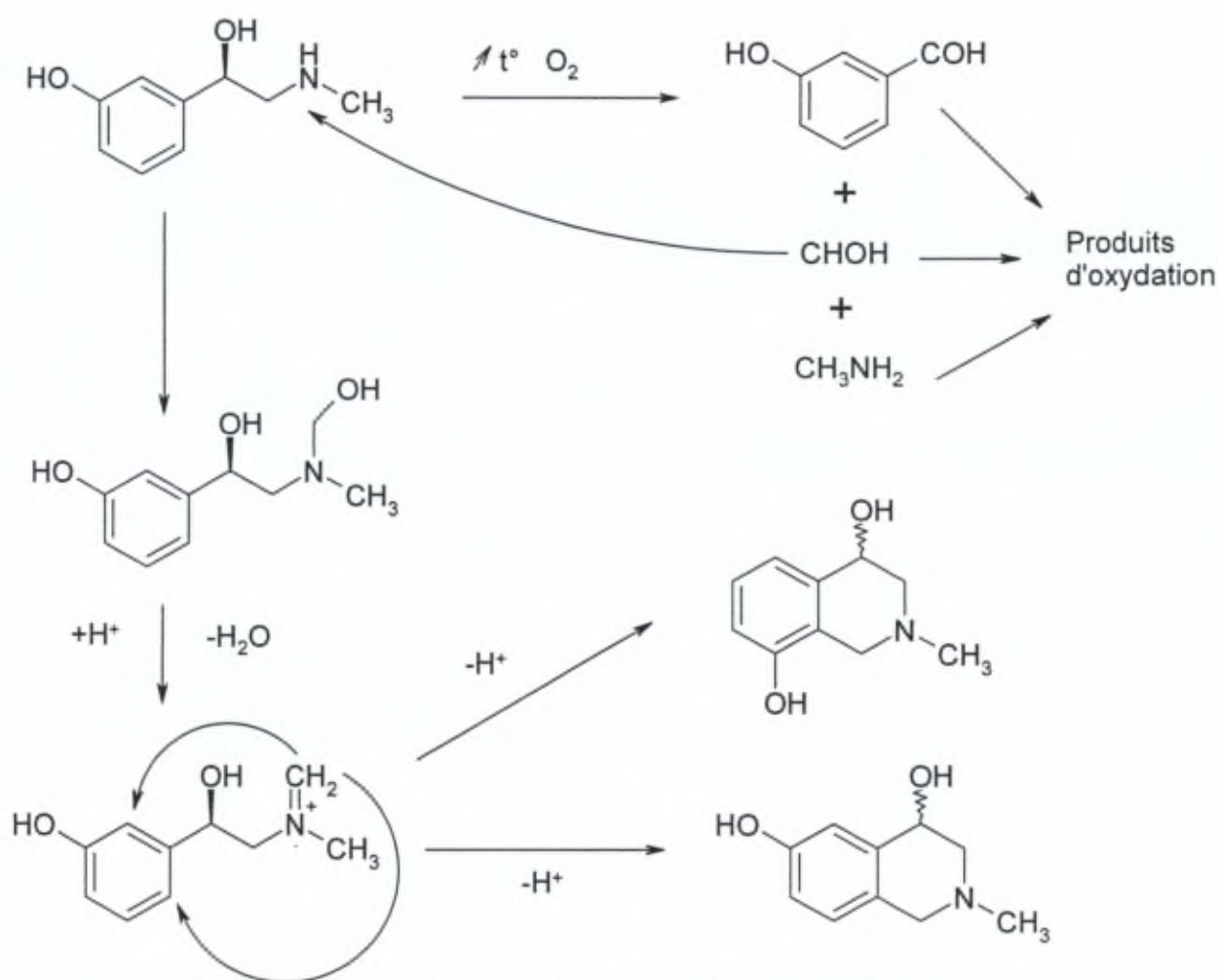


Figure 28 : Schéma de la dégradation de la phényléphrine.HCl selon Millard et col., 1973

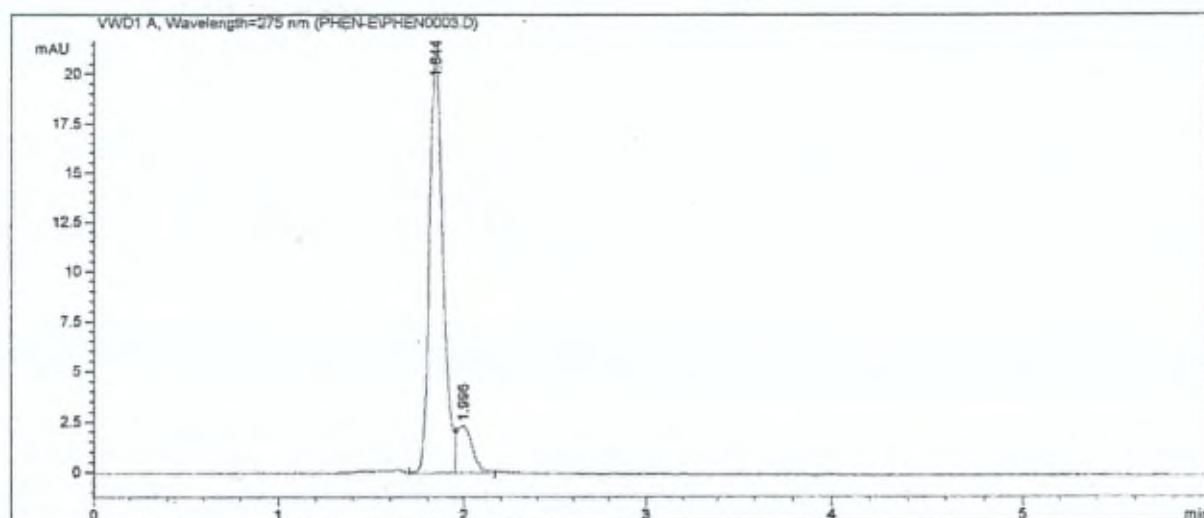


Figure 29 : Chromatogramme de l'échantillon de microbilles fraîchement fabriquées (E1)

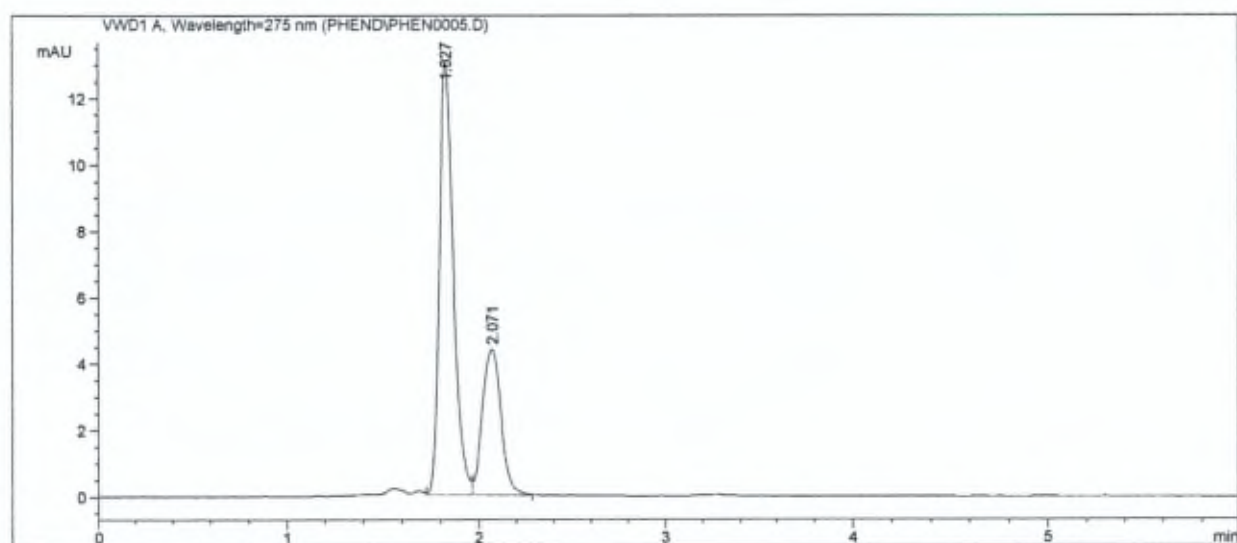


Figure 30 : Chromatogramme de l'échantillon conservé pendant 3 ans à 4°C (E2)

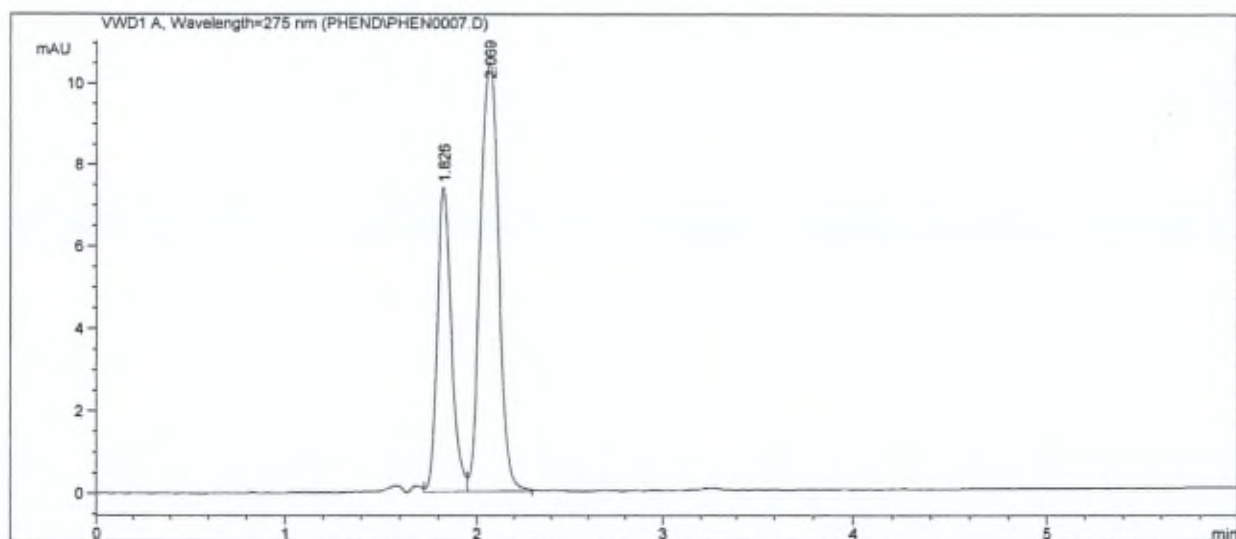


Figure 31 : Chromatogramme de l'échantillon conservé pendant 1 an à 30°C – 60% HR (E3)

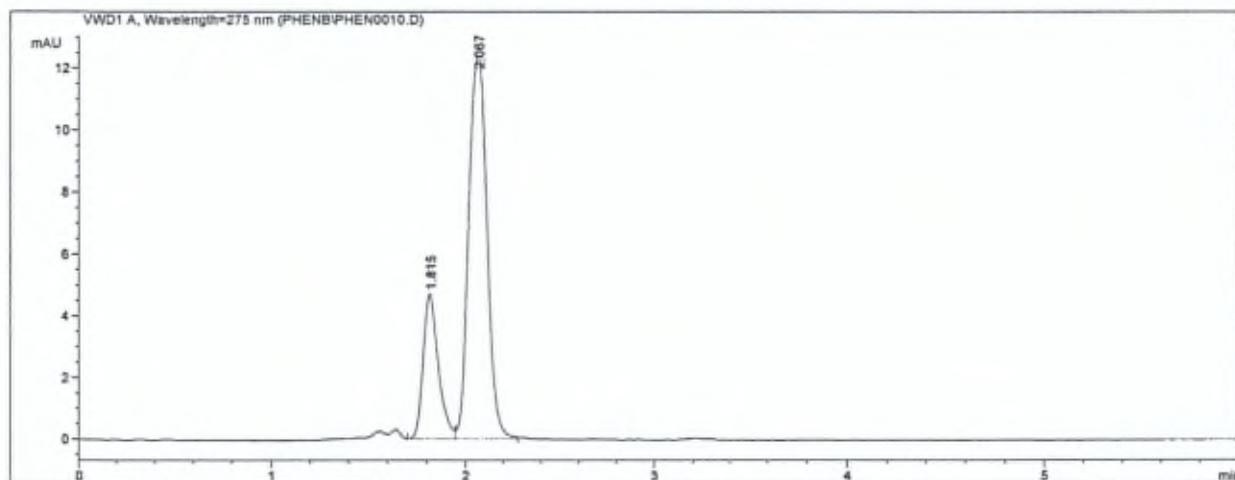


Figure 32 : Chromatogramme de l'échantillon conservé pendant 2 ans à 25°C – 60% HR (E4)

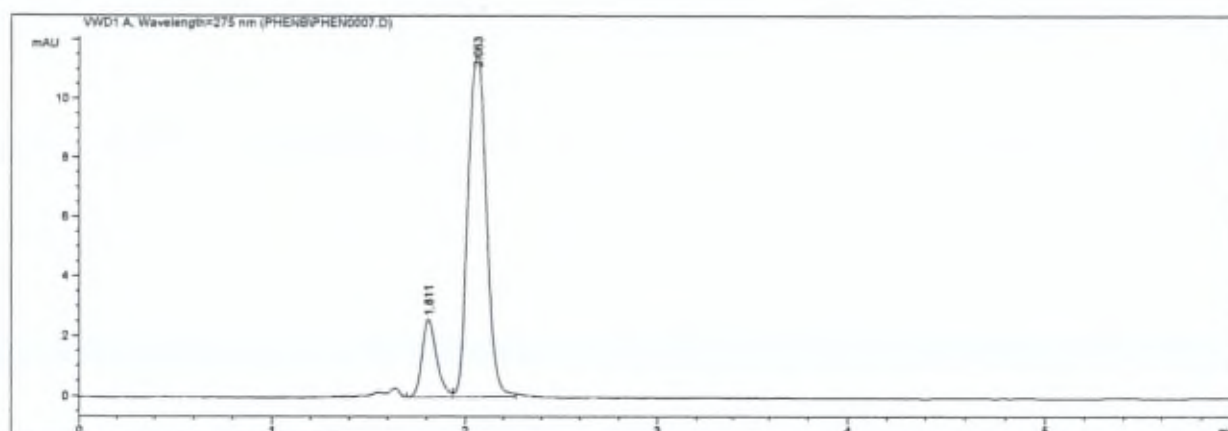


Figure 33 : Chromatogramme de l'échantillon conservé pendant 6 semaines à 40°C – 75% HR (E5)

C.2. Etudes de la stabilité des microbilles contenant du chlorhydrate de ciprofloxacine

L'étude de stabilité que nous avons menée sur les microbilles de chlorhydrate de phényléphrine a montré une importante modification du profil de libération de cette molécule dans la condition de conservation 40°C-75% HR. Bien que les analyses effectuées par chromatographie liquide aient révélé une décomposition de ce principe actif, nous avons voulu nous assurer de la stabilité des microbilles lipidiques que nous avons développées en testant la stabilité d'un lot de microbilles contenant 15% m/m de Précirrol[®], 10% m/m de Compritol[®] et 75% de chlorhydrate de ciprofloxacine. Nous avons conservé ces microbilles dans les conditions suivantes :

- 25°C – 60% HR , pendant 1 an (51 semaines)
- 40°C – 75% HR, pendant 6 mois (26 semaines)
- 4°C, pendant 2 ans (104 semaines)

Nous avons effectué des tests de dissolution sur des échantillons prélevés après différentes périodes de vieillissement (figures 34 et 35). Ces figures montrent que contrairement à ce que nous avons observé pour les microbilles de chlorhydrate de phényléphrine, les échantillons de chlorhydrate de ciprofloxacine gardent tous un profil de libération prolongée, et ce même après leur conservation pendant 6 mois à 40°C et 75% d'HR.

Bien que Les profils de libération de la ciprofloxacine à partir des microbilles conservées à 25°C et à 40°C, s'écartent du profil initial (temps 0), cette différence reste acceptable La courbe de dissolution des microbilles de ciprofloxacine conservées pendant 2 ans à 4°C se superpose parfaitement à celles des microbilles au temps zéro.

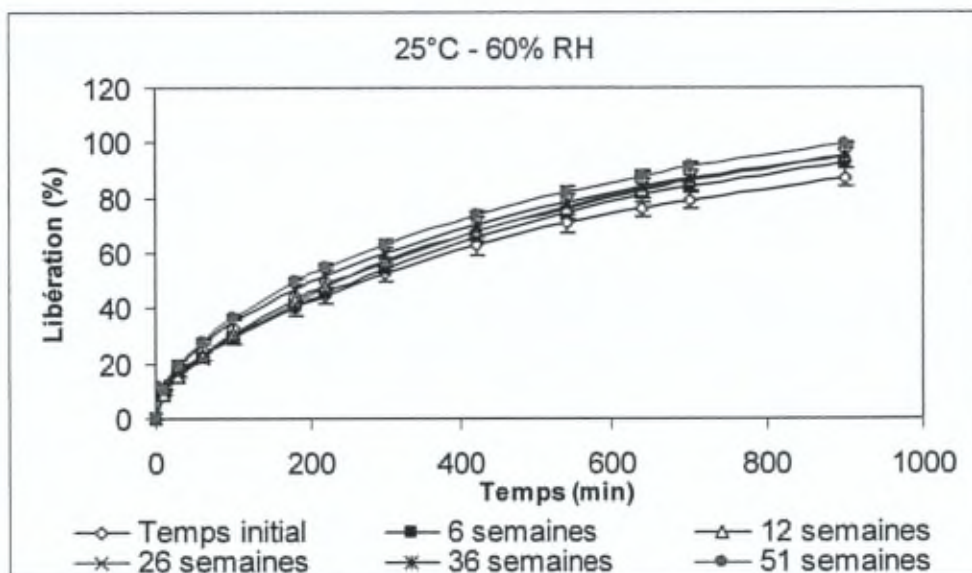


Figure 34 : Influence de la durée de conservation sur les courbes de dissolution (tampon phosphates/acétates pH 1.5) du chlorhydrate de ciprofloxacine à 25°C-60 % HR. Les microbilles appartiennent à la fraction granulométrique 700 – 1500 µm

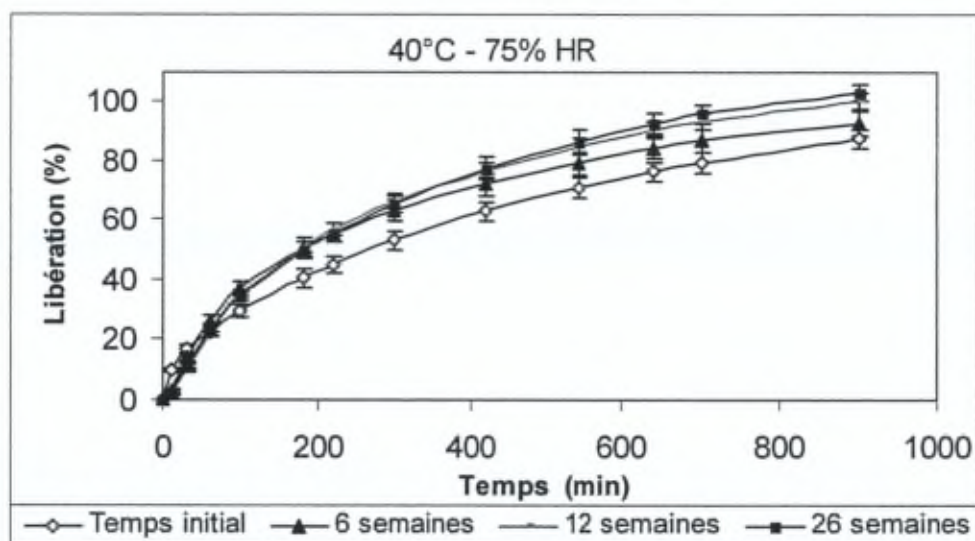


Figure 35 : Influence de la durée de conservation sur les courbes de dissolution (tampon phosphates/acétates pH 1.5) du chlorhydrate de ciprofloxacine à 40°C - 75 % HR. Les microbilles appartiennent à la fraction granulométrique 700 - 1500 µm

Comme nous l'avons fait lors des essais de stabilité des microbilles de phényléphrine.HCl, nous avons également effectué quelques tests par chromatographie liquide (CLHP) sur les microbilles de chlorhydrate de ciprofloxacine ayant séjourné dans les différentes conditions de stabilité énoncées ci-dessus, afin de détecter une éventuelle dégradation du principe actif au cours du stockage.

Le chromatogramme de référence est celui obtenu après l'injection d'un échantillon de chlorhydrate de ciprofloxacine pur (ER). Ce chromatogramme (figure 36) présente un pic principal à un temps de rétention (TR) de 10,2 min.

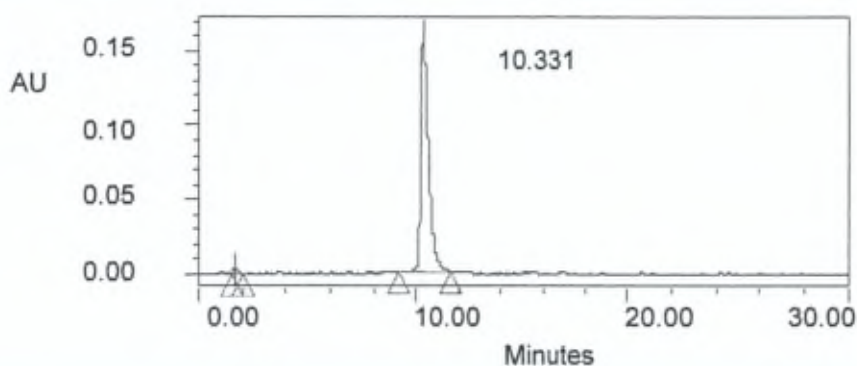


Figure 36 : Chromatogramme du chlorhydrate de ciprofloxacine pur

Ce chromatogramme a été comparé à ceux obtenus pour les échantillons de microbilles suivants :

- E1 : un échantillon de microbilles conservé pendant 2 ans à 4°C
- E2 : un échantillon de microbilles conservé pendant 51 semaines à 25°C - 60 % HR
- E3 : un échantillon de microbilles conservé pendant 26 semaines à 40°C - 75% HR

Le tableau 16 reprend les valeurs des aires obtenues ($n = 3$) pour chacun de ces échantillons (ER, E1, E2 et E3).

Tableau 16 : moyenne ($n = 3$) des aires obtenues par mg de chlorhydrate de ciprofloxacine pour les différents échantillons de microbilles

Echantillon	Aire du pic /mg de pa
ER	2 870 508 $\pm$ 70 867
E1	2 973 170 $\pm$ 397 737
E2	2 781 267 $\pm$ 240 972
E3	2 787 239 $\pm$ 52 010

Les chromatogrammes relatifs aux échantillons E1, E2 et E3 sont représentés par les figures 37 à 39.

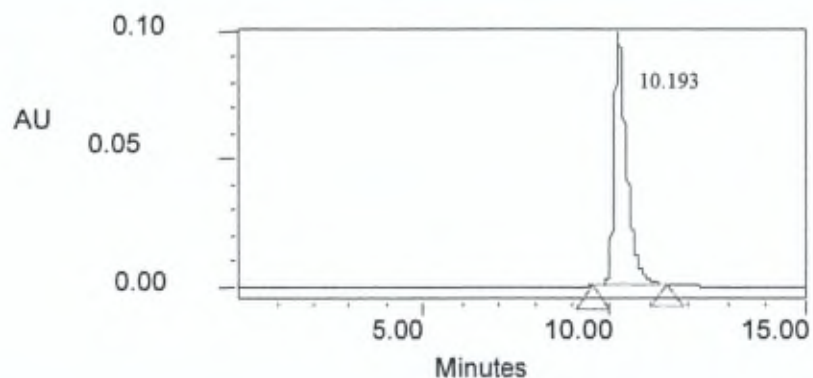


Figure 37 : Chromatogramme de l'échantillon de microbilles conservé à 4°C pendant 2 ans (E1)

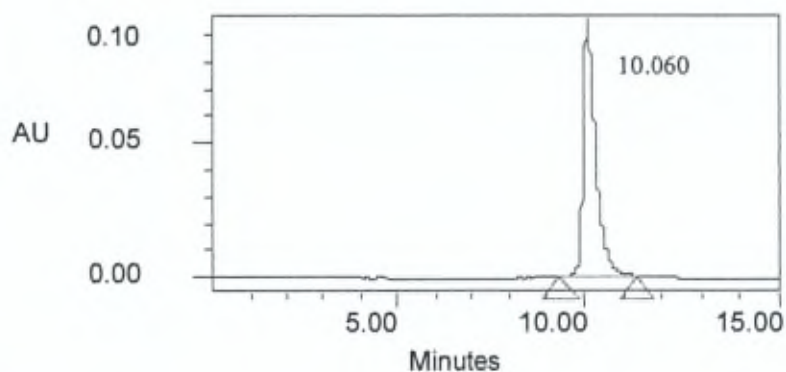


Figure 38 : Chromatogramme de l'échantillon de microbilles conservé à 25°C-60%HR pendant 51 semaines (E2)

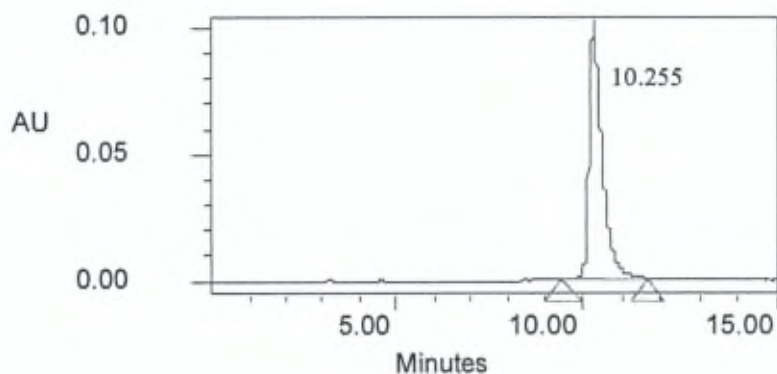


Figure 39 : Chromatogramme de l'échantillon de microbilles conservé à 40°C-75%HR pendant 26 semaines (E3)

A l'examen des figures 37 à 39 et du tableau 16, nous ne constatons pas de dégradation du chlorhydrate de ciprofloxacine. Comme l'échantillon de référence, le pic obtenu pour la ciprofloxacine apparaît toujours aux environs de 10,2 min. Par ailleurs, nous avons effectué l'analyse pour l'échantillon (E3) sur une durée totale de 60 min et aucun autre pic, distinct du pic principal, n'a été décelé. Enfin, la comparaison statistique des aires des pics obtenues par milligramme de principe actif (test de t de Student pour échantillons non paires), effectuée entre chacun des échantillons de microbilles conservées dans les différentes conditions précitées (E1, E2 et E3) versus l'échantillon de référence (ER), ne montre pas de différences significatives entre la moyenne des aires des pics obtenus ($p > 0,05$).

Nous pouvons donc conclure que la fabrication des microbilles selon le procédé de pelletisation thermoplastique que nous avons mis au point n'altère pas la stabilité des principes actifs testés (phényléphrine.HCl et ciprofloxacine.HCl). Par contre des conditions drastiques de stockage ($40^{\circ}\text{C} - 75\% \text{ HR}$) sont à l'origine de la dégradation de principes actifs peu stables comme le chlorhydrate de phényléphrine et d'une modification du profil de dissolution de celui-ci. Cette dégradation est inhérente au principe actif même et ne met apparemment pas en cause les excipients gras utilisés. En effet, l'étude de stabilité de microbilles de ciprofloxacine.HCl dans ces mêmes conditions n'a pas été révélatrice d'une quelconque dégradation de ce principe actif lors de son stockage. De même, nous n'avons pas observé d'influence marquante de ces conditions de stockage étudiées sur la cinétique de libération de ce principe actif. Cette constatation est importante compte tenu de la nature complexe des excipients gras utilisés et de l'évolution de leur structure cristalline au cours du temps et des conditions de conservation que nous avons évoquées dans le chapitre III.1.

III.2.4. Conclusion

Le procédé de pelletisation thermoplastique est un procédé séduisant pour sa simplicité et sa rapidité. Il offre l'avantage considérable d'être un procédé de fabrication en une étape, ne recourant ni à l'eau ni aux solvants organiques comme agents liants. Il met à profit le pouvoir liant de corps gras facilement fusibles. Ces corps gras, pour peu qu'ils soient hydrophobes, peuvent servir à la fabrication de formes à libération prolongée.

Partant de ces données relatées dans la littérature, nous avons développé une formulation à libération prolongée utilisant le Compritol® et le Précirol® comme excipients lipidiques

hydrophobes capables de ralentir la libération de différents principes actifs testés (phényléphrine.HCl, théophylline, kétoprofène et ciprofloxacine.HCl). Ces deux excipients présentent l'avantage d'avoir des plages de fusion différentes et de garder cette propriété, même lorsqu'ils sont en mélange. En effet, le Précirrol® a une plage de fusion comprise entre 53°C et 57°C et le Compritol® entre 69°C et 74°C. Cette donnée nous a aiguillés vers l'idée d'utiliser le Précirrol® comme agent liant en quantité limitée (15% m/m) afin d'éviter tout risque de « surmouillage ». Le Précirrol® joue également le rôle de corps gras hydrophobe favorisant le ralentissement de la libération d'un principe actif hydrophile. Nous avons eu recours au Compritol® pour renforcer le caractère hydrophobe de la forme matricielle et participer au ralentissement de la libération du principe actif. Par ailleurs, l'étude des propriétés thermiques et rhéologiques de ces corps gras (chapitre III.1) a montré que ces excipients commençaient à fondre et donc à se déformer sous l'action d'une contrainte, à des températures inférieures à celles de leurs plages de fusion. Ainsi, il est ressorti de cette étude que 50°C était une température suffisante pour atteindre cette fusion partielle et la déformation qui en découle. Cette donnée a largement contribué à la mise au point des paramètres de fabrication des microbilles par pelletisation thermoplastique.

Ainsi, après avoir essayé deux types de mélangeurs granulateurs à haute vitesse : le Pellmix P/L 1/8 et le Mi-Pro®, notre choix s'est porté sur ce dernier pour les avantages qu'il présentait en terme de contrôle de la température au cours du processus de fabrication. En effet, plusieurs essais préliminaires nous avaient montré que sans ce contrôle, la température augmentait sous l'action des frictions entre les particules conduisant à la fusion totale des corps gras et à l'agglomération des particules à cause de la présence d'une trop grande quantité d'agent liant en fusion ; c'est ce que l'on appelle, par analogie avec la granulation humide, un phénomène de « surmouillage ». Nous avons alors mis au point les paramètres optimums de fabrication (température de la double paroi, vitesse du bras du mélangeur et du chopper, temps de sphéronisation, arrivée d'air au niveau de la masse) en utilisant le mélangeur granulateur Mi-Pro® et nous avons abouti à la fabrication de microbilles contenant 15% m/m de Précirrol® et des quantités croissantes de Compritol® allant de 3 à 65% m/m. Les essais de dissolution effectués sur ces formulations avec du chlorhydrate de phényléphrine comme agent traceur, ont montré qu'une libération prolongée effective était déjà obtenue pour une formulation contenant 15% m/m de Précirrol et 10% m/m de Compritol, c'est-à-dire une formulation contenant 25% m/m de corps gras.

Une fois les conditions opératoires et les formulations à libération prolongée mises au point, nous avons testé la capacité de fabrication d'une forme divisée à libération prolongée

par ce procédé de pelletisation thermoplastique avec d'autres principes actifs : théophylline, kétoprofène et chlorhydrate de ciprofloxacine ; le but étant de fabriquer des formes contenant une forte charge en principe actif (75% m/m), ce qui est intéressant pour les principes actifs à forte dose thérapeutique et à libération prolongée. Nous y sommes parvenus en modulant légèrement deux paramètres de fabrication : la température de la double paroi et le temps de sphéronisation (TS) en fonction des propriétés granulométriques et de conductivité thermique des principe actifs testés.

Enfin, des études de stabilité ont été menées sur des microbilles de chlorhydrate de phényléphrine et de chlorhydrate de ciprofloxacine conservées dans différentes conditions de température et d'humidité relative (4°C, 25°C -60% HR et 40°C-75% HR). Ces études s'imposaient d'autant que les excipients lipidiques que nous avons utilisés montraient une évolution de leurs propriétés cristallines en fonction de la température et de la durée de stockage (chapitre III.1). Ces études de stabilité ont révélé une instabilité des microbilles de chlorhydrate de phényléphrine après leur conservation à 40°C et 75% d'humidité relative. En effet, une importante modification du profil de libération du traceur est perçue après 6 semaines de conservation dans cette condition : la libération devient immédiate. Une étude par chromatographie liquide a montré l'émergence d'un pic de dégradation, probablement par oxydation du chlorhydrate de phényléphrine lors de la conservation des microbilles dans cette condition drastique de température et d'humidité relative ; par contre le chromatogramme se rapportant à un échantillon de microbilles analysé le lendemain de sa fabrication ne montre pas une telle dégradation du chlorhydrate de phényléphrine. Ces essais de stabilité ont également été conduits sur des microbilles de chlorhydrate de ciprofloxacine. Cette fois-ci, les tests de dissolution effectués sur ces échantillons ont tous présenté un profil de libération prolongée pour ce principe actif et ce même après 6 mois de conservation des microbilles à 40°C et 75% d'HR. Les chromatogrammes obtenus après la conservation des microbilles de ciprofloxacine. HCl dans les différentes conditions précitées, sont tout à fait comparables au chromatogramme de référence produit par un échantillon de chlorhydrate de ciprofloxacine pur.

Il découle de ces études de stabilité deux informations importantes :

- Bien que la température atteinte lors du procédé de pelletisation avoisinait les 50°C, elle n'a pas été responsable de la dégradation des deux principes actifs testés : le chlorhydrate de phényléphrine et le chlorhydrate de ciprofloxacine.

- La condition de vieillissement accéléré largement utilisée par l'industrie pharmaceutique lors des études de stabilité des formes finies, à savoir : 6 mois de conservation à 40°C et 75% d'humidité relative n'a pas altéré les propriétés de libération du chlorhydrate de ciprofloxacine ; ce principe actif n'a par ailleurs subi aucune dégradation lors de sa conservation dans cette condition.

Nous pouvons conclure que les formulations à base de Compritol® et de Précirrol® que nous avons développées nous semblent tout à fait aptes à être employées dans la fabrication de microbilles à libération prolongée en utilisant la technique de la pelletisation thermoplastique. La stabilité des formes finies ne semble pas compromise, toutefois une conservation à une température comprise entre 15°C et 25°C serait à conseiller et une vigilance accrue devra être accordée aux principes actifs instables comme le chlorhydrate de phényléphrine.

III.3 Essais de Mise au Point et Évaluation d'une Forme Divisée Flottante

III.3.1. Introduction

En entamant cette dernière partie expérimentale, notre objectif était de trouver d'autres applications potentielles à la technique de pelletisation thermoplastique, outre celui de la fabrication de microbilles à libération prolongée. Dans cet esprit d'élargissement du champ d'application de cette technique, nous avons envisagé le développement de formes flottantes divisées à libération prolongée. Il était dès lors important d'essayer de mettre au point une formulation qui assure la flottabilité des microbilles, sans pour autant nous éloigner de la « philosophie » simple et rapide de ce procédé de fabrication tel qu'il a été décrit dans le chapitre III.2.

Comme système permettant la flottaison des microbilles, nous avons opté pour un système basé sur l'utilisation d'agents effervescents ; l'idée est d'utiliser le bicarbonate sodique seul ou en mélange avec un acide (l'acide tartrique) pour générer du CO_2 au sein de la matrice. Cette dernière reste une matrice semblable à celles développées dans le chapitre précédent, à savoir, une matrice contenant au minimum 25 % m/m d'un mélange de corps gras : Compritol® et Précirol®. Ces corps gras permettraient non seulement de lier le mélange de poudres en vue d'une granulation suivie d'une sphéronisation mais également de ralentir la libération du principe actif ; enfin, ils participeraient à « alléger » les microbilles de par leur faible densité et donc à favoriser leur flottabilité. Par ailleurs, d'autres composés pourront être additionnés si nécessaire, comme des polymères cellulosiques (hydroxypropylcellulose) afin d'emprisonner les bulles de CO_2 dégagées par les microbilles lors de leur contact avec un fluide mimant le fluide gastrique.

Ce développement a été conduit sur des formulations placebo contenant du lactose 450 Me, ainsi que sur des formulations contenant différents principes actifs. A ce titre, nous avons choisi les **chlorhydrates de ciprofloxacine et de tétracycline**.

Le premier présente une solubilité dépendant du pH, elle est favorisée à des pH acides. Par contre à pH 7,0 sa solubilité est minimale, et comme nous l'avons évoqué dans le chapitre précédent, cette faible solubilité à ce pH est sans doute à l'origine de la faible résorption

colonique décrite dans la littérature pour ce principe actif (Louie-Helm 2001). Dès lors, il serait intéressant de fabriquer une forme à rétention gastrique afin de libérer ce principe actif dans l'estomac et la partie supérieure de l'intestin, à des zones où le pH est compris entre 1,5 et 6,5.

La deuxième molécule choisie fut le chlorhydrate de tétracycline qui est l'un des antibiotiques utilisé dans le cadre de la trithérapie proposée pour le traitement de l'infection à *Helicobacter pylori* lors d'un ulcère gastrique. Il est alors associé au métronidazole et à des sels de bismuth (Laine et col. 2003 ; Pakodi et col. 2000 ; Yang et col. 1999). Enfin, la capacité de rétention gastrique des formes divisées développées a été estimée en utilisant la **riboflavine** comme agent traceur. En effet, le site d'absorption de cette vitamine étant localisé dans la partie supérieure de l'intestin grêle, elle s'avère être intéressante pour l'étude d'une forme flottante. De plus, cette molécule, de part son innocuité et la facilité de son dosage en milieu biologique, est avantageuse pour mener une étude *in vivo* afin de démontrer de manière indirecte l'allongement du séjour de la forme en amont de son site de résorption. Cette méthode consiste en le dosage par spectrofluorimétrie de la quantité de riboflavine excrétée par les urines de volontaires sains après ingestion de formes flottantes et non flottantes de riboflavine (Ingani, 1987a).

III.3.2. Matériels et méthodes

A. Produits utilisés

Tableau 1 : Les excipients et les principes actifs utilisés

Produit	Fournisseur
Ciprofloxacine chlorhydrate	Siris (Inde)
Tétracycline chlorhydrate	Welpar (Belgique)
Théophylline	BASF (Allemagne)
Riboflavine 5' Phosphate sodique	Certa (Belgique)
Lactose 450 Me	DMV International (Pays-Bas)
Précirol® ATO 5	Gattefossé (France)
Compritol® 888	Gattefossé (France)
*Methocel® K 100	Colocron (Etats-Unis)
*Methocel® K 4M	Colocron (Etats-Unis)
*Methocel® K 15M	Colocron (Etats-Unis)
Bicarbonate sodique	Fédéra (Belgique)
Acide tartrique	Fédéra (Belgique)
Acide chlorhydrique	Carlo Erba (France)
Polysorbate 20	Fédéra (Belgique)

*Les Methocel® K, sont des hydrocolloïdes de type hydroxypropylméthylcellulose. La viscosité d'une dispersion aqueuse à 2 % (m/v) à 25 °C est de 100, 4000 et 15000 mPa.s pour, respectivement le Methocel K 100, K4M et K 15M.

B. Le mélangeur granulateur à haute vitesse

La fabrication des microbilles flottantes a été effectuée en utilisant comme mélangeur granulateur à haute vitesse le Mi-Pro®. Celui-ci a été décrit dans le précédent chapitre (chapitre III.2).

C. L'appréciation de la flottabilité des microbilles

Elle a été effectuée par deux méthodes : une méthode utilisant le principe de poids résultant et une méthode de comptage visuel.

C.1. Le poids résultant

Comme nous l'avions évoqué dans la partie introductive de ce travail (chapitre II.2.1), les premiers essais concluants quant à l'élaboration de formes orales flottantes ont été menés par l'équipe de Seth et Tossounian en 1975. Le système proposé est un système HBS « Hydrodynamically Balanced System ». Ces systèmes HBS sont constitués de matrices hydrophiles qui gonflent après leur contact avec le liquide gastrique et acquièrent une densité inférieure à celle du fluide gastrique ($< 1,004$). Depuis, de nombreuses approches ont vu le jour afin d'améliorer la capacité de flottabilité des formes pharmaceutiques d'abord monolithiques puis divisées.

Une fois élaborés, il s'agissait ensuite d'estimer au mieux la flottabilité de ces différents systèmes. On se basait alors sur la densité de la forme et sur son temps de flottaison. Cependant ces éléments se limitent à renseigner l'aspect qualitatif du phénomène : la forme flotte ou ne flotte pas. De plus, l'estimation de la densité du système avant son immersion dans un fluide, ne renseigne pas, du moins pour certaines formes (les formes HBS, les formes effervescentes), l'évolution de cette densité *in situ*, après réaction des différents composants de la forme avec le milieu servant à mimer le fluide gastrique (Timmermans et Moës., 1990a). Partant de là, Timmermans et Moës (Timmermans et Moës 1990b ; Timmermans et Moës 1990c) mirent au point un appareil de mesure du **poids résultant (PR)** ; celui-ci permet de quantifier la force de flottaison d'un système immergé dans un liquide au cours du temps.

Cet appareillage de mesure de PR mesure en continu la force de flottaison, exprimée en poids résultant, généré par la forme après son immersion dans une solution d'HCl 0,1N additionnée de 0,05 % (m/v) de polysorbate 20 et thermostatisée à 37°C.

La force totale (**F**) mesurée par ce dispositif représente la somme vectorielle des forces de flottaison (**F_{flott}**) et de gravité (**F_{grav}**). Ces forces sont développées verticalement lors de l'immersion d'un solide dans un liquide (figure 1) tandis que les autres forces s'annulent. Si cet objet est raccordé à une balance, la force totale résultante de **F_{flott}** et **F_{grav}** peut être assimilée et quantifiée par le poids résultant affiché par la balance. Par convention cette force résultante **F** est positive lorsque l'objet flotte et négative lorsqu'il coule (équation 3).

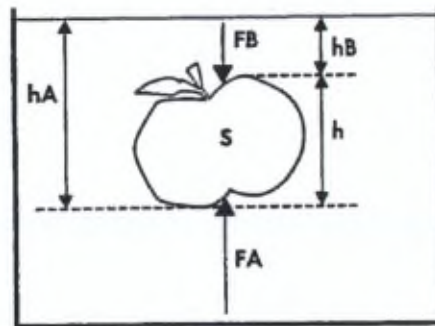


Figure 1 : Vue schématique des forces subies par un solide immergé dans un liquide (Timmermans., 1991)

Le principe de la mesure par l'appareil de poids résultant découle des équations [1] à [3]. Lorsqu'un solide est placé dans un liquide (figure 1), celui-ci exerce une force perpendiculairement à la surface S du solide immergé. Cette force est la force de flottaison F_{flott} , qui résulte de la différence entre F_A , la force agissant à la profondeur A où la pression est de p_A et F_B , la force opposée à F_A , agissant à la profondeur B à une certaine pression p_B . La magnitude de la force F_{flott} est donnée par les équations [1] et [2]. (Timmermans et Moës., 1990b ; Timmermans., 1991).

$$F_{\text{flott}} = F_A - F_B = p_A \times S - p_B \times S = \rho_f \times g \times h_A \times S - \rho_f \times g \times h_B \times S \quad [1]$$

$$F_{\text{flott}} = \rho_f \times g \times S (h_A - h_B) = \rho_f \times g \times V_s \quad [2]$$

Où :

h_A : la profondeur jusqu'au niveau A (m)

h_B : la profondeur jusqu'au niveau B (m)

F_A : la force agissant à la profondeur A (N)

F_B : la force agissant à la profondeur B (N)

p_A : la pression à la profondeur A (Pa)

p_B : la pression à la profondeur B (Pa)

g : l'accélération de la gravité (m/s^2)

h : la hauteur du solide (m)

S : la surface du solide (m^2)

V_s : le volume du solide (m^3)

d_s : la masse volumique du solide (Kg/m^3)

d_f : la masse volumique du fluide (Kg/m^3)

Par ailleurs, un objet immergé dans un liquide est également soumis à une force de gravité, F_{grav} . Donc la force verticale totale agissant sur un solide maintenu immergé dans un liquide peut être exprimée de la manière suivante par F (la force résultante):

$$F = F_{\text{flott}} - F_{\text{grav}} \quad [3]$$

$$F = d_f \times g \times V_s - d_s \times g \times V_s \quad [4]$$

$$F = (d_f - d_s) \times g \times V_s \quad [5]$$

Si le solide immergé dans le liquide est connecté directement à une balance, cette force résultante F sera renseignée par le poids résultant affiché par la balance ; c'est le principe de base de l'appareil poids résultant. Le dispositif PR est représenté de façon simplifiée par la figure 2, une description plus détaillée en est donnée par la figure 3.

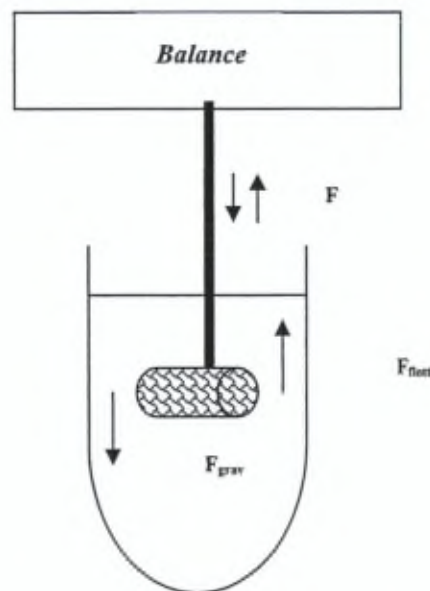


Figure 2 : Représentation simplifiée du principe d'un appareil poids résultant (Timmermans et Moës., 1990a)

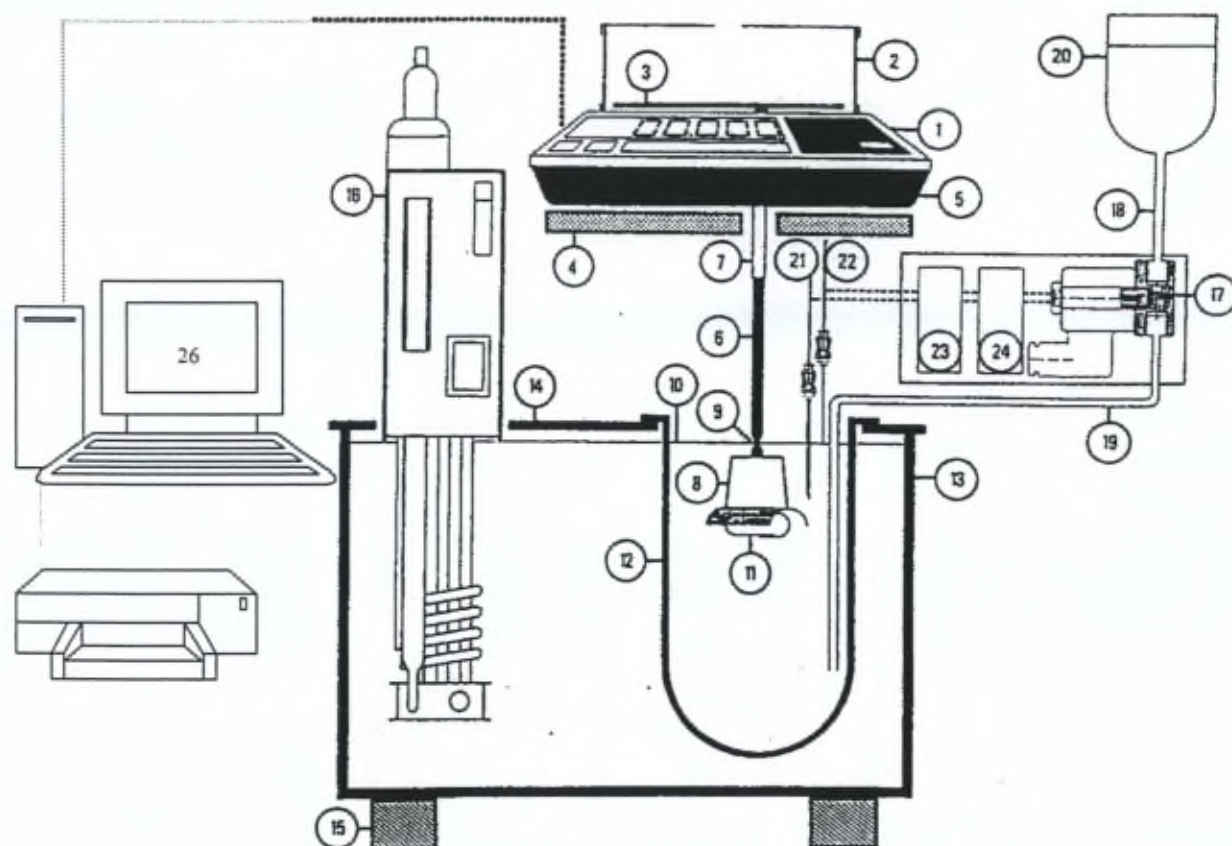


Figure 3 : Description complète de l'appareil poids résultant (Timmermans., 1991)

L'appareil de mesure du poids résultant est constitué de différentes parties (Timmermans., 1991) :

1. Un système de mesure : les mesures se font moyennant une balance d'une précision de 1/1000 de grammes (Sartorius L 420D) [1] ; elle est munie d'un couvercle [2] qui protège le plateau [3], un support en polystyrène [4] protège la base de la balance [5] des inévitables vapeurs d'eau auxquelles le module est exposé. Une tige de transmission des forces [7] prolonge vers le bas le module de la balance jusqu'à l'ouverture du récipient [12] ; cette tige a également comme fonction de maintenir la forme pharmaceutique immergée dans le liquide d'épreuve de sorte que toute force appliquée sur cette tige (qu'elle soit ascendante ou descendante) soit transmise au module de mesure et affichée par la balance. La valeur mesurée est appelée poids résultant. A l'extrémité inférieure de cette tige vient se visser un support [6] et [8] destiné à contenir la forme pharmaceutique ; en l'occurrence ici est représentée une

gélule flottante [11]. Ce support est recouvert d'une fine couche de téflon le protégeant de la corrosion due à l'acidité du milieu, ce support comporte également un étranglement [9] destiné à indiquer le niveau souhaité du liquide d'épreuve. La reproductibilité de la profondeur d'immersion de l'échantillon est ainsi assurée.

2. Le liquide d'épreuve : une solution d'HCl 0,1 N ($\text{pH} = 1,5$) additionnée de 0,05 % (m/v) de Polysorbate 20.
3. Un système de compensation des pertes du liquide du récipient : ce système permet de pallier les pertes du liquide par évaporation du milieu. Il comporte un réservoir de liquide [20] relié à une électrovalve [17] par un tuyau résistant aux acides [18]. L'électrovalve régule automatiquement le niveau du liquide d'épreuve moyennant deux électrodes en acier inoxydable [21] [22] qui y sont plongées et qui sont également reliées à l'électrovalve via un amplificateur [23] et un module de commande de l'électrovalve [24]. Elles déclenchent l'appel du liquide de compensation via un tuyau d'arrivée [19], et ce dès que le niveau du récipient diminue.
4. Le récipient d'épreuve et le bain thermostatisé : le récipient d'épreuve est suspendu sur une plaque qui recouvre un bain d'eau [13] thermostatisé à 37°C grâce à un thermostat plongeant [16]. La plaque recouvrant le bain a pour fonction de limiter les pertes par évaporation de l'eau. L'ensemble est placé sur un support antivibratoire [15], précaution indispensable pour éviter les perturbations lors de l'enregistrement des mesures.
5. La collecte des mesures : les mesures sont directement transmises de la balance à un ordinateur [26] grâce à un programme SartoConnect (Sartorius, YSC01L. V3.1.6, Allemagne) permettant l'enregistrement du poids affiché par la balance en fonction du temps (une récolte de donnée par seconde).

En fonction de la nature de la forme pharmaceutique (comprimé, gélule...), différents supports peuvent être utilisés. Notre forme étant une forme divisée, nous avons utilisé un panier cylindrique pour contenir les microbilles. La figure 4 montre une photographie de celui-ci.

**Propriétés du panier :**

Ouverture des mailles : 1 mm

Diamètre du cylindre : 2 cm

Longueur du cylindre : 4,5 cm

Hauteur (tige comprise) : 8,2 cm

Figure 4 : Photographie du panier destiné à accueillir les microbilles pour le test du poids résultant

C.2. Le comptage des microbilles

L'appréciation de la flottabilité des microbilles *in vitro* a également été effectuée par comptage. Ce type de méthode est souvent décrit dans la littérature (Ichikawa et col., 1991 ; Iannuccelli et col., 1998a). Un nombre précis de microbilles (compris entre 100 et 150) est introduit dans un bécher contenant 70 ml d'une solution d'HCl 0,1 N (pH = 1,5), additionnée de 0,05 % m/v de polysorbate 20 et thermostatisée à 37°C dans un bain agitant. Une agitation horizontale de 100 cycles/min est imposée aux béchers. Des photographies sont ensuite prises à des temps précis et le comptage des microbilles flottantes est effectué sur base de ces photographies.

D. La microscopie électronique à balayage

Au même titre que ce que nous avons fait pour les microbilles non flottantes à libération prolongée, nous avons là aussi visualisé la microstructure des microbilles flottantes par microscopie électronique à balayage. L'appareillage utilisé est le même que celui décrit précédemment (chapitre III.2.2.D.2).

E. Les tests de dissolution in vitro

Les caractéristiques de libération des principes actifs testés ont, sauf indication contraire, été estimées par des tests de dissolution dans un milieu acide (HCl 0,1 N + 0,05 % m/v de Polysorbate 20). Ces tests ont été effectués moyennant l'appareillage décrit précédemment (chapitre III.2.2.D.4), le nombre d'essais est de cinq par test. La teneur en principe actif a été déterminée par spectrophotométrie aux longueurs d'ondes de 356, 317, 243 et 445 nm pour le chlorhydrate de tétracycline, le chlorhydrate de ciprofloxacine, la théophylline et la

riboflavine, repectivement. Les tests de dissolution ont été précédés par la détermination de la teneur en principe actif présente au sein des microbilles par spectrophotométrie UV- Visible aux différentes longueurs d'ondes spécifiées.

III.3.3. Résultats et discussion

Avant d'aboutir à des formulations optimisées, plusieurs essais d'orientation ont été effectués. Nous en présentons un récapitulatif dans la section ci-dessous ; ce récapitulatif est précédé du descriptif des conditions de fabrication des microbilles.

A. Les conditions de fabrication des microbilles

Les microbilles ont été fabriquées dans le mélangeur granulateur à haute vitesse Mi-Pro®. Les conditions opératoires variaient légèrement en fonction des propriétés du composant principal de la formulation, notamment sa granulométrie et sa conductivité thermique. Ces variations ont concerné le temps de sphéronisation et la température de la double paroi comme nous l'avions évoqué dans le chapitre III.2.

Les conditions de fabrication sont les suivantes:

❖ *Granulation*

Vitesse du bras du mélangeur : 1800 rpm

Vitesse du chopper : 130 rpm

Température de la double paroi : entre 50°C et 55°C

❖ *Sphéronisation*

Vitesse du bras du mélangeur : 800 rpm

Vitesse du chopper : 4000 rpm

Température de la double paroi : entre 50°C et 55°C

Temps de sphéronisation : de 12 à 20 min

Durée de l'enrobage : 2 min

Débit d'air comprimé : 2 à 3 m³

L'examen des conditions de fabrication des microbilles flottantes révèle une étape supplémentaire par rapport à la fabrication des microbilles non flottantes décrite dans le

chapitre III.2, à savoir une étape d'enrobage. L'enrobage des microbilles, lorsqu'il a eu lieu, a consisté en la simple addition d'un mélange de poudres contenant du Précirrol® aux microbilles déjà formées et au maintien des conditions de sphéronisation (IS, CS...) pendant 2 min. Le Précirrol® par sa fusion favorisera l'adhésion des particules de poudre à la surface de la microbille et la formation d'une « couche d'enrobage ». Il va de soi que cet enrobage n'est pas à comparer avec des films d'enrobage uniformes et continus comme on en rencontre lors de l'utilisation de dispositifs d'enrobage en turbine ou en lit d'air fluidisé, mais il a contribué à favoriser les propriétés de flottabilité des microbilles, sans pour autant alourdir le procédé de fabrication.

Une fois fabriquées, les microbilles sont étalées sur une surface plane et refroidies à température ambiante. L'analyse granulométrique des microbilles flottantes a donné des résultats comparables à ceux rencontrés lors de la fabrication de microbilles non flottantes.

Nous avons sélectionné pour nos tests (évaluation des propriétés de flottabilité, tests de dissolution) les microbilles ayant une plage granulométrique comprise entre 1250 et 2000 μm et ce pour des raisons pratiques. En effet, l'ouverture des mailles du panier destiné à accueillir les microbilles lors du test de poids résultant est de 1mm ; des microbilles de taille inférieure à cette mesure passeraient à travers les mailles faussant ainsi les résultats du test.

B. Le récapitulatif des essais d'orientation

Nous exposerons dans cette section une partie des essais d'orientation que nous avons menés avant d'aboutir à des formulations flottantes optimisées. Chaque « groupe » de formulations plus ou moins similaires sera présenté dans un tableau détaillant la composition des formulations. Ce tableau sera chaque fois suivi de quelques explications quant à la démarche suivie.

La flottabilité de ces formulations a d'abord été évaluée par la méthode du poids résultant. Pour rappel, selon ce principe, une formulation est considérée comme flottante lorsque la force de flottaison est supérieure à la force de gravité ; la force résultante de la somme vectorielle de ces deux forces, qui est assimilée au poids résultant, est alors positive.

B.1. Essais impliquant une augmentation de la quantité de corps gras dans la formulation

Tableau 2 : Les premiers essais utilisant le chlorhydrate de ciprofloxacine

Dénomination	Formulation (% m/m)	Commentaires
Flott 1	Principe actif 65	PR < 0 après 20 min
	Précirol® 15	
	Compritol® 10	
	Mélange effervescent* 10	
Flott 2	Principe actif 50	PR < 0 après 60 min
	Précirol® 15	
	Compritol® 25	
	Mélange effervescent* 10	
Flott 3	Principe actif 45	PR positif, mais la poussée est très faible, son maximum est de 20 mg/ 100 mg de microbilles
	Précirol® 15	
	Compritol® 25	
	Mélange effervescent* 15	

* le mélange effervescent est composé pour 1 mole d'acide tartrique de 2 moles de NaHCO₃

Nous avons d'abord essayé des formulations simples de chlorhydrate de ciprofloxacine (tableau 2), avec un minimum d'excipients et sans enrobage. Ce principe actif a été choisi pour le développement d'une forme flottante à libération prolongée pour deux raisons : d'une part, il présente un temps de demi-vie plasmatique court (3 à 4 h) et d'autre part, comme nous l'avons évoqué dans le chapitre III.2 ainsi que dans la partie introductive du présent chapitre, sa solubilité est meilleure aux pH acides qu'à pH neutre. Cependant, les formulations reprises par le tableau 2 n'ont pas montré de résultats encourageants quant à leur capacité de flottabilité, tant en augmentant la quantité de corps gras qu'en renforçant la teneur en mélange effervescent. Face à cet échec, nous avons préféré tester des formulations placebo, avec du lactose 450 Me (tableau 3). Nous avons ainsi envisagé une formulation à forte charge en corps gras: 50 % m/m (Flott 4, tableau 3) de manière à encore diminuer la densité de la forme. De plus, nous avons ajouté un enrobage (2% m/m de Précirol®) afin de ralentir l'échappement des bulles de CO₂.

Tableau 3 : Essai avec une forte charge en corps gras dans la formulation

Dénomination	Formulation (% m/m)	Commentaires
Flott 4	<u>Matrice : (250 g)</u>	PR positif, avec une poussée de 70 mg/100 mg de microbilles. Le PR reste positif pendant 800 min.
	Lactose 450 Me 30	
	Précirol® 15	
	Compritol® 35	
	Mélange effervescent 20	
	<u>Enrobage : (5 g)</u>	
	Précirol® 2*	

* Le pourcentage d'enrobage est calculé par rapport à la matrice

Cette formulation placebo a montré de bonnes capacités de flottabilité, mais les corps gras en occupent une grande part, ne permettant pas l'incorporation d'une forte charge en principe actif. Or ces formes flottantes peuvent très bien se destiner à libérer des antibiotiques prescrits à forte dose dans le cadre de l'éradication de *l'Helicobacter pylori* lors du traitement de l'ulcère gastrique. Ce traitement implique l'administration de fortes charges en divers antibiotiques comme l'amoxicilline, la tétracycline, la clarithromycine (Pakodi et col., 2000 ; Hejazi et col., 2002 ; Yang et col., 1999 ; Laine et col., 2003).

B.2. Essais impliquant l'incorporation d'un polymère cellulosique dans la formulation

A partir du moment où la quantité de corps gras devait être limitée dans la formulation, nous avons essayé d'introduire un polymère cellulosique à haut poids moléculaire afin de tenter d'emprisonner les bulles de CO₂ au sein de la forme et améliorer ainsi sa flottabilité.

Nous avons dès lors essayé plusieurs formulations avec divers polymères cellulosiques comme le Methocel K15M et le Methocel K4M (tableau 4) ; ce sont des hydroxypropylméthylcelluloses de haut degré de polymérisation. Ces polymères cellulosiques, en s'hydratant, ont la capacité de gonfler et pourraient emprisonner des bulles de CO₂. Des formulations contenant de 5 à 15 % m/m en ces polymères au sein de la matrice ont été testées. Cependant, nous avons constaté que ces polymères, en gonflant, conduisaient à une désintégration des microbilles.

Tableau 4 : Essais incluant les polymères cellulosiques Methocel K4M et Methocel K 15M

Dénomination	Formulation (% m/m)		Commentaires
Flott 5	Lactose 450 Me	45	Les microbilles mettent près de 40 min avant de flotter. De plus, elles se désintègrent après 1h30 de contact avec le milieu (HCl 0.1N + polysorbate 20)
	Précirol®	15	
	Compritol®	10	
	Mélange effervescent	20	
	Methocel K 15M	10	
Flott 6	Lactose 450 Me	45	Les microbilles se désintègrent rapidement (en quelques minutes)
	Précirol®	15	
	Compritol®	10	
	Mélange effervescent	15	
	Methocel K4M	15	
Flott 7	Lactose 450 Me	35	Les microbilles s'effritent pour se désintégrer après 2 h et 30 min de test
	Précirol®	15	
	Compritol®	25	
	Mélange effervescent	15	
	Methocel K4M	10	
Flott 8	Lactose 450 Me	40	PR positif, avec une poussée de 60 mg/100 mg de microbilles. Le PR reste positif pendant 800 min, cependant les microbilles ont tendance à s'agglomérer, par ailleurs elles s'effritent toujours en partie
	Précirol®	15	
	Compritol®	25	
	Mélange effervescent	15	
	Methocel K4M	5	

Outre le fait que les polymères cellulosiques à haut poids moléculaire avaient tendance à désintégrer les microbilles lorsqu'ils étaient incorporés dans la matrice, ils prolongeaient également le temps de latence avant lequel les microbilles flottent (lag time ; par exemple, le Methocel K 15M). Dans le même esprit mais afin d'éviter la désintégration, nous avons envisagé l'enrobage des microbilles par un mélange constitué d'un polymère hydrophile de plus faible poids moléculaire qui présente l'avantage de s'hydrater rapidement comme le Methocel K100. Nous l'avons alors associé à un corps gras qui aura comme fonction de faciliter la formation d'un enrobage par sa fusion lors du processus de fabrication. C'est le Précirol® que nous avons choisi, puisque des deux corps gras utilisés dans nos formulations, c'est celui qui présente la plage de fusion la plus faible. Il nécessite pour son ramollissement

et fusion partielle une température voisine de 50°C lors de la fabrication des microbilles. L'enrobage avec ce mélange Préciról / Methocel K100 a fourni d'assez bons résultats pour les formulations placebo (tableau 5). Dans ces formulations, nous avons supprimé l'acide tartrique étant donné qu'au cours de nos tests *in vitro*, l'acidité du milieu suffisait à réagir avec le bicarbonate sodique et enclencher l'effervescence du CO₂.

Enfin, à côté de la méthode du poids résultant comme moyen d'évaluation de la flottabilité des microbilles, nous avons eu recours à une méthode de comptage du nombre de microbilles flottantes dans une solution d'HCL 0,1 N additionnée de 0,05 % m/v de Polysorbate 20. Cette méthode, décrite dans la section III.3.2.C.2, nous a aidés à visualiser la manière dont les microbilles flottaient. Elle nous a également permis de voir si les microbilles avaient tendance à s'agglomérer ou pas lors de leur contact avec le liquide d'épreuve et si elles restaient intactes ou subissaient une désintégration au cours du temps.

Nous avons estimé qu'une forme présentait de bonnes capacités de flottabilité lorsque l'essai de PR effectué sur celle-ci donnait un PR en mg/100mg de microbilles qui se maintenait positif durant 800 minutes de test et/ou que le pourcentage de microbilles flottantes était supérieur à 60 % durant les huit premières heures de test. Les formes qui remplissent ces conditions seront attribuées d'un signe « + » au niveau des tableaux descriptifs des formulations (tableaux 5 et 6).

Les courbes de comparaison du poids résultant des microbilles obtenues selon les formulations du tableau 5 sont représentées par les figures 5 et 6.

Tableau 5 : Essais avec un enrobage au Methocel K100 et au Précirol® :

	Dénomination	Formulation (% m/m)	Flottabilité
Formulations placebo	Flott 9	<u>Matrice :</u> Précirol® 15 Compritol® 25 NaHCO ₃ 8 Lactose 450 Me ad 100 <u>Enrobage:</u> Methocel K100 5 Précirol® 2	+
	Flott 10	<u>Matrice :</u> Précirol® 15 Compritol® 10 NaHCO ₃ 8 Lactose 450 Me ad 100 <u>Enrobage:</u> Methocel K100 5 Précirol® 2	+
	Flott 11	<u>Matrice :</u> Précirol® 15 Compritol 22 NaHCO ₃ 8 Methocel K100 5 Lactose 450 Me ad 100 <u>Enrobage:</u> Précirol® 10	-
Formulation avec le chlorhydrate de ciprofloxacine	Flott 12	<u>Matrice :</u> Précirol® 15 Compritol® 25 NaHCO ₃ 8 Ciprofloxacine ad 100 <u>Enrobage:</u> Methocel K100 5 Précirol® 2	-
	Flott 13	<u>Matrice :</u> Précirol® 15 Compritol® 10 NaHCO ₃ 8 Ciprofloxacine ad 100 <u>Enrobage:</u> Methocel K100 5 Précirol® 2	-
	Flott 14	<u>Matrice :</u> Précirol® 15 Compritol® 10 NaHCO ₃ 8 Methocel K100 5 Lactose 450 Me 22 Ciprofloxacine ad 100 <u>Enrobage:</u> Methocel K100 5 Précirol® 2	-
	Flott 15	<u>Matrice :</u> Précirol® 15 Compritol 22 NaHCO ₃ 8 Methocel K100 5 Ciprofloxacine ad 100 <u>Enrobage:</u> Methocel K100 5 Précirol® 2	-

- Les formulations placebo détaillées par le tableau 5

L'incorporation du Methocel K100 à raison de 5% (m/m) dans les formulations placebo Flott 9 (40 % m/m CG dans la matrice) et Flott 10 (25 % m/m de CG dans la matrice), a procuré une bonne flottabilité aux microbilles issues de ces mélanges. Ces deux formulations placebo se distinguent par la quantité de corps gras incorporé dans la matrice. L'examen de la figure 5 nous révèle que, toutes proportions par ailleurs identiques, le fait de renforcer la quantité de corps gras dans la matrice des microbilles améliore leur flottabilité. Ceci est sans doute lié à la faible densité des corps gras. Des matrices grasses à base de glycérol mono-oléate sont d'ailleurs relatées dans la littérature comme étant des formes à rétention gastrique (Kumar et col. 2004).

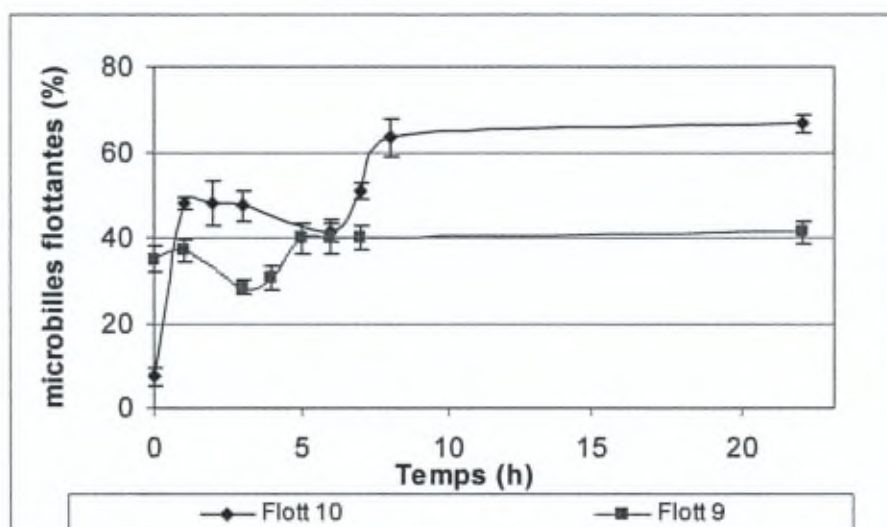


Figure 5 : Le pourcentage de microbilles flottantes en fonction du temps ($m \pm SD$, $n=3$), formulations Flott 9 et Flott 10 du tableau 5

Par ailleurs, l'appréciation de la flottabilité de ces deux formulations par le suivi du poids résultant au cours du temps montre des courbes qui se maintiennent au-dessus du zéro durant 800 minutes (figure 6). Cependant, la présence du Précirrol® seul en enrobage dessert les propriétés de flottabilité de la forme, comme le montre le suivi du PR de la formulation Flott 11 qui devient négatif après 50 min de test. De plus, le pourcentage de microbilles flottantes pour cette formulation ne dépasse pas les 20 % durant les huit premières heures du test. En effet, l'enrobage des microbilles doit contenir une substance hydrophile afin de ne pas créer

une barrière lipophile défavorable à la pénétration du liquide au sein de la matrice et au dégagement de CO_2 à partir du mélange effervescent incorporé dans la matrice.

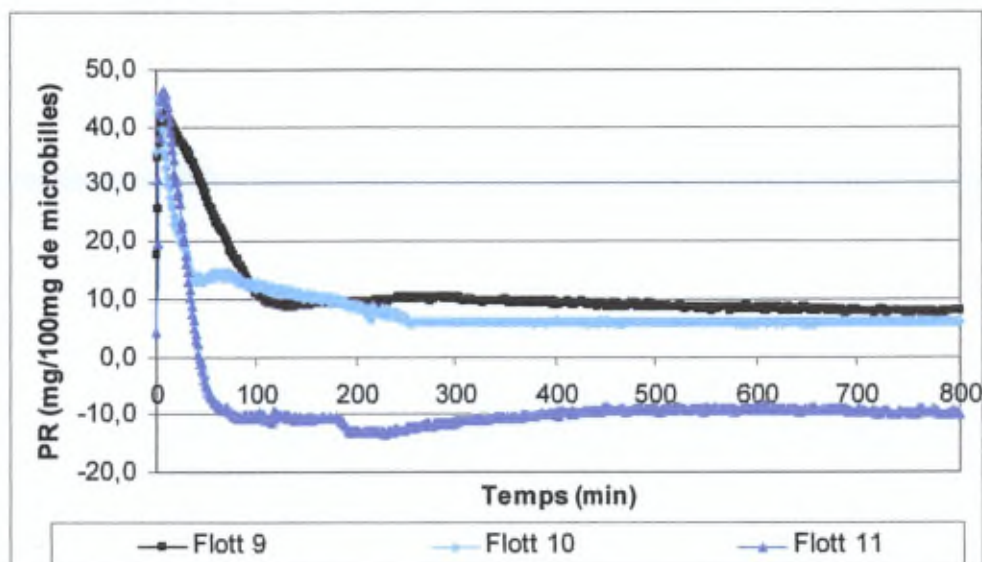


Figure 6 : Evolution du poids résultant (PR) des microbilles des formulations placebo (Flott 9, 10 et 11 du tableau 5)

- Les formulations contenant le chlorhydrate de ciprofloxacine

Les formulations placebo Flott 9 et Flott 10 ayant montré d'assez bonnes propriétés de flottabilité, nous avons remplacé le lactose 450 Me par un principe actif : le chlorhydrate de ciprofloxacine. Nous avons alors été surpris de constater que, pour des formulations identiques, la substitution du lactose par de la ciprofloxacine conduisait à une diminution de la flottabilité des microbilles. Ainsi, comme le montre la figure 7, pour les formulations contenant 25% m/m de corps gras, bien que la poussée de départ de la formulation Flott 13 (ciprofloxacine) soit supérieure à celle de Flott 10 (lactose), les microbilles issues de la formulation contenant la ciprofloxacine flottent de manière irrégulière : le PR devient négatif après 30 min de test, puis redevient positif pour enfin retomber à des valeurs négatives en fin de test. De même, la comparaison de Flott 9 (lactose) et Flott 12 (ciprofloxacine) montre, pour ces formulations contenant 40% m/m de corps gras, une moins bonne flottabilité des microbilles de ciprofloxacine en comparaison des microbilles placebo. Ainsi, les microbilles provenant de Flott 12 donnent un PR négatif après 30 min de test, et celui-ci se maintient à des valeurs en dessous du zéro jusqu'à la fin du test (800 min). Cette différence dans la

capacité de flottabilité des microbilles en fonction de la présence ou non de chlorhydrate de ciprofloxacine au sein de la masse a persisté pour plusieurs autres formulations testées. Nous sommes tout de même parvenus à légèrement améliorer la flottabilité des microbilles contenant ce principe actif en incorporant au sein de la matrice du Methocel K100 : formulations Flott 14 et 15 du tableau 5.

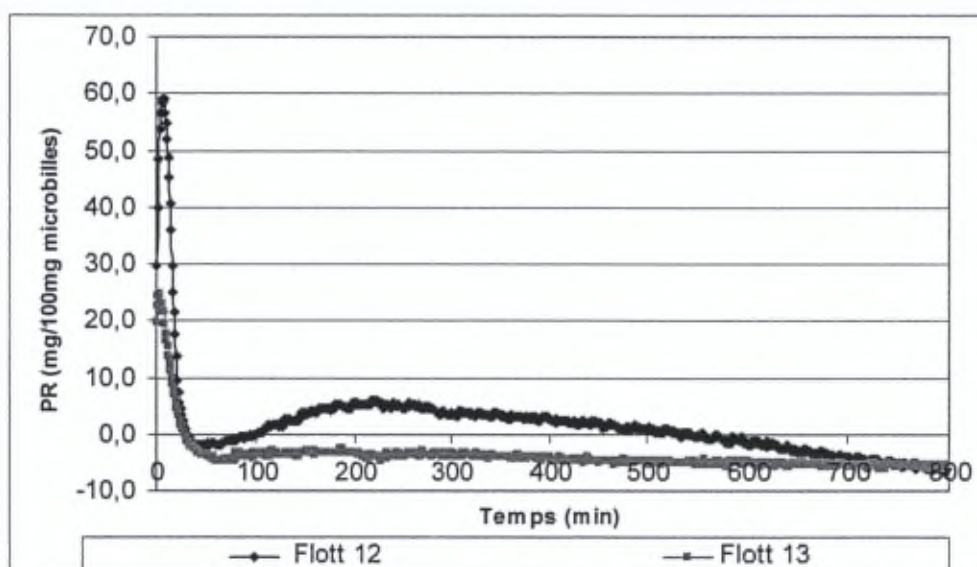


Figure 7 : Comparaison de l'évolution du poids résultant (PR) de microbilles issues de deux formulations à base de ciprofloxacine l'une contenant 25% de corps gras (Flott 13) et l'autre 40% de corps gras (Flott 12) dans la matrice

Dans la formulation Flott 14, nous avons non seulement incorporé du Methocel K 100 au sein de la matrice, mais nous avons également remplacé 22 % de chlorhydrate de ciprofloxacine par du lactose 450 Me, le résultat du point de vue de la flottabilité fut encourageant, avec un poids résultant qui se maintenait positif durant 800 min (figure 8), mais la libération du principe actif de la matrice était plus rapide comme le montre la figure 9. Par ailleurs l'incorporation du lactose dans la formulation réduit l'espace occupé par le principe actif.

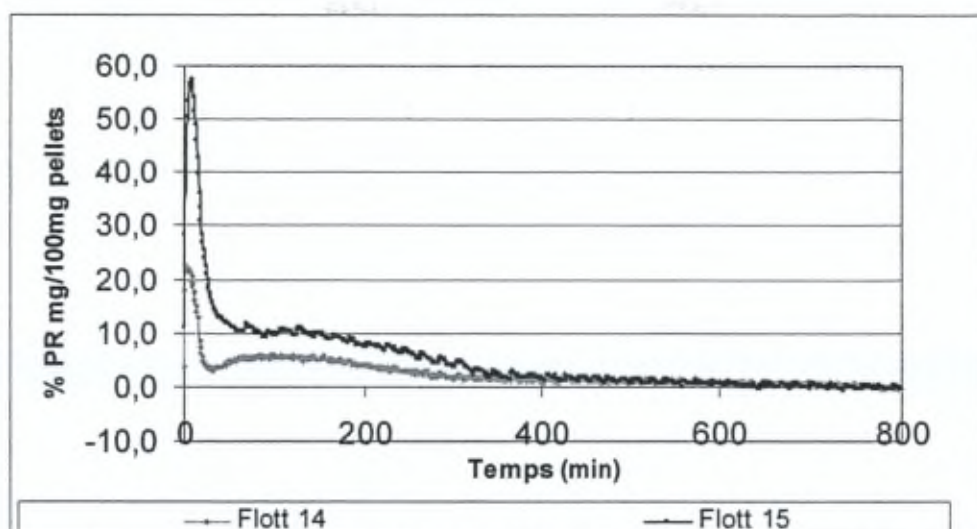


Figure 8 : Comparaison de l'évolution du poids résultant (PR) de microbilles issues de deux formulations à base de ciprofloxacine : Flott 14 et Flott 15

C'est la raison pour laquelle nous avons décidé d'augmenter la quantité de corps gras au sein de la matrice pour passer de 25 % (m/m) présents dans Flott 14 à 37 % (m/m) au sein de Flott 15. Nous avons également supprimé le lactose de la formulation afin de diminuer son hydrophilie, en vue de ralentir la libération du principe actif. Cette dernière formulation montre une libération plus progressive de la ciprofloxacine comparativement à Flott 14 (figure 9). Pour ce qui est de sa flottabilité, les microbilles donnent un PR positif durant les 800 min de test. Le pourcentage des microbilles flottantes reste cependant assez faible ; il est compris entre 30 et 40 % durant les huit premières heures du test. De plus, les valeurs de PR, bien que positives, restent assez faibles. Ce qui risque de compromettre grandement la flottabilité des microbilles.

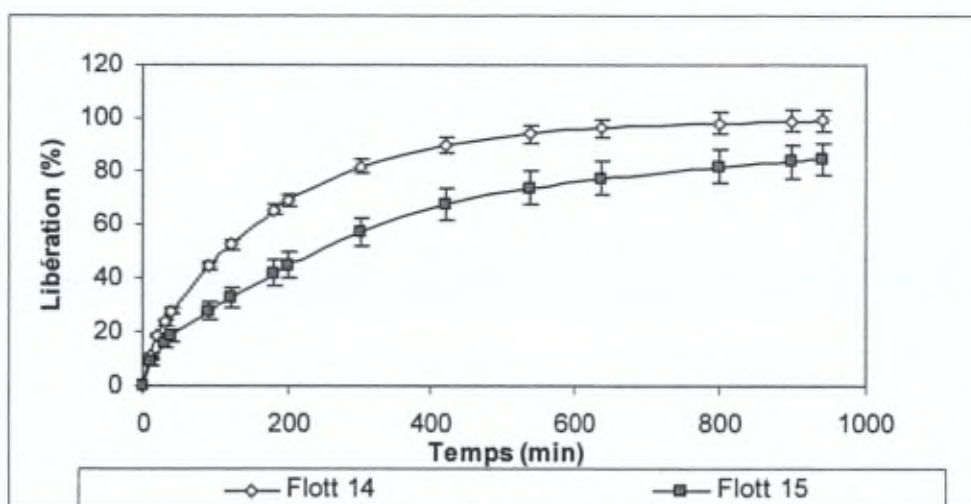


Figure 9 : Comparaison des profils de dissolution (HCl 0,1 N + 0,05 % m/v de polysorbate 20) de deux formulations de chlorhydrate de ciprofloxacine, l'une contenant 25% (m/m) de corps gras (Flott 14) et l'autre 37% (m/m) (Flott 15)

Toutes ces formulations contenant du Methocel K100 en enrobage partagent une même observation relevée lors des essais de comptage des microbilles, à savoir qu'avec le temps, ces microbilles ont tendance à s'agglomérer. Certes, leur agglomération est moindre que ce que nous avons observé pour les microbilles contenant des polymères de poids moléculaire supérieur au Methocel K 100 (formulations du tableau 4), mais elle est tout de même présente. Or une telle agglomération des microbilles est déconseillée, puisqu'elle risque de faire perdre à la forme son avantage de forme divisée (Moës, 1989). Par ailleurs, les formulations ne contenant pas de Methocel K100 en enrobage mais uniquement du Précirol® comme la formulation Flott 11 du tableau 5, ont toutes donné un poids résultant négatif et un pourcentage de microbilles flottantes très faible (avoisinant les 30 % après une heure et décroissant par la suite). Il est donc nécessaire d'ajouter au Précirol® présent en enrobage un excipient hydrophile.

Etant donné l'agglomération progressive des microbilles contenant un polymère cellulosique en enrobage, l'idée nous est venue d'incorporer du bicarbonate sodique en enrobage aux côtés du Précirol®. Le bicarbonate sodique présente non seulement l'avantage d'être hydrophile, mais également celui de provoquer un dégagement de CO₂, dès le contact des microbilles avec la solution d'HCl 0,1 N, favorisant la flottaison immédiate de celles-ci. Sur base de cette idée, nous avons testé avec succès la flottabilité d'une formulation placebo

(Flott 16) que nous détaillerons dans la section ci-dessous. Cette section reprend les formulations flottantes optimisées que nous avons obtenues sur base des différentes observations relevées lors des divers essais préliminaires effectués et dont nous venons de relater la majeure partie.

C. Les formulations retenues

La composition de la formulation placebo optimisée est détaillée ci-dessous. Cette formulation ayant montré de bonnes capacités de flottabilité avec le lactose, nous l'avons ensuite appliquée à différents principes actifs.

Composition de la formulation placebo optimisée (Flott 16):

Une matrice (250 g) composée de:

- ✓ Corps gras : 37% (m/m) (dont 15% de Précirol® et 22% de Compritol®)
- ✓ NaHCO₃ : 8 % (m/m)
- ✓ Methocel K100 : 5 % (m/m)
- ✓ Lactose ou principe actif ad 100 % (m/m)

Un « enrobage » (37,5 g) composé de :

- ✓ Précirol® : 10 % (m/m)
- ✓ NaHCO₃ : 5% (m/m)

Conditions de fabrication des microbilles:

❖ Granulation

Vitesse du bras du mélangeur : 1800 rpm

Vitesse du chopper : 130 rpm

Température de la double paroi : entre 50°C et 55°C

❖ Sphéronisation

Vitesse du bras du mélangeur : 800 rpm

Vitesse du chopper : 4000 rpm

Température de la double paroi : 50°C

Temps de sphéronisation : de 12 min

Durée de l'enrobage : 2 min

Débit d'air comprimé : 2 m³/h

Les microbilles placebo fabriquées en appliquant ces conditions ont un diamètre géométrique $d_{\text{géo}} = 1173 \mu\text{m}$ ($sd_{\text{géo}} = 1,4$). Le rendement de fabrication exprimé par la fraction de microbilles entrant dans la fourchette granulométrique comprise entre $1250 \mu\text{m}$ et $2000 \mu\text{m}$ est de 73 %.

Les courbes d'enregistrement de l'évolution du torque et de la température en fonction du temps de Flott 16 sont décrites par la figure 10. On observe que, mis à part le temps d'arrêt nécessaire à l'addition du mélange de poudres destiné à l'enrobage des microbilles, ces enregistrements sont tout à fait comparables à ceux décrits précédemment (chapitre III.2) pour les microbilles à libération prolongée non flottantes.

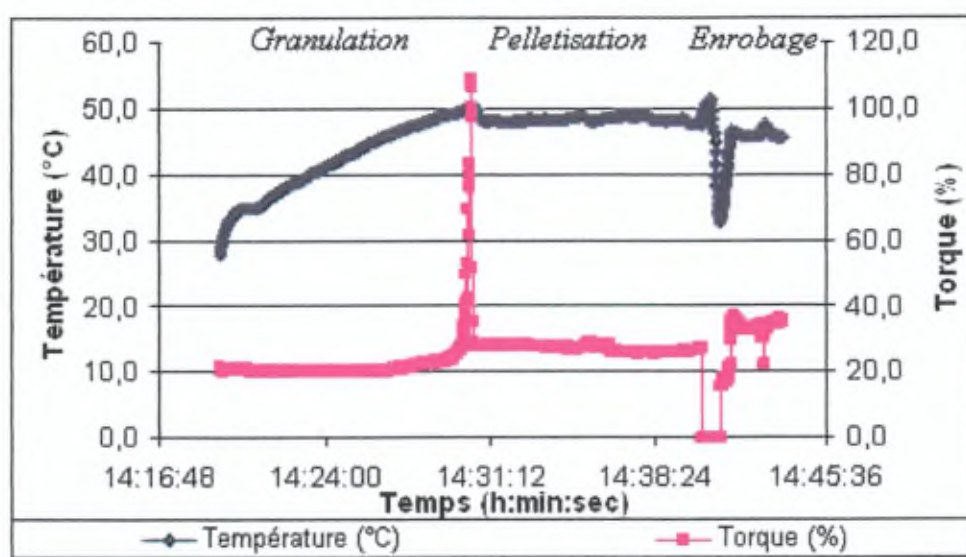


Figure 10 : Courbes d'enregistrement du torque et de la température pour la formulation flottante placebo (Flott 16)

Comme prérequis au développement de notre formulation, il semblait important de vérifier que la distribution de l'enrobage se limitait bien à la périphérie de la matrice, étant donné qu'il ne s'agit pas ici d'un enrobage classique tel qu'on l'entend par un enrobage par film à l'aide du dépôt d'une dispersion de polymères par exemple. C'est la raison pour laquelle nous avons eu recours à la microscopie électronique couplée à la diffraction RX (microscopie-RX), méthode décrite précédemment (chapitre III.2), afin de nous assurer que, durant les deux minutes d'enrobage, les particules constitutives de celui-ci restaient bien en périphérie des

microbilles. Pour ce faire, nous avons « marqué » l'enrobage d'une formulation placebo, en y incorporant du NaCl. Nous avons ensuite observé la distribution des chlorures au sein d'une coupe de microbille ; cette distribution s'est avérée se limiter à la partie externe de la microbille comme le montre la figure 11.

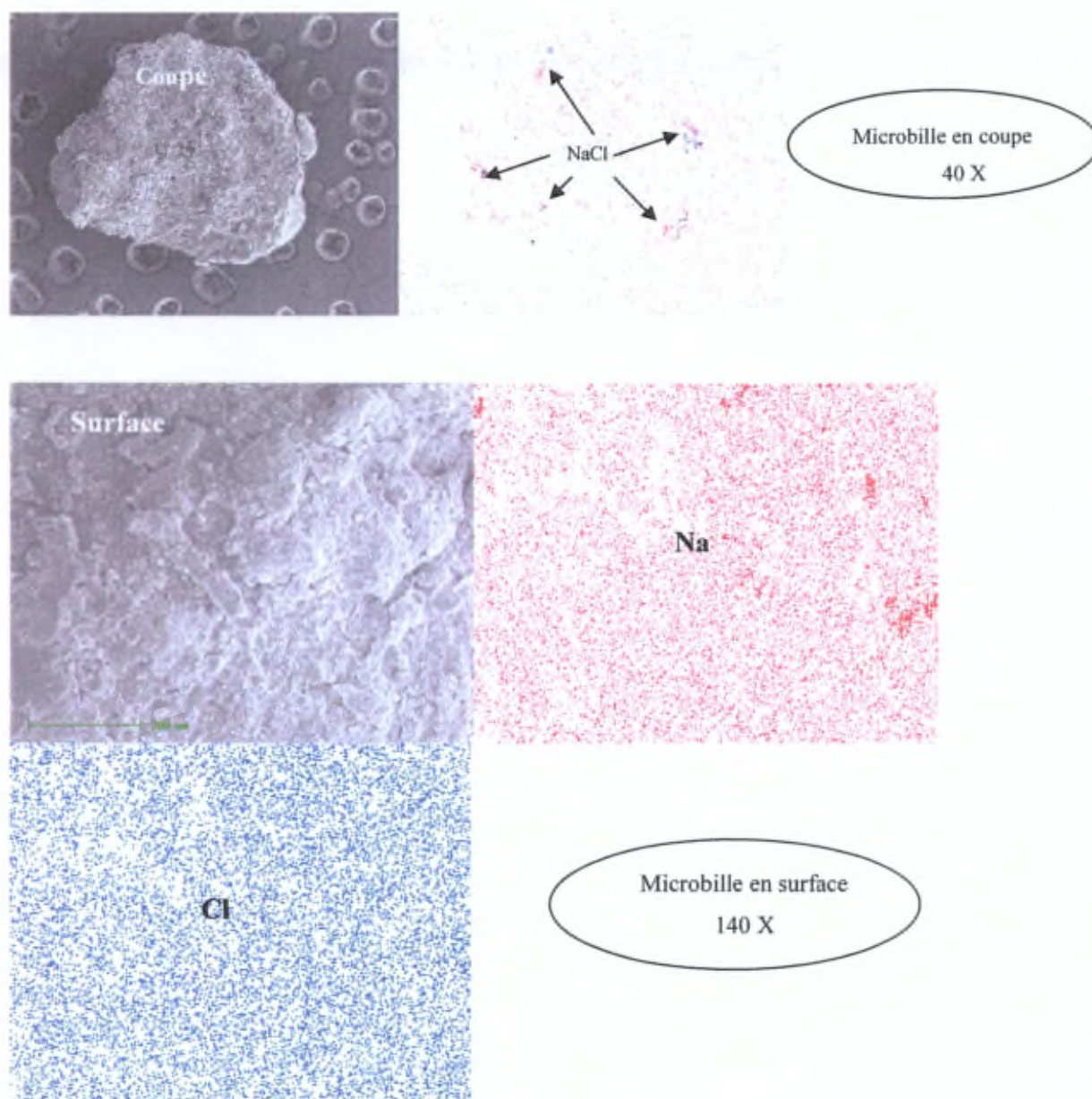


Figure 11 : Images obtenues par microscopie-RX, montrant la répartition des chlorures et du sodium présents en enrobage sur la surface et la coupe d'une microbille

La distribution de l'enrobage se limitant donc bien à la partie périphérique de la microbille, nous nous sommes basés sur la formulation décrite ci-dessus pour fabriquer et

tester des microbilles contenant du lactose ainsi que différents principes actifs ; le tableau 6 reprend en détail ces formulations.

Le tableau 6 renseigne la composition des microbilles fabriquées selon la formulation placebo optimisée ainsi que différentes formulations à base de principes actifs. Ce tableau renseigne également les conditions de fabrication des microbilles dans le granulateur à haute vitesse Mi-Pro® et le rendement de fabrication. Dans ce tableau le rendement de fabrication est exprimé ici par la fraction de microbilles dont la granulométrie entre dans la fourchette : 1250 µm-2000 µm.

Tableau 6 : Tableau récapitulatif de la formulation placebo optimisée (Flott 16) appliquée à différents principes actifs ainsi que des conditions de fabrication des microbilles

Dénomination	Formulation (% m/m)	Conditions opératoires	Rendement (%)	Flottabilité
Flott 16 Placebo	<u>Matrice (250 g) :</u> Précirol® 15 Compritol® 22 NaHCO ₃ 8 Methocel K100 5 Lactose 450 Me ad 100 <u>Enrobage (37,5 g) :</u> Précirol® 10 NaHCO ₃ 5	<u>Granulation :</u> IS : 1800 rpm CS : 130 rpm Double paroi : 50°C <u>Sphéronisation :</u> IS : 800 rpm CS : 4000 rpm TS : 10 min Durée de l'enrobage : 2 min	72,8	+
Flott 17 Chlorhydrate de ciprofloxacine	<u>Matrice (250 g) :</u> Précirol® 15 Compritol® 22 NaHCO ₃ 8 Methocel K100 5 Ciprofloxacine.HCl ad 100 <u>Enrobage (37,5) :</u> Précirol® 10 NaHCO ₃ 5	<u>Granulation :</u> IS : 1800 rpm CS : 130 rpm Double paroi : 55°C <u>Sphéronisation :</u> IS : 800 rpm CS : 4000 rpm TS : 25 min Durée de l'enrobage : 2 min	74,3	-
Flott 18 Chlorhydrate de tétracycline	<u>Matrice (250 g) :</u> Précirol® 15 Compritol® 22 NaHCO ₃ 8 Methocel K100 5 Tétracycline.HCl ad 100 <u>Enrobage (37,5) :</u> Précirol® 10 NaHCO ₃ 5	<u>Granulation :</u> IS : 1800 rpm CS : 130 rpm Double paroi : 55°C <u>Sphéronisation :</u> IS : 800 rpm CS : 4000 rpm TS : 12 min Durée de l'enrobage : 2 min	73,5	+
Flott 19 Chlorhydrate de tétracycline	<u>Matrice (250 g) :</u> Précirol® 15 Compritol® 10 NaHCO ₃ 8 Methocel K100 5 Lactose 450 Me 12 Tétracycline.HCl ad 100 <u>Enrobage (25 g) :</u> Précirol® 5 NaHCO ₃ 5	<u>Granulation :</u> IS : 1800 rpm CS : 130 rpm Double paroi : 55°C <u>Sphéronisation :</u> IS : 800 rpm CS : 4000 rpm TS : 12 min Durée de l'enrobage : 2 min	72,2	+
Flott 20 Théophylline	<u>Matrice (250 g) :</u> Précirol® 15 Compritol® 22 NaHCO ₃ 8 Methocel K100 5 Théophylline ad 100 <u>Enrobage (37,5) :</u> Précirol® 10 NaHCO ₃ 5	<u>Granulation :</u> IS : 1800 rpm CS : 130 rpm Double paroi : 55°C <u>Sphéronisation :</u> IS : 800 rpm CS : 4000 rpm TS : 15 min Durée de l'enrobage : 2 min	69,8	+

C.1. Comparaison des résultats obtenus à partir de la formulation placebo (Flott 16) et de la formulation au chlorhydrate de ciprofloxacine (Flott 17)

Comme nous l'avions déjà observé lors des essais d'orientation (comparaison de Flott 9, 10, 12 et 13), nous avons également relevé une différence dans la capacité de flottabilité des microbilles contenant du lactose et celles contenant le chlorhydrate de ciprofloxacine, avec une capacité moindre pour ces dernières. Ainsi, tandis que les microbilles de lactose donnent un PR qui se maintient positif pendant 800 min avec un minimum de 20 mg/ 100mg comme le montre la figure 12, les microbilles de chlorhydrate de ciprofloxacine donnent un PR négatif après 30 min de test (figure 13).

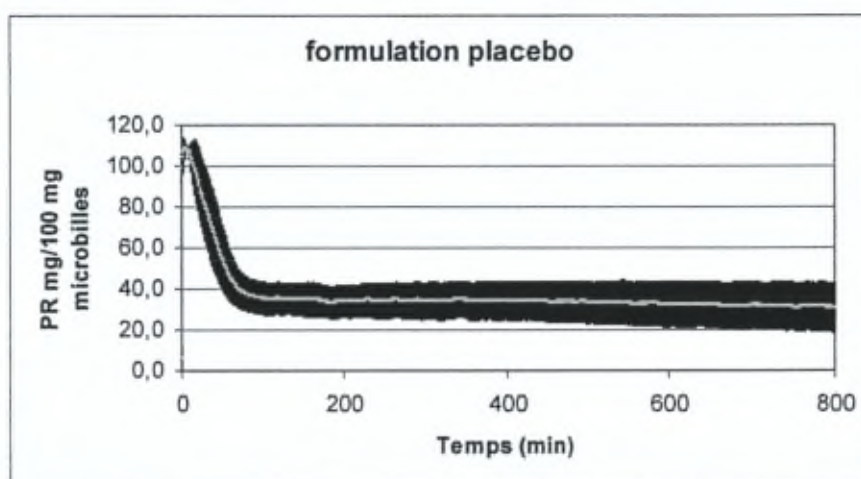


Figure 12 : Evolution du poids résidant obtenu à partir des microbilles placebo de la formulation Flott 16 décrite dans le tableau 6 ($n=3$, $m \pm SD$)

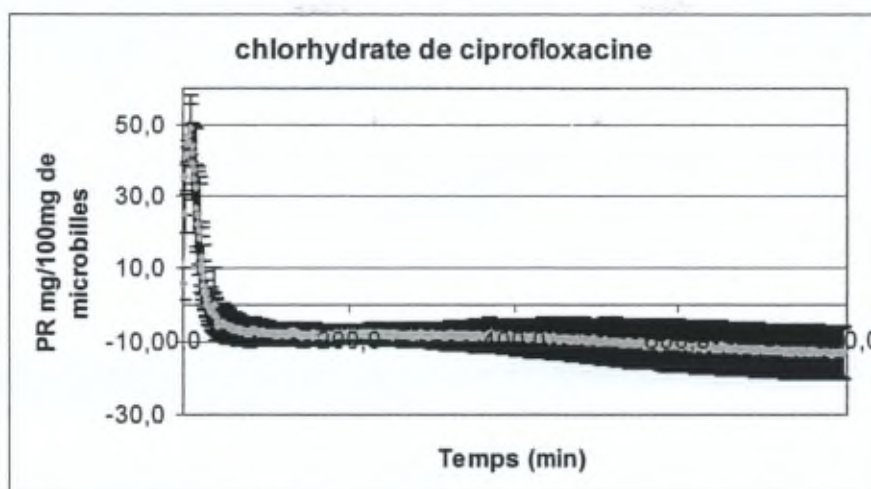


Figure 13 : Evolution du poids résultant obtenu à partir des microbilles de chlorhydrate de ciprofloxacine de la formulation Flott 17 décrite dans le tableau 6 ($n=3$, $m \pm SD$)

Par ailleurs, le comptage des microbilles flottantes confirme le résultat obtenu par PR. En effet, la figure 14 montre un pourcentage de pellets flottants nettement supérieur pour la formulation placebo comparativement à la formulation contenant le chlorhydrate de ciprofloxacine. Le pourcentage de microbilles provenant de la formulation Flott 16 est supérieur à 80 % après 1 h de test et il dépasse les 90 % après 23 h de test ; par contre le pourcentage de microbilles de ciprofloxacine flottantes comparable à cette formulation placebo atteint à peine les 40 % après 1 h et tombe à 12 % après 23 h de test.

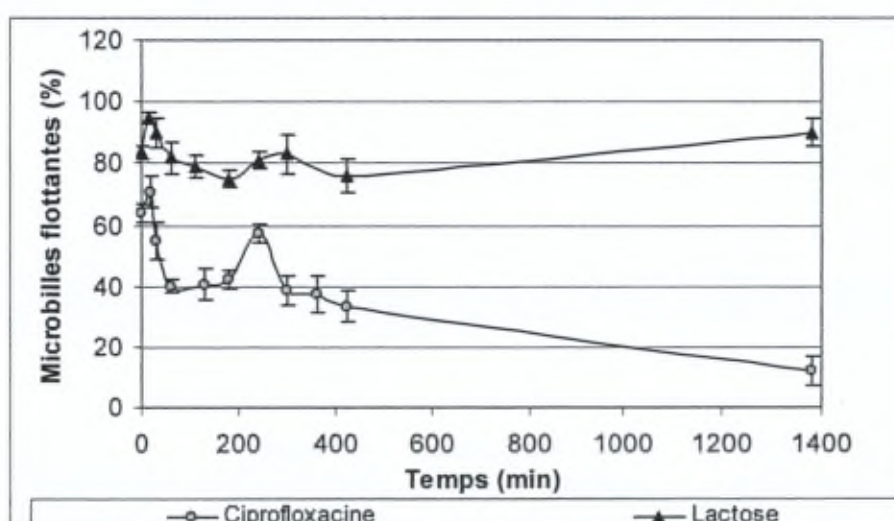


Figure 14 : Comparaison de la capacité de flottabilité des microbilles placebo (Flott 16) et des microbilles contenant du chlorhydrate ciprofloxacine (Flott 17) par comptage ($n=3$, $m \pm SD$)

Cette différence de flottabilité entre les microbilles de ciprofloxacine et les pellets placebo ayant été relevée, tant lors des essais préliminaires que pour la formulation optimisée, nous avons cherché à en connaître l'origine. Pour ce faire, nous avons comparé des coupes de microbilles de lactose avec celles de chlorhydrate de ciprofloxacine après un séjour de 22 h dans un bain d'HCl 0,1 N thermostatisé à 37°C et avec une agitation horizontale de 100 cycles/minute. Après séchage, les microphotographies obtenues par SEM ont montré une structure beaucoup plus dense pour les microbilles de ciprofloxacine en comparaison aux microbilles de lactose. Cette différence est bien illustrée par la figure 15, où nous constatons que bien que la microbille de ciprofloxacine présente des cavités correspondant aux cavités provoquées lors du dégagement de CO₂ ; sa structure est par ailleurs bien plus compacte que celle observée pour la microbille au lactose.

Nous avons dès lors émis l'hypothèse que la différence de granulométrie entre le lactose 450 Me et le chlorhydrate de ciprofloxacine pouvait expliquer cette dissemblance de comportement. Cette dernière présente une granulométrie très fine, celle-ci est renseignée par le tableau 7.

Tableau 7 : Granulométrie des différents principes actifs et du lactose

Produit	Taille des particules*
	D [4,3] (µm)
Lactose 450 Me	21,4
Ciprofloxacine.HCl	9,4
Tétracycline.HCl	56,4

* la granulométrie a été déterminée par diffraction laser (cf. section III.2.2.B)

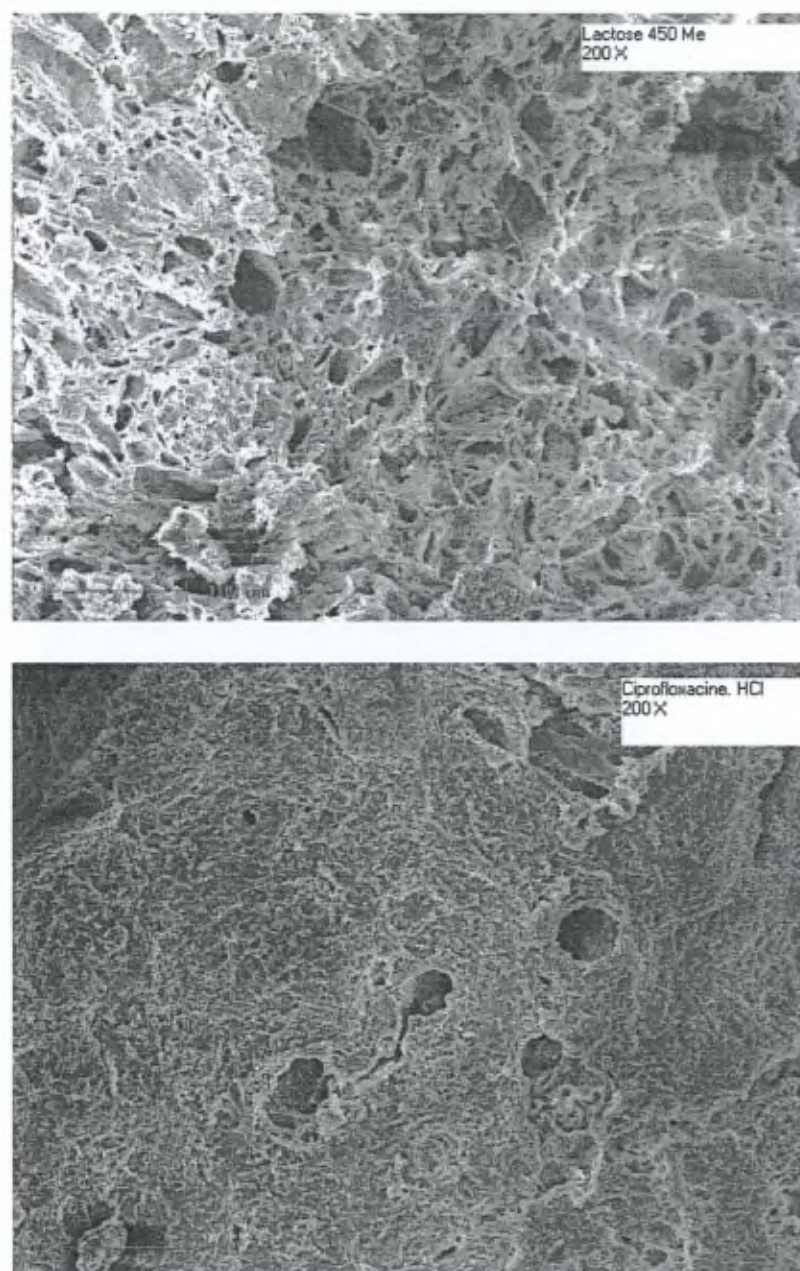


Figure 15 : Microphotographies comparant des coupes de microbilles de lactose (Flott 16) et de ciprofloxacin.HCl (Flott 17) obtenues par SEM. Grossissement 200 X

La différence de granulométrie et d'aspect des particules de lactose 450 Me et de chlorhydrate de ciprofloxacine est clairement illustrée par la figure 16, où les particules de chlorhydrate de ciprofloxacine apparaissent sous forme de très fines aiguilles ayant tendance à s'agglomérer en oursins.

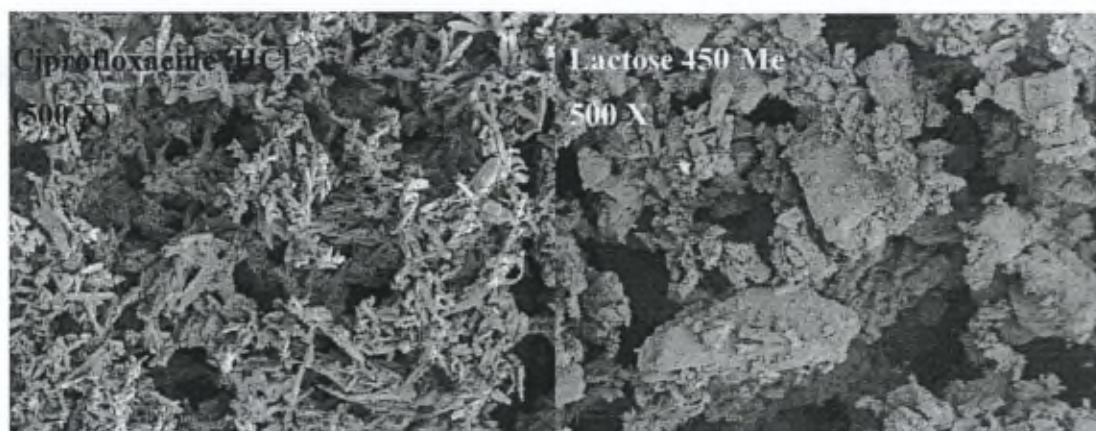


Figure 16 : Microphotographies obtenues par SEM (500X) comparant les particules de lactose et celles de chlorhydrate de ciprofloxacine

Cette différence de granulométrie favorise probablement la formation et la multiplication de liens inter-particulaires étroits entre les particules de ciprofloxacine lors du procédé de fabrication des microbilles par pelletisation thermoplastique. Rappelons que cette méthode est avant tout une méthode de granulation et que plus les particules sont fines, plus leur surface spécifique est grande et donc plus les liens inter-particulaires sont nombreux. Ces liens étroits procurent aux microbilles de ciprofloxacine une structure plus dense qui joue en la défaveur de leur flottabilité.

C.2. Les microbilles flottantes de chlorhydrate de tétracycline (Flott 18 et 19) et de théophylline (Flott 20)

Afin de corroborer cette hypothèse, nous avons testé la flottabilité de microbilles fabriquées avec des principes actifs de granulométrie supérieure à celle de la ciprofloxacine. Nous avons ainsi fabriqué des microbilles de chlorhydrate de tétracycline ($D[4,3] = 56,4 \mu\text{m}$) comme en était notre intention au départ, mais nous avons également testé comme autre principe actif de granulométrie supérieure à la ciprofloxacine, la théophylline ($D[4,3] = 109,8 \mu\text{m}$) même si une forme à rétention gastrique n'est pas vraiment intéressante pour cette

molécule. Les formulations qui y correspondent ont été précédemment détaillées par le tableau 6 ; ce sont les formulations Flott 18 et Flott 19 pour la tétracycline et la formulation Flott 20 pour la théophylline. L'estimation de la flottabilité des microbilles à base de chlorhydrate de tétracycline a montré de bonnes capacités de flottaison pour ces microbilles contrairement aux microbilles de ciprofloxacine. En effet, comme le montre la figure 17, le poids résultant des microbilles de tétracycline (Flott 18) est positif sur toute la durée du test (800 min) avec une forte poussée au départ dépassant les 200 mg/100 mg de microbilles ; de même le comptage des microbilles donne des résultats tout à fait satisfaisants. Ainsi, plus de 60 % des microbilles flottent après 1 h de test, ce pourcentage croît par la suite pour dépasser les 80 % après 2 h et se maintient aux environs des 90 % de microbilles flottantes pendant 24 h, comme le montre la figure 18. A titre d'illustration, des photographies présentant une vue globale des microbilles flottantes dans des béchers contenant de l'HCl 0,1N et soumis à une agitation de 100 cycles/min dans un bain porté à 37°C sont montrées par la figure 19.

Nous nous sommes basés sur ce type de photographies pour effectuer nos comptages. Nous avons par ailleurs testé une autre formulation au chlorhydrate de tétracycline, mais contenant moins de corps gras que Flott 18, il s'agit de la formulation Flott 19 du tableau 6. Cette dernière contient 30 % m/m de corps gras au lieu de 47 % m/m. La flottabilité de cette formulation s'est révélée être également satisfaisante avec un poids résultant positif pendant 800 min (la poussée initiale est de plus de 200 mg/100 mg de pellets) ; le résultat par comptage donne près de 80 % de microbilles flottantes ; après 1 h, ce pourcentage se maintient pendant 8 h puis tombe à 67 % après 24 h de test.

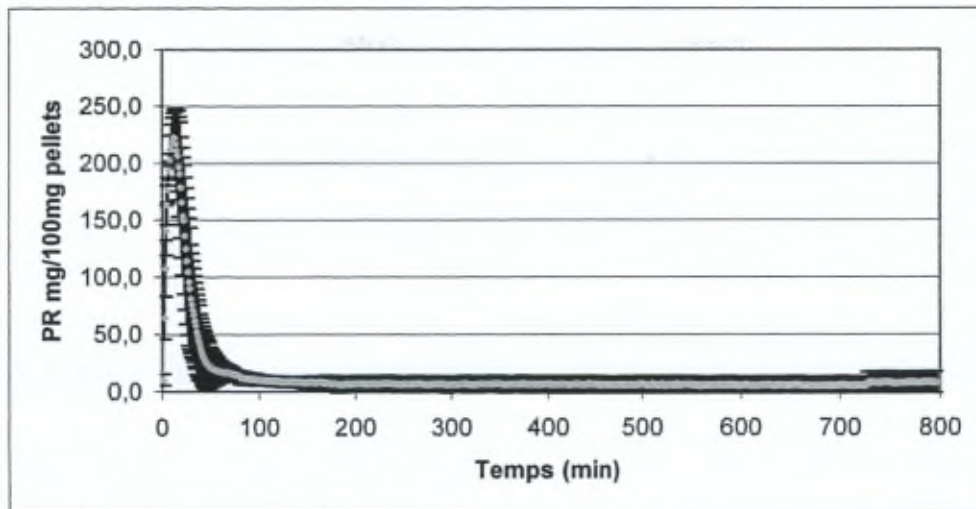


Figure 17 : Evolution du poids résultant obtenu à partir des microbilles de chlorhydrate de tétracycline (Flott 18) ($m \pm SD$, $n=3$)

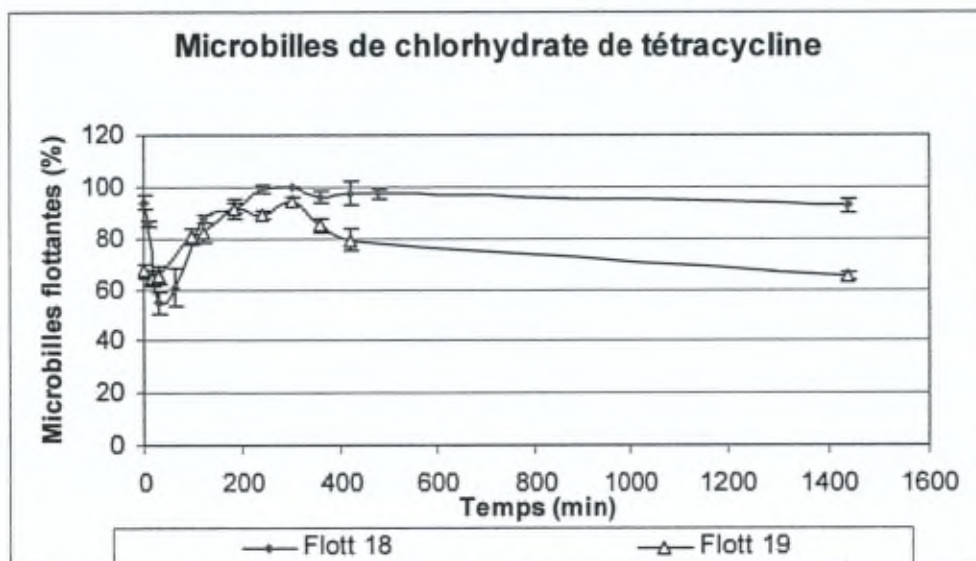


Figure 18 : Le pourcentage de microbilles flottantes obtenu pour les microbilles de chlorhydrate de tétracycline (formulations : Flott 19 contenant 30% CG et Flott 18 contenant 47% CG) ($m \pm SD$, $n=3$)

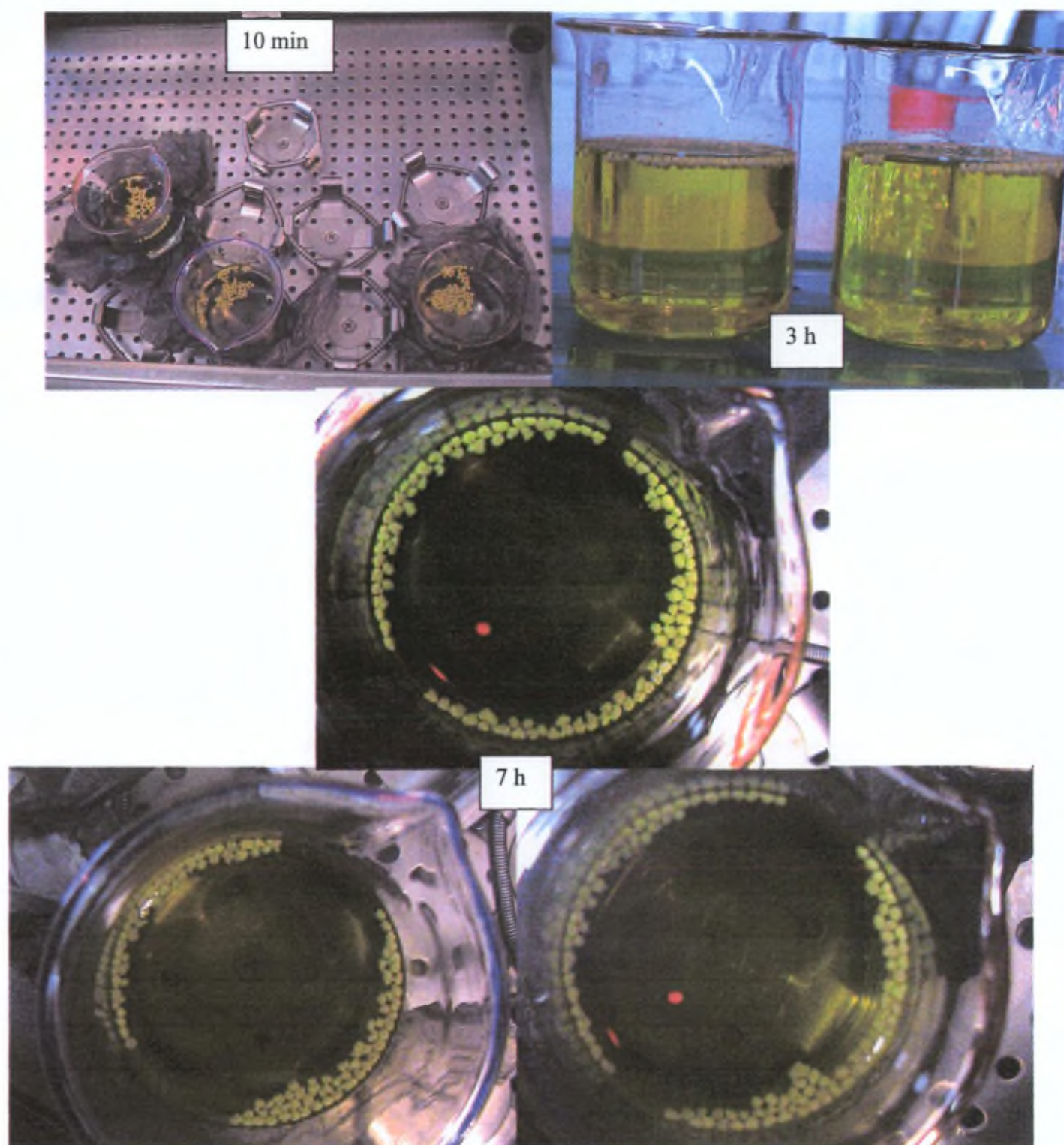


Figure 19: Quelques exemples de photographies de microbilles flottantes ayant servi à l'essai de comptage du pourcentage de microbilles flottantes (formulation Flott 19 au chlorhydrate de tétracycline)

Les profils de libération du chlorhydrate de tétracycline sont présentés par la figure 20. L'influence de la quantité de corps gras présents dans la formulation sur la libération du principe actif y est illustrée ; la cinétique de libération du principe actif à partir de la formulation contenant 30 % (m/m) de corps gras est légèrement plus rapide que celle relative à la formulation contenant 47 % (m/m) de corps gras.

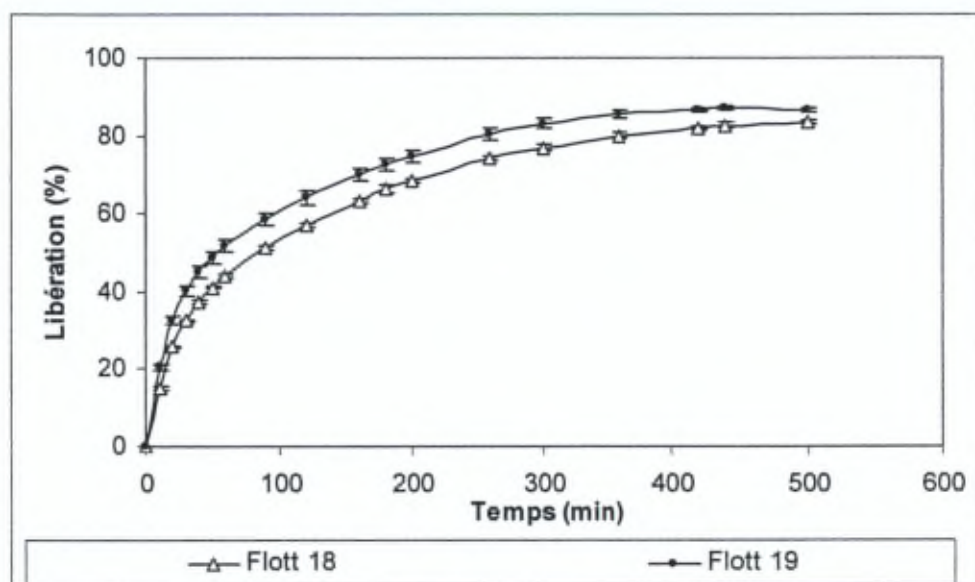


Figure 20 : Comparaison des profils de dissolution de deux formulations de chlorhydrate de tétracycline, l'une contenant 30 % (m/m) de corps gras (Flott 19) et l'autre 47 % (m/m) (Flott 18) dans de l'HCl 0,1N, additionné de 0,05 % de polysorbate 20 ($m \pm SD$, $n = 5$)

L'observation d'une coupe de microbilles de tétracycline (figure 21) au microscope électronique à balayage (SEM) montre une structure aérée pour les microbilles, ayant séjournées pendant 24 h dans une solution d'HCl 0,1N. Nous observons la présence de cavités bien visibles, occasionnées par les bulles de CO_2 après leur dégagement, favorisant la flottaison de ces microbilles.

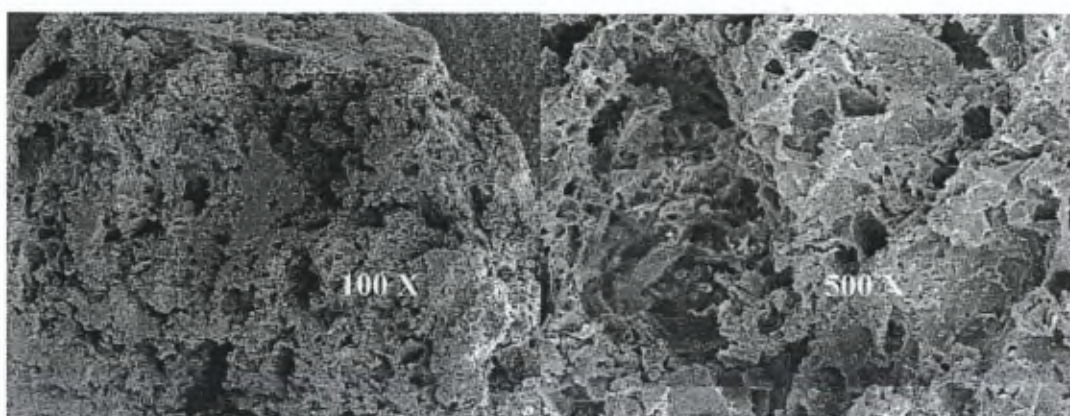


Figure 21: Microphotographies obtenues par SEM effectuée sur une coupe de microbilles de tétracycline après leur séjour pendant 24 h dans un bain d'HCl 0,1 N

Pour ce qui est des microbilles de théophylline de la formulation Flott 20, elles ont montré de bonnes capacités de flottabilité comme le montre la figure 22 où l'on constate que plus de 70 % des microbilles flottent après une heure de test, et que ce pourcentage se maintient pendant 8 h avant de décroître à près de 60 % après 23 h de test. Le poids résultant se maintient à des valeurs positives durant 800 minutes.

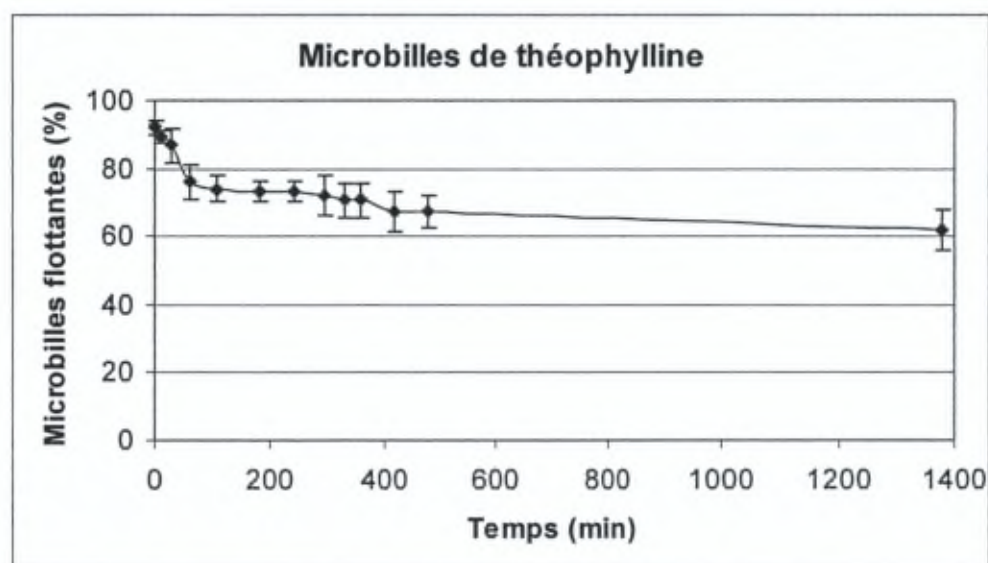


Figure 22: Le pourcentage de microbilles flottantes obtenu pour les microbilles de théophylline (formulation Flott 20, tableau 6) ($m \pm SD$, $n=3$)

La libération de la théophylline à partir de la matrice est bien prolongée ; elle atteint 21,4 % $\pm$ 0,7 % de principe actif libéré après 1h de test et 82,4 % $\pm$ 3,0 % après 16 h de test.

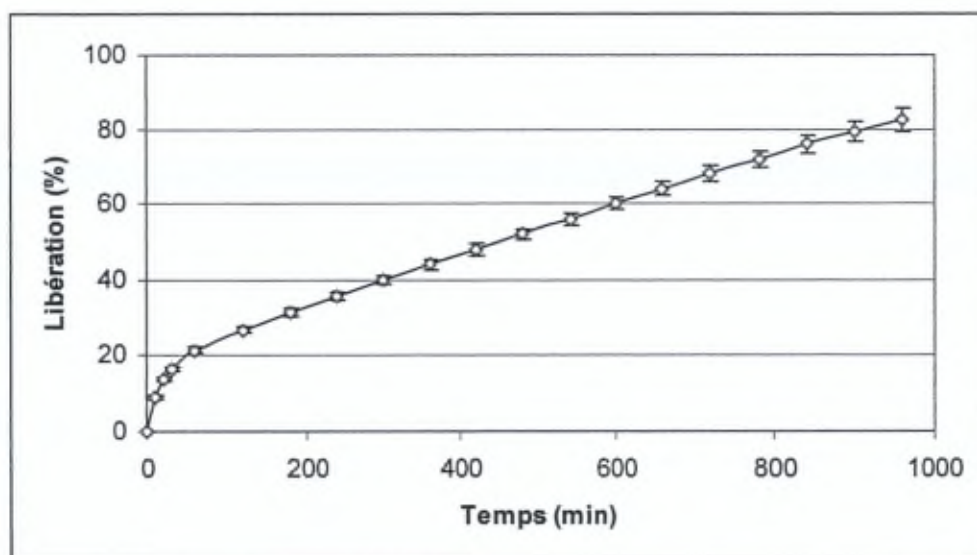


Figure 23: Le profil de dissolution de la formulation flottante (Flott 20) contenant de la théophylline dans de l'HCl 0,1 N additionné de 0,05% de polysorbate 20 ($m \pm SD$, $n = 5$)

Comme pour les microbilles de tétracycline, l'observation d'une coupe de microbilles de théophylline (figure 24) au microscope électronique à balayage (SEM) montre une structure aérée, avec des cavités bien visibles laissées par les bulles de CO_2 après leur dégagement.

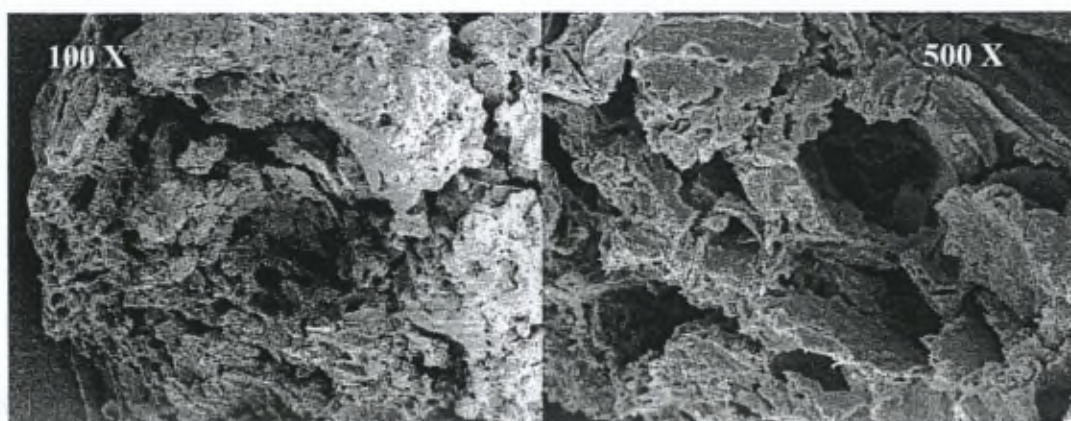


Figure 24: Microphotographies obtenues par SEM effectuée sur une coupe de microbilles de théophylline après leur séjour pendant 24 h dans un bain d'HCl 0,1 N

D. Evaluation in vitro et in vivo de microbilles flottantes de riboflavine

D.1. Introduction

Lors de la mise au point d'une forme flottante, il est souhaitable d'évaluer sa capacité de rétention gastrique *in vivo*. Différentes méthodes sont décrites dans la littérature à propos de cette évaluation. Ces méthodes vont de l'observation de la forme chargée de sulfate de baryum par radiographie-RX chez des volontaires humains (Iannuccelli et col. 1998b; Baumgartner et col. 2000) à l'utilisation de radio-isotopes à courte demi-vie afin de marquer la forme pharmaceutique et la suivre le long du TGI par scintigraphie gamma. Ce dernier mode d'évaluation est le plus répandu depuis qu'il a été décrit par Davis (Davis 1986 ; Timmermans 1991 ; Atyabi et col. 1996 ; Whitehead et col. 1998b ; Billa et col. 2000 ; Wilding et col. 2001).

A côté de ces méthodes de visualisation directe de la capacité de rétention gastrique de la forme pharmaceutique, il existe des méthodes indirectes qui consistent en le dosage dans le sang ou dans les urines de la quantité de principe actif résorbée. Ces méthodes sont d'application lorsque le principe actif, incorporé dans la forme, présente une étroite fenêtre d'absorption située au niveau de la partie supérieure de l'intestin grêle. Un allongement du séjour de la forme pharmaceutique en amont du site de résorption du principe actif retardera son absorption, constituant ainsi une méthode d'évaluation indirecte de la capacité de rétention gastrique de la forme.

Nous avons choisi comme méthode d'évaluation de la capacité de rétention gastrique de nos microbilles flottantes le suivi de l'excrétion urinaire de la riboflavine (RF) chez des volontaires humains sains. La riboflavine ou vitamine B₂ est décrite dans la littérature comme étant un bon traceur pour ce type d'évaluation (Ingani 1987a et 1987b ; Klausner et col. 2002 ; Sato et col. 2003). En effet, le site d'absorption de la RF est situé dans la partie proximale de l'intestin grêle. Par ailleurs, son élimination s'effectue presque exclusivement par voie urinaire sous forme intacte. Le pic d'excrétion urinaire de la RF est obtenu endéans les deux heures suivant son administration orale sous une forme à libération rapide. La RF est transformée en flavine mononucléotide par phosphorylation au niveau intestinal, et est ensuite dirigée vers le foie où elle subit une déphosphorylation. La RF est donc présente comme telle dans la grande circulation (Ingani 1987a).

Enfin, l'innocuité de la riboflavine (LD₅₀ > 10 g/kg, chez le rat par voie orale) et son dosage aisé en milieu biologique (par spectrofluorimétrie) en font un bon candidat comme traceur pour l'évaluation du temps de résidence gastrique d'une forme flottante. Soulignons

également le caractère non invasif de cette méthode qui ne nécessite du volontaire que des prélèvements d'urine à des temps prédéfinis, sans recours à des prélèvements plasmatiques plus invasifs.

D.2. Les formulations à base de riboflavine

Nous avons mis au point deux formulations à libération prolongée de RF, une formulation flottante (RFF) et une formulation non flottante (RFNF). Le tableau 8 décrit les formulations ainsi que les conditions de fabrication des microbilles utilisées pour l'étude *in vivo*.

Comme le montre ce tableau nous avons choisi d'utiliser la riboflavine sous forme de sel : riboflavine 5'phosphate sodique qui présente une meilleure solubilité dans l'eau que la riboflavine. La riboflavine 5'phosphate sodique (RF5'PNa) présente les mêmes caractéristiques d'absorption que la RF. Administrée par voie orale, la RF5'PNa subit une déphosphorylation rapide dans l'intestin, suivie d'une phosphorylation au niveau de la muqueuse intestinale avant son transfert dans le sang. La RF5'PNa est donc résorbée et éliminée par voie urinaire sous forme de RF (Ingani, 1987a).

Tableau 8 : Les formulations et les conditions de fabrication des microbilles flottantes (RFF) et non flottantes (RFNF) de riboflavine utilisées pour l'étude *in vivo*

Dénomination	Formulation (% m/m)	Conditions opératoires	Rendement* (%)
RFF	<u>Matrice : (250 g)</u>		69,7
	Riboflavine 5'phosphateNa 12	<u>Granulation :</u>	
	Précirrol® 15	IS : 1800 rpm	
	Compritrol® 53	CS : 130 rpm	
	NaHCO ₃ 8	Double paroi : 45°C	
	Acide tartrique 7	<u>Sphéronisation :</u>	
	Methocel K100 5	IS : 800 rpm	
	<u>Enrobage: (70 g)</u>	CS : 4000 rpm	
	Précirrol® 20	TS : 18min	
	NaHCO ₃ 5	Enrobage: 5 min	
	Acide tartrique 3		
RFNF		<u>Granulation :</u>	67,5
	<u>Matrice : (250 g)</u>	IS : 1800 rpm	
	Riboflavine 5'phosphate Na 12	CS : 130 rpm	
	Précirrol® 15	Double paroi : 45°C	
	Compritrol® 15	<u>Sphéronisation :</u>	
	Lactose 450 Me ad 100	IS : 800 rpm	
		CS : 4000 rpm	
		TS : 25 min	

* Le rendement est exprimé par le pourcentage de microbilles dont le diamètre géométrique est compris entre 1250 µm et 2000 µm.

Nous avons d'abord fabriqué des microbilles de RF5'PNa en nous basant sur une formulation comparable à celles que nous avons proposées comme formulations flottantes Placebo ou formulation au chlorhydrate de tétracycline (sections C.1 et C.2 du présent chapitre) ; à savoir :

Une matrice (250 g) contenant (% m/m) :

Riboflavine 5' phosphate sodique	12
Compritol®	22
Précirol®	15
NaHCO ₃	8
Acide tartrique	7
Methocel K100	5
Lactose 450 Me	100

Un enrobage (45 g) contenant (% m/m) :

Précirol®	10
NaHCO ₃	5
Acide tartrique	3

Bien que la capacité de flottabilité in vitro des microbilles issues de cette formulation se soit montrée satisfaisante, puisque le poids résultant se maintient positif durant près de 800 minutes et le pourcentage de microbilles flottantes est aux environs de 70 % durant les huit premières heures du test de comptage des microbilles, cette formulation n'a pas été retenue. En effet, la cinétique de libération de la RF5'PNa à partir des microbilles issues de cette formulation s'est révélée être trop rapide. Le test de dissolution effectué dans un tampon phosphate 0,05 M à pH 3,0 a montré une libération de l'agent traceur de 57 % $\pm$ 3 % après 60 minutes de test. La libération de RF5'PNa atteint les 100 % $\pm$ 2 % au bout de 7 heures de test.

Nous avons dès lors renforcé la quantité de corps gras en présence dans la formulation afin de ralentir la libération de la RF5'PNa. C'est ainsi que nous en sommes arrivés à proposer la formulation flottante RFF du tableau 8. Par ailleurs, afin de maintenir des cinétiques de libération du traceur comparables à partir de la formulation flottante (RFF) et non flottante (RFNF), la quantité de Compritol® a été réduite à 15 % (m/m) dans la matrice

non flottante (tableau 8). Ceci s'explique par le fait que la matrice non flottante ne contient pas de mélange effervescent qui peut être responsable d'une libération plus rapide de l'agent traceur.

D.3. Les résultats de dissolution in vitro des formulations RFF et RFNF

Nous avons effectué des essais de dissolution in vitro sur les microbilles issues des formulations RFF et RFNF décrites par le tableau 8. Ces essais ont été précédés du dosage de la RF5'PNa, par spectrophotométrie visible à 445 nm. La quantité de RF5'PNa ($n = 3$) retrouvée dans les microbilles RFF est de $100 \% \pm 2\%$ et dans les microbilles RFNF de $103 \% \pm 5 \%$. Les essais de dissolution ont été conduits dans un tampon phosphate 0,05 M à différentes valeurs de pH : pH = 1,5 (figure 25) ; pH = 3,0 (figure 26) ; pH = 6,5 (figure 27). Les milieux sont additionnés de 0,05 % (m/v) de polysorbate 20. Les courbes de dissolution de la RF5'PNa, présentent toutes un « burst effect » assez important. La dissolution de la RF5'PNa à pH 6,5 est beaucoup plus rapide qu'aux pH acides. Ceci s'explique par une meilleure solubilité de la RF5'PNa à pH 6,5. En effet, à titre indicatif, la solubilité de la RF5'PNa dans une solution aqueuse à pH 6,9 est de 112 mg/ml, alors qu'elle atteint 43 mg/ml à pH 3,8 (Merck, 1996).

Malgré la réduction importante de la quantité de CG dans la formulation non flottante, nous obtenons toujours une cinétique de libération un peu plus lente pour cette forme comparativement à la forme flottante. La présence du mélange effervescent dans la formulation RFF accélère la libération de la RF5'PNa. Nous avons tout de même retenu ces formulations pour les essais *in vivo*. D'autant que ces différences de cinétiques de libération ne sont pas trop marquées durant les 4 premières heures du test et que des les travaux relatés dans la littérature renseignent le pic d'excrétion urinaire de la riboflavine endéans les premières heures qui suivent la prise (Ingani, 1987a).

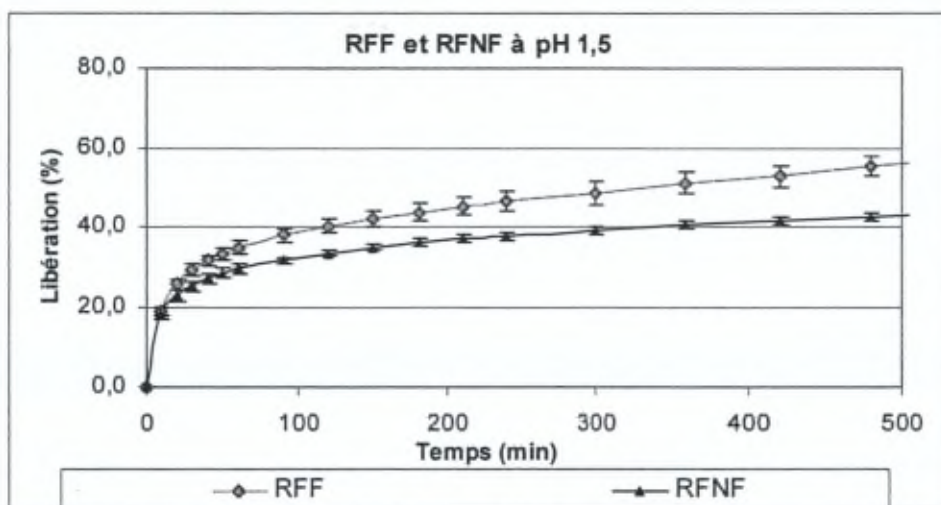


Figure 25: Les profils de libération de la riboflavine 5' phosphate sodique à partir des microbilles flottantes (RFF) et non flottantes (RFNF). Tampon phosphate 0,05M à pH 1,5. ($m \pm SD$, $n=5$)

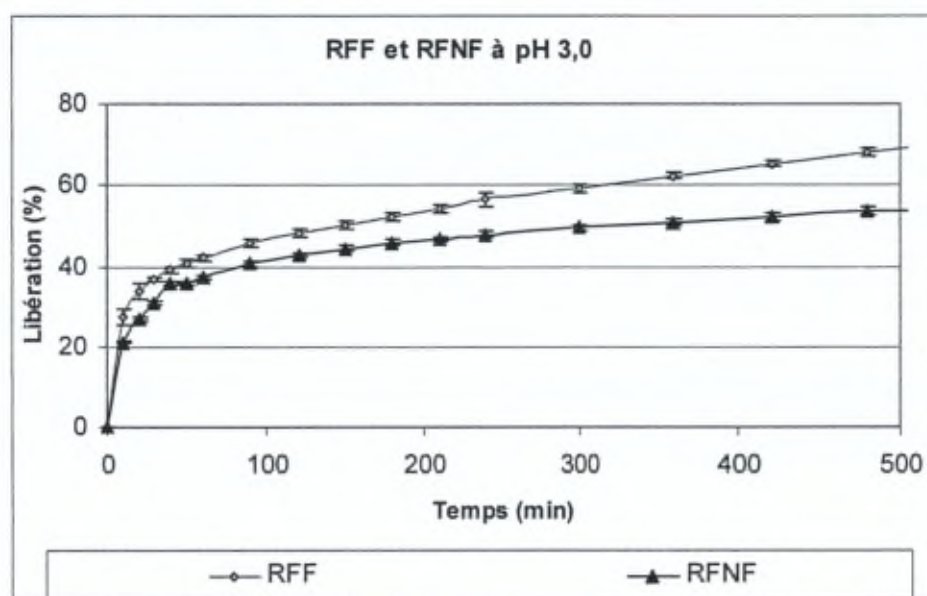


Figure 26: Les profils de libération de la riboflavine 5' phosphate sodique à partir des microbilles flottantes (RFF) et non flottantes (RFNF). Tampon phosphate 0,05M à pH 3,0. ($m \pm SD$, $n=5$)

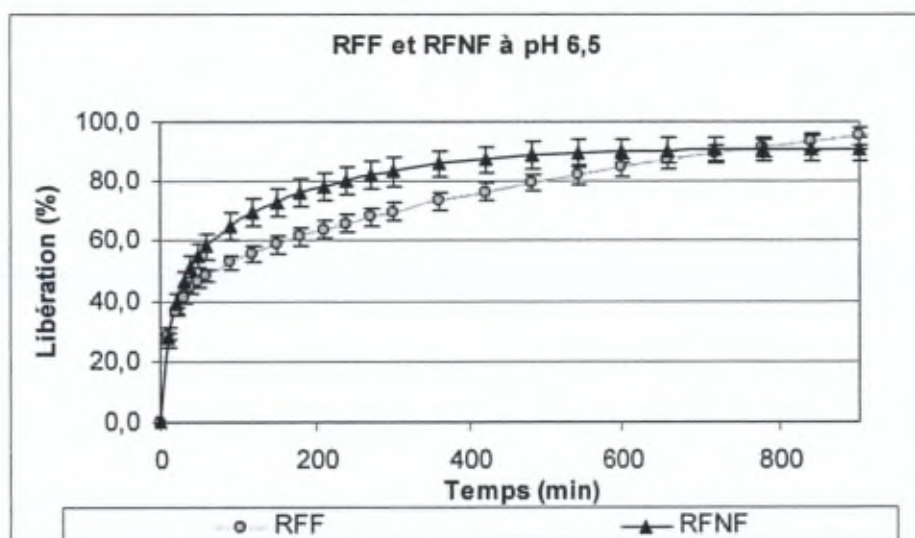


Figure 27: Les profils de libération de la riboflavine 5' phosphate sodique à partir des microbilles flottantes (RFF) et non flottantes (RFNF). Tampon phosphate 0,05M à pH 3,0. ($m \pm SD$, $n=5$)

D.4. L'estimation de la capacité de flottabilité des microbilles *in vitro*

De la même manière que pour les formulations flottantes décrites précédemment, l'estimation *in vitro* de la capacité de flottabilité des microbilles RFF a été effectuée grâce au suivi de l'évolution du poids résultant au cours du temps et au comptage du pourcentage de microbilles flottantes à la surface d'une solution d'HCl 0,1N additionnée de 0,05 % (m/v) de polysorbate 20.

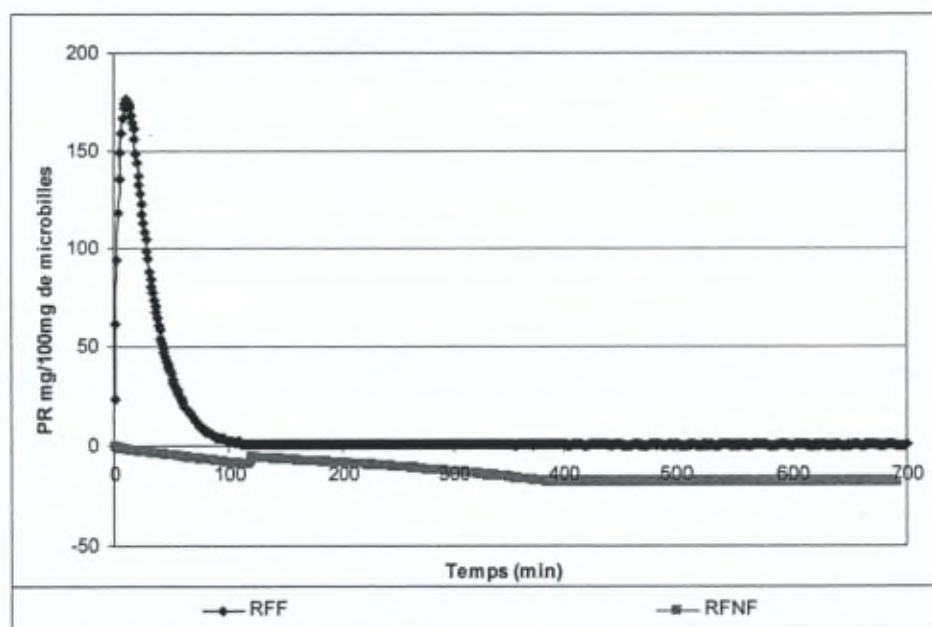


Figure 28: Evolution du poids résultant obtenu à partir des microbilles flottantes de riboflavine 5' phosphate sodique (RFF) et non flottantes (RFNF)

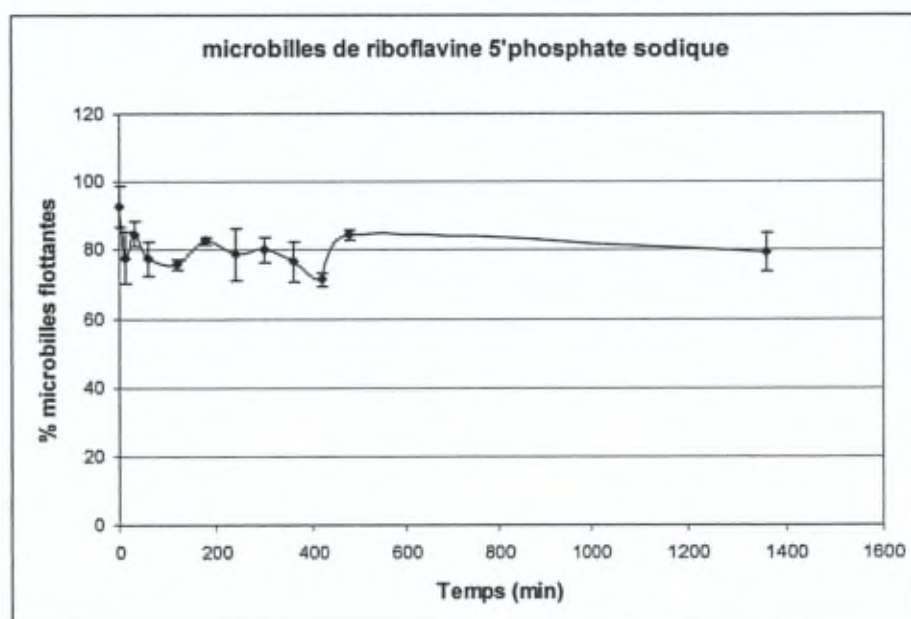


Figure 29: Le pourcentage de microbilles flottantes obtenu à partir de la formulation RFF. (m ± SD, n=3)

La capacité de flottabilité des microbilles de RF5'PNa, estimée *in vitro* s'est montrée satisfaisante. En effet, le poids résultant traduit une forte poussée initiale, puis se maintient à

des valeurs supérieures à zéro à l'opposé, la courbe du PR relatif aux microbilles non flottantes (figure 28).

Le pourcentage des microbilles flottantes (figure 29) est compris entre 70 % et 80 % durant plus de 8 heures, alors que celui des microbilles non flottantes est seulement de 3 % après 30 min de test et de 0 % au bout d'une heure de test. Il se maintient à cette valeur nulle pendant 24 h.

La capacité de flottabilité de la forme flottante ayant été prouvée *in vitro*, son évaluation *in vivo* peut dès lors être envisagée.

D.5. L'estimation de la flottabilité des microbilles in vivo

D.5.1. Protocole expérimental

L'étude proposée concerne 9 volontaires adultes masculins sains, âgés de 23 à 45 ans, ne subissant aucune médication et n'ayant pas souffert d'antécédents d'affections gastro-duodénales. Les volontaires devront lire attentivement un formulaire de consentement, le signer et remplir une fiche signalétique avant leur participation à l'étude. Ces documents ont été approuvés par le comité d'éthique de l'Hôpital Erasme ; ils sont repris en annexe (annexes 1 et 2)

Les volontaires doivent ingérer selon un protocole établi des gélules opaques contenant la forme divisée flottante (RFF) ou non flottante (RFNF). La dose en riboflavine 5' phosphate sodique ingérée par session est de 20 mg.

L'étude est effectuée de manière randomisée, en double aveugle. Elle se déroule en deux sessions espacées d'une période de « wash out » de 6 jours.

Les volontaires sont divisés en deux groupes : « groupe à jeun » et « groupe repas ».

Tableau 9 : Design de l'étude *in vivo*

Nombre de sujets	Période 1 (jour 1)	Jours 2 à 7	Période 2 (jour 8)
4 (groupe à jeun)	RFF ou RFNF	« Wash out »	RFNF ou RFF
5 (groupe repas)	RFF ou RFNF	« Wash out »	RFNF ou RFF

alimentaire suivi par les volontaires durant les sessions, ainsi que les différents temps de prélèvement des échantillons urinaires.

Le protocole de l'étude par session :

- A son arrivée, à **7 h 45 min.**, le volontaire est invité à vider sa vessie.
- Selon le groupe auquel il appartient : « groupe à jeun » ou « groupe repas », il suivra le régime alimentaire qui lui est attribué (tableau 10). L'attribution du groupe se fait de manière randomisée
- Les urines sont récoltées après les temps **1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h, 14 h et 23 h**. Le temps zéro est le temps correspondant à l'administration de la forme.
- Les volontaires reçoivent des flacons bruns étiquetés (N° échantillon, code du volontaire, heure de l'excrétion urinaire) destinés à recueillir la totalité des urines ; ils sont conservées au frigo à 4 °C jusqu'à la fin de la session ou remis directement au responsable de l'étude. A chaque prélèvement, la totalité des urines est récoltée.
- L'analyste introduira alors dans les flacons 5 gouttes d'HCl 12 N. Les échantillons sont conservés au congélateur (-18°C) jusqu'à leur analyse.
- La riboflavine contenue dans les urines est dosée par une méthode spectrofluorimétrique inspirée de la littérature (Ingani, 1987a).



Tableau 10 : Le régime alimentaire suivi par les volontaires et les heures prévues pour les prélèvements d'échantillons durant une session

Repas	Groupe à jeun (n=4)	Groupe repas (n=5)	Prélèvements
7h45			Vidange de la vessie
8h00	-	200 ml de jus d'orange 105 g de pain gris (3 tranches) 10 g de margarine 20 g de confiture 50 g de fromage maigre 150 ml de thé + 1 sucre	
8h30	Administration d'une gélule avec 200 ml d'eau plate Aucun repas n'est autorisé pendant 4h	Administration d'une gélule avec 200 ml d'eau plate	t ₀ (pas de prélèvement)
9h30			t _{1h}
10h20	200 ml d'eau plate	85 g carré confiture 150 ml de thé + 1 sucre	
10h30			t _{2h}
11h30	200 ml d'eau plate	200 ml d'eau plate	t _{3 h}
12h30			t _{4h}
Déjeuner 12h45	200 ml potage vert 150 g de poulet rôti 50 g sauce tomate 100 g pommes de terre cuites à l'eau 175 ml d'eau minérale 150 ml de thé + 1 sucre	200 ml potage vert 150 g de poulet rôti 50 g sauce tomate 100 g pommes de terre cuites à l'eau 175 ml d'eau minérale 150 ml de thé + 1 sucre	
14h30			t _{6 h}
Goûter 15h15	75 g de tarte aux pommes 150 ml de thé + 1 sucre	75 g de tarte aux pommes + 150 ml de thé + 1 sucre	
16h30			t _{8 h}
Energie totale (Kcal)	729	1634	
Apport hydrique total (g)	1290	1530	
Le soir	Repas Libre et récolte des urines à domicile		
22h30			t _{14 h}
7h30 du matin			t _{23 h}

Le dosage de la riboflavine dans les urines

Le dosage de la RF dans les urines est effectué suivant une méthode spectrofluorimétrique décrite par Ingani (Ingani, 1987a) :

- 4,0 ml d'urine sont introduits dans un tube à centrifuger muni d'un bouchon fermant hermétiquement ; on leur ajoute 0,4 ml d'une solution 3,25 M d'acide acétique tamponnée à pH 3,5 par l'addition d'une solution de NaOH 1 N, puis 1 ml d'une solution de KMnO_4 (4 % m/v) qu'on laisse réagir pendant 1 minute.
- L'excès de KMnO_4 est ensuite réduit par 0,1 ml d'eau oxygénée à 30 %. Après addition de 4 g de sulfate ammonique et de 3,0 ml d'alcool benzylique saturé d'eau, on agite le tube pendant 3 minutes. Le mélange est centrifugé à 3000 tours par minute pendant 5 minutes.
- On prélève 1,0 ml de la solution benzylique surnageante, auquel on additionne 7,0 ml d'une solution à 45 % (v/v) d'éthanol dans une solution 0,1 N d'acide acétique / 0,1 N d'acétate sodique.

La mesure de l'intensité de fluorescence émise à 522 nm est effectuée à l'aide d'un spectrofluorimètre (Perkin Elmer LS 50B, Bucks, Angleterre), muni d'un logiciel de traitement des données : FL Winlab. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 440 nm, les fenêtres de mesure sont de 3 nm. La mesure s'effectue contre un blanc constitué de 1,0 ml d'alcool benzylique saturée en eau et 7,0 ml de la solution éthanolique d'acide acétique/acétate sodique.

L'étalonnage s'effectue à l'aide de solutions de riboflavine de concentrations égales à 0,5 ; 1 ; 2 ; 3 ; 5 et 10 $\mu\text{g/ml}$ ayant subi les mêmes opérations que les échantillons d'urines.

La dilution des urines est effectuée de manière à obtenir une concentration en RF comprise entre 0,5 et 10 $\mu\text{g/ml}$.

D.5.2. Résultats et discussion

Le but de cette étude *in vivo* est de comparer des microbilles flottantes (RFF) à des microbilles non flottantes (RFNF). L'hypothèse posée est que la forme RFF séjournant plus longtemps au-dessus du site d'absorption de la riboflavine, elle améliore la résorption de

cette molécule. En comparaison, la RFNF passe plus rapidement la fenêtre d'absorption de la riboflavine.

La quantité totale de riboflavine (quantité cumulée en mg) excrétée en 23 heures est représentée, pour chaque volontaire, dans le tableau 11. Nous constatons que cette quantité est systématiquement plus élevée, chez tous les sujets, après l'administration de la forme flottante (RFF) et ce quel que soit le groupe du sujet (à jeun ou repas). La comparaison statistique (test t de student sur échantillons pairés) des quantités cumulées excrétées en 23 h par les volontaires à jeun après l'administration de RFF et RFNF ne montre pas de différence significative ($p=0,056$) entre les deux formes galéniques. Par contre, au sein du groupe repas, une différence significative ($p<0,05$) existe entre les quantités cumulées excrétées en 23 h après l'administration des microbilles flottantes et non flottantes. Les figures 30 et 31 reprennent les quantités moyennes en riboflavine excrétées par les volontaires au sein de chaque groupe. Bien que les variabilités inter-individuelles soient assez grandes, l'examen de ces figures confirme la tendance d'excrétion d'une quantité plus importante de riboflavine lors de l'administration de la forme flottante.

Tableau 11 : Les quantités cumulées de riboflavine (mg) éliminées dans les urines (de t_0 à t_{23h})

Volontaire	RFF (Q, mg)	RFNF (Q, mg)
<i>Groupe à jeun</i>		
1	24	16
2	17	14
3	24	13
4	14	11
Moyenne $\pm$ SD	20 ± 5	14 ± 2
<i>Groupe repas</i>		
1	21	13
2	30	14
3	22	19
4	24	21
5	30	16
Moyenne $\pm$ SD	26 ± 4	17 ± 3

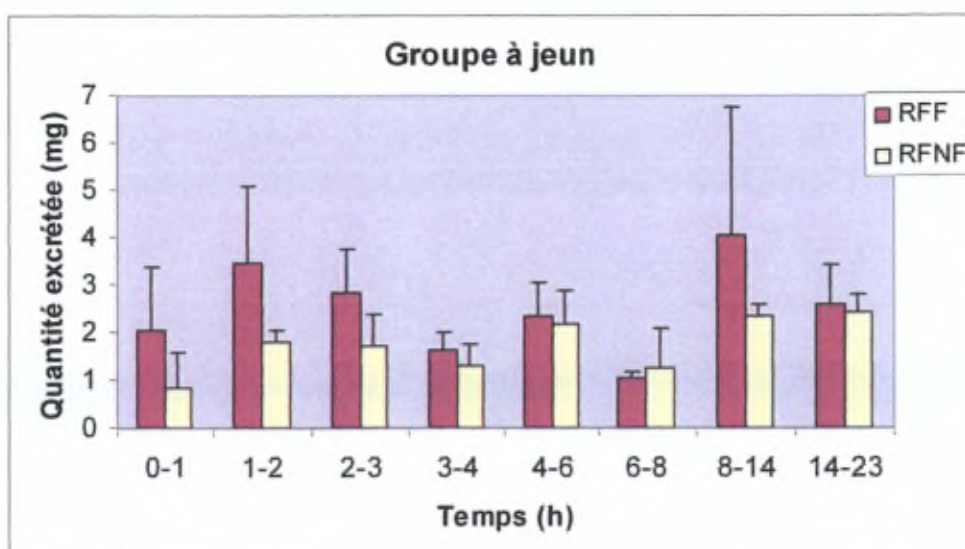


Figure 30 : Les quantités moyennes de riboflavine excrétées en fonction du temps chez les volontaires à jeun (n=4)

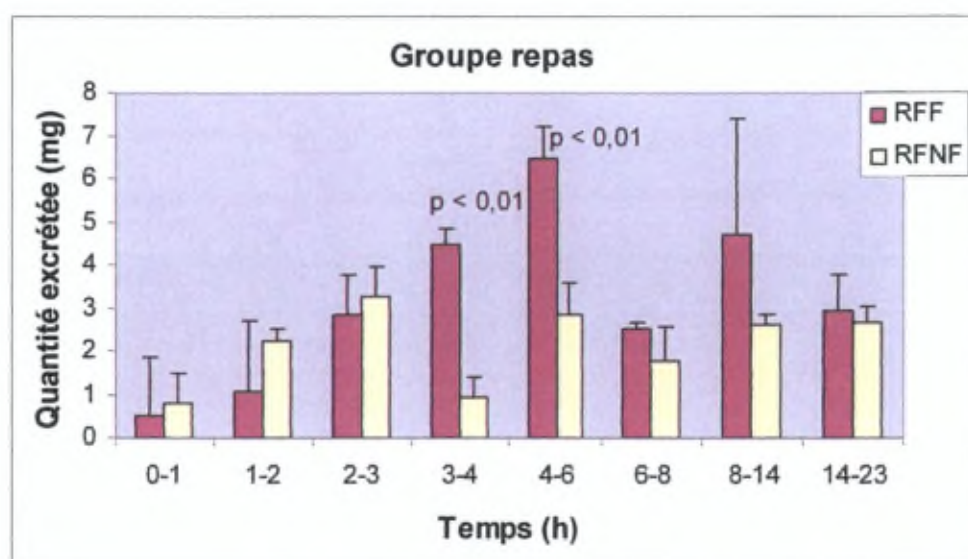


Figure 31 : Les quantités moyennes de riboflavine excrétées en fonction du temps chez les volontaires du groupe repas (n=5)

A l'examen des figures 30 et 31, nous constatons qu'après l'administration de repas caloriques (tableau 10), nous obtenons des résultats significativement ($p < 0,01$) supérieurs pour la quantité de RF excrétée lors de la prise des microbilles flottantes. Ceci est vraisemblablement dû au fait que la vidange gastrique des formes flottantes est alors moins importante.

Nous avons par ailleurs comparé les vitesses d'excrétion urinaire en fonction du temps des deux types de microbilles, les résultats sont repris par les figures 32 à 35. Les courbes 32 et 33 représentent les vitesses d'excrétion urinaire moyennes obtenues par groupe. Les figures 34 et 35 reprennent les vitesses d'excrétion urinaire obtenues, par sujet, pour chaque forme (RFF et RFNF).

De la même manière, nous constatons une influence de la prise du repas sur la vitesse d'excrétion urinaire. En effet, à jeun (figure 32), nous n'observons pas de différence dans les pics de vitesse d'excrétion urinaire (T_{max}), ils ont lieu à $t = 2$ h pour les microbilles flottantes comme non flottantes. Par contre, dans le groupe repas (figure 33), nous observons un retard d'une heure dans le pic de vitesse d'excrétion urinaire de la forme flottante par rapport à la non flottante. Par ailleurs, le profil de la courbe de vitesse d'excrétion urinaire de la forme flottante est plus étalé que celui de la forme non flottante.

A jeun, les microbilles, sortent probablement groupées de l'estomac alors qu'après la prise d'une succession de repas, les microbilles flottantes sont vidangées progressivement par l'estomac, ce qui expliquerait les différences entre les T_{max} observés pour le groupe repas et celui du groupe à jeun.

Ces résultats sont en accord avec ce qui est relaté dans la littérature, aussi bien pour les formes divisées que monolithiques (Sato et col. 2003, Ingani et col. 1987b). Sato et col. (2003) ont effectué une étude similaire portant sur l'excrétion urinaire de la RF contenue dans des microsphères creuses flottantes chez des volontaires humains. Cette excrétion urinaire a été comparée à celle obtenue à partir de microbilles non flottantes. Les volontaires ont été divisés en deux groupes, un groupe à jeun et un groupe repas. Ces auteurs ont trouvé une excrétion urinaire en RF supérieure à partir des microsphères flottantes comparativement aux microsphères non flottantes. Ce constat a été relevé aussi bien dans le groupe à jeun que dans le groupe repas, mais il est plus prononcé au sein du groupe repas. Selon ces auteurs, la prise de repas améliore la flottabilité des microsphères puisque la quantité totale excrétée est supérieure pour les microsphères creuses.

Ingani (1987b) a testé l'excrétion urinaire de la riboflavine contenue dans une forme monolithique de type matrice hydrophile flottante à double couche. Cette excrétion a été comparée à celle obtenue à partir d'une matrice classique non flottante et de comprimés à libération immédiate. Cet auteur a constaté que comparativement aux comprimés à libération immédiate, les profils d'excrétion urinaire de la RF au cours du temps sont plus étalés après l'administration du comprimé flottant. Par ailleurs, il a relevé que le pourcentage en RF

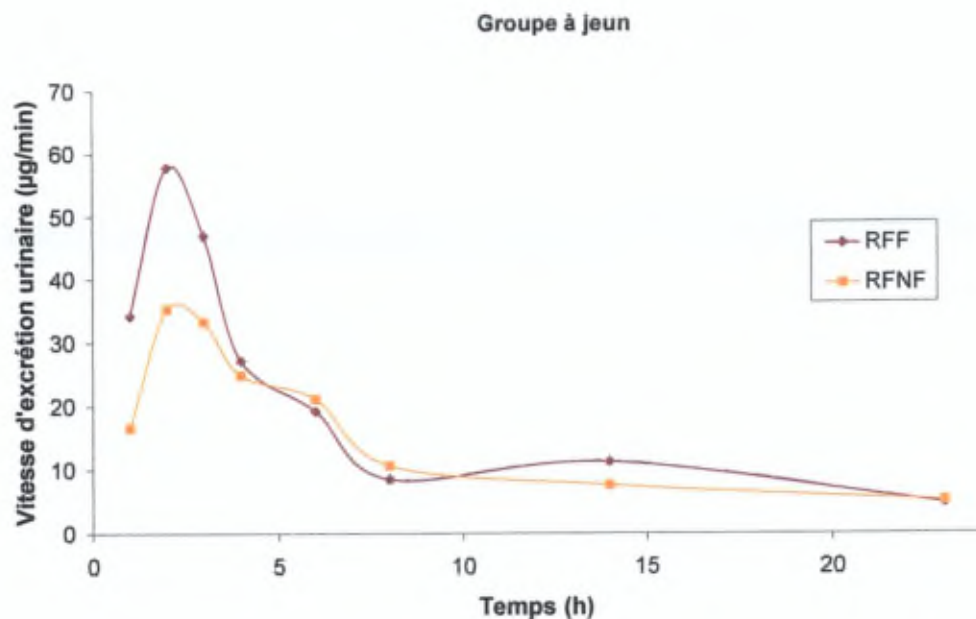


Figure 32 : L'évolution de la vitesse moyenne d'excrétion urinaire chez les volontaires du groupe à jeun (n=4)

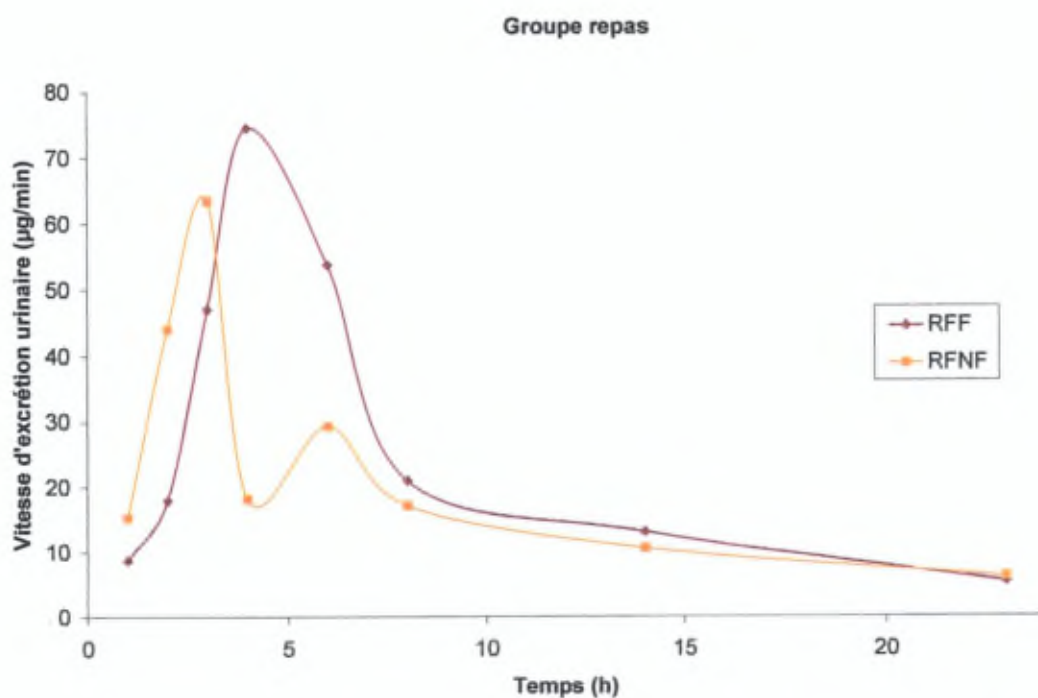


Figure 33 : L'évolution de la vitesse moyenne d'excrétion urinaire chez les volontaires du groupe repas (n=5)

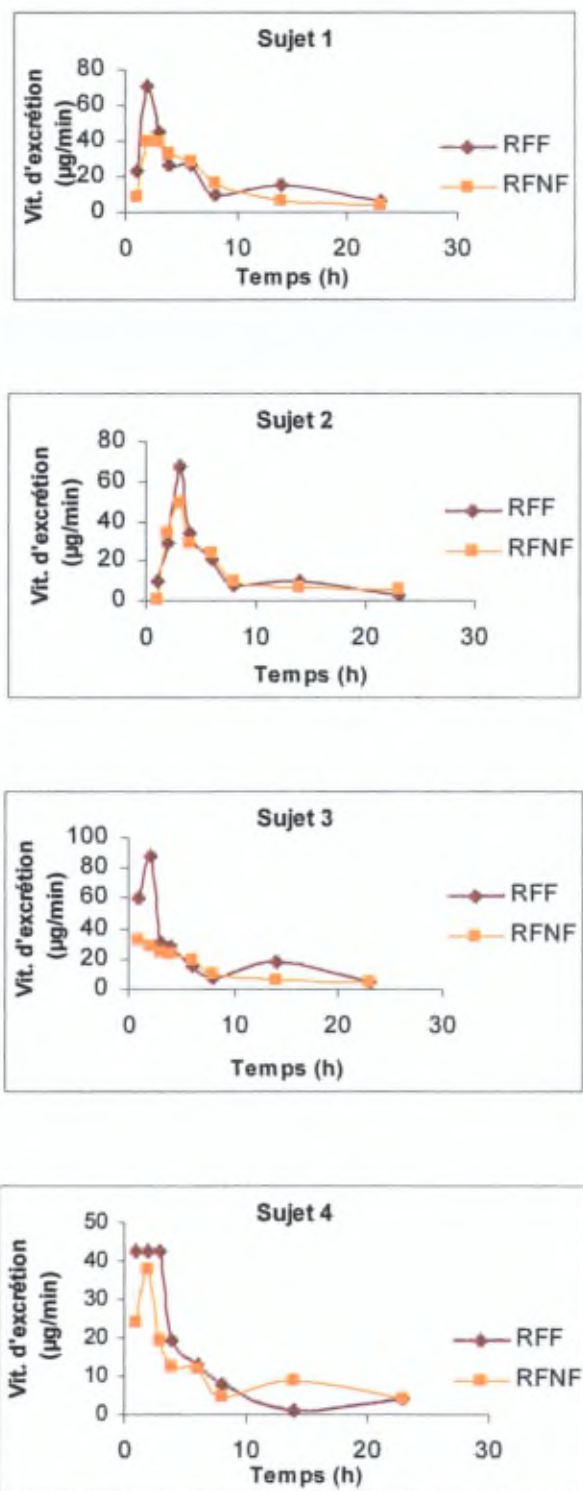


Figure 34 : Les vitesses d'excrétion urinaire obtenues chez les volontaires du groupe à jeun (n=4)

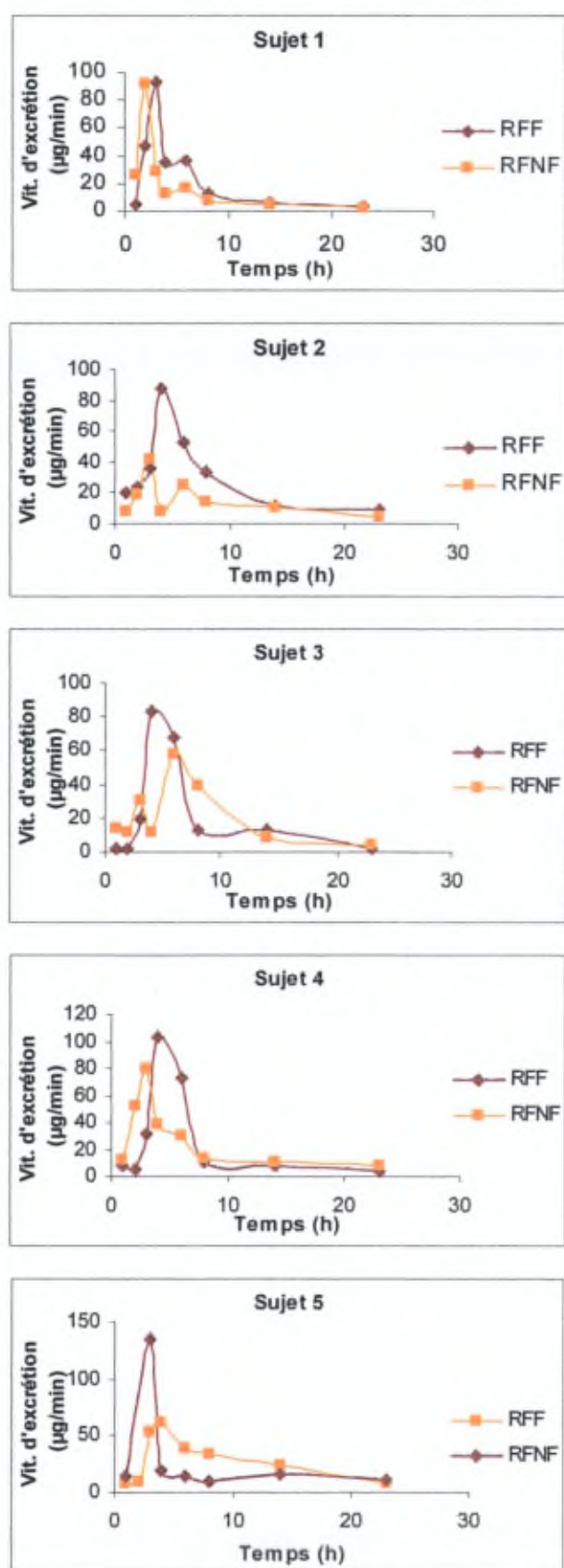


Figure 35 : Les vitesses d'excrétion urinaire obtenues chez les volontaires du groupe repas ($n=5$)

éliminée par voie urinaire endéans les 24 h est systématiquement plus élevé chez tous les sujets après l'administration de la forme flottante et ce qu'ils soient à jeun ou non. Cependant, il a observé qu'à partir de la troisième heure, la quantité de RF excrétée est plus élevée après l'administration des comprimés flottants au sein du groupe à jeun, tandis qu'elle est plus élevée à partir de la sixième heure dans le groupe repas. Une différence aussi importante n'a pas été relevée au cours de nos essais. Ce décalage important, entre les groupes à jeun et repas décrit par cet auteur, s'explique sans doute par la nature unitaire de la forme administrée (comprimé) ainsi que par des cinétiques de libération *in vitro*, beaucoup plus lentes que celles que nous avons obtenu.

D.5.3. Conclusion

Nous avons mené une étude *in vivo* sur l'appréciation de la flottabilité de microbilles de riboflavine. Cette étude a porté sur neuf volontaires masculins sains qui ont été divisés en deux groupes, un groupe à jeun et un groupe repas. Les volontaires ont suivi durant les sessions d'étude un régime alimentaire standardisé.

Chaque volontaire a reçu des microbilles de riboflavine flottantes (RFF) *versus* des microbilles de riboflavine non flottantes (RFNF). Dans le groupe repas, la quantité totale de riboflavine excrétée endéans 23 h est significativement ($p < 0,05$) plus élevée après l'administration des microbilles flottantes. Par contre, la différence est non significative au sein du groupe à jeun ($p = 0,056$).

Le site de résorption de la riboflavine étant situé dans la partie proximale de l'intestin grêle, le maintien des microbilles par leur flottaison en amont de ce site améliore la résorption de cette molécule. Par ailleurs, la prise de repas successifs, en accord avec ce qui est relaté dans la littérature (Moës., 1993), semble favoriser la flottabilité des microbilles.

III.3.4. Conclusion

A la suite de nombreux essais d'orientation, nous avons retenu les formulations suivantes pour aboutir à des microbilles flottantes par le procédé de pelletisation thermoplastique :

Formulation A :

Matrice (250 g) % (m/m)	
Principe actif	50
Compritol [®]	22
Précirol [®]	15
Bicarbonate Sodique	8
Methocel K100	5
Enrobage (37,5 g) % (m/m)	
Précirol [®]	10
Bicarbonate Sodique	5

Formulation B :

Matrice (250 g) % (m/m)	
Principe actif	50
Compritol [®]	22
Précirol [®]	15
Bicarbonate Sodique	8
Methocel K100	5
Enrobage (25 g) % (m/m)	
Précirol [®]	5
Bicarbonate Sodique	5

La *formulation A* est une formulation contenant 37 % (m/m) de matières grasses à faible valeur HLB dans la matrice et 10 % (m/m) en enrobage, ce qui en fait une formulation à libération prolongée. La *formulation B* contient moins de corps gras : 25 % (m/m) dans la matrice et 5% (m/m) en enrobage. C'est une formulation qui serait destinée à des principes actifs à temps de demi-vie moyen à long. Les microbilles, obtenues à partir de ces formulations, possèdent de bonnes propriétés de flottabilité *in vitro*.

Cependant, vu le volume important occupé par le principe actif au sein de la forme, les propriétés physico-chimiques de celui-ci influencent grandement la flottabilité de la forme. Nous avons ainsi constaté que des microbilles fabriquées avec du chlorhydrate de ciprofloxacine comme principe actif présentaient de moins bonnes propriétés de flottabilité que des microbilles placebo. Une granulométrie trop fine ($\pm 10 \mu\text{m}$) du principe actif pourrait expliquer ce phénomène en multipliant les liens interparticulaires lors du procédé de pelletisation thermoplastique, diminuant ainsi la porosité de ces microbilles. Cette hypothèse a été confirmée en comparant les microphotographies obtenues par SEM correspondant aux coupes effectuées sur les microbilles de ciprofloxacine et les microbilles placebo flottantes. Par ailleurs, des microbilles de chlorhydrate de tétracycline et de théophylline ont montré une bonne flottabilité *in vitro*, alliée à une libération prolongée du principe actif.

In vivo, l'estimation de la flottabilité de microbilles de riboflavine a été effectuée de manière indirecte. Nous avons dosé la quantité de riboflavine excrétée dans les urines après l'absorption d'une forme flottante et non flottante. Au sein du groupe repas, les quantités en riboflavine excrétées par les volontaires ayant reçu les microbilles flottantes de riboflavine se sont montrées significativement ($p < 0,05$) plus importantes. Ce qui est probablement dû au séjour plus long de la forme flottante en amont du site d'absorption de la riboflavine.

Nous pouvons dès lors conclure que nous avons montré une nouvelle application à la technique de pelletisation thermoplastique. Elle consiste en la mise au point de microbilles flottantes à libération prolongée. Outre la simplicité et la rapidité de la méthode de fabrication, les formulations que nous proposons permettent l'incorporation de fortes charges en principe actif ($> 40 \% \text{ m/m}$). Ces deux points constituent des avantages considérables comparativement aux formulations relatées dans la littérature (Whitehead., 1998a ; Joseph et col. 2002 ; Torrado et col., 2004).

IV. Conclusion Générale

La pelletisation thermoplastique est un moyen simple et rapide pour aboutir à la fabrication de formes divisées de type microbilles. C'est un procédé en une étape, qui ne nécessite ni eau ni solvants organiques, en mettant à profit le pouvoir liant d'excipients facilement fusibles (plages de fusion comprises entre 50 et 70 °C). Pour peu que les excipients choisis soient de nature lipophile, ce procédé devient alors un moyen aisé pour la fabrication d'une forme divisée à libération prolongée.

Notre choix s'est porté sur l'utilisation d'une combinaison de deux excipients lipidiques de la famille des Gélucires. Le Précirol® (palmito-stéarate de glycérol, plage de fusion = 53-57°C) et le Compritol® (béhénate de glycérol, plage de fusion = 69-74°C).

Avant d'entreprendre la mise au point des microbilles, une étude de préformulation a porté sur les propriétés physico-chimiques des excipients lipidiques. Les analyses des échantillons de Compritol® et de Précirol® par diffraction aux rayons X ont montré que ces composés « recristallisent » sous une structure partiellement amorphe qui évolue avec le temps en une structure cristalline. La vitesse avec laquelle le composé évolue vers cette structure cristalline dépend de la longueur des chaînes d'acides gras qui estérifient le glycérol et des conditions de conservation. Plus longues sont les chaînes carbonées de l'acide gras, plus lente est cette évolution. Plus la température de conservation se rapproche de la plage de fusion du corps gras, plus rapide est la transformation. Les analyses calorimétriques par DSC et HSM ont montré que ces deux corps gras présentent des plages de fusion fort distinctes. De plus, cette caractéristique est conservée pour leurs mélanges binaires. Les études rhéologiques nous ont révélé qu'à 50°C les mélanges de ces corps gras sont suffisamment ramollis pour subir une déformation leur permettant de jouer le rôle d'agent liant.

Partant des données concernant les caractéristiques physico-chimiques des excipients lipidiques, nous avons mis au point les conditions de fabrication des microbilles par pelletisation thermoplastique dans un mélangeur granulateur à haute vitesse. Après avoir testé deux appareils - le Pellmix P/L 1/8 et le Mi Pro® - notre choix s'est porté sur ce dernier pour l'avantage majeur qu'il présente en terme de contrôle de la température de la masse au cours du procédé de fabrication. En effet, des essais préliminaires nous ont montré l'importance de ce contrôle afin d'éviter tout phénomène de « surmouillage » et l'agglomération des

microbilles qui en résulte. En accord avec les études de rhéologie, nous avons observé lors de ces essais que la température critique de 50°C ne doit pas être dépassée si l'on veut éviter ce phénomène de « surmouillage » des particules.

Le procédé de pelletisation thermoplastique peut être décrit comme comportant deux phases : une phase de granulation et une phase de sphéronisation. Nous avons mis au point les paramètres de fabrication optimaux pour chacune de ces phases.

Durant *l'étape de granulation* du mélange :

- La température de la double paroi : 45 à 55 °C
- La vitesse du bras du mélangeur est maintenue à 1800 rpm
- La vitesse du chopper est maintenue à 130 rpm

Durant *l'étape de sphéronisation* des particules :

- La température de la double paroi : 45 à 55 °C
- La vitesse du bras du mélangeur est fixée à 800 rpm
- La vitesse du chopper est portée à 4000 rpm
- La durée de sphéronisation est de 8 à 25 min
- Un balayage de la masse par un courant d'air à température ambiante (2 à 3 m³/h)

Nous avons testé des formulations contenant 15 % (m/m) du corps gras qui possède la plus basse plage de fusion, à savoir le Précirol® et des quantités croissantes allant de 3 à 65 % (m/m) de Compritol®. Les essais de dissolution menés sur ces formulations avec le chlorhydrate de phényléphrine comme agent traceur, ont montré qu'une quantité de 25 % (m/m) du mélange de corps gras (15 % Précirol et 10 % Compritol) était suffisante pour ralentir la libération du traceur.

Nous avons testé la capacité de fabrication de microbilles à libération prolongée moyennant ce procédé, en incorporant une forte charge (75 % (m/m)), en principe actif (théophylline, kétoprofène ou chlorhydrate de ciprofloxacine) dans la formulation, le reste étant occupé par les corps gras. Nous y sommes parvenus en modulant légèrement deux paramètres de fabrication : **la température de la double paroi** et **la durée de sphéronisation**. Ces modifications se sont révélées nécessaires puisque les propriétés granulométriques des principes actifs testés n'étaient pas similaires.

En raison de l'évolution de la structure cristalline du Précir[®] et du Compritol[®] en fonction du temps et des conditions de stockage, des études de stabilité ont porté sur les formes finies contenant du chlorhydrate de phényléphrine et du chlorhydrate de ciprofloxacine. Les microbilles ont été conservées dans différentes conditions de température et d'humidité relative (4°C, 25°C-60 % HR et 40°C – 75 % HR). Ces études ont montré que si la température atteinte lors du procédé de pelletisation est de l'ordre de 50°C, elle n'est pas pour autant responsable de la dégradation des deux principes actifs testés. Cependant, nous avons relevé une instabilité des microbilles de chlorhydrate de **phényléphrine** après leur conservation durant six semaines à 40°C et 75 % d'humidité relative. Cette altération s'est accompagnée d'une modification importante du profil de libération du principe actif. Des essais par chromatographie liquide ont montré l'émergence d'un pic de dégradation de la phényléphrine, probablement par oxydation, pour l'échantillon conservé sous cette condition drastique. Par contre, les microbilles de chlorhydrate de ciprofloxacine conservées pendant six mois à 40°C et 75 % HR n'ont pas vu leurs propriétés de libération prolongée altérées. Ce principe actif n'a d'ailleurs subi aucune dégradation lors de sa conservation sous cette condition. C'est donc bien l'instabilité du principe actif qui est en cause et non celle de la forme galénique. Une vigilance particulière doit être portée aux microbilles fabriquées avec des principes actifs instables comme le chlorhydrate de phényléphrine.

Enfin, étant donné l'intérêt croissant porté aux formes divisées à rétention gastrique et vu la complexité des méthodes de fabrication de ces formes, nous nous sommes penchés sur la faisabilité de microbilles flottantes moyennant la pelletisation thermoplastique.

Nous sommes parvenus à mettre au point des microbilles flottantes de lactose (placebo), de chlorhydrate de tétracycline et de théophylline. Ces microbilles contiennent une forte charge en principe actif (> 40 % m/m). Leur capacité de flottabilité *in vitro* a été démontrée sur une période supérieure à huit heures. Cependant, puisque les microbilles sont fortement chargées en principe actif, les propriétés intrinsèques de celui-ci peuvent influencer la flottabilité de la forme. Nous pensons notamment qu'une granulométrie trop fine ($\pm 10 \mu\text{m}$) du principe actif peut conduire à une densification des microbilles en multipliant les liens interparticulaires lors du procédé de pelletisation. C'est ce que nous avons observé pour des microbilles de chlorhydrate de ciprofloxacine.

In vivo, l'estimation de la flottabilité de microbilles de riboflavine a été effectuée de manière indirecte. Nous avons dosé la quantité de riboflavine excrétée dans les urines après l'absorption d'une forme flottante et non flottante. Les quantités de riboflavine excrétées par

les volontaires du groupe repas ayant reçu les microbilles flottantes de riboflavine se sont montrées plus importantes. Ce qui est probablement dû au séjour plus long de la forme flottante en amont du site d'absorption de la riboflavine.

La pelletisation thermoplastique apparaît donc comme un moyen simple, rapide, écologique et économique pour aboutir à la fabrication de microbilles. L'étude des propriétés physico-chimiques des excipients gras utilisés nous a aidés à optimiser les paramètres de fabrication. Le choix d'excipients appropriés nous a permis de mettre au point des microbilles à libération prolongée et des microbilles flottantes. Nous espérons avoir ainsi pu apporter notre contribution dans la recherche foisonnante qui entoure ces techniques de granulation et de pelletisation thermoplastique.

V. Bibliographie

- Aïnaoui, A., Vergnaud, J.M., 1998.** Modelling the plasma drug level with oral controlled release dosage forms with lipidic Gelucire. *Int. J. Pharm.* 169, 155-162.
- Aïnaoui, A., Ouriemchi, E.M., Bidah, D., El Amrani, M.K., Vergnaud, J.M., 1997.** Process of drug release with oral dosage forms with a lipidic Gelucire matrix. *J. Polym. Eng.* 17, 245-257.
- Akiyama, Y., Yoshioka, M., Horibe, H., Hirai, S., Kitamori, N., Toguchi, H., 1993.** Novel oral controlled-release microspheres using polyglycerol esters of fatty acids. *J. Control. Release.* 26, 1-10.
- Atyabi, F., Sharma, H.L., Mohammad, H.A.H., Fell, J.T., 1996.** Controlled drug release from coated floating ion exchange resin beads. *J. Control. Release.* 42, 25-28.
- Atyabi, F., Sharma, H.L., Mohammed, H.A.H., Fell, J.T., 1996.** In vivo evaluation of a novel gastric retentive formulation based on ion exchange resins. *J. Control. Release.* 42, 105-113.
- Augsburger, L.L., Vuppala, M.K., 1997.** Theory of Granulation *in Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology. Drugs and the pharmaceutical sciences. Volume 81.* Marcel Dekker, INC. New York, 7-23.
- Ausseur, T., Vignoles, P; Farah, N. and Brossard, C., 1998.** Theophylline extended release from waxy matrix granules obtained by melt granulation. *Proc. 2nd World Meeting APGI/APV, Paris, 25/28 May.* 293-294.
- Barthelemy, P., Laforêt, J.P., Farah, N., Joachim, J., 1999.** Compritol® 888 ATO: an innovative hot-melt coating agent for prolonged-release drug formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 47, 87-90.
- Baumgartner, S., Kristl, J., Vrecer, F., Vodopivec, P., Zorko, B., 2000.** Optimisation of floating matrix tablets and evaluation of their gastric residence time. *Int. J. Pharm.* 195, 125-135.
- Bidah, D., Ouriemchi, E.M., Vergnaud, J.M., 1992.** Diffusional process of drug delivery from a dosage form with a Gelucire matrix. *Int. J. Pharm.* 80, 145-149.
- Billa, N., Yuen, K.H., Abdul Khader, M.A., Omar, A., 2000.** Gamma-

- scintigraphic study of the gastrointestinal transit and in vivo dissolution of a controlled release diclofenac sodium formulation in xanthan gum matrices. *Int. J. Pharm.* 201, 109-120.
- Brittain, H.G., 2002.** Polymorphism: Pharmaceutical aspects *in* Encyclopaedia of pharmaceutical technology. Second Edition. Volume 3. Swarbrick, J. and J. Boylan, J.C. Marcel Dekker, INC. New York. 2239-2249.
- Brockerhoff, H., Jensen, R.G., 1975.** Lipolytic Enzymes. Academic Press. New York.
- Buri, P., Puisieux, F., Doelker, E., Benoît, J. P., 1985.** Voie orale *in* : Formes pharmaceutiques nouvelles, aspects technologiques, biopharmaceutique et médical. Lavoisier TEC&DOC. Paris, 175-227.
- Burton, S., Washington, N., Steele, R.J.C., Russon, R., Fehly, L., 1995.** Intragastric distribution of ion-exchange resins: a drug delivery system for the topical treatment of the gastric mucosa. *J. Pharm. Pharmacol.* 47, 901-906.
- Chiao, C.S.L., Robinson, J., 1995.** Sustained-Release Drug Delivery Systems. *In* The science and Practice of Pharmacy. Nineteenth Edition. Volume II. Remington. Mack publishing company. Easton. Pennsylvania, 1660-1675.
- Choi, H.K., Kim, O.J., 1996.** Process development to prepare floating microspheres with acrylic resin. *Pharm. Res.* 13, S-333.
- Chungi, V.S., Dittert, L.W, Smith. R.B., 1979.** Gastrointestinal sites of furosemide absorption in rats. *Int. J. Pharm.* 4, 27-38.
- Clas, S.D., Dalton, C.R., Hancock, B., 2002.** Calorimetry in Pharm. Res. and development *in* Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. Second Edition. Swarbrick, J., Boylan, J., Volume 1. Marcel Dekker. New York. 289-301.
- Craig, D.Q.M., 1996.** The physical characterisation of Gelucire 50/13. *B. T. Gattefossé* 89, 39-51.
- Crowley, K., Forbes, R.T., York, P., Nyqvist, H., Camber, O., 2000.** Drug-fatty acid salt with wax-like properties employed as binder in melt granulation. *Int. J. Pharm.* 211, 9-17.
- Dandelot, Keller, M.P., 1990.** Importance des lipases du tractus digestif sur la libération de substances incorporées dans des excipients glycéridiques. Thèse présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Genève pour obtenir le grade de docteur ès sciences, mention sciences pharmaceutiques.

- Thèse N° 2428. Université de Genève.
- Davis, S.S., Hardy, J.G., Taylor, M.J., Whallez, D.R., Wilson, C.C., 1984a.** 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., Taylor, M.J., Whallez, D.R., Wilson, C.C., 1984b.** A comparative study of the gastrointestinal transit of a pellet and tablet formulation. *Int. J. Pharm.* 21, 167-177.
- Davis, S.S., 1986.** Evaluation of the gastrointestinal transit of pharmaceutical dosage forms using the technique of gamma scintigraphy. *S.T.P. Pharma. Sci.* 22, 1015-1022.
- Davis, S.S., Khosla, R., Wilson, C.G., Washington, N., 1987.** Gastrointestinal transit of a controlled-release pellet formulation of tiaprofenic acid and the effect of food. *Int. J. Pharm.* 35, 253-258.
- Dollery, C., 1999.** *Therapeutic Drugs*. Second Edition. Churchill Livingstone. Edinburg.
- Dressman, J.B., Amidon, G.L., Peppas, C., Shah, V.P., 1998.** Dissolution Testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. *Pharm. Res.* 15, 11-22.
- EL Gibaly, I., 2002.** Development and in vitro evaluation of novel floating chitosan microcapsules for oral use: comparison with non-floating chitosan microspheres. *Int. J. Pharm.* 249, 7-21.
- Eliassen, H., Shaefer, T., Kristensen, H. G., 1998.** Effects of binder rheology on melt agglomeration in a high shear mixer. *Int. J. Pharm.* 176, 73-83.
- Eliassen, H., Kristensen, H. G., Shaefer, T., 1999.** Growth mechanisms in melt agglomeration with a low viscosity binder. *Int. J. Pharm.* 186, 149-159.
- Ennis, B. J., Tardos, G., Pfeffer, R., 1991.** A microlevel-based characterization of granulation phenomena. *Powder Technol.* 65, 257-272.
- Erk, N., Kartal, M., 1998.** Simultaneous high performance liquid chromatographic and derivative ratio spectra spectrophotometry determination of chlorpheniramine maleate and phenylephrine hydrochloride. *Il Farmaco*. 53, 617-622.
- Evrard, B., Delattre, L., 1992.** Melt granulation with a new laboratory high-shear mixer. 6^{ième} congrès international de technologie pharmaceutique. Paris.

Vol. 3. 187-196.

- Evrard, B., 1995.** Développement d'une forme galénique orale à libération prolongée en médecine vétérinaire: mise au point d'un bolus à rétention dans le réticulo-rumen chez l'ovin. Thèse de Doctorat en Sciences Pharmaceutiques. Université de Liège. Belgique.
- Evrard, B., Delattre, L., 1996.** In vitro evaluation of lipid matrices for the development of a sustained-release sulfamethazine bolus for lambs. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 22, 111-118.
- Evrard, B., Amighi, K., Beten, D., Delattre, L., Moës, A. J., 1999.** Influence of melting and rheological properties of fatty binders on the melt granulation process in a high-shear mixer. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 25, 1177-1184.
- Faham, A., Prinderre, P., Farah, N., Eichler, K. D., Kalantzis, G., Joachim, J., 2000.** Hot-melt coating technology. I. Influence of Compritol 888 Ato and granule size on theophylline release. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 26, 167-176.
- Flanders, P., Dyer, G.A., Jordan, D., 1987.** The control of drug release from conventional malt granulation matrices. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 13, 1001-1022.
- Follonier, N., Doelker, E., 1992.** Biopharmaceutical comparison of oral multiple-unit and single-unit sustained-release dosage forms. *S.T.P. Pharma. Sci.* 2, 141-158..
- Ford, J. L , Timmins, P., 1989.** Pharmaceutical thermal analysis, techniques and applications. Ellis Horwood Limited. Chichester.
- Gaglia , C.A.Jr., 1974.** Phenylephrine hydrochloride *in* Analytical Profiles of Drug Substances. Florey, K. Volume 3. Academic Press. London.
- Galia, E., Nicolaides, E., Hörter, D., Löbenberg, R., Reppas, C., Dressman, J.B., 1998.** Evaluation of various dissolution media for predicting *in vivo* performance of class I and class II drugs. *Pharm. Res.* 15, 698-705.
- Gattefossé 1998.** Fiche informative sur les propriétés du Compritol® et du Précirol®. Document de la société Gattefossé. France.
- Gueurten, D., 1982.** Recherches sur l'optimisation de la formulation des préparations à action prolongée per os. Thèse de Doctorat en Sciences Pharmaceutiques. Faculté de Médecine. Laboratoire de Pharmacie Galénique. Université de Liège.

- Harder, S., Fuhr, U., Beermann, D., Staib, A.H., 1990.** Ciprofloxacin absorption in different regions of the human gastrointestinal tract. Investigations with the hf-capsule. *Brit. J. Clin. Pharmacol.* 30, 35-39.
- Hejazi, R., Amiji, M., 2002.** Stomach-specific anti-*H. pylori* therapy. I: preparation and characterization of tetracycline-loaded chitosan microspheres. *Int. J. Pharm.* 235, 87-94.
- Heng, P.W., Wong, T.W., Chan, L.W., 2000.** Influence of production variables on the sphericity of melt pellets. *Chem. Pharm. Bull.* 48, 420-424.
- Hoffman, A., Stepensky, D., Lavy, A., Eyal, S., Klausner, E., Friedman, M., 2004.** Pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects of gastroretentive dosage forms. *Int. J. Pharm.* 277, 141-153.
- Holm, P., 1997.** High Shear Mixer Granulators *in Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology*. Drugs and the pharmaceutical sciences. Volume 81. Marcel Dekker, INC. New York, 151-225.
- Hou, W-M, Miyazaki, S., Takada, M., Komai, T., 1985.** Sustained release indomethacine from chitosan granules. *Chem. Pharm. Bull.* 33, 3986-3992.
- Huart-Oth, M., 1987.** Contribution à l'étude des dispersions solides: Utilisation des coévaporés pour un meilleur passage de l'interface huile/eau – Investigation de coévaporés à libération contrôlée. Thèse de Doctorat en Sciences Pharmaceutiques. Laboratoire de Pharmacie Galénique et Biopharmacie. Université Libre de Bruxelles.
- Hunter, E., Fell, J.T., Sharma, H., 1982.** The gastric emptying of pellets contained in hard gelatine capsules. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 8, 751-757.
- Hwang, S.J., Park, H., Park, K., 1998.** Gastric retentive drug-delivery systems. *Crit. Rev. Ther. Drug.* 15, 243-284.
- Iannuccelli, V., Coppi, G., Bernabei, M.T., Cameroni, R., 1998a.** Air compartment multiple-unit system for prolonged gastric residence. Part I. Formulation study. *Int. J. Pharm.* 174, 47-54.
- Iannuccelli, V., Coppi, G., Sansone, R., Ferolla, G., 1998b.** Air compartment multiple-unit system for prolonged gastric residence. Part II. In vivo evaluation. *Int. J. Pharm.* 174, 55-62.
- Ichikawa, M., Watanabe, S., Miyake, Y., 1991.** A new multiple-unit oral floating dosage system. I: Preparation and in vitro evaluation of floating and

- sustained-release characteristics. *J. Pharm. Sci.* 80, 1062-1066.
- Ingani H.M., 1987a.** Etude des paramètres de formulation influençant les caractéristiques de libération de principes actifs à partir de matrices hydrophiles à base de gomme xanthane et conception de comprimés matriciels bicouches flottants. Thèse de doctorat en Sciences Pharmaceutiques. Institut de Pharmacie. Laboratoire de Pharmacie Galénique et Biopharmacie. Université Libre de Bruxelles
- Ingani, H.M., Timmermans, J., Moës, A.J., 1987b.** Conception and in vivo investigation of peroral sustained release floating dosage forms with enhanced gastrointestinal transit. *Int. J. Pharm.* 35, 157-164.
- IOS, International Organization for Standardization, 1996.** Particle size analysis – Guidance on laser diffraction methods. ISO/DIN 13320 : 1996 (E).
- Joseph, N.J., Lakshmi, S., Jayakrishnan, A., 2002.** A floating-type oral dosage form for piroxicam based on hollow polycarbonate microspheres: in vitro and in vivo evaluation in rabbits. *J. Control. Release.* 79, 71-79.
- Kambou, S. Y.E, 2001.** Développement des microbilles à libération prolongée par granulation thermoplastique à l'aide du Mi-Pro®. Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Pharmacien d'Industrie (DES). Université Libre de Bruxelles.
- Kane, J., Sternheim, M., 1997.** Propriétés élastiques des matériaux. Physique. Masson/Inter Editions. Paris.
- Kawashima, Y., Niwa, T., Takeuchi, H., Hino, T., Itoh, Y., 1992.** Hollow microspheres for use as a floating controlled drug delivery system in the stomach. *J. Pharm. Sci.* 18, 135-140.
- Kim, K.H., Singh, B.N., 2002.** Drug delivery-Oral route *in*: Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. Second Edition. Swarbrick, J., Boylan, J., Volume 1. Marcel Dekker. New York, 886-909.
- Kinget, R., Kemel, R., 1985.** Preparation and properties of granulates containing solid dispersions. *Acta Pharm. Technol.* 31, 57-62.
- Klausner, E.A., Lavy, E., Friedman, M., Hoffman, A., 2003.** Expandable gastroretentive dosage forms. Review. *J. Control. Release.* 90, 143-162.
- Klausner, E., Lavy, E., Stepensky, D., Friedman, M., Hoffman, A., 2002.** Novel gastroretentive dosage forms: Evaluation of gastroretentivity and its effect

- on riboflavin absorption in dogs. *Pharm. Res.* 19, 10, 1516-1523.
- Kleinebudde, P., Nymo, L., 1995.** Homogeneous pellets of binary mixtures, comparison between extruder/spheronizer and high-shear mixer. *Proceeding. 1st World Meeting APGI/APV, Budapest, 9/11 may.* 343-344
- Kopcha, M., Roland, E., Bubb, G., Vadino, W.A., 1992.** Monitoring the granulation process in a high shear mixer/granulator: an evaluation of three approaches to instrumentation. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 18, 1945-1968.
- Kraemer, H.J., Gehrke, R., Breithaupt, A., Breithaupt, H., 1997.** Simultaneous quantification of cefotaxime, desacetylcefotaxime, ofloxacin and ciprofloxacin in ocular aqueous humor and in plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography. B.* 700, 147- 153.
- Kumar, K.M., Shah, M.H., Ketkar, A., Mahadik, K.R., Paradkar, A., 2004.** Effect of drug solubility and different excipients on floating behaviour and release from glyceryl monooleate matrices. *Int. J. Pharm.* 272, 151-160.
- Laine, E., Auramo, P., Kahela, P., 1988.** On the structural behaviour of triglycerides with time. *Int. J. Pharm.* 43, 241-247.
- Laine, L., Hunt, R., El-Zimaity, H., Nguyen, B., Osato, M., Spenard, J., 2003.** Bismuth-Based quadruple therapy using a single capsule of bismuth biskalcitrate, metronidazole and tetracycline given with omeprazole *versus* Omeprazole, Amoxicilline and Clarithromycin for Eradication of *Helicobacter pylori* in duodenal ulcer patients: a prospective, randomized, multicenter, north American trial. *Am. J. Gastroenterol.* 98, 562-567.
- Linkam** Manuel d'utilisation de la platine chauffante. Linkam Scientific Instruments Ltd. Angleterre.
- Liu, J., Zhang, F., McGinity, J.W., 2001.** Properties of lipophilic matrix tablets containing phenylpropanolamine hydrochloride prepared by hot-melt extrusion. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 52, 181-190.
- Louie-Helm, J., Fell, R., Shell, J.N., Dye, D., Levy, G., Gorsline, J., Mueller, M., Dilger, C., Berner, B., 2001.** Pharmacokinetics of ciprofloxacin gastric retentive (GRTM) tablets in healthy volunteers. *Control. Release Soc. Proceeding. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 28, 698-699.
- Mayersohn, M., 2002.** Principles of drug absorption *in* : *Modern Pharmaceutics*. Fourth

- Edition. Drugs and The Pharmaceutical Sciences. Volume 121. Banker and Rhodes. Marcel Dekker. New York. 23-66.
- Mc Taggart**, C., Ganley, J. A., Sickmueller, A., Walker, S. E., **1984**. The evaluation of formulation and processing conditions of a melt granulation process. *Int .J. Pharm.* 19, 139-148.
- Merck** Index . **1996**. Twelfth Edition. Merck &Co., INC. U.S.A.
- Millard**, B.J., Priaux, D.J., and Shotton, E., **1973**. The stability of aqueous solutions of phenylephrine at elevated temperatures: identification of the decomposition products. *J. Pharm. Pharmacol.* 25, suppl., 24P-31P.
- Moës**, A.J., **1989**. Recherche et développement de formes orales à libération contrôlée. *J. Pharm.Belg.* 44, 60-70.
- Moës**, A.J., **1993**. Gastroretentive dosage forms. *Crit. Rev. Ther. Drug.* 10, 143-195.
- Murata**, Y., Sasaki, N., Miyamoto, E., Kawashima, S., **2000**. Use of floating alginate gel beads for stomach-specific drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50, 221-226.
- Nicoli**, S., Colombo, P., **2001**. Séance thématique, Libération contrôlée des médicaments voies et formes utilisées. *Ann. Pharm. Fr.* 59, 227-231.
- Ossman**, E.N.A.R., **1980**. Determination of phenylephrine in presence of its decomposition products. *J. Pharm. Belg.* 35, 445-450.
- Oth**, M., Franz, M., Timmermans, J., Moës, A.J., **1992**. The bilayer floating capsule : a stomach-directed drug delivery system for misoprostol. *Pharm. Res.* 9, 298-302.
- Ozdemir**, A.N., Agabeyoglu, I.T., **1990**. Studies on sustained release XI: Lipid granules of sulfamethizole. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 16, 1805-1814.
- Pakodi**, F., Abdel-Salam., O.M.E., Debreceni, A., Mozsik, G., **2000**. *Helicobacter pylori*. One bacterium and a broad spectrum of human disease! An overview. *J. Physiol. (Paris)*. 94, 139-152.
- Parikh**, D. M., **1997**. Introduction in Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology. Drugs and the pharmaceutical sciences. Volume 81. Marcel Dekker, INC. New York, 1-6.
- Passerini** N., Albertini, B., Gonzalez-Rodriguez, M.L., Cavallari, C., Rodriguez, L., **2002**. Preparation and characterisation of ibuprofen-poloxamer 188

- granules obtained by melt granulation. *Eur. J. Pharm. Sci.* 15, 71-78.
- Patel, V.R., Amiji, M.M., 1996.** Preparation and characterization of freeze-dried chitosan-poly(ethyleneoxide) hydrogels for site specific antibiotic delivery in the stomach. *Pharm. Res.* 13, 588-593.
- Perissutti, B., Voinovich, D., Moneghini, M., Franceschini, E., 2002.** A powerful technique to prepare in a single step potential sustained release dosage forms: melt pelletisation in high shear mixer. Fourth World Meeting on Pharmaceutics Biopharmaceutics Pharmaceutical Technology. Florence.
- Perissutti, B., Rubessa, F., Moneghini, M., Voinovich, D., 2003.** Formulation design of carbamazepine fast-release tablets prepared by melt granulation technique. *Int. J. Pharm.* 256, 53-63.
- Pommier, A.M., Brossard, C., Ser, J., Duchêne, D., 1988.** Influence des paramètres opératoires sur la libération de la diprophylline à partir d'un comprimé matriciel lipidique. *S.T.P. Pharma. Sci.* 4, 384-391.
- Pro-C-epT** Manuel d'utilisation du Mi Pro[®]. Pro-C-epT. Belgique.
- Ratsimbazafy, V., Brossard, C., 1991.** Les Gélucires et le ralentissement de la libération des principes actifs. *S.T.P. Pharma. Prat.* 1, 335-349.
- Rawle, 2004.** A. Basic principles of particle size analysis. Malvern Technical Paper.
[http://www.malvern.co.uk/malvern/kbase.nsf/0/5E3F5A148D336B0480256BF2006E2195/\\$file/Basic_principles_of_particle_size_analysis_MRK034-low_res.pdf](http://www.malvern.co.uk/malvern/kbase.nsf/0/5E3F5A148D336B0480256BF2006E2195/$file/Basic_principles_of_particle_size_analysis_MRK034-low_res.pdf).
- Rouge, N., Buri, P., Doelker, E., 1996.** Drug absorption sites in the gastrointestinal tract and dosage forms for site-specific delivery. *Int. J. Pharm.* 136, 117-139.
- Rouge, N., Cole, E.T., Doelker, E., Buri, P., 1997.** Screening of potentially floating excipients for minitables. *S.T.P. Pharma. Sci.* 7, 386-392.
- Rowe, R., Sheskey, P.J., Weller, P., 2003.** Handbook of pharmaceutical excipients. Fourth Edition. Pharmaceutical Press and American Pharmaceutical Association. Chicago.
- Rubinstein, M.H., Musikabhumma, P., 1980.** Formulation and evaluation of paracetamol 500 mg tablets produced by a new direct granulation method. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 6, 451-473.

- Rudnic, E., 1995.** Oral solid dosage forms *in* The science and practice of pharmacy. Nineteenth edition. Volume 2. Marck publishing company. Easton. Pennsylvania, 1615-1649.
- Saraiya, D., Bolton, S., 1990.** The use of Precirol® to prepare sustained release tablets of theophylline and quinidine gluconate. Drug. Dev. Ind. Pharm. 16, 1963-1969.
- Sato, Y., Kawashima, Y., Takeuchi, H., Yamamoto, H., 2003.** In vivo evaluation of riboflavin-containing microballoons for floating controlled drug delivery system in healthy human volunteers. J. Control. Release. 93, 39-47.
- Schaefer, T., Holm, P., Kristensen, H. G., 1990.** Melt granulation in a laboratory scale high shear mixer. Drug. Dev. Ind. Pharm. 16, 1249-1277.
- Schaefer, T., Holm, P., Kristensen, H.G., 1992a.** Melt pelletization in high shear mixer. I. Effect of process variables and binder. Acta. Pharm. Nord. 4, 133-140.
- Schaefer, T., Holm, P., Kristensen, H.G., 1992b.** Melt pelletization in a high shear mixer. III. Effects of lactose quality. Acta. Pharm. Nord. 4, 245-252.
- Schaefer, T., Taagegaard, B., Thomsen, L. J., Kristensen, H.G., 1993.** Melt pelletization in a high shear mixer. IV. Effects of process variables in a laboratory scale mixer. Eur. J. Pharm. Sci. 1, 125-131.
- Schaefer, T., 1996a.** Melt agglomeration with polyethylene glycols in high shear mixers. Ph.D. Thesis. The Royal Danish School of Pharmacy. Copenhagen. Denmark.
- Schaefer, T., Mathiesen, C., 1996b.** Melt pelletization in a high shear mixer. VIII. Effects of binder viscosity. Int. J. Pharm. 139, 125-138.
- Schaefer, T., Mathiesen, C., 1996c.** Melt pelletization in a high shear mixer. VII. Effects of product temperature. Int. J. Pharm. 134, 105-117.
- Schaefer, T., Johnsen, D., Johansen, A., 2004.** Effects of powder particle size and binder viscosity on intragranular and intragranular particle size heterogeneity during high shear granulation. Eur. J. Pharm. Sci. 21, 525-531.
- Schramm, G., 1981.** Introduction to practical viscosimetry. Haake viscometers. Gebrüder Haake. Karlsruhe.

- Seo, A., Schaefer, T., 2001.** Melt agglomeration with polyethylene glycol beads at a low impeller speed in a high shear mixer. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 52, 315-325.
- Seth P.R., Tossounian, J.L., 1984.** Hydrodynamically balanced controlled release compositions containing L-dopa and a decarboxylase inhibitor. U.S. Patent 4, 424, 235
- Seth, P.R., Tossounian, J.L., 1975.** Sustained release formulation. U.S. Patent 4, 559.107.
- Seth, P.R., Tossounian, J.L., 1979.** Sustained release tablet formulation. U.S. Patent 4, 167, 558.
- Silber, M., Bialer, M., Yacobi, Y., 1987.** Pharmacokinetic/Pharmacodynamic basis of controlled drug delivery. *Controlled Drug Delivery, Fundamentals and applications.* Second Edition. Drugs and the Pharmaceutical Sciences. 29. J.R. Robinson and V.H. L. Lee. Marcel Dekker. New York.
- Singh, B.N., Kim, K.H., 2000.** Floating drug delivery systems: an approach to oral controlled drug delivery via gastric retention. *J. Control. Release*, 63, 235-259.
- Soppimath, K.S., Kulkarni, A.R., Rudzinski, W.E., Aminabhavi, T.M., 2001.** Microspheres as floating drug-delivery systems to increase gastric retention of drugs. *Drug. Metab. Rev.* 33, 149-160.
- Steele, G., 2001.** Pharmaceutical preformulation and formulation, a practical guide from candidate drug selection to commercial dosage form. Mark Gibson. Englewood.
- Streubel, A., Siepmann, J., Bodmeier, R., 2003.** Floating matrix tablets based on low density foam powder: effects of formulation and processing parameters on drug release. *Eur. J. Pharm. Sci.* 18, 37-45.
- Suryanarayanan, R., Rastogi, S., 2002.** X-Ray powder diffractometry. *Encyclopaedia of pharmaceutical technology.* Second edition. Volume 3. Marcel Dekker, INC. New York.
- Sutananta, W., Craig, D.Q.M., Newton, J. M., 1994.** The effects of ageing on the thermal behaviour and mechanical properties of pharmaceutical glycerides. *Int. J. Pharm.* 111, 51-62.
- Sutananta, W., Craig, D.Q.M., Newton, J. M., 1995a.** An evaluation of the

- mechanisms of drug release from glyceride bases. *J. Pharm. Pharmacol.* 47, 182-187.
- Sutananta, W., Craig, D.Q.M., Newton, J. M., 1995b.** An investigation into the effect of preparation conditions and storage on the rate of drug release from pharmaceutical glyceride bases. *J. Pharm. Pharmacol.* 47, 355-359.
- Thanoo, B.C., Sunny, M.C., Jayakrishnan, A., 1993.** Oral sustained release drug delivery systems using polycarbonate microspheres capable of floating on the gastric fluid. *J. Pharm. Pharmacol.* 45, 21-24
- Thies, R., Kleinebudde, P., 1999.** Melt pelletisation of a hygroscopic drug in a high shear mixer, Part 1. Influence of process variables. *Int. J. Pharm.* 188, 131-143.
- Thies, R., Kleinebudde, P., 2000.** Melt pelletisation of a hygroscopic drug in a high shear mixer, Part 2. Mutual compensation of influence variables. *Eur. J. Pharm. Sci.* 10, 103-110.
- Thomsen, L. J., Schaefer, T., Sonnergaard, J. M., Kristensen, H.G., 1993.** Prolonged release matrix pellets prepared by melt pelletization, I. Process variables. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 19, 1867-1887.
- Thomsen, L. J., Schaefer, T., Kristensen, H.G., 1994.** Prolonged release matrix pellets prepared by melt pelletization II. Hydrophobic substances as meltable binders. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 20, 1179-1197.
- Timmermans, J., Moës, A.J., 1990a.** How well do floating dosage forms float? *Int. J. Pharm.* 62, 207-216.
- Timmermans, J., Moës, A.J., 1990b.** Measuring the resultant-weight of an immersed test material: I. Validation of an apparatus and a method dedicated to Pharmaceutical applications. *Acta. Pharm. Technol.* 36, 171-175.
- Timmermans, J., Moës, A.J., 1990c.** Measuring the resultant-weight of an immersed test material: II. Examples of kinetic determinations applied to monolithic dosage forms. *Acta. Pharm. Technol.* 36, 176-180.
- Timmermans, J., 1991.** Floating hydrophilic matrix dosage forms for oral use: Factors controlling their buoyancy and gastric residence capabilities. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en sciences Pharmaceutiques. Université Libre de Bruxelles. Bruxelles.
- Torrado, S., Prada, P., de la Torre, P.M., Torrado, S., 2004.** Chitosan-poly (acrylic)

- acid polyionic complex: in vivo study to demonstrate prolonged gastric retention. *Biomaterials*. 25, 917-923.
- Tortora, G.J., Grabowski, S.R., 1994.** *Le Système Digestif in Principes d'anatomie et de physiologie*. Deuxième édition Française. De Boeck Université. Anjou (Québec), 814-873.
- Vitez, I. M., Newman, A. W., Davidovich, M., Kiesnowski, C., 1998.** The evolution of hot-stage microscopy to aid solid-state characterizations of pharmaceutical solids. *Thermochim. Acta*. 324, 187-196.
- Voinovich, D., Campisi, B., Moneghini, M., Vincenzi, C., Phan-Tan-Luu, R., 1999.** Screening of high shear mixer melt granulation process variables using an asymmetrical factorial design. *Int. J. Pharm.* 190, 73-81.
- Voinovich, D., Moneghini, M., Perissutti, B., Filipovic-Grcic, J., Grabnar, I., 2000.** Preparation in high-shear mixer of sustained-release pellets by melt pelletisation. *Int. J. Pharm.* 203, 235-244.
- Voinovich, D., Moneghini, M., Perissutti, B., Franceschinis, E., 2001.** Melt pelletization in high shear mixer using a hydrophobic melt binder: influence of some apparatus and process variables. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 52. 305-313.
- Welling, P.G., Dobrinska, M.R., 1987.** Dosing considerations and bioavailability assessment of controlled drug delivery systems. *Controlled Drug Delivery, Fundamentals and applications*. Second Edition. Drugs and the Pharmaceutical Sciences. 29. J.R. Robinson and V.H. L. Lee. Marcel Dekker. New York.
- Whitehead, L., 1998a.** An investigation of a gastroretentive dosage form. Ph.D Thesis. School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. University of Manchester. United Kingdom.
- Whitehead, L., Fell, J.T., Collett, J.H., Sharma, H.L., Smith, A.M., 1998b.** Floating dosage forms: an in vivo study demonstrating prolonged gastric retention. *J. Control. Release*. 55, 3-12.
- Whitehead, L., Collett, J.H., Fell, J.T., 2000.** Amoxycillin release from a floating dosage form based on alginates. *Int. J. Pharm.* 210, 45-49.
- Wilding, I.R., Coupe, A.J., Davis, S.S., 2001.** The role of gamma-scintigraphy in oral drug delivery. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 46, 103-124.

- Wilson, C.G., O'Mahony, B., Lindsay, B., 2002.** Physiological factors affecting oral drug delivery *in* : Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. Second Edition. Swarbrick,J., Boylan, J., Volume 3. Marcel Dekker. New York, 2204-2213.
- Yang L., Fassihi, R., 1996.** Zero-order release kinetics from a self-correcting floatable asymmetric configuration drug delivery system. *J. Pharm. Sci.* 85, 170-173.
- Yang, L., Eshraghi, J., Fassihi, R., 1999.** A new intragastric delivery system for the treatment of *Helicobacter pylori* associated gastric ulcer: *in vitro* evaluation. *J. Control. Release.* 57, 215-222.
- Zhou, F., Vervaet, C., Remon, J. P., 1996.** Matrix pellets based on the combination of waxes, starches and maltodextrins. *Int. J. Pharm.* 133, 155-160.
- Zhou, F., Vervaet, C., Remon, J. P., 1997.** Influence of processing on the characteristics of matrix pellets based on microcrystalline waxes and starch derivatives. *Int. J. Pharm.* 147, 23-30.

Récapitulatif des sites internet utilisés comme références bibliographiques :

- www.phy.ulaval.ca/gb/17323/XRD.html, 2004
- http://www.lrccp.net/public/htmls/competences/fr_ut1_3.htm, 2005
- [http://www.malvern.co.uk/malvern/kbase.nsf/0/5E3F5A148D336B0480256BF2006E2195/\\$file/Basic_principles_of_particle_size_analysis_MRK034-low_res.pdf](http://www.malvern.co.uk/malvern/kbase.nsf/0/5E3F5A148D336B0480256BF2006E2195/$file/Basic_principles_of_particle_size_analysis_MRK034-low_res.pdf), 2004

VI. Annexes

Annexe 1 : Information du sujet volontaire

Etude *in Vivo* de la capacité de flottabilité de formes divisées de riboflavine sur des volontaires humains sains

1. But de l'étude / Notion de recherche :

Le but de cette étude est d'estimer la capacité de flottabilité dans l'estomac et l'intestin grêle, de microbilles contenues dans une gélule en fonction du temps et du type de repas administré. Cette étude entre dans le cadre d'un travail de recherche pour une thèse de doctorat, elle ne revêt aucun aspect commercial et n'est pas financée par une industrie Pharmaceutique ou autre.

Les microbilles utilisées contiennent des excipients, c'est-à-dire des produits non actifs et de la riboflavine 5' phosphate sodique qui est un dérivé de la vitamine B₂ comme traceur urinaire. La liste des excipients utilisés est renseignée par le tableau ci-dessous (tableau 1) ces produits sont inoffensifs pour autant que le patient ne présente pas d'allergie connue à leur rencontre.

L'estimation de la capacité de flottabilité des formes est effectuée de manière indirecte en suivant l'élimination de cette vitamine par l'urine. En effet, la riboflavine 5' phosphate sodique est essentiellement absorbée au niveau proximal de l'intestin grêle, ce qui en fait un bon traceur pour estimer la capacité de flottabilité de la forme. Etant donné qu'une forme flottante séjournera plus longtemps dans l'estomac qu'une forme non flottante, le délai de résorption de cette vitamine et son élimination par les urines seront différentes entre les deux formes (flottantes et non flottante). Par ailleurs, l'élimination de cette molécule s'effectue presque exclusivement par voie urinaire ce qui rend son étude chez des volontaires humains facile et non contraignante : le volontaire devra simplement récolter ses urines selon un protocole préétabli.

Tableau 1 : récapitulatif des excipients utilisés

Produits
Compritol [®]
Béhénate de glycérol
Précirol [®]
Palmitostéarate de glycérol
Lactose 450Me
Bicarbonate Sodique
Carbonate calcique
Acide tartrique
Hydroxypropylmethylcellulose

2. Design de l'étude :

L'administration des gélules contenant les formes flottantes ou non se fera de manière randomisée, c'est-à-dire que c'est le hasard qui déterminera quel type de gélule recevra le volontaire. Il en est de même pour l'attribution de son groupe « groupe à jeun » ou « groupe repas ». Le code reliant les numéros d'échantillons aux volontaires ne sera rompu qu'à la fin de l'étude.

3. Bénéfices thérapeutiques:

L'essai clinique proposé ici n'a aucune visée thérapeutique, il est simplement destiné à estimer la capacité de flottabilité des formes administrées. Le volontaire n'en retire donc aucun bénéfice thérapeutique.

4. Caractère volontaire de la participation:

La fiche signalétique du sujet volontaire doit être complétée avant l'étude. Ce questionnaire est conçu pour établir les critères médicaux d'exclusion et d'inclusion d'un sujet dans l'étude.

Il est dès lors dans l'intérêt du sujet volontaire de répondre le plus complètement possible et en toute honnêteté aux questions posées.

La présente étude ne débutera qu'après approbation et autorisation du Comité d'Ethique Médicale de l'Hôpital Erasme. Cette étude sera réalisée selon les normes scientifiques et éthiques actuelles et en respectant les droits du sujet volontaire.

Ce formulaire de consentement éclairé est destiné à informer le sujet volontaire quant à la nature de l'étude ainsi que ses droits et devoirs. Il doit obligatoirement être signé pour accord par le volontaire avant toute participation à l'étude. Il pourra également en discuter avec le coordonnateur de l'étude et/ou toute autre personne de son choix, y compris son médecin traitant, avant de donner son accord. Le sujet dispose d'un temps de réflexion de trois jours ouvrables avant de signer le présent formulaire. Si le sujet accepte de participer à cette étude, il reste libre de la quitter à tout moment sans devoir se justifier.

La participation à cette étude se faisant sur des bases volontaires, en cas de refus de participation ou abandon de l'étude. Le chercheur, doctorant, membre du corps technique, scientifique ou académique ne fera en aucun cas l'objet de pression de la part de ses supérieurs et collègues dans l'optique de maintenir une bonne entente entre collègues.

5. Contraintes avant la session d'étude

Durant la semaine précédant la session d'étude (durant 7 jours), le sujet ne prendra aucun médicament. En cas de besoin majeur (ou de prescription médicale), il préviendra le responsable de l'étude avant la date de convocation et l'informerá sur le type de médicament pris.

Un à deux jours avant la session d'étude, le sujet ne consommera pas de manière excessive des jus de fruits ou des aliments pouvant provoquer un trouble du transit gastro-intestinal (diarrhée, flatulence,...).

Le volontaire ne devra pas avoir subi d'intervention chirurgicale au niveau du tractus gastro-intestinal.

6. Contraintes en cours d'étude (déroulement d'une session), durée de l'étude

Les volontaires sont répartis en deux groupes tirés au sort : « groupe à jeun » et « groupe repas »

Le jour de l'étude, le sujet se présentera à jeun depuis la veille à minuit.

A **7 h 45 min**, les volontaires seront invités à vider leur vessie dans un pot brun qui leur sera distribué. Ensuite, ils seront invités à respecter le régime alimentaire, décrit par le tableau ci-dessous, suivant leur groupe, ainsi que les différents temps de prélèvement d'urine.

A **8 h 30 min**, les volontaires sont invités à prendre leur gélule (temps = t_0). Ensuite, tous les prélèvements d'urine seront récoltés par les volontaires dans des pots bruns, étiquetés à leur code, selon un timing prédéterminé : 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h, 14 h et 23 h. Les heures de prélèvements sont indiquées sur chaque flacon. Ces flacons seront remis au fur et mesure au coordonnateur de l'étude, sauf pour ce qui est des prélèvements de 14 h et 23 h, le volontaire les conservera dans son frigo (température : 4°C à 6°C) jusqu'au lendemain. Si pour une quelconque raison, le volontaire ne peut procurer son échantillon d'urine au coordonnateur, juste après son prélèvement, il doit impérativement le conserver au frigo. Par ailleurs, le volontaire ne devra pas se mettre en position couchée entre les temps t_0 et t_{8h} .

L'étude se déroulera sur **quatre périodes (journées complètes)** durant lesquelles le volontaire s'engage à être disponible de **7 h 45 du matin à 17 h le soir** et à effectuer deux prélèvements d'urine **à son domicile** dans un flaconnage spécial qui lui sera fourni. Ces deux échantillons seront gardés par le volontaire dans son réfrigérateur avant leur restitution au responsable de l'étude le lendemain du jour de l'étude.

Les quatre périodes de l'étude seront **espacées de six jours**.

Le régime suivi par les volontaires et les heures prévues pour les prélèvements d'échantillons durant une session :

Repas	Groupe à jeun (n=5)	Groupe repas (n=5)	Prélèvements
7h45			Vidange de la vessie
8h00	-	200 ml de jus d'orange 105 g de pain gris (3 tranches) 10 g de margarine 20 g de confiture 50 g de fromage maigre 150 ml de thé + 1 sucre	
8h30	Administration d'une gélule avec 200 ml d'eau plate Aucun repas n'est autorisé pendant 4h	Administration d'une gélule avec 200 ml d'eau plate	t ₀ (pas de prélèvement)
9h30			t _{1h}
10h20	200 ml d'eau	85 g carré confiture 150 ml de thé+ 1 sucre	
10h30			t _{2h}
11h30	200 ml d'eau	200 ml d'eau	t _{3 h}
12h30			t _{4h}
Déjeuner 12h45	200 ml potage vert 150 g de poulet rôti 50 g sauce tomate 100 g pommes de terres cuites à l'eau 175 ml d'eau minérale 150 ml de thé + 1 sucre	200 ml potage vert 150 g de poulet rôti 50 g sauce tomate 100 g pommes de terres cuites à l'eau 175 ml d'eau minérale 150 ml de thé + 1 sucre	
14h30			t _{6 h}
Goûter 15h15	75 g de tarte aux pommes 150 ml de thé+ 1 sucre	75 g de tarte aux pommes + 150 ml de thé+ 1 sucre	
16h30			t _{8 h}
Energie totale (Kcal)	729	1634	
Apport hydrique total (g)	1290	1530	
Le soir	Repas Libre et récolte des urines à domicile		
22h30			t _{14 h}
7h30 du matin			t _{23 h}

7. Participation, recrutement et durée

La durée d'une session est de 7h 45 à 17h, deux prélèvements d'urine sont à effectuer par le volontaire **à son domicile**. Il les fournira le lendemain de l'étude après leur conservation **au frigo** (température entre 4°C et 6°C).

Le nombre de sujets recrutés pour l'étude est de dix volontaires

La durée totale de l'étude est de 4 sessions ou périodes espacées chacune de 6 jours, soit un total de 28 jours.

8. Lieu des sessions d'étude

Université Libre de Bruxelles

Institut de Pharmacie

Laboratoire de Pharmacie Galénique et de Biopharmacie (niveau 6)

Campus Plaine – CP 207

Bd du Triomphe 1050 Bruxelles

9. Date et heure de la convocation

Pour des raisons techniques, un retard de maximum 15 minutes est autorisé avant l'exclusion du sujet de l'étude.

10. Contact pour information

Prof. K. Amighi, ULB (Institut de Pharmacie), tél : 02/ 650 52 52

Email : kamighi@ulb.ac.be

Service Médical de l'ULB : Bâtiment M, Campus du Solbosch, Tél : 02/650 29 29

11. Risques prévisibles :

Une étude similaire a été effectuée au sein du laboratoire de Pharmacie Galénique et Biopharmacie en 1987 dans le cadre du travail de recherche de M. Ingani sous la direction du Prof. Moës, aucun effet indésirable dû à l'ingestion des comprimés de riboflavine n'a été relaté. Ce travail est d'ailleurs relaté dans la thèse de doctorat de M. Ingani, celle-ci disponible à la bibliothèque de Pharmacie (ULB, Campus Plaine, Bâtiment BC, niveau 4, tél : 02/ 650 51 48).

12. Assurance RC :

Le directeur du laboratoire de Pharmacie galénique s'engage à souscrire à une assurance RC destinée à fournir au volontaire une compensation financière pour d'éventuels événements graves survenus du fait de sa participation à l'étude.

13. Paiement, frais et rémunération :

Aucun frais lié à sa participation à l'étude n'est réclamé au volontaire.

Les volontaires faisant partie du corps académique, scientifique et technique de l'Institut de Pharmacie, aucune rémunération n'est prévue à leur participation à l'étude.

14. Confidentialité des données :

Les données sont confidentielles et tenues sous forme d'une base de données anonymisée par l'investigateur principal. En cas de besoin, seuls l'investigateur principal et un médecin du centre médical de l'ULB (bâtiment M, campus du solbosch) pourront y avoir accès. Auquel cas le médecin est bien évidemment tenu par le secret médical.

15. Approbation du volontaire:

L'étude ne débutera qu'après l'approbation du comité d'éthique de l'Hôpital Universitaire Erasme et après une lecture attentive de ce formulaire d'information au sujet volontaire et la signature de celui-ci par le sujet. Cette signature doit être précédée de la mention « lu et approuvé ».

Bruxelles le :

Nom et Prénom du volontaire :

Signature du volontaire précédée de la mention « lu et approuvé » :

Annexe 2 : Formulaire de consentement éclairé du patient (Confidentiel)

Intitulé de l'étude : Etude *in Vivo* de la capacité de flottabilité de formes divisées de riboflavine chez des volontaires humains sains

Responsable de l'étude : Prof. K. Amighi.

Service de Pharmacie galénique et de Biopharmacie. Université Libre de Bruxelles.
Campus Plaine, CP 207. BD du Triomphe 1050 Bruxelles.

Tél : 02/ 650 52 52

Email : kamighi@ulb.ac.be

Fiche signalétique du patient :

Nom et Prénom :

Sexe :

Age :

Poids :

Coordonnées complètes :

Durée de l'étude :

L'étude se déroulera sur **quatre périodes (journées complètes)** durant lesquelles le volontaire s'engage à être disponible de **7 h 45 du matin à 17 h** le soir et à effectuer deux prélèvements d'urine **à son domicile** dans un flaconnage spécial qui lui sera fourni. Ces deux échantillons seront gardés par le volontaire dans son réfrigérateur avant leur restitution au responsable de l'étude le lendemain du jour de l'étude.

Les quatre périodes de l'étude seront **espacées de six jours**.

Lieu de l'étude :

Université Libre de Bruxelles

Campus Plaine, CP 207. BD du Triomphe 1050 Bruxelles.

Service de Pharmacie Galénique et de Biopharmacie, Bâtiment BC, niveau 6.

Personne de contact : Prof. K. Amighi

Tél : 02/ 650 52 52

Email :kamighi@ulb.ac.be

Questions : (biffer la mention inutile)

1. Avez-vous récemment souffert d'une affection quelconque ?

- OUI

- NON

2. Suivez-vous une quelconque médication actuellement ?

- OUI

- NON

3. Avez-vous subi une quelconque intervention chirurgicale du tractus gastro-intestinal :

- OUI

- NON

Si la réponse à l'une de ces questions est positive, le volontaire ne participera pas à l'étude.

Connaissance du formulaire information au patient :

Le patient volontaire sain déclare avoir pris connaissance du document « information au patient », d'en avoir compris le sens et y avoir mûrement réfléchi, en foi de quoi, il consent à rejoindre l'étude dont l'intitulé est : « Etude in Vivo de la capacité de flottabilité de formes divisées de riboflavine chez des volontaires humains sains ».

Fait à Bruxelles le :

Nom, Prénom, Signature :

