

2012-2013

**Thèse**

Pour le

**Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie**

**Evaluation du pH à l'intérieur de  
mini-granules enrobées par  
spectrométrie de fluorescence**

**Fahier Julie** |

**née le : 23 juillet 1988**

**Sous la direction de Mme** |  
**Muschert Susanne**

Membres du jury

Frédéric Lagarce | Président

Susanne Muschert | Directeur

Marie-Claire Venier-Julienne | Co-directeur

Jean-François Goossens | Membre

Soutenue publiquement le :  
10 décembre 2013

# ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

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

**Année Universitaire 2012-2013**

## **Liste des enseignants**

### **Département Pharmacie**

<b><i>PROFESSEURS</i></b>	<b><i>Disciplines</i></b>
BENOIT Jean-Pierre	Pharmacotechnie - Biopharmacie
DUVAL Olivier	Chimie Thérapeutique
JARDEL Alain	Physiologie
LAGARCE Frédéric	Pharmacotechnie-Biopharmacie
MARCHAIS Véronique	Bactériologie - Virologie
PASSIRANI Catherine	Chimie générale – Chimie analytique
RICHOMME Pascal	Pharmacognosie
ROBERT Raymond	Parasitologie et Mycologie médicale
SAULNIER Patrick	Biophysique pharmaceutique et biostatistiques
SERAPHIN Denis	Chimie Organique
VENIER Marie-Claire	Pharmacotechnie - Biopharmacie

<b><i>PAST</i></b>	<b><i>Disciplines</i></b>
BRUNA Étienne	Industrie

<b><i>MAITRES DE CONFERENCES</i></b>	<b><i>Disciplines</i></b>
ANNAIX Véronique	Biochimie Générale et Clinique
BAGLIN Isabelle	Pharmaco - Chimie
BASTIAT Guillaume	Biophysique – biostatistiques -Rhéologie
BENOIT Jacqueline	Pharmacologie et Pharmacocinétique
CLERE Nicolas	Physiologie - Pharmacologie
CORVEZ Pol	Communication - Sémiologie
DERBRÉ Séverine	Pharmacognosie-
ÉVEILLARD Matthieu	Bactériologie - Virologie
FAURE Sébastien	Pharmacologie Physiologie
FLEURY Maxime	Immunologie
GUILLET David	Chimie Analytique

**MAITRES DE CONFERENCES****Disciplines**

HELESBEUX Jean-Jacques	Chimie Organique
LANDREAU Anne	Botanique
LARCHER Gérald	Biochimie
MALLET Marie-Sabine	Chimie Analytique et Bromatologie
MAROT Agnès	Parasitologie et Mycologie médicale
PECH Brigitte	Pharmacotechnie
ROGER Émilie	Pharmacotechnie
SCHINKOVITZ Andréas	Pharmacognosie
TRICAUD Anne	Biologie Cellulaire

**A.H.U.****Disciplines**

BRIS Céline	Biochimie
SPIESSER-ROBELET Laurence	Pharmacie clinique et Éducation Thérapeutique

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

GENARD Nicole	Anglais
---------------	---------

**ATER (Assistants Enseignement Supérieur et Recherche).****Disciplines**

DESHAYES Caroline	Bactériologie
LEONETTI Daniella	Toxicologie
PACE Stéphanie	Biophysique - Biostatistiques

## Liste des enseignants

### Département ISSBA

#### ***PROFESSEURS***

	<b><i>Disciplines</i></b>
BOURY Franck	Biophysique
CALENDA Alphonse	Biologie Moléculaire - Biotechnologie
MAHAZA Chetaou	Bactériologie - Virologie
MAURAS Geneviève	Biologie Cellulaire

#### ***MAITRES DE CONFERENCES***

	<b><i>Disciplines</i></b>
BATAILLE Nelly	Biologie Cellulaire et Moléculaire
BILLAUD Sandrine	Immunologie - Parasitologie
CALVIGNAC Brice	Génie des procédés bioindustries
DUBREUIL Véronique	Chimie Analytique
GIRAUD Sandrine	Biologie moléculaire et cellulaire
MILTGEN-LANCELOT Caroline	Management, gestion des organisations de santé
OGER Jean-Michel	Chimie
RICHOMME Anne-Marie	Valorisation des substances naturelles

#### ***PRAG (Professeurs Agrégés)***

	<b><i>Disciplines</i></b>
HANOTTE Caroline	Economie – Gestion
ROUX Martine	Espagnol

#### ***PRCE***

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

	<b><i>Disciplines</i></b>
LECOMTE Stéphane	Anglais
MEENTS Ulrike	Allemand

#### ***PAST***

	<b><i>Disciplines</i></b>
DIDIER Alain	Systèmes d'information santé
BERGER Virginie	Sureté de fonctionnement des études cliniques
BLOUIN Laurence	Management des structures des soins
DELOUIS Anne-Laure	Prévention des risques et sécurité
MASSOT Odile	Prévention des risques, ingénierie bâtiment
MATHIEU Éric	Ingénierie de projets dans les domaines de santé
POURIAS Marie-Annick	Projets professionnels – Formation continue

VERBORG Soisik

Management – Qualité

*ATER (Assistants Enseignement  
Supérieur et Recherche).*

*Disciplines*

FATEH Talal

Hygiène Sécurité – Environnement santé

# REMERCIEMENTS

Je remercie sincèrement les membres de mon jury :

Monsieur le **Professeur Frédéric LAGARCE** qui m'a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse,

Madame le **Professeur Marie-Claire VENIER** pour avoir accepté de juger ce travail,

Mademoiselle **Susanne MUSCHERT**, maître de conférences, pour m'avoir accueillie et permis de participer à ce projet au sein du laboratoire de pharmacotechnie industrielle mais aussi pour son encadrement, sa sympathie, sa disponibilité et ses conseils qui m'ont permis de mener à bien ce projet, ainsi que pour sa présence dans le jury,

Monsieur le **Professeur Jean-François GOOSSENS**, pour son accueil dans le laboratoire de chimie analytique dans lequel j'ai réalisé une partie de ce travail, pour sa disponibilité et surtout pour ses précieux conseils sur la partie analytique ainsi que pour sa participation dans le jury.

Je remercie l'équipe du laboratoire de pharmacotechnie industrielle de Lille :

Monsieur le **Professeur Juergen SIEPMANN** et **Madame Florence SIEPMANN**, maître de conférences, pour leur accueil au sein du laboratoire et pour leur sympathie,

Les doctorantes avec qui j'ai eu le plaisir de partager ces 6 mois, et surtout pour leur sympathie, leur disponibilité et leur aide au cours de ce travail.

Sur le plan plus personnel, je remercie :

Mes parents, que je remercie pour tout, surtout pour m'avoir soutenue aussi bien financièrement que moralement tout au long de ces études,

Mon frère et ma sœur,

Ma grand-mère, partie trop tôt, mais grâce à elle, je suis devenue pharmacien,

Benjamin, merci pour tout ce que tu m'apportes, pour ton soutien et pour ton amour,

Mes amis de la fac avec lesquels j'ai pu partager tant de bons moments durant ces cinq années à Angers, mais également à mes amis mayennais qui m'ont toujours soutenu.

# TABLE DES MATIERES



LISTE DES ABREVIATIONS .....	10
INTRODUCTION .....	12
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE .....	17
<b>I. LES MEDICAMENTS A LIBERATION CONTROLEE .....</b>	<b>18</b>
1. INTRODUCTION .....	18
2. CLASSIFICATION DES SYSTEMES A LIBERATION CONTROLEE .....	20
2.1. <i>Les systèmes contrôlés par diffusion</i> .....	20
2.1.1. Les systèmes réservoirs .....	20
2.1.2. Les systèmes matriciels .....	21
2.2. <i>Les systèmes à libération contrôlée par activation de solvant</i> .....	22
2.2.1. Les systèmes gonflants .....	22
2.2.2. Les systèmes érodibles .....	24
2.2.3. Les systèmes osmotiques .....	24
2.3. <i>Un exemple, les mini-granules</i> .....	25
<b>II. TECHNIQUE D'OBTENTION DES MINI-GRANULES : L'EXTRUSION-SPHERONISATION .....</b>	<b>27</b>
1. INTRODUCTION .....	27
2. LES DIFFERENTES ETAPES : DE LA POUDRE AUX MINI-GRANULES .....	28
3. PARAMETRES INFLUENÇANT LA QUALITE DES MINI-GRANULES .....	32
3.1. <i>Les principaux composants d'une formulation pour l'extrusion-sphéronisation</i> .....	32
3.2. <i>Les différentes variables opératoires pour chaque étape</i> .....	34
<b>III. ENROBAGE DES MINI-GRANULES .....</b>	<b>36</b>
1. COMPOSITION DU FILM D'ENROBAGE .....	36
1.1. <i>Les principaux polymères</i> .....	36
1.2. <i>Les plastifiants</i> .....	39
1.3. <i>Les autres additifs</i> .....	40
2. PROCEDE D'ENROBAGE DES MINI-GRANULES .....	41
2.1. <i>Mécanisme de formation d'un film d'enrobage</i> .....	41
2.2. <i>Les étapes du procédé</i> .....	42
2.3. <i>Les équipements</i> .....	43
3. LES PRINCIPAUX PARAMETRES INFLUENÇANT LA FORMATION ET LA STABILITE DE L'ENROBAGE DES MINI-GRANULES .....	45
<b>IV. LA SPECTROMETRIE DE FLUORESCENCE .....</b>	<b>47</b>
1. PRINCIPE .....	47

2. LES FLUOROPHORES .....	49
3. APPLICATIONS .....	52
 PARTIE EXPERIMENTALE .....	 55
<b>I. MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>56</b>
1. MATERIELS.....	56
2. METHODES .....	56
2.1. Préparation des mini-granules chargées en substance active.....	56
2.2. Enrobage des mini-granules.....	57
2.3. Test de dissolution in vitro.....	58
2.4. Evaluation du pH à l'intérieur de mini-granules enrobées.....	59
2.4.1. Screening des fluorophores .....	59
2.4.2. Fabrication des mini-granules.....	60
2.4.3. Mesure du pH par spectroscopie de fluorescence .....	60
2.4.4. Validation des mesures de pH .....	60
 <b>II. RESULTATS.....</b>	 <b>61</b>
1. LES PROFILS DE LIBERATION DU VERAPAMIL HCL A PARTIR DES DIFFERENTES FORMULATIONS .....	61
1.1. Conséquences du taux d'enrobage .....	61
1.2. Influence du pH.....	62
1.3. Influence de la quantité de polymère dans l'enrobage.....	64
2. TEST DE DISSOLUTION A PARTIR D'UNE SEULE MINI-GRANULE.....	65
3. DETERMINATION DU PH A L'INTERIEUR DE MINI-GRANULES ENROBEES .....	66
3.1. Screening de fluorophores.....	66
3.2. Evaluation du pH à l'intérieur de mini-granules enrobées.....	71
 <b>III. DISCUSSION .....</b>	 <b>72</b>
1. A PROPOS DES PROFILS DE LIBERATION.....	72
2. A PROPOS DE L'EVALUATION DU PH A L'INTERIEUR DE MINI-GRANULES ENROBEES .....	73
CONCLUSION .....	78
BIBLIOGRAPHIE.....	81
TABLE DES FIGURES.....	87
TABLE DES TABLEAUX.....	89

# **LISTE DES ABREVIATIONS**

BCS	Système de classification biopharmaceutique
CMC	Cellulose microcristalline
Cs	Concentration de saturation
Em	Emission
EPR	Résonance paramagnétique électronique
Exc	Excitation
FI	Intensité de fluorescence
HCl	Acide hydrochloride
HPMC	Hydroxypropylméthylcellulose
KCl	Chlorure de potassium
LAF	Lit d'air fluidisé
MFT	Température minimale de formation de film
NaCl	Chlorure de sodium
NADH	Nicotiamide adenine dinucléotide (forme réduite)
PVAc	Polyvinyl acétate
PVA-PEG	Poly(vinyl alcool)-poly(éthylène glycol)
PVP	Poly(vinyl pyrrolidone)= Povidone
RFU	Unité relative de fluorescence
SA	Substance active
Tg	Température de transition vitreuse
TGI	Tractus gastro-intestinal
UV	Ultraviolet
VIS	Visible

# INTRODUCTION

Les formes pharmaceutiques à libération contrôlée présentent depuis plusieurs années un grand intérêt. Elles peuvent être appliquées dans le traitement de différentes pathologies telles que celles du tractus gastro-intestinal (TGI), mais également l'asthme, l'arthrite et les maladies cardiaques. Ces systèmes multiparticulaires sont devenus une alternative efficace par rapport aux médicaments conventionnels ou à libération immédiate (Schultz et Kleinebudde, 1996). En effet, ils présentent de nombreux avantages :

- ✓ Diminution du nombre de prises
- ✓ Obtention de différents profils de libération de la substance active (SA)
- ✓ Limitation des fluctuations intra et inter-individuelles
- ✓ Limitation des effets secondaires
- ✓ Amélioration de l'observance du patient
- ✓ Thérapie à plus faible coût

L'objectif du développement de ces systèmes à libération modifiée est de contrôler le relargage de la molécule active et ainsi de suivre son absorption dans le TGI. Une des technologies utilisées pour modifier la cinétique de libération de la SA est la formulation des systèmes réservoirs (figure 1).

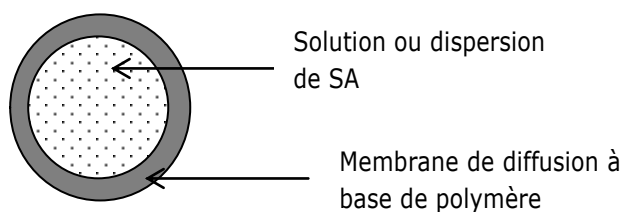


Figure 1 : schéma de système réservoir

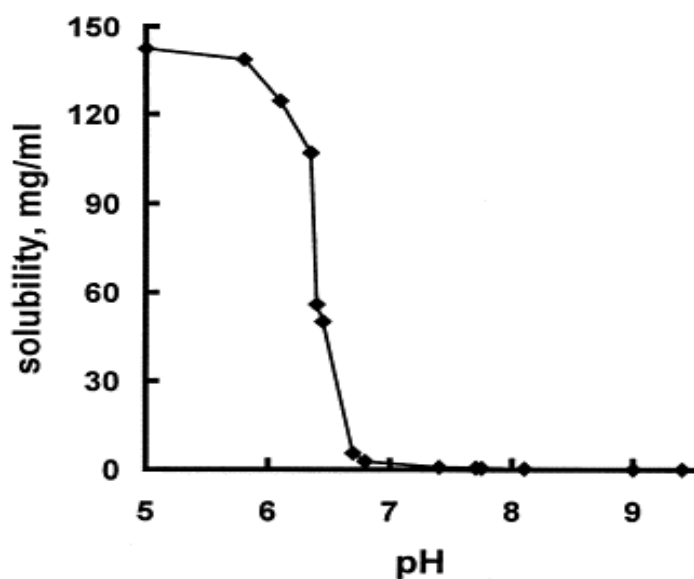
Ils consistent en un enrobage à base de polymère autour d'un cœur solide constitué d'une solution ou d'une dispersion contenant la substance active. On peut citer par exemple les mini-granules présentées comme telles ou sous forme de comprimés ou encore conditionnées dans des capsules.

Les mini-granules sont des formes solides sphériques ou semi-sphériques ayant une taille comprise entre 0,5 et 1,5 mm et destinées à la voie orale. De nombreuses méthodes de fabrication sont reportées dans la littérature telles que le procédé d'extrusion-sphéronisation ou de superposition par lit fluidisé (Manivannan *et al.*, 2010).

Ensuite, un film d'enrobage à base d'agents insolubles dans l'eau est nécessaire pour créer une barrière à la libération de la SA et ainsi la modifier. Le film peut être composé de polymère(s) contenu(s) dans une solution organique, dans une émulsion ou dans une dispersion aqueuse. Il était généralement formé à partir d'une solution organique de polymère. Cependant, la récente introduction sur le marché d'une large gamme de dispersions aqueuses polymériques a permis de développer de nouveaux films d'enrobage sans utilisation de solvant organique (Ozturk *et al.*, 1990).

L'usage de ces solvants est devenu limité de par leurs inconvénients comme leur toxicité, leur inflammabilité et la pollution environnementale qu'ils produisent. C'est pourquoi, les dispersions aqueuses de polymère sont préférées pour leur sécurité. Ces dispersions ou émulsions aqueuses de polymère peuvent être préparées soit par polymérisation de monomère (latex), soit par émulsification de polymère (pseudolatex) (McGinity et Felton, 2008).

Une fois les médicaments à libération contrôlée administrés, ils sont exposés au changement de pH lors de leur passage dans le TGI ; d'un pH acide au niveau stomacal à un pH basique dans les intestins. Ceci peut provoquer des problèmes de dissolution et ensuite d'absorption de la molécule active ; d'autant plus s'il s'agit de bases faibles, comme le vérapamil hydrochloride, montrant des solubilités très variées en fonction du pH. En effet, à faible pH, ces molécules sont facilement solubles donnant une libération rapide tandis qu'à pH basique, elles deviennent insolubles ce qui diminue le taux de dissolution (figure 2). Le vérapamil hydrochloride (HCl) (figure 3) est un dérivé de papavérine avec une masse moléculaire de 491.06 Da et est utilisé comme molécule de référence dans cette étude (Dashevsky *et al.*, 2004).



*Sa solubilité aqueuse diminue à pH 6 pour devenir insoluble.*

Figure 2 : profil de solubilité du vérapamil (Streubel *et al.*, 2000)

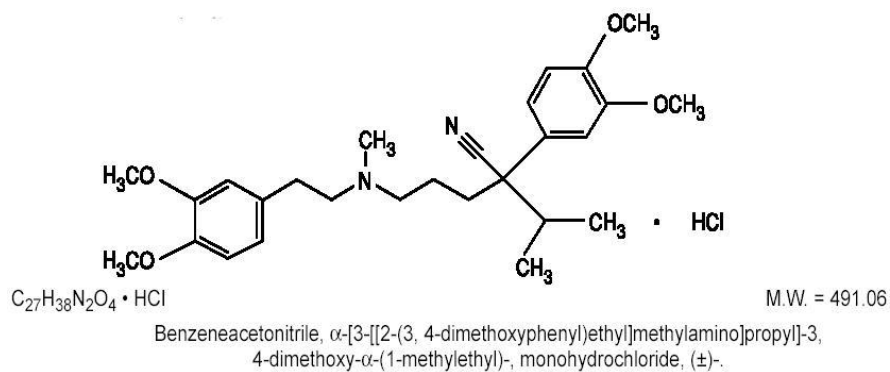


Figure 3 : formule du Vérapamil (Mylan Pharmaceuticals Inc, 2007)

Le vérapamil hydrochloride est une poudre blanche cristalline au goût amer, sans odeur et fortement soluble dans le chloroforme et dans l'eau mais insoluble dans l'éthanol et l'éther. Sa température de fusion est de 140°C et doit être conservé à l'abri de la lumière. Cette SA est un inhibiteur calcique, un vasodilatateur et un antiarythmique. Donc, elle est utilisée dans le traitement des tachyarythmies supraventriculaires, des angines de poitrine et de l'hypertension (Thériaque, 2011).

Aujourd'hui, peu de connaissances concernant les variations du pH dans les systèmes réservoirs pendant leur passage gastro-intestinal sont établies. On propose des micro-électrodes et de la spectroscopie à résonance paramagnétique électronique pour tracer les changements du potentiel dans les systèmes pelliculés (Eisenächer *et al.*, 2011) ou encore la microscopie confocale à balayage laser en utilisant un marqueur de fluorescence dans les pellets matriciels (Li et Schwendeman, 2005). Ces marqueurs montrent un changement d'intensité de fluorescence en fonction du pH.

L'objectif de cette étude est de tracer les changements de pH à l'intérieur de mini-granules enrobées. Elles contiennent du vérapamil hydrochloride comme SA et sont pelliculées avec un mélange de deux polymères, le Kollicoat® SR et le Kollicoat® IR. Le pH est évalué par une méthode non-invasive, la spectrométrie de fluorescence où un fluorophore est incorporé à l'intérieur des pellets.

Le présent rapport s'articulera en deux parties. Dans un premier temps, une revue bibliographique permettra de détailler les mini-granules et leurs intérêts.

Une des techniques d'obtention de mini-granules, l'extrusion-sphéronisation sera également développée ainsi que l'enrobage de ces dernières.

Enfin, le principe et quelques outils concernant la spectrométrie de fluorescence seront présentés.



Dans un second temps, une partie expérimentale développera la mise au point de la technique analytique permettant l'évaluation de ce pH à l'intérieur de mini-granules enrobées.

Ce chapitre sera présenté de façon conventionnelle : les matériels et méthodes employés précéderont les résultats et leur discussion. Enfin, une conclusion générale portant sur l'ensemble des travaux réalisés et des perspectives permettront de clôturer le rapport.

# **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

# I. Les médicaments à libération contrôlée

## 1. Introduction

La libération contrôlée des médicaments est un phénomène récent dans l'histoire pharmaceutique. Elle a débuté dans les années 1930 par l'apparition des premières formes mais s'est vraiment affirmée vers 1960 grâce aux innovations de la société Alza (Nicoli et Colombo, 2001). Cette dernière, spécialisée dans les techniques d'administration des médicaments, a développé un grand nombre de systèmes thérapeutiques novateurs pour répondre aux besoins du patient comme par exemple le système OROS. Cette technologie a été appliquée à certaines thérapies telles que le Ditropan<sup>®</sup> XL (incontinence) et Concerta<sup>®</sup> (syndrome de l'hyperactivité de l'enfant). Aujourd'hui, cette entreprise fait partie du groupe Johnson & Johnson qui l'a rachetée en 2001 (Industrie pharma, 2001 ; Hoffman, 2008).

Pour la définir, la libération contrôlée est destinée à maintenir une concentration thérapeutique suffisante durant une période plus longue que celle obtenue après administration répétée au cours de la journée. Elle consiste donc à modifier la pharmacocinétique du médicament en jouant sur l'absorption de la molécule grâce au système contrôlé. Cette définition se différencie de la libération modifiée qui comprend les formes à libération retardée, accélérée et prolongée où la vitesse de libération est modifiée par rapport à la libération immédiate ou conventionnelle (figure 4) (Boudendouna, 2010).

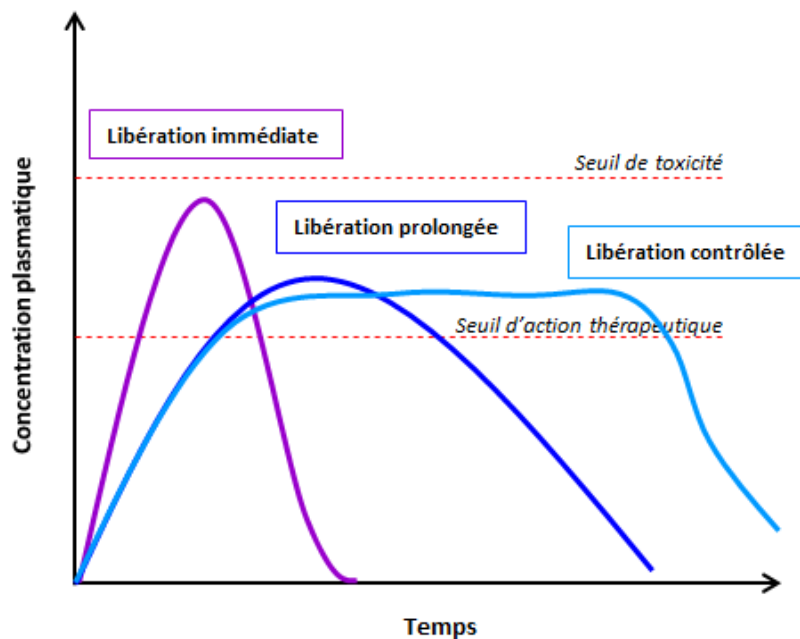


Figure 4 : représentation des profils de libération d'une substance active : immédiate, prolongée et contrôlée (Boudendouna, 2010).

Auparavant, la libération contrôlée était fondée sur la physico-chimie mais maintenant, elle se repose aussi sur une forte base biologique. Son développement a suivi celui de la chimie analytique, de la pharmacocinétique, de la pharmacotechnie et de la biologie. La libération contrôlée reste un domaine étroit comprenant le contrôle dans le temps et l'espace, la disponibilité de la SA et les potentielles voies d'administration.

Avec les médicaments conventionnels, on peut être confronté à différents problèmes tels que les interactions avec d'autres molécules ou aliments, la diminution de la biodisponibilité, le risque de « *dose-dumping* », une inefficacité due à une mauvaise absorption.

Les objectifs des médicaments à libération contrôlée sont d'ordre thérapeutique et économique :

- Diminuer les effets indésirables
- Augmenter l'efficacité du traitement
- Améliorer l'observance des patients
- Redonner vie aux médicaments anciens
- Réduire les coûts

Ils sont réalisables en prévoyant l'absorption du produit actif, en contrôlant sa concentration dans le sang et les tissus et en prolongeant son action pharmacologique de plusieurs heures à plusieurs mois après une seule administration (Nicoli et Colombo, 2001).

Les systèmes à libération contrôlée sont formés de plusieurs éléments destinés à assurer une fonction définie :

- Un réservoir de médicament contenant la dose à administrer
- Une source d'énergie permettant de la faire sortir
- Un dispositif contrôlant la vitesse de libération.

Ils sont donc basés sur le matériel formant le système, la technologie de fabrication, le mécanisme de libération et la cinétique de la SA (Nicoli et Colombo, 2001).

En 2001, les médicaments à libération contrôlée représentaient 15 % du marché total des médicaments et aujourd'hui, étant devenu un grand intérêt pour les industriels pharmaceutiques, ce chiffre est en constante augmentation.

Ces formes pharmaceutiques sont plus utilisées pour la voie orale par leur facilité d'usage. On retrouve les systèmes matriciels, les systèmes réservoirs et les pompes. Néanmoins, on peut les rencontrer également dans les voies transdermique, nasale et pulmonaire par exemple.

## 2. Classification des systèmes à libération contrôlée

Il existe différents dispositifs pharmaceutiques permettant la libération contrôlée de la molécule active. Ils peuvent être classés selon le mécanisme de libération de cette dernière.

### 2.1. Les systèmes contrôlés par diffusion

#### 2.1.1. Les systèmes réservoirs (figure 1)

Il s'agit d'un film de polymère entourant la SA qui peut se retrouver à l'état solide, en solution ou en suspension. Selon la nature et la structure de la membrane, le profil de libération sera différent.

On distingue :

- Les systèmes réservoirs à activité constante où la SA est en excès et sous forme solide dans la phase réservoir : la concentration en molécules diffusantes dissoutes reste égale à la concentration de saturation de la SA au cours du temps.
- Les systèmes réservoirs à activité non constante où la SA est initialement dissoute dans le compartiment réservoir : la concentration en molécule active va décroître au cours du temps.

Lorsque ces médicaments entrent en contact avec les fluides corporels aqueux, l'eau va pénétrer à l'intérieur et dissoudre la SA. Dans le cas des systèmes réservoirs à activité constante, seulement une partie des molécules seront dissoutes due à leur solubilité limitée. Dans l'autre cas, toutes les molécules actives sont rapidement dissoutes. Ensuite, elles peuvent diffuser à travers la membrane par gradient de concentration. La diffusion (figure 5) entraîne différents phénomènes tels que la diffusion de l'eau, la dissolution de la SA, la diffusion de celle-ci, le gonflement des chaînes de polymères, leur dissolution et/ou leur dégradation. La diffusion du produit actif est la plupart du temps, l'étape la plus lente et donc en contrôlant le taux de libération et en utilisant la description mathématique de la diffusion à travers la membrane, on peut caractériser la libération (Siepmann et al., 2012 (a)).

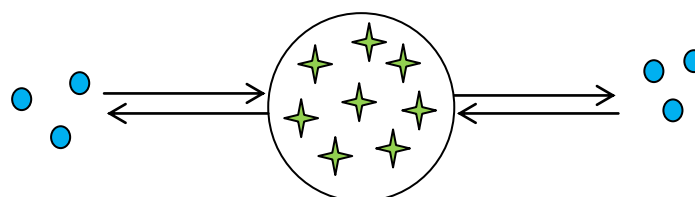


Figure 5 : transport de masse par diffusion

Seuls l'eau, la SA et les molécules de polymère désenchevêtrées peuvent diffuser de part et d'autre de la membrane. La vitesse de diffusion d'une espèce suit la loi de Fick, où le soluté diffuse spontanément de la zone la plus concentrée vers la moins concentrée :

$$\frac{dM}{dt} = -AD \frac{dc}{dx}$$

Le transport de masse par diffusion ( $\frac{dM}{dt}$ ) s'accroît proportionnellement lorsque la surface disponible pour la diffusion (A), la mobilité de l'espèce diffusant (D) et la différence de concentration augmentent et que le chemin de diffusion diminue.

### 2.1.2. Les systèmes matriciels

Dans les systèmes matriciels (figure 6), la SA est distribuée uniformément à l'état moléculaire ou particulaire dans un réseau polymérique, lipidique ou minéral.

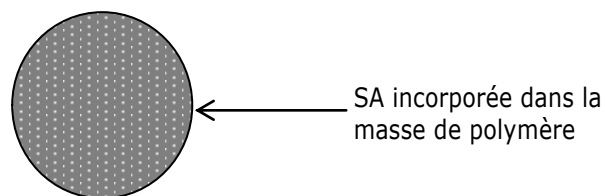


Figure 6 : schéma de système matriciel

La matrice est composée d'excipients physiologiquement tolérés formant un réseau pour piéger les molécules actives. Celle-ci doit montrer une certaine résistance à la désagrégation lorsqu'elle se trouve au contact des liquides digestifs afin d'obtenir une libération prolongée. Cependant, elle peut soit gonfler soit s'éroder dans le TGI selon la nature du système matriciel. Ainsi, la libération de l'agent actif peut se faire de différentes manières : par diffusion, gonflement ou érosion. En effet, les matrices dites homogènes sont formées d'une phase continue non poreuse dans laquelle la SA diffuse et les matrices hétérogènes quant à elles poreuses pouvant rencontrer tous les types de relargage de la SA, c'est-à-dire diffusion, érosion et/ou gonflement.

Il existe plusieurs classifications des matrices selon les auteurs en fonction des critères auxquels ils se basent. D'après C. Brossard, on différencie trois types de matrices suivant la nature des constituants du système et son comportement dans le milieu environnant :

- Les matrices inertes
- Les matrices hydrophiles
- Les matrices érodables

Tout d'abord, les matrices inertes sont constituées d'un réseau poreux insoluble où la SA est incorporée. Une fois dans le TGI, les fluides digestifs pénètrent par capillarité dans le système matriciel. Ensuite, les molécules actives et les excipients se dissolvent et diffusent par les canalicules vers le milieu environnant indépendamment des conditions extérieures. Parmi les matrices inertes se trouvent les matrices minérales et plastiques.

Ensuite, les matrices hydrophiles sont composées d'un polymère hydrophile ayant des propriétés gélifiantes et de principe actif. Lors du contact avec le milieu environnant, une fraction de SA est rapidement dissoute puis la matrice gonfle par hydratation et se gélifie en formant une couche visqueuse où l'eau continue de pénétrer. Cette couche permet aux molécules actives de se libérer lentement en faisant barrière.

Enfin, les matrices érodables sont soit de nature lipidique ou polymérique. Dans le cas des lipidiques, elles sont constituées de corps gras (glycérides, acides et alcools gras par exemple) et l'érosion se fait par action enzymatique ou solubilisation lente des acides gras. Quant aux matrices polymériques généralement composées de polymère de solubilité pH-dépendante (Hydroxypropylméthylcellulose, copolymère méthacrylique, polyvinylpyrrolidone...), elles subissent deux phénomènes, une érosion en surface et une diffusion de la SA (Boudendouna, 2010).

## 2.2. Les systèmes à libération contrôlée par activation de solvant

### 2.2.1. Les systèmes gonflants

Concernant ce type de système (figure 7), le processus est plus complexe. Le solvant diffuse tout d'abord dans le polymère pour induire la relaxation des chaînes macromoléculaires et ainsi la SA diffuse dans la phase gélifiée.

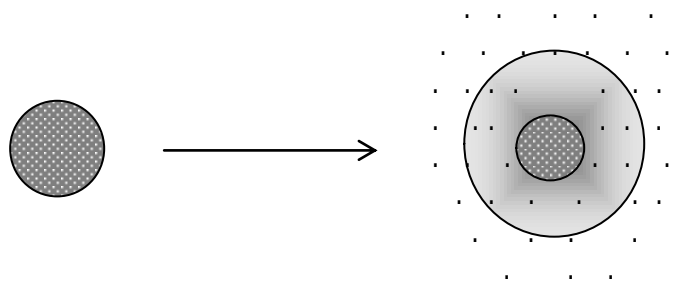


Figure 7 : schéma de système gonflant

Cependant, un minimum d'eau est nécessaire pour détendre les chaînes de polymères selon ses caractéristiques physico-chimiques (structure, masse moléculaire...) et de la température. Avant contact avec le milieu environnant, le réseau de polymère est immobile et la SA est piégée tandis qu'après contact avec les fluides aqueux, l'eau va pouvoir diffuser à travers le dispositif par gradient de concentration. Dès que le minimum d'eau est atteint, le système commence à gonfler (Siepmann *et al.*, 2012 (b)).

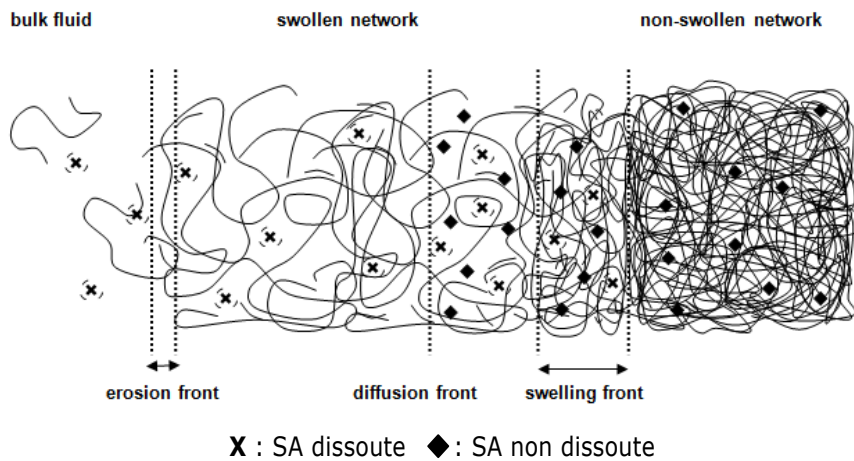


Figure 8 : représentation schématique d'un réseau polymérique chargé en SA à l'état sec puis après pénétration de fluide aqueux (Siepmann *et al.*, 2012 (b))

Par conséquent, le gonflement est responsable du rallongement du chemin de diffusion de la SA et ainsi en résulte une vitesse de libération diminuée bien que la mobilité des chaînes et des molécules augmentent. Lorsque ce type de dispositif entre en contact avec les liquides digestifs (figure 8), l'eau diffuse à travers et provoque le gonflement du polymère ainsi que la dissolution des molécules actives. Après dissolution, elles vont se diriger vers le milieu extérieur. Si le polymère est soluble dans l'eau, sa dissolution se fera à la surface du réseau et deux fronts de mouvement se créent (figure 9). Le premier, le front d'érosion, sépare les fluides environnants du système. Le second, le front de gonflement, limite les chaînes de polymère relaxées contenant la SA dissoute de celles enchevêtrées piégeant la SA non dissoute. Toutefois, si l'agent actif dissous et non dissous coexistent dans le système hydraté, alors un autre front se forme mais seule les espèces dissoutes peuvent diffuser.

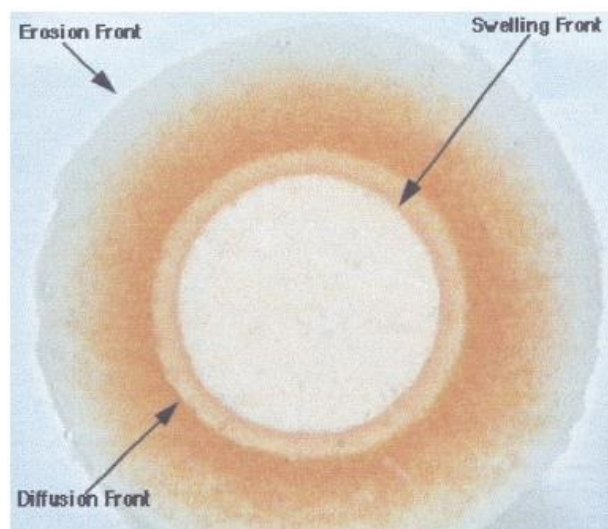


Figure 9 : image d'une matrice d'HPMC contenant 60 % de phosphate de buflovedilpyridoxal après 240 min de gonflement (Colombo *et al.*, 2000)



### 2.2.2. Les systèmes érodibles

Les systèmes érodibles (figure 10) fonctionnent différemment des autres présentés précédemment. Le polymère est solubilisé et forme la matrice du système où se trouve la substance active. Une fois dans le TGI, l'hydrolyse des liaisons de pontage du polymère réticulé a lieu, le polymère se dégrade et forme ensuite des oligomères qui vont se solubiliser au fur et à mesure. Ainsi, la libération des molécules actives se fait progressivement selon l'avancée de l'érosion.

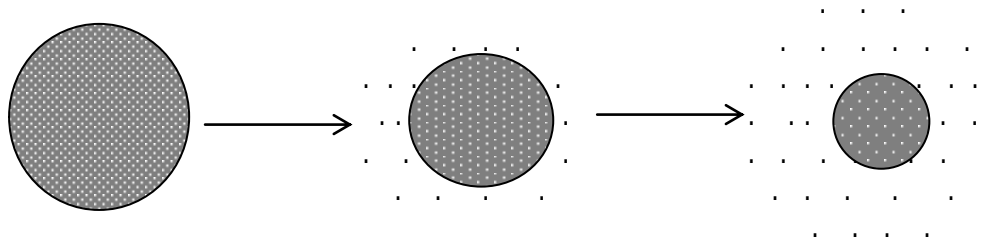


Figure 10 : schéma de système érodible

Ces systèmes peuvent également se dégrader biologiquement, c'est-à-dire que le polymère se décompose en petits fragments à l'intérieur de l'organisme et libère la SA de façon contrôlée. Ces dispositifs sont très appréciés en chirurgie où tous les implants ne doivent pas obligatoirement être retirés après traitement (Shen *et al.*, 2004).

### 2.2.3. Les systèmes osmotiques

Parmi les systèmes osmotiques, on trouve les comprimés osmotiques simples appelé OROS<sup>®</sup> (Oral osmotic system) (figure 11).

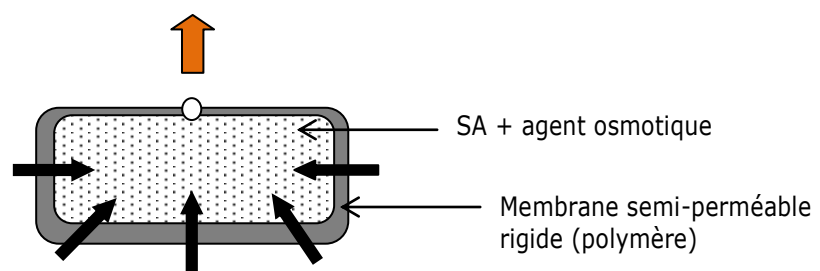


Figure 11 : schéma d'un système osmotique OROS<sup>®</sup>

Il s'agit d'un dispositif avec un noyau solide contenant la SA (soluble dans le fluide GI) mélangée à un agent osmotique (NaCl, KCl) ainsi que d'une membrane polymérique (dérivés de cellulose) semi-perméable entourant le tout. Il faut noter que cette membrane est indéformable. De plus, celle-ci présente un orifice afin que le produit actif puisse passer dans le milieu extérieur. Le fonctionnement est le suivant : l'eau pénètre par appel osmotique à travers la membrane ce qui va dissoudre les solutés et augmenter la pression à l'intérieur pour provoquer la libération de la solution

saturée en SA. La cinétique de libération est régulée par la surface de la membrane, son épaisseur, sa perméabilité à l'eau et par les propriétés osmotiques du noyau.

Ensuite, les comprimés osmotiques à double couche (Oros push-pull®) (figure 12) font partie de cette catégorie.

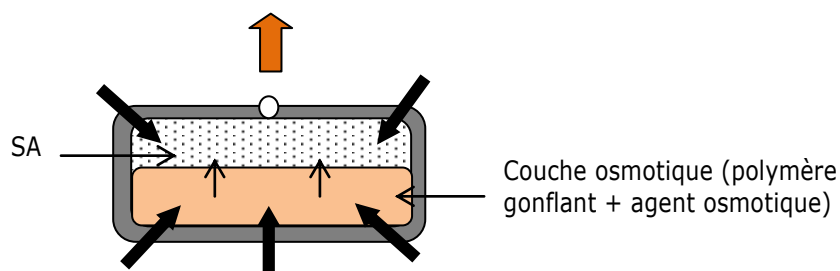


Figure 12 : schéma de comprimé osmotique à double couche (Oros push-pull®)

Ce dispositif est utilisé pour des SA très solubles ou peu solubles dans le fluide GI. Dans ce dernier cas, les molécules actives sont libérées sous forme de suspension. Il est constitué d'un noyau osmotique contenant un sel minéral (NaCl, KCl) dans un premier compartiment séparé du milieu extérieur par une membrane semi-perméable et dans une autre cellule se trouve la solution de SA séparée par une membrane souple et imperméable. Après contact avec le milieu environnant, l'eau pénètre à l'intérieur du système ce qui va augmenter le volume du premier compartiment et créer une poussée hydrodynamique sur le deuxième compartiment. Ainsi, la SA est expulsée au fur et à mesure par l'orifice.

Il existe également de nombreux autres systèmes comme ceux contrôlés chimiquement, iontophorétiques, etc.

### 2.3. Un exemple, les mini-granules

Les granules pelliculées agissent comme des systèmes réservoir où la substance active a la capacité de se libérer de façon contrôlée et sur une cible spécifique selon l'application pharmaceutique requise (Patel *et al.*, 2013). Depuis plusieurs années, ces systèmes montrent un nouvel essor par leur haute flexibilité de développement de nouvelles formes pharmaceutiques orales (suspension, sachet, comprimé et capsule).

D'après Ghebre-Sellassie (1989), les pellets sont des particules solides et sphériques avec une distribution de taille étroite allant de 500 à 1500  $\mu\text{m}$  pour des applications pharmaceutiques et plus particulièrement destinées à la voie orale. Elles sont préparées via un processus de granulation qui, à partir de fines poudres de SA et d'excipients, permet d'obtenir des petites unités sphériques ou semi-sphériques ayant de bonnes propriétés d'écoulement (Ghebre-Sellassie, 1989).

L'intérêt des granules a augmenté continuellement grâce à leur nature multiparticulaire et leurs avantages thérapeutiques et de fabrication. Tout d'abord, le risque d'avoir une forte concentration locale et donc un effet irritant sur la muqueuse gastrique est réduit grâce à la répartition de la SA sous forme de petite dose unitaire. Ainsi, l'absorption de la molécule est améliorée par une meilleure dispersion des pellets et les fluctuations plasmatiques sont diminuées (Dukic-Ott *et al.*, 2008). De plus, il est possible de mélanger plusieurs agents actifs présentant des incompatibilités.

Quant aux avantages technologiques, les granules présentent de bonnes propriétés d'écoulement, une faible friabilité, une distribution de taille étroite et peuvent être enrobées grâce à leur surface lisse et leur géométrie. Ce dernier stabilise le principe actif et/ou contrôle sa libération. La granulation permet également d'augmenter la densité du produit afin d'améliorer le *process* et le packaging (Patel *et al.*, 2013).

Ces systèmes ont la capacité d'incorporer une grande quantité de composants actifs et peuvent fournir différents profils de libération selon l'épaisseur et la composition du film d'enrobage.

Pour que les granules possèdent tous ces avantages, il est nécessaire qu'elles possèdent certaines propriétés présentées dans le tableau 1.

<b>Propriétés</b>	<b>Exigences</b>
<b>Forme</b>	Sphérique et uniforme
<b>Texture de la surface</b>	Lisse
<b>Taille moyenne</b>	500-1500 $\mu\text{m}$
<b>Distribution de taille</b>	Etroite
<b>Densité</b>	Haute
<b>Force mécanique</b>	Haute
<b>Propriété d'écoulement</b>	Bonne
<b>Contenu en SA</b>	De très basse à plus de 95 %

Tableau 1 : propriétés requises pour des pellets non enrobées (Patel *et al.*, 2013)

Une fois enrobées, les granules conservent les mêmes propriétés et obtiennent en plus les caractéristiques du profil de libération désiré.

Enfin, les sphéroïdes présentent une bonne plasticité utile pour des opérations ultérieures telles que la compression et l'enrobage.

## II. Technique d'obtention des mini-granules : l'extrusion-sphéronisation

### 1. Introduction

Quatre techniques sont répertoriées pour l'élaboration de granules (Gandhi, 1999 ; Ghebresellassie, 1989 ; Vervaet, 1995).

La première est le montage en turbine où une solution composée de liant et de SA est pulvérisée sur des noyaux de saccharose par exemple. Ensuite, il existe le montage en lit d'air fluidisé dont le principe est le même que précédemment. En revanche, la pulvérisation peut se faire soit par le haut (« top spray »), par le bas (« bottom spray ») ou encore tangiellement (« tangential spray »). Puis, la rotogranulation permet d'obtenir des sphéroïdes à partir d'un mélange de poudre d'excipients et d'agent actif sur lequel est pulvérisé un liant.

Enfin, la méthode la plus répandue pour la mise au point des granules est l'extrusion - sphéronisation. La sphéronisation, d'origine japonaise, a été inventée par Nakara en 1964 et l'association des 2 étapes extrusion et sphéronisation s'est faite en 1966 pour le domaine pharmaceutique. Cependant, elle a été reportée pour la première fois par A.D. Reynolds, J.W. Conine et H.R. Hadley en 1970 (Désiré, 2011 ; Gandhi *et al.*, 1999). Elle se déroule en quatre étapes :

1. Granulation : préparation de la masse humide
2. Extrusion : formation d'extrudats par passage de la masse humide dans un cylindre perforé
3. Sphéronisation : obtention de sphères par rupture et arrondissement des extrudats
4. Séchage des granules

Ce procédé est apprécié par les avantages qu'il offre (Glatt GmbH, 2006 ; Gandhi *et al.*, 1999) :

- Rapide par sa facilité d'opération
- Bon rendement de production avec de faible perte
- Distribution de taille des particules étroite
- Amélioration des propriétés d'écoulement du produit fini
- Faible friabilité
- Réduction des particules de poussière
- Automatisable
- Bonne répétabilité

## 2. Les différentes étapes : de la poudre aux mini-granules

Le procédé d'extrusion et de sphéronisation (figure 13) consiste en un mélange de poudre suivi d'une granulation, d'une extrusion et sphéronisation et enfin d'un séchage.

### Granulation

Tout d'abord, la première étape correspond à la préparation d'une masse humide. Pour cela, les poudres (excipients et/ou SA) sont, dans un premier temps, mélangées puis la solution de mouillage est introduite sous agitation jusqu'à obtention d'un mélange humide homogène. C'est une phase fondamentale car elle va influencer la qualité des extrudats et donc des sphéroïdes selon le taux d'humidité obtenue du mélange.

Pour les mélanges à sec, plusieurs appareils peuvent être utilisés : les mélangeurs par retournement à cuve tournante ou à cuve fixe, les mélangeurs à vis (Nautamix Hosokawa®) et horizontaux (Lödige®).

Ensuite, le but du mouillage est d'obtenir une répartition homogène du liquide dans le lit de poudre. Pour s'en assurer, d'autres systèmes sont employés tels que le mélangeur planétaire, à fort cisaillement ou encore le mélangeur à lame type sigma. La solution, généralement constituée d'eau, agit comme un liant qui va permettre d'obtenir des propriétés cohésives et rhéologiques de la masse de poudre et ainsi permettre la formation d'extrudats puis de granules. La quantité du liquide va dépendre de la proportion en cellulose microcristalline (CMC) dans le mélange, du type de CMC, de la solubilité et de la capacité d'absorption en eau des autres composants (Désiré, 2011 ; Gandhi *et al.*, 1999 ; Vervaet *et al.*, 1994). Il est important de noter qu'il faut minimiser l'évaporation de cette solution liante lors de la granulation. En effet, la masse peut perdre de la cohésion et de la plasticité et les extrudats seront de mauvaise qualité. Ce problème est souvent rencontré lors de l'utilisation de mélangeur à haut cisaillement où une grande partie d'énergie est introduite se transformant en chaleur et provoquant l'évaporation du liquide (Vervaet *et al.*, 1994).

### Extrusion

Il s'agit pour la seconde étape d'une compaction et d'une transformation de la masse humide en longs bâtonnets appelés plus couramment extrudats lors de son passage dans un cylindre contenant des orifices calibrés. Ces derniers doivent conserver une bonne cohésion et une plasticité



Figure 13 : l'extrusion-sphéronisation  
(Glatt GmbH, 2006)

suffisante pour éviter de retourner à leur état initial c'est-à-dire en poudre et pour devenir le plus sphérique possible lors de la sphéronisation. Par ailleurs, ils ne doivent pas non plus être trop collants de risque à s'agglomérer les uns aux autres et former de gros sphéroïdes. Il est donc nécessaire d'avoir une masse plastique cohésive et une lubrification pour cette phase d'extrusion. C'est la solution liante en quantité adéquate qui va permettre de l'obtenir. (Gandhi *et al.*, 1999 ; Désiré, 2011).

Pour réaliser ces extrudats, quatre types d'appareils sont répertoriés selon leur mécanisme de transport de la masse humide vers la grille d'extrusion (Vervaet *et al.*, 1994 ; Wilson et Rough, 2007) : les extrudeurs à vis, à tamis, à panier et rouleaux et enfin à piston.

Le premier est constitué d'une ou deux vis sans fin pour assurer une pression nécessaire au passage de la masse de poudre à travers les orifices calibrés produisant ainsi des extrudats uniformes. Il en existe deux types :

- **L'extrudeur à vis type axial (figure 14)** : la grille d'extrusion entoure la vis et les extrudats sortent perpendiculairement à la vis.

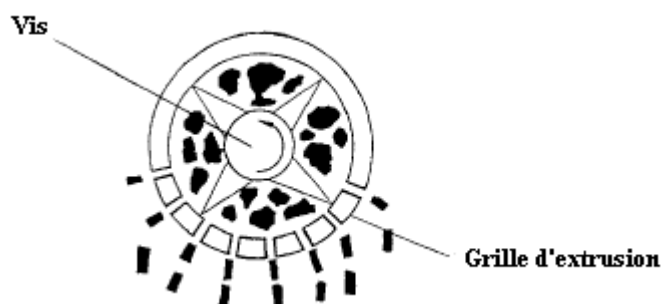


Figure 14 : extrudeur à vis de type axial (Vervaet *et al.*, 1994)

- **L'extrudeur à vis de type radial (figure 15)** : la grille d'extrusion est disposée de façon perpendiculaire et en fin de vis.

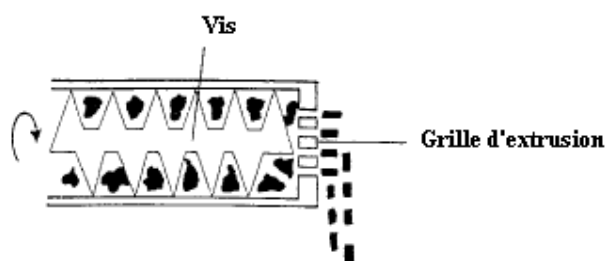


Figure 15 : extrudeur à vis de type radial (Vervaet *et al.*, 1994)

En ce qui concerne les extrudeurs à tamis et à panier, la masse de poudre est alimentée par gravité dans la cuve et une rotation du système (couteaux ou cylindres) amène la matière à travers les

orifices d'extrusion. La différence entre les deux est la position de la grille d'extrusion (en axial pour l'extrudeur à tamis et en radial pour celui à panier).

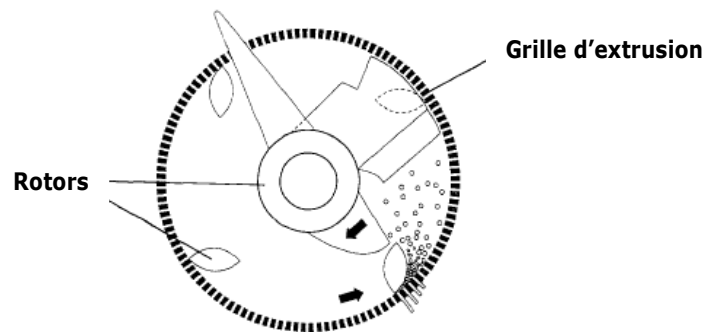


Figure 16 : extrudeur à panier (Vervaet *et al.*, 1994)

Les extrudeurs à paniers (figure 16) sont composés de couteaux rotatifs situés au centre d'un cylindre perforé. Les couteaux permettent de pousser la masse de poudre à travers la grille d'extrusion et ainsi former des extrudats.

Ensuite, la troisième classe concerne les extrudeurs à rouleaux. On peut différencier deux genres : le premier (figure 17) est constitué de deux roues tournant à contre-sens, une ou les deux étant perforées ; le deuxième (figure 18) est équipé d'un cylindre perforé muni de rotation autour d'un ou plusieurs rouleaux permettant l'extrusion de la matière vers l'extérieur. Le cylindre perforé sert de grille d'extrusion et quant au non-perforé, il permet la contre-pression.

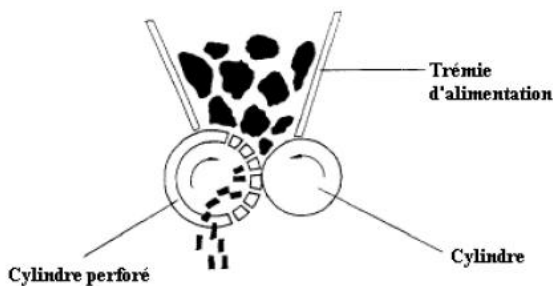


Figure 17 : extrudeur à rouleaux avec un seul rouleau perforé (Vervaet *et al.*, 1994)

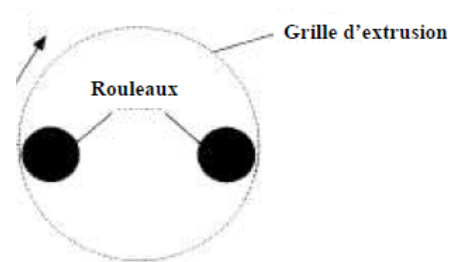


Figure 18 : extrudeur à rouleaux entourés de la grille d'extrusion (Vervaet *et al.*, 1994)

Enfin, les extrudeurs à piston (figure 19) représentent le dernier type d'appareils réservé à un usage strictement expérimental. Il dispose d'un piston qui va pousser la matière vers l'intérieur d'un cylindre jusqu'à la comprimer contre un tamis pour former des extrudats.

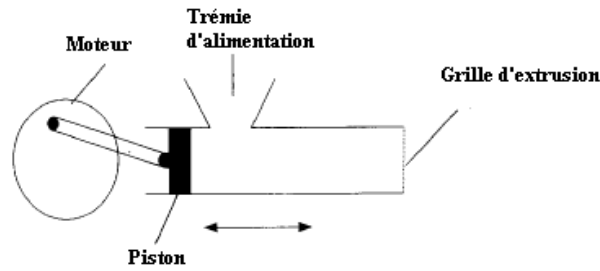


Figure 19 : extrudeur à piston (Vervaet *et al.*, 1994)

### Sphéronisation

La troisième étape consiste à transférer les extrudats humides dans le sphéroniseur. Ce dernier est composé d'un cylindre vertical creux avec au fond un plateau rotatif. Les extrudats vont se casser en petits bâtonnets de longueur égale à leur diamètre pour ensuite s'arrondir et former des sphéroïdes grâce au mouvement rotatif du plateau (figure 20). En fait, d'une part, la force centrifuge créée par la rotation du plateau envoyant les particules contre les parois du cylindre est responsable de la formation de petits cylindres et d'autre part, les frictions interparticulaires et sur la surface striée du plateau sont responsables de leur sphéricité (Gandhi *et al.*, 1999 ; Wilson et Rough, 2007).

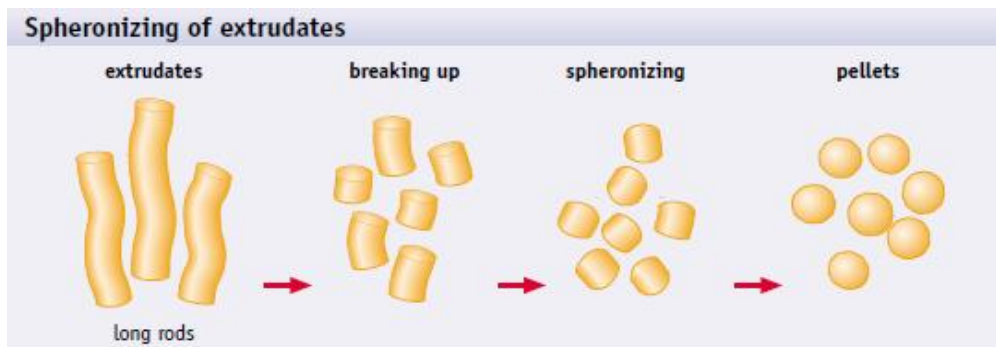


Figure 20 : la sphéronisation des extrudats (Glatt GmbH, 2006)

Cette étape prend environ entre 2 et 10 minutes et la vitesse de rotation est généralement comprise entre 200 et 400 rpm. En revanche, pour certains auteurs, la vitesse de rotation doit excéder les 400 rpm. Or, la vitesse en elle-même n'a pas de signification, il faut la corrélérer au diamètre du plateau rotatif.

Lors de la sphéronisation, plusieurs sous-phases peuvent être distinguées selon la forme que prennent les extrudats humides.

Selon Rowe (1985) et par les forces de friction, les extrudats se cassent tout d'abord en petits bâtonnets, pour ensuite commencer à s'arrondir et former des haltères, des sphères elliptiques et enfin des sphéroïdes (figure 21).





Figure 21 : formation des sphéroïdes selon Rowe (1985) : I : extrudat, II : cylindre arrondi, III : haltère, IV : sphère elliptique, V : sphère

Tandis que Baert (1993) suggère un autre mécanisme de formation des granules. Une torsion du cylindre intervient avant l'arrondissement de ce dernier ce qui va provoquer sa cassure en 2 morceaux (figure 22).



Figure 22 : formation des granules selon Baert (1993) : I : cylindre, II : cordon, III : haltère, IV : sphère avec une cavité extérieure, V : sphère

### Séchage

La quatrième et dernière étape du procédé de fabrication des granules correspond au séchage des sphères humides obtenues après sphéronisation. En effet, la solution mouillante incorporée lors de la granulation doit être éliminée jusqu'à une certaine teneur en humidité résiduelle suffisante pour assurer la stabilité du produit fini. Elles peuvent être séchées à température ambiante mais également à température plus élevée en utilisant des étuves, des atomiseurs ou un lit d'air fluidisé ; le dernier étant le plus pratiqué dû à sa courte durée.

## 3. Paramètres influençant la qualité des mini-granules

Le procédé de fabrication des mini-granules par extrusion-sphéronisation est couramment utilisé et répertorié de nombreuses fois dans la littérature. Cependant, les formulations varient selon l'objectif et l'application pharmaceutique finale. Le bon déroulement des étapes va donc dépendre des propriétés des excipients, de la SA mais également des variables opératoires.

### 3.1 Les principaux composants d'une formulation pour l'extrusion-sphéronisation

Premièrement, les excipients faisant partis de la phase solide sont les composants majeurs en terme de volume et inertes de la formulation. Ils fournissent au produit fini les propriétés mécaniques adéquates. De plus, ils permettent de faciliter les opérations en fournissant les caractéristiques rhéologiques nécessaires telles que la cohésion et la plasticité de la masse de poudre. Par ailleurs, ces excipients doivent être quasi insolubles dans la phase liquide. Les plus couramment employés sont la

cellulose microcristalline, le carbonate de calcium, le talc ou encore des mélanges comme la CMC et le lactose ; la CMC étant le plus classique.

La cellulose microcristalline est un polymère de cellulose de formule brute  $(C_6H_{10}O_5)_n$  et constituée d'unités de cellobiose reliées par des liaisons  $\beta$ -(1-4)glucosidiques. Trois groupements hydroxyles sont présents sur les hétérocycles et sont responsables de la formation des liaisons hydrogènes inter et intra-moléculaires. C'est pourquoi de bonnes propriétés de cohésion sont obtenues. D'autre part, la CMC n'est pas hydrosoluble mais absorbe et retient une forte quantité d'eau grâce à sa surface et à ses pores internes. Elle est assimilée à une éponge moléculaire et apporte une bonne cohésion et lubrification à la masse humide. De plus, elle ajoute de la plasticité aux extrudats pendant la sphéronisation ce qui facilite leurs transformations en sphéroïdes (Dukic-Ott *et al.*, 2008).

Toutefois, il existe différents grades de CMC sur le marché suivant leurs méthodes de fabrication, leurs propriétés physiques et leurs applications ; l'Avicel® PH-101 étant le plus adapté au procédé d'extrusion-sphéronisation. Par exemple, la CMC contenant des particules de grande taille apportera un meilleur écoulement et celle à faible teneur en humidité sera utilisée pour des matériaux hygroscopiques (Rowe, 2005).

Deuxièmement intervient les propriétés de la SA utilisée. La taille des particules, sa densité et sa sensibilité à la chaleur sont des informations à connaître pour adapter au mieux les étapes et éviter la ségrégation lors du mélange initial.

Troisièmement, la phase liquide, généralement de l'eau ou une solution aqueuse, joue un rôle fondamental. Elle favorise la liaison des particules les unes aux autres afin d'obtenir une masse humide cohésive et apporte aussi une lubrification et une plasticité nécessaires au bon déroulement de l'extrusion-sphéronisation. Son bon ajustement en terme de quantité est un paramètre extrêmement important. A savoir que la proportion va varier d'une formulation à une autre, de l'équipement ainsi que des conditions environnantes. Le ratio solide/liquide est donc décisif :

- Une faible quantité de phase liquide va demander une force plus importante pour l'extrusion du lit de poudre ; la sphéronisation sera de mauvaise qualité et le séchage va générer de la poussière.
- Une grande quantité de solution liante provoquera un surmouillage de la phase solide. Une fois extrudée, la surface sera trop humide et causera des agglomérations dans le sphéroniseur.

Ainsi, le taux d'humidité influence la taille et la forme des granules (Wilson et Rough, 2007).

Enfin, la solubilité et la distribution de taille de tous les composants sont des points importants. Ils aident à déterminer la quantité de liquide nécessaire pour avoir une bonne plasticité. Une SA soluble dans la phase liquide sera dissoute et augmentera le volume, ce qui amènera à un surmouillage du mélange contrairement à une formulation avec une molécule active insoluble. De plus, la taille des particules affectent la taille des sphères.

Sinon, d'autres adjuvants peuvent être ajoutés comme des surfactants ou lubrifiants pour optimiser le procédé et donc le produit fini.

### 3.2. Les différentes variables opératoires pour chaque étape

Le procédé d'extrusion-sphéronisation implique un grand nombre de paramètres pouvant influencer la qualité du produit fini. Sur le diagramme ci-dessous (figure 23) sont décrites les différentes étapes avec pour chacune d'entre elles le matériel et les variables opératoires.

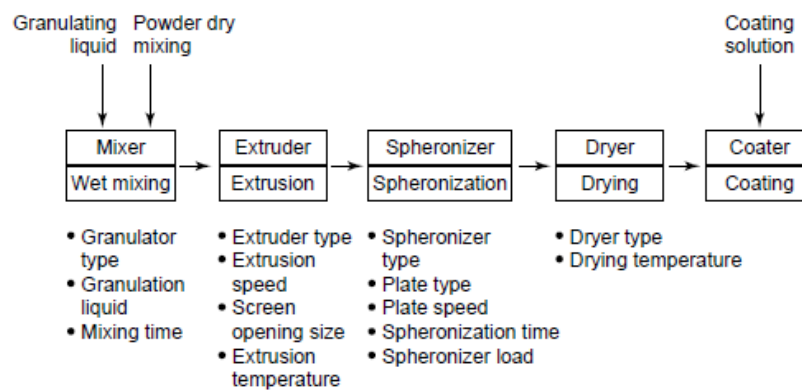


Figure 23 : diagramme représentant les équipements, les étapes et les paramètres impliqués lors de l'extrusion-sphéronisation (Gandhi *et al.*, 1999)

#### Granulation

Tout d'abord, le type de mélangeur et le temps de granulation ont un impact sur la qualité du mélange et de la masse humide finale. En effet, l'utilisation d'un mélangeur planétaire et d'un mélangeur à fort cisaillement ne donnera pas la même masse de poudre. Le dernier nécessite beaucoup d'énergie procurant de la chaleur et augmentant la température du système. Ainsi, l'eau ajoutée aura tendance à s'évaporer, ce qui nécessitera un apport plus important et donc une durée de granulation plus longue. La masse humide de poudre ne sera pas assez cohésive et plastique pour pouvoir former de bons extrudats et ensuite être transformés en granules (Vervaet *et al.*, 1994 ; Désiré, 2011). De plus, il faut considérer également la vitesse d'agitation et le taux de remplissage lors de cette phase.

#### Extrusion

La qualité des extrudats dépend de la masse humide de poudre obtenue, puis du type d'extrudeur employé, de la vitesse d'extrusion, de la grille d'extrusion et de la température d'extrusion. Le choix de l'appareil est donc fonction de l'objectif et de l'application pharmaceutique du produit fini.

D'une part, le type d'extrudeur peut influencer l'aspect des granules (sphéricité, densité, distribution de taille). Par exemple, les extrudeurs à vis axiale et à panier vont produire des granules assez denses et dures contrairement aux extrudeurs à vis radiale en raison d'une différence de production de chaleur et de rendement (Wilson et Rough, 2007). Il en est de même si l'on compare un extrudeur à rouleau et à piston (Fielden *et al.*, 1992). Toutes ces variations sont principalement dues au changement de quantité de phase liquide dépendante de chaque appareil.

D'autre part, intervient la vitesse d'extrusion qui a un effet sur la taille et la surface des sphères. D'ailleurs, le rendement qui doit être le plus haut possible pour des raisons économiques, est gouverné par la vitesse d'extrusion. En effet, si elle est augmentée, des défauts de surface tels qu'une rugosité seront observés car les extrudats vont se casser de manière inégale lors de la sphéronisation ; d'autant plus que de l'énergie est transformée en chaleur provoquant ainsi une évaporation de la phase liquide et une apparition de poussière. Il en résultera une large population de fines particules et donc une distribution de taille étendue.

Ensuite, le modèle de la grille ou du cylindre d'extrusion utilisé interfère sur la qualité finale du produit fini en termes de surface et de densification. Il est caractérisé par sa longueur (épaisseur de la grille) et par le diamètre des orifices. Un changement d'un de ces deux paramètres peut modifier le résultat. De plus, la taille des orifices détermine le diamètre des extrudats qui est relié à la taille finale des granules, c'est donc un critère essentiel de l'opération.

Enfin, la température d'extrusion joue également un rôle important lors de cette deuxième étape non seulement si la formulation est thermolabile mais aussi pour éviter tout assèchement de la masse de poudre. Si elle est trop élevée, le contenu en eau sera altéré dû à son évaporation surtout avec de l'avicel® PH-101 où l'eau est retenue sous forme libre en surface donc une évaporation plus facile et rapide (Vervaet *et al.*, 1994 ; Gandhi *et al.*, 1999).

### *Sphéronisation*

Trois grandes variables sont à considérer lors de la troisième étape du procédé, la sphéronisation. La première est la vitesse de sphéronisation qui affecte quelques caractéristiques des granules comme la taille, la dureté, la densité, la porosité et la friabilité. Si elle est trop faible, les granules ne seront pas assez sphériques et la densité sera faible. En revanche, si elle est trop élevée, les sphéroïdes peuvent s'agglomérer entre eux d'où une bonne adaptation de la vitesse en fonction de l'objectif à atteindre. La seconde variable est la durée de sphéronisation. Une augmentation de celle-ci entraîne un grossissement du diamètre, une distribution de taille étroite et une surface plus lisse. Enfin, la troisième variable correspond au chargement du sphéroniseur. En mettant une grande quantité d'extrudats dans le système, les interactions des particules avec le bol seront moindres mais les chocs inter-particulaires prédomineront favorisant ainsi la formation de petites granules plus poreuses et plus dures et nécessitant dans ce cas un temps plus long. On peut augmenter la vitesse de

l'appareil si le chargement est faible sans avoir de véritables conséquences (Vervaet *et al.*, 1994 ; Gandhi *et al.*, 1999).

Quant au diamètre et à la forme du sphéroniseur, les variations ne sont pas notables.

### *Séchage*

On peut observer des différences d'aspect des granules selon le type d'appareillage, le temps et la température utilisés. Ces paramètres influencent également la vitesse de séchage qui selon le temps d'élimination de l'eau, modifiera la structure poreuse et la surface des granules. Par exemple, un séchage en étuve donnera des sphéroïdes poreux, durs avec une surface homogène. Si le séchage est trop long, les grains auront tendance à se rétrécir et à développer une surface irrégulière et rugueuse.

## **III. Enrobage des mini-granules**

Les granules sont enrobées pour des raisons esthétiques et/ou pour ajouter des fonctionnalités supplémentaires au produit telles qu'une libération contrôlée. L'enrobage peut être également appliqué pour le masquage de goût et pour une meilleure protection aux conditions environnementales (humidité, lumière,...).

Un des avantages des mini-granules est leur profil de libération qui est modulable selon le type et l'épaisseur de l'enrobage. Il existe différentes manières de procéder à la fabrication de mini-granules enrobées. La SA peut être soit incluse dans le noyau des sphéroïdes ou soit intégrée dans une couche superposée au noyau et ensuite dans les deux cas, un pelliculage de polymère sera ajouté afin de contrôler la libération. Ainsi, plusieurs granules ayant des profils de libération variables peuvent être conditionnées dans une même capsule.

### **1. Composition du film d'enrobage**

#### **1.1. Les principaux polymères**

Différentes macromolécules d'origine naturelle ou synthétique ont été prouvées pour être adaptées à l'enrobage de formes pharmaceutiques et pouvant fournir des profils de libération variés. Pour obtenir la libération qui convient aux caractéristiques pharmacocinétiques de la molécule active et au type de traitement, plusieurs formulations et paramètres opératoires peuvent être modulés tels que le taux d'enrobage, la nature du polymère et la quantité de plastifiants (Siepmann *et al.*, 2008 (a)).

Les polymères insolubles sont les composants majoritaires dans la formulation de l'enrobage pour formes à libération contrôlée. Ils se présentent sous forme de dispersions aqueuses, c'est-à-dire une forte concentration de polymère formant soit des particules colloïdales de latex, si la préparation

est effectuée à partir de monomères ou soit de pseudo-latex si c'est à partir d'une émulsification de polymère. Les dispersions aqueuses polymériques sont aujourd'hui préférées pour leurs avantages, à savoir le respect de l'environnement, la sécurité d'emploi, l'utilisation de solvant aqueux et non organique et une diminution de la durée de l'enrobage. Plusieurs procédés d'émulsification peuvent être employés pour préparer des pseudo-latex. Le polymère est dissous dans un solvant aqueux immiscible et la phase organique est émulsifiée dans l'eau. Après homogénéisation, le solvant est évaporé par distillation sous vide, menant à une dispersion de 30% de polymère dans l'eau. Il en résulte une suspension de faible viscosité et facilement pulvérisable (Carlin et Li, 2008).

Les polymères les plus communs à l'enrobage de granules sont les suivants :

- Les dérivés cellulosiques, exemple : éthylcellulose, Aquacoat®
- Les polyméthacrylates, exemple : Eudragit®
- Les polymères à base de polyvinyl, exemple : polyvinyl acétate, Kollicoat® SR

### *L'éthylcellulose*

L'éthylcellulose (figure 24) seul est peu utilisé en raison de sa faible perméabilité libérant trop lentement la plupart des SA.

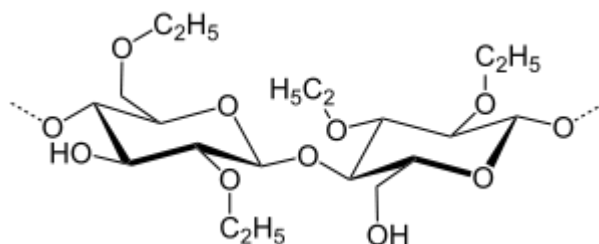


Figure 24 : formule de l'éthylcellulose

C'est pourquoi, l'éthylcellulose est associé à un autre polymère soluble tel que le polyéthylène glycol (PEG), poly(vinylpyrrolidone) (PVP), les éthers de cellulose hydrophile (Hydroxypropylméthylcellulose, HPMC). Ainsi, le film devient plus perméable, et libère plus aisément la molécule active. Le mélange le plus fréquent est l'éthylcellulose et le Kollicoat® IR pour la fabrication de systèmes contrôlés osmotiquement par exemple (Muschert, 2009). Ensuite, il est possible de moduler le relargage de la SA, car lorsqu'on diminue la masse molaire de l'éthylcellulose, la libération augmente due à la diminution de la stabilité mécanique du film facilitant la formation des pores et donc la diffusion des molécules. Une autre possibilité est l'application de dispersions aqueuses d'éthylcellulose connues sous le nom d'Aquacoat® ou encore Surelease®.

L'Aquacoat® est employé pour l'enrobage, le masquage de goût et pour la protection contre l'humidité. Il est constitué d'éthylcellulose, de surfactant (Sodium lauryl sulfate) et de stabilisant (cetyl alcool). C'est une dispersion colloïdale d'éthylcellulose à 30% de matière solide obtenue par émulsification et évaporation de solvant. Ce polymère est insoluble dans l'eau et la libération sera pH-

dépendante due à la présence de surfactant anionique. Il est également recommandé d'utiliser un plastifiant pour avoir un film continu et homogène (Carlin et al., 2008).

### Les polyméthacrylates

L'Eudragit® est impliqué dans de nombreuses applications pharmaceutiques, notamment pour l'enrobage de formes solides. Les copolymères méthacryliques sont produits par polymérisation radicalaire où la croissance de la chaîne polymérique se fait par réaction chimique à partir de dérivés acrylates ou méthacrylates. Cet agent est particulièrement connu et quelques interactions avec des SA, dues à leurs groupements fonctionnels et parfois à leurs charges, ont été caractérisées et sont présentes dans la littérature. Ils peuvent être classés selon leur charge :

- Anionique : Eudragit® L, Eudragit® S
- Cationique : Eudragit® E (figure 25)
- Zwitterionique : Eudragit® RS, Eudragit® RL
- Neutre : Eudragit® NE

Dans la plupart des cas, ils sont utilisés sous forme de complexe ou de coprécipité grâce à l'interaction molécule active/polymère. Par contre, une neutralisation de la charge de l'Eudragit® est quelquefois indispensable (Bruce et McGinity, 2008).

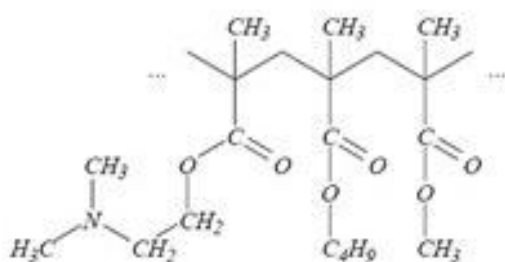


Figure 25 : formule de l'Eudragit® E (Evonik industries, 2012)

### Les dérivés vinyliques

Le Kollicoat® SR 30D est une dispersion aqueuse colloïdale contenant 27% de polyvinyl acétate (PVAc) (figure 26) stabilisé avec 0,3% de sodium lauryl sulfate et de 2,7% de povidone, polymère soluble permettant la formation de pores.

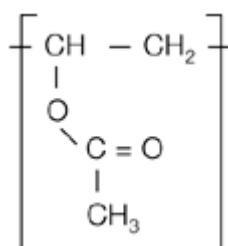


Figure 26 : formule du PVAc (BASF, 2001)

C'est un agent filmogène très employé de par ses propriétés telles que sa plasticité, une température minimale de formation de film (MFT) basse (18°C), un pouvoir non collant. Ce polymère est insoluble dans l'eau et donc il est nécessaire de bien le quantifier dans la formulation pour éviter d'avoir un retard de libération de la SA. Dans ce cas, un polymère hydrophile (Kollicoat IR<sup>®</sup> par exemple) ou des tensioactifs peuvent être ajoutés. Il est apprécié pour la granulation humide de comprimés matriciels à libération prolongée, pour l'enrobage pelliculé, pour le masquage de goût et pour la compression de pellets en comprimé grâce à la bonne plasticité qu'il fournit. De plus, il n'est pas nécessaire d'ajouter un plastifiant car sa MFT est faible. S'il en faut un, du propylène glycol (5 à 10%) convient (Bühler, 2010).

Dans les polymères à base de polyvinyl, on peut citer le Kollicoat<sup>®</sup> IR (figure 27) entré sur le marché récemment. Il s'agit d'un copolymère de polyéthylène glycol et d'alcool de polyvinyle (PVA-PEG) dans un rapport de 25:75. Une chaîne de PEG forme une base sur laquelle les chaînes latérales de PVA sont greffées.

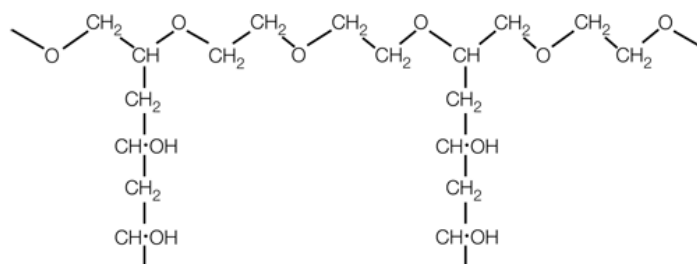


Figure 27 : formule du Kollicoat<sup>®</sup> IR (BASF, 2013)

C'est un agent utilisé pour les libérations immédiates en raison de son hydrophilie, de sa grande plasticité et de sa très faible viscosité. Il est donc soluble et permet d'accélérer la libération de la SA lorsqu'il est mélangé à un polymère insoluble comme le Kollicoat<sup>®</sup> SR 30D.

## 1.2. Les plastifiants

Ces agents sont incorporés dans la formulation avec les dispersions de polymère pour modifier les propriétés mécaniques, physico-chimiques et thermiques du film. En effet, le plastifiant interrompt partiellement les interactions entre les chaînes responsables de la cohésion mécanique ce qui permet d'augmenter leur mobilité. Ainsi, le matériau devient souple et flexible. En outre, il améliore la coalescence des particules de polymère au cours de la formation du film. Il facilite le procédé d'enrobage en diminuant la MFT et la température de transition vitreuse<sup>1</sup> (Tg), donc la température de production du procédé devient accessible. Cependant, il faut prêter attention à la compatibilité avec le polymère en question et bien ajuster la proportion car son efficacité en dépend.

<sup>1</sup> Tg : température à laquelle le polymère passe d'un état vitreux (rigide) à un état caoutchouteux. A une température inférieure à la Tg, le polymère est rigide avec une mobilité réduite tandis qu'à une température supérieure à la Tg, le polymère devient souple et les chaînes acquièrent une mobilité.



Pour pouvoir s'associer, le plastifiant doit être miscible avec le polymère et pour avoir une action permanente, ils ne doivent pas être volatiles. Toutefois, le polymère étant mélangé avec le plastifiant, un temps supplémentaire est nécessaire pour que la plastification du polymère se fasse (jusqu'à 24h) avant l'enrobage. Le plastifiant doit diffuser dans les particules colloïdales de polymère selon sa solubilité et son affinité pour la phase polymérique.

Les plastifiants les plus communs sont les suivants :

- |   |   |                      |
|---|---|----------------------|
| <ul style="list-style-type: none"><li>- Triéthylcitrate (TEC)</li><li>- Triacétine ou triacétate de glycérol</li><li>- Polyéthylène glycol</li><li>- Propylène glycol</li></ul> | } | Polymères solubles   |
| <ul style="list-style-type: none"><li>- Dibutylsébacate (DBS)</li><li>- Dibutyl phtalate (DBP)</li><li>- Monoglycéride acétylé</li></ul>  | } | Polymères insolubles |

L'ajout de plastifiant dans la solution d'enrobage peut avoir des répercussions sur le procédé (agglomération des pellets) et sur le produit fini (modification de la cinétique de libération) (Carlin *et al.*, 2008, Siepmann *et al.*, 2008 (b)).

### 1.3. Les autres additifs

Pour améliorer la formulation, le déroulement du procédé et le produit fini, d'autres additifs peuvent être ajoutés. D'abord, on peut utiliser des anti-adhérents pour prévenir l'agglomération des mini-granules lors du procédé d'enrobage et du stockage. Environ 0,5 à 2% de talc ou de silice (Aerosil®) suffisent pour éviter ce problème. Néanmoins, le talc est d'origine minérale ce qui favorise les contaminations microbiennes et est connu pour déstabiliser les films de par des interactions. Une autre solution possible est l'utilisation de monostéarate de glycérol, d'HPMC.

Quant au stéarate de magnésium, son usage est limité aux solutions organiques de polymère ou aux dispersions aqueuses d'Eudragit® NE/NM/E car avec les autres polyméthacrylates, il y a coagulation.

Ensuite, des stabilisants sont recommandés pour les dispersions de latex contenant des pigments ou électrolytes car le zéta potentiel peut être modifié et provoquer ainsi une floculation de la formulation. On trouve par exemple du polysorbate, PVP, sodium dodecyl sulfate. Ils sont ajoutés avec les pigments et exigent une nuit pour une efficacité optimale (Skalsky et Petereit, 2008).

Puis, pour protéger la molécule active et les autres composants de la lumière, des opacifiants peuvent être inclus dans la formule. Il s'agit du dioxyde de titane, du carbonate de magnésium et du carbonate de calcium pour les plus courants.

Des colorants sont requis également pour modifier l'aspect visuel, et identifier le produit fini. Les colorants les plus communs pour l'enrobage sont : la laque d'aluminium, l'oxyde de fer, les

caroténoïdes, les anthocyanines (Orban, 2002). Enfin, des agents de saveur ou édulcorants (saccharine sodique) sont parfois présents pour améliorer le goût et ainsi faciliter l'administration du médicament. Cependant, leur usage est limité en raison de leur structure chimique complexe. Il est important de noter que l'ajout de ces excipients ont des effets sur les propriétés mécaniques des films d'enrobage (taille, forme, surface) ainsi que sur la stabilité et la cinétique de libération.

## 2. Procédé d'enrobage des mini-granules

### 2.1. Mécanisme de formation d'un film d'enrobage

La formation du film d'enrobage se déroule différemment selon le type de solvant employé.

Lors de l'utilisation d'une solution organique (figure 28a), le polymère se trouve à l'état moléculaire. Lors de l'évaporation du solvant, les chaînes polymériques se rapprochent et s'enchevêtrent pour ensuite se densifier et former un réseau continu et compact à la fin du procédé.

Quant à la dispersion aqueuse de polymère (figure 28b), le mécanisme est plus complexe car le polymère n'est pas en solution. Lors de la pulvérisation, la dispersion se dépose tout d'abord sur les mini-granules et l'élimination du solvant va permettre aux particules de se rapprocher pour enfin coalescer en un film continu. Ceci est rendu possible lorsque les particules se sont déformées par la force capillaire et par la mobilité des chaînes de polymère. Quatre étapes sont plus exactement distinguées :

- Rangement et rapprochement des particules de polymère au début de l'évaporation du solvant.
- Déformation de celles-ci jusqu'à leurs fusions grâce à l'élimination de l'eau formant une structure compacte.
- Coalescence des particules due à leurs fragmentations constituant une phase continue.
- Formation d'un film continu par interpénétration des chaînes de polymère après l'étape de mûrissement (via le *curing*) avec disparition des espaces interparticulaires.

Dans ce cas, le film n'est pas formé spontanément mais progressivement et l'étape de *curing* est importante pour l'obtention d'un film continu (Carlin *et al.*, 2008, Qiao Wen Yang, 2009).

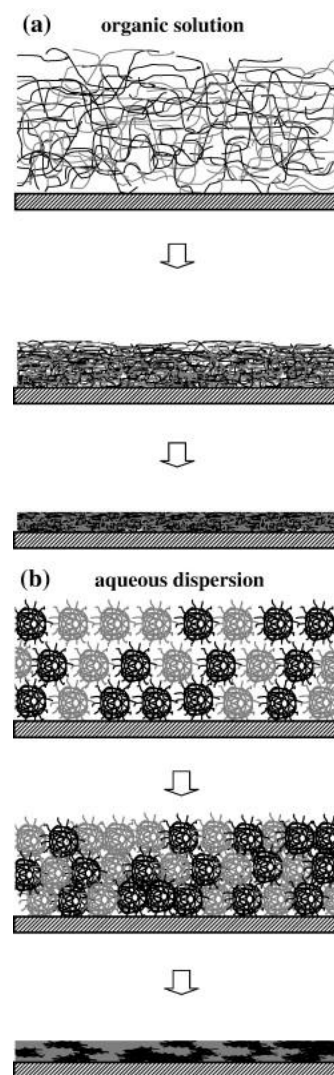


Figure 28 : mécanisme de formation d'un film a) à partir de solution organique polymérique, b) à partir de dispersion aqueuse de polymère (Siepmann et al., 2008 (a))

## 2.2. Les étapes du procédé

Le fait d'utiliser davantage les dispersions aqueuses de polymère par rapport aux solutions organiques complique le procédé d'enrobage. En effet, l'évaporation de l'eau nécessite une production d'une plus forte chaleur et donc le temps de manipulation se prolonge. Le choix de l'équipement et des paramètres opératoires doivent donc être adaptés à ces différences. Le développement du matériel a permis d'appliquer ces nouvelles dispersions aqueuses sans problème prédominant (Mehta, 2008).

Il existe différentes techniques d'enrobage mais la plus courante pour pelliculer les mini-granules est celle en lit d'air fluidisé (LAF). Tout d'abord, le ou les polymère(s) sont dissous ou dispersés dans le solvant en présence ou non d'excipients (vus précédemment). Durant le procédé, plusieurs phases se succèdent (figure 29) :

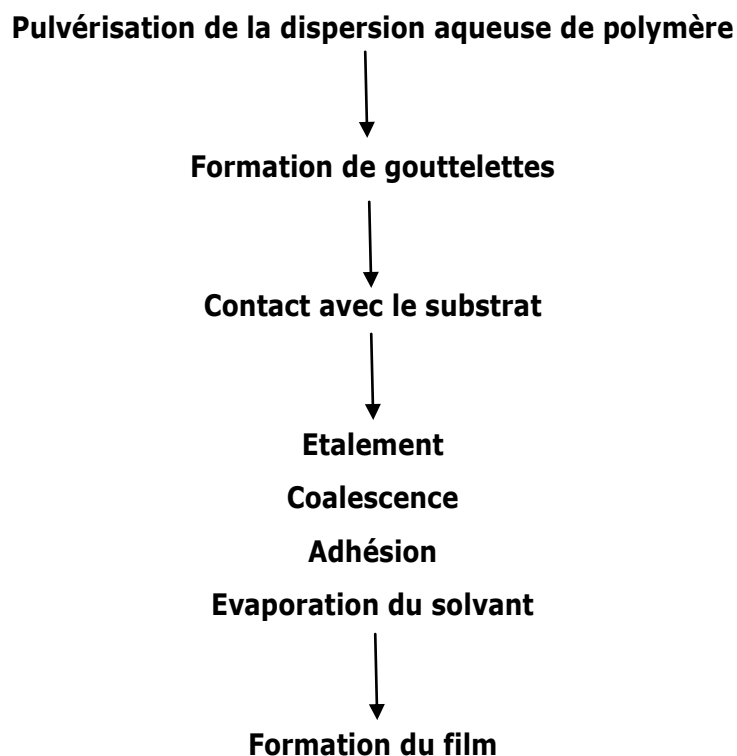


Figure 29 : Dynamique du procédé d'enrobage (Mehta, 2008)

L'épaisseur approximative du film est de l'ordre de 10 à 50  $\mu\text{m}$  mais on peut atteindre 200  $\mu\text{m}$  pour une libération retardée (Ensslin, 2008). Les mini-granules enrobées subissent donc une phase de séchage lors de la fabrication mais dans certains cas, elles requièrent un traitement supplémentaire à température élevée appelé *curing*. C'est une étape de mûrissement du film qui permet de compléter la coalescence des particules de polymère afin d'obtenir un film continu. Cette forte chaleur provoque une diminution de la rigidité du polymère, augmente sa déformation et l'eau présente dans les interstices est éliminée pour ainsi former plus facilement un réseau continu (figure 30). Ainsi, la perméabilité du film est diminuée.

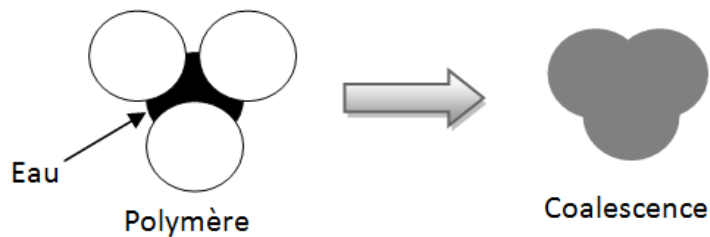


Figure 30 : formation du film à partir de dispersion polymérique aqueuse (carlin *et al.*, 2008)

Cette dernière étape est réalisée soit en étuve, en turbine ou parfois en LAF. Il existe plusieurs conditions dépendantes du système et des caractéristiques finales. Soit un *curing* à température ambiante suffit ou une température allant de 40 à 60° C est nécessaire pendant une durée variant de 1h à 24h (Qiao Wen Yang, 2009). Il est recommandé de ne pas sécher trop rapidement les mini-granules car la perte rapide en eau ne va pas permettre de développer des forces capillaires suffisantes ce qui empêchera donc la coalescence totale des particules. Cette phase a des effets sur le produit fini et il faut donc étudier les variations qu'elle peut apporter (Carlin *et al.*, 2008).

## 2.3. Les équipements

Les appareils utilisés pour l'enrobage sont regroupés en trois grandes catégories :

- Les turbines classiques
  - Les turbines perforées
  - Les lits d'air fluidisé
- } Comprimés
- } Comprimés et pellets

Ces systèmes sont conçus pour contenir le matériel à enrober et à sécher. Ils ont également la capacité de répartir la solution sur chaque particule en quantité égale.

En premier lieu, les turbines classiques (figure 31) datent d'environ 140 ans, elles étaient et restent beaucoup employées. Cependant, leurs applications sont limitées à la dragéification et à l'enrobage à base de solvant organique du fait de leur faible capacité de séchage. Ces appareils sont composés d'un grand bol sphérique en acier inoxydable et ouvert tournant autour d'un axe incliné à 45°. Les sphéroïdes roulent en cascade en même temps que la pulvérisation de la solution se produise. Le mélange en cascade peut causer des attritions des noyaux mais également des abrasions de l'enrobage.

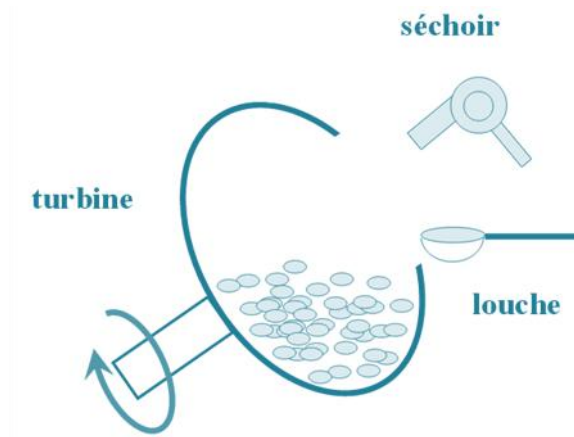


Figure 31 : schéma d'une turbine classique

En deuxième lieu, s'est développée la turbine perforée (figure 32) pour subvenir aux problèmes de séchage. Le courant d'air dont la température et le débit sont réglés, est envoyé à travers le lit de noyaux en mouvement. La surface d'échange entre l'air et les sphéroïdes est augmentée, d'où un séchage plus rapide et plus efficace. De plus, l'entrée d'air est modulable, différentes positions existent (Mehta, 2008).

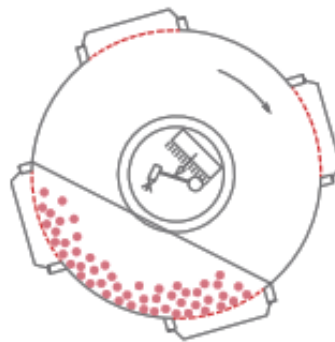


Figure 32 : schéma d'une turbine perforée (Lödige, 2006)

En dernier lieu se trouve le lit d'air fluidisé très convoité par sa performance de séchage et il est utilisé pour la granulation et le séchage depuis plusieurs années. Il est surtout choisi pour les systèmes d'enrobage aqueux en raison de son efficacité de séchage, de son design amélioré et de ses paramètres contrôlés. En outre, il offre une variété de techniques d'application en proposant différentes positions de pulvérisation (figure 33) :

- Par le haut (« *top-spray* ») : granulation, mode conventionnel
- Par le bas (« *bottom-spray* ») : Wurster
- Tangentiellement (« *tangential-spray* ») : granulateur rotatif

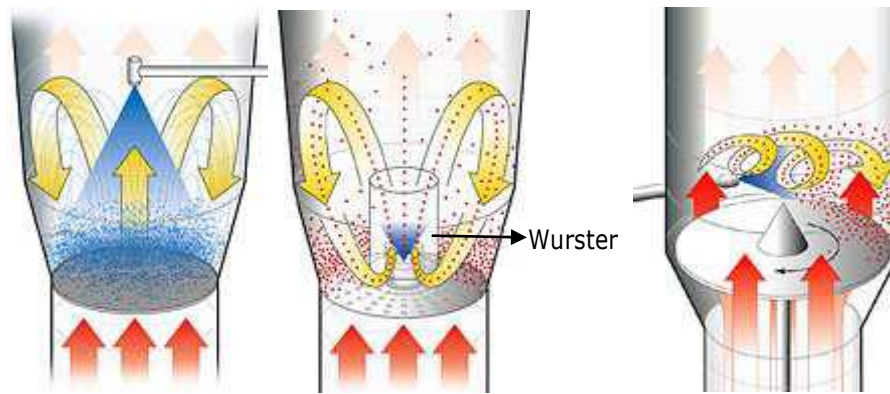


Figure 33 : Les différents lits d'air fluidisé : A : *Top-spray*, B : *Bottom-spray* avec une colonne Wurster, C : *Tangential-spray* (Glatt GmbH, <http://www.glatt.com/cm/?id=43>)

Le « *top spray* » concerne seulement l'enrobage des petites particules. Les films formés ne sont généralement pas uniformes, c'est pourquoi on utilise cette technique pour le masquage de goût par exemple. Le matériel à pelliculer est fluidisé en hauteur jusqu'à la buse qui pulvérise en contre-sens les pellets. L'enrobage se fait sans agglomération en raison d'un transfert de chaleur efficace et à la haute vitesse de l'air.

Le « *bottom spray* » est composé d'un système Wurster datant de 25 ans et qui connaît un grand succès par sa technologie. Le flux d'air est formé grâce à un système divisé et à la présence d'une pièce perforée. La majorité de l'air passe à travers les orifices mettant en mouvement les sphéroïdes vers le haut. Lorsque qu'ils entrent dans la zone extérieure du flux, la vitesse de l'air diminue et ils retombent jusqu'à être réentraînés à nouveau par le flux. Ce mouvement s'effectue sous forme de cycle. Ainsi, une forte proportion de pellets est présente dans la zone de pulvérisation due au système Wurster. Ce dernier est conçu pour garder les particules loin de la buse mais à l'endroit le flux d'air est maximal. C'est pourquoi, une forte capacité de séchage est possible. La taille des gouttelettes pulvérisées peut être adaptée à la taille du matériel à enrober.

Le « *tangential spray* » est composé d'un disque rotatif qui ajoute une force centrifuge à celles déjà présentes c'est-à-dire, les forces de fluidisation et la gravité. Ainsi, le mélange est rapide et efficace. Ce système peut être utilisé pour des tailles variables de particules, et le taux de liquide distribué est contrôlé. On retrouve également une efficacité de séchage et une formation de film uniforme (Mehta, 2008).

### 3. Les principaux paramètres influençant la formation et la stabilité de l'enrobage des mini-granules

Il existe plusieurs facteurs qui influencent la formation et la stabilité du film qui se répercute ensuite sur la cinétique de libération de la SA.

Le film se formera différemment selon le type de la technique d'enrobage (aqueux versus organique). En effet, il y a une importance majeure sur le résultat de la structure du film et sur la libération de la SA. Une dispersion colloïdale polymérique contient une forte concentration en polymère tout en conservant une faible viscosité ce qui n'est pas le cas pour une solution organique. En revanche, un système aqueux est sensible aux facteurs environnants tels que la température, le pH, la présence d'électrolytes, ou d'autres composants ce qui peut provoquer une coagulation (exemple : éthylcellulose et HPMC). Le type et la concentration de plastifiant joue également un rôle important et modifie les caractéristiques de l'enrobage. C'est pourquoi, il est nécessaire d'étudier au préalable l'association plastifiant-polymère et déterminer la concentration optimale. Par exemple, un plastifiant hydrophile affecte la capture de l'eau dans le film, change la dureté et la perméabilité (Siepmann, 2008 (a)).

Concernant la formation du film, entre en compte tous les paramètres opératoires (tableau 2) :

<b>Paramètres opératoires</b>
Taille du lot (g)
Température de l'air entrant (°C)
Température de l'air sortant (°C)
Température du produit (°C)
Buse (mm)
Pression de l'air atomisé (bar)
Débit d'air (m <sup>3</sup> /h)
Débit de pulvérisation (g/min)

Tableau 2 : paramètres d'enrobage des mini-granules en lit d'air fluidisé

Le débit de pulvérisation est à prendre en considération car il contrôle le dépôt qui doit être uniforme sur les particules. Le taux de transfert de chaleur est un paramètre critique car il influence le taux d'évaporation du solvant mais aussi le taux et le degré de coalescence du polymère.

Quant à la stabilité du film, l'étape du *curing* intervient. La température et l'humidité résiduelle ont un rôle majeur. Il est nécessaire de se placer à une température de 10 à 20°C au-dessus de la MFT. De plus, à haut taux d'humidité résiduel, la mobilité des chaînes de polymère augmente par une diminution de la Tg. Enfin, la nature et la concentration en plastifiant rend cette étape plus ou moins efficace.



## IV. La spectrométrie de fluorescence

### 1. Principe

La spectrométrie de fluorescence dans le domaine ultraviolet (UV) allant de 185 à 380 nm et dans le visible (VIS) de 380 à 800 nm est une technique courante pour contrôler et identifier les composés chimiques mais surtout pour étudier les mécanismes biologiques impliquant les protéines et les cellules. Cette technique s'est développée ces dernières années de par ses équipements et leur simplicité d'usage pour l'obtention des spectres. De plus, c'est une méthode d'analyse rapide, non-invasive et dotée d'une haute sensibilité. Puis, le développement de nombreuses molécules fluorescentes a permis d'élargir le champ d'application (Birch, 2001 ; Le Moigne *et al.*, 2008).

La spectroscopie de fluorescence est basée sur le principe d'absorption et d'émission de photons définissant la luminescence. Cette dernière divise la photoluminescence, phénomène radiatif dû à une excitation lumineuse, de la chimiluminescence provoquée par une réaction chimique ou enzymatique. La photoluminescence regroupe la fluorescence et la phosphorescence.

Dans le cas de la fluorescence, la molécule cible est excitée par une onde électromagnétique et réémet un rayonnement afin de revenir à son niveau d'énergie initial. L'émission de fluorescence correspond, entre autre, à la désexcitation du fluorophore.

L'excitation de la molécule est due à l'absorption d'un photon suffisamment énergétique. Cette transition correspond au passage d'un électron à un niveau d'énergie plus élevée. L'état excité a une durée de vie caractéristique de la molécule. Ensuite, l'électron retourne rapidement au niveau d'énergie le plus bas (l'état fondamental  $S_0$ ) via une restitution d'une partie de l'énergie absorbée sous forme d'une émission radiative. D'après l'équation 1, cette émission est donc caractérisée par une longueur d'onde supérieure à celle correspondant à l'excitation, c'est la loi de Stokes.

$$E = h\nu = h \frac{c}{\lambda}$$

(Equation 1)

E : énergie  
 $\lambda$  : longueur d'onde  
c : constante de Planck

Quant à la phosphorescence, l'état excité a une durée de vie plus longue et le retour à l'état fondamental s'effectue plus lentement. Ainsi, la radiation dure plus longtemps même après l'arrêt de la lumière incidente. Les transitions électroniques de ces deux phénomènes sont expliquées sur le diagramme de Jablonski (figure 34) (Aït-Slimane, 2010).



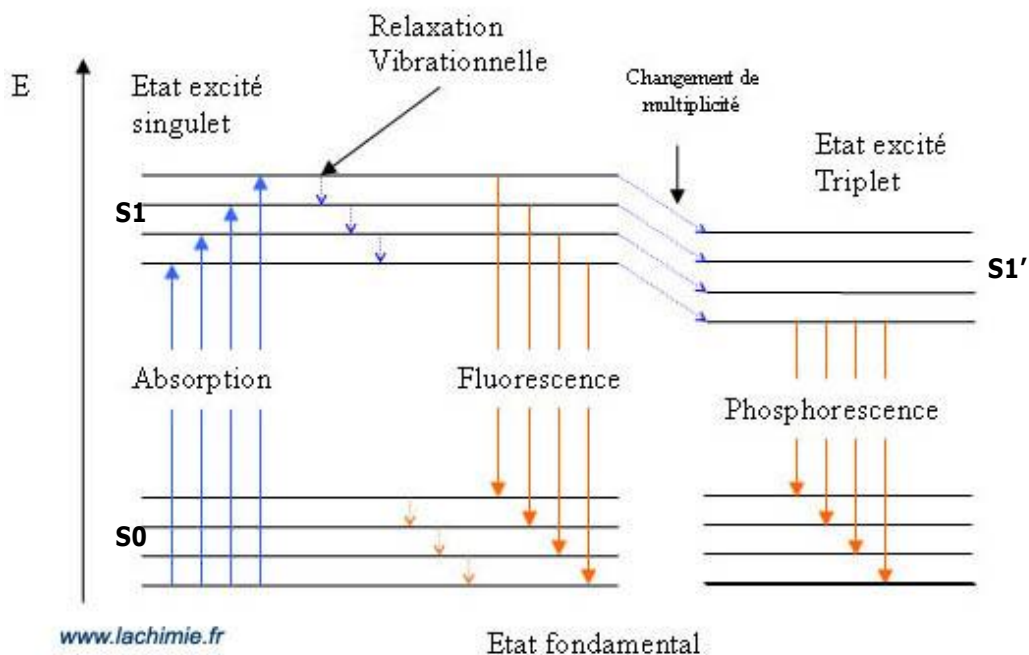


Figure 34 : diagramme simplifié de Jablonski (Lachimie.fr, 2008-2013)

Il faut savoir que chaque électron d'une molécule possède un état d'énergie fondamental bien particulier et donc des niveaux d'énergie et de transitions électroniques spécifiques.

La spectrométrie UV-VIS permet l'analyse quantitative car l'absorption est caractéristique de la particule et des groupements d'atomes. Ce phénomène est d'ailleurs décrit par la loi de Beer-Lambert :

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon l C$$

(Equation 2)

A : absorbance

$I_0$  : intensité lumineuse incidente

I : intensité lumineuse transmise

$\epsilon$  : coefficient d'absorption molaire

l : largeur de la cuve

L'intensité de fluorescence (FI) (exprimée en RFU) de la lumière émise à une longueur d'onde d'excitation et d'émission données est proportionnelle à la concentration de la molécule fluorescente.

Elle est représentée par deux spectres caractéristiques :

#### - Spectre d'émission

Il s'agit d'une courbe représentant les intensités de fluorescence libérées par le fluorophore lors de la transition radiative vers les différents niveaux de résonance de l'état fondamental. En d'autres termes, il montre que la quantité de lumière émise est dépendante de la longueur d'onde. Dans ce cas, la longueur d'onde d'excitation est fixée, et seule la longueur d'onde d'émission varie.

#### - Spectre d'excitation

L'excitation est par principe équivalente à l'absorption puisque la longueur d'onde émise est proportionnelle au nombre de photons absorbés. Le spectre obtenu correspond donc à une longueur d'onde d'émission fixée et varie en fonction de la longueur d'onde d'excitation (Albani, 2007).

L'analyse des spectres d'émission est généralement plus aisée car l'excitation d'un fluorophore à différentes longueurs d'onde ne modifie pas le profil d'émission correspondant. Il faut noter que l'intensité d'émission est proportionnelle à celle d'excitation.

En spectroscopie de fluorescence, la méthode ratiométrique est généralement utilisée afin de réduire les artefacts lors des mesures. En effet, des signaux d'erreur sont causés par des imprécisions de concentration en fluorophore, de la longueur du trajet optique, des possibilités de fuite de la molécule fluorescente ou encore dus au phénomène de « *photobleaching* » ou photoblanchiment<sup>2</sup>. Pour se faire, le ratio des intensités de fluorescence mesurées à la longueur d'onde isobestique<sup>3</sup> et à la longueur d'onde maximale est calculé afin que les mesures soient indépendantes de la concentration en fluorophore (Haugland, 2005).

Bien que les longueurs d'onde d'excitation et d'émission pour la plupart des fluorophores soient connues, il est préférable de les évaluer dans les conditions opératoires spécifiques. Pour ce projet, les longueurs d'onde pour chaque composant sont déterminées via la collection des deux spectres. Ils sont obtenus avec l'appareil Varioskan® Flash (figure 35) qui est un lecteur multimode à balayage de spectres (Thermo Fischer Scientific Inc., 2013).



Figure 35 : Varioskan® Flash (OpenWetWare, 2012)

## 2. Les fluorophores

Les fluorochromes sont des composés chimiques susceptibles de subir des transitions électroniques et capables d'émettre de la fluorescence après excitation. Quand ils sont liés à une macromolécule, on parle de fluorophore. Ce sont généralement des substances constituées de noyaux aromatiques conjugués ou des hétérocycles, molécules planes comportant des liaisons  $\pi$ .

Chaque fluorophore a ses propres propriétés, mais qui peuvent être modifiées par l'environnement dans lequel il se trouve, ils sont principalement caractérisés par :

- Leurs longueurs d'onde : point isobestique, maximum des spectres d'excitation et d'émission
- Leur temps de vie pendant lequel fluorophore reste dans un état excité

<sup>2</sup> Destruction irréversible du fluorophore excité par la lumière en présence d'oxygène.

<sup>3</sup> Le point isobestique est une longueur d'onde spécifique où l'intensité est indépendante du pH.

- Leur coefficient d'extinction moléculaire  $\epsilon$ , reflétant la probabilité d'absorption de la molécule.
- Leur rendement quantique  $\phi$ , ou efficacité de fluorescence correspondant au rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés par la molécule (Aït-Slimane, 2010).

A la fin du 19<sup>ème</sup> siècle apparaissent les sondes fluorescentes telles que la rhodamine, l'acridine orange et la fluorescéine, la plus utilisée en biologie. On distingue deux catégories, les fluorophores intrinsèques et extrinsèques. Tout d'abord, les intrinsèques sont ceux déjà présents dans l'échantillon biologique. Il s'agit par exemple des acides aminés aromatiques, des purines, pyrimidines, certains cofacteurs enzymatiques (NADH) et vitamines. Tandis que les fluorophores extrinsèques sont ajoutés pour l'analyse d'un composé non fluorescent, et servent à marquer un constituant spécifique. On peut employer des molécules fluorescentes s'intercalant dans diverses molécules pour étudier l'activité enzymatique, le pH intracellulaire ou encore la viabilité des cellules (Tourkya, 2009). En bref, il existe une grande variété de substances pouvant être utilisées en fluorescence et nécessaire pour étudier la biologie. Cependant, l'usage de ces molécules s'étend de plus en plus à d'autres applications du fait du développement de molécules fluorescentes ayant des caractéristiques particulières.

A ce sujet, Molecular probes offre une variété d'indicateurs de pH fluorescents, leurs conjugués et autres agents pour les mesures de pH principalement utilisés pour les systèmes biologiques. Dans le cadre de cette étude, quatre fluorophores ont été présélectionnés pour leurs caractéristiques et par la suite, ils ont été contrôlés afin de définir celui ou ceux les plus adaptés à notre méthode analytique puisque peu de fluorophores sont appliqués à la galénique. Pour rappel, il s'agit d'évaluer le pH à l'intérieur de mini-granules enrobées dans une gamme de pH allant de pH 1 à 7,4 correspondant aux milieux de dissolution configurés par la pharmacopée européenne pour effectuer le test de libération d'un médicament. Ces molécules répertoriées dans le tableau 3, ont été choisies grâce à leurs propriétés hydrophiles apportées par le dextran. En effet, les fluorophores doivent être à l'état moléculaire à l'intérieur des pellets sans en échapper.

	<b>BCECF dextran</b>	<b>Oregon green dextran</b>	<b>Lysosensor yellow/blue</b>	<b>SNARF-5F</b>
<b>Formule moléculaire</b>	C <sub>30</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub> (form II), C <sub>35</sub> H <sub>29</sub> O <sub>15</sub> (form III)	C <sub>33</sub> H <sub>37</sub> F <sub>2</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>27</sub> H <sub>18</sub> FNO <sub>6</sub>
<b>Poids moléculaire</b>	10000	10000	366.42	471.44
<b>pKa</b>	7.0	4,7	4,2	7,2
<b>gamme de pH</b>	6-8	4-6	3-6,5	5-9
<b>Exc/Em (nm)</b>	508/532	496/524	329/440	580/640

Tableau 3 : description des fluorophores (Haugland, 2005)

Brièvement quelques indications sur les fluorophores sélectionnés :

- Le BCECF dextran (2',7' -bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein) est un indicateur de pH conjugué au dextran. Ces polysaccharides sont caractérisés par leur haut poids moléculaire, leur faible toxicité et leur inertie relative. Les conjugués ont la particularité d'avoir une forte solubilité dans l'eau et ainsi être facilement encapsulés dans des systèmes. Du fait de l'unité dextran encombrante, ces molécules y sont retenues et la probabilité de fuite reste faible. Le BCECF dextran est le meilleur conjugué pour des mesures ratiométriques d'excitation. Il est utilisé pour l'évaluation du pH aux alentours de 7 et surtout pour des applications biologiques telles que le pH intracellulaire et intra-tissulaires (figure 36) (Molecular Probes, 2006).

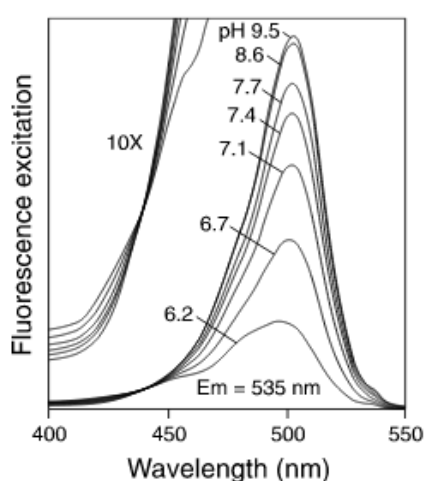
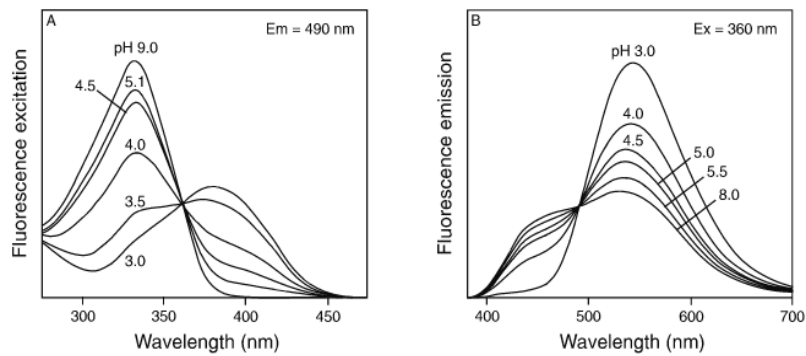


Figure 36 : Spectre d'excitation du BCECF (Molecular Probes, 2006)

- L'oregon green dextran est également un fluorophore conjugué pH dépendant lui conférant les mêmes propriétés que le BCECF. Il a une bonne photostabilité et une sensibilité optimale pour les mesures de pH dans les lysosomes et endosomes. Il est également requis pour monitorer

les divisions cellulaires, le mouvement des cellules en vie. Quant à lui, son pKa est plus faible, permettant de mesurer le pH dans des environnements plus acides (Haugland, 2005).

- Le lysosensor yellow/blue est une sonde ratiométrique qui peut être utilisée pour mesurer le pH des organites acides. Il produit une fluorescence bleue dans un environnement neutre et change en jaune lors d'une acidification (figure 37) (Molecular probes, 2013).



- Le SNARF-5F (SNARF®-5F 5-(and-6)-Carboxylic Acid) montre un changement d'émission significatif et dépendant du pH allant du jaune-orange au rouge foncé dans des conditions acide et basique respectivement. Cette dépendance au pH permet d'utiliser les ratios d'intensité de fluorescence et de déterminer le pH (Haugland, 2005).

### 3. Applications

Le pH des formes pharmaceutiques solides est influencé par plusieurs facteurs incluant les excipients, la SA, la quantité d'eau pénétrant dans le système, le processus de diffusion et le pH du milieu de dissolution. C'est pourquoi, définir le pH microenvironnemental est plutôt difficile. Il est donc nécessaire d'évaluer le pH à l'intérieur de ces formulations afin d'améliorer la stabilité de la molécule active et de connaître et moduler la libération de celle-ci.

Bien que le pH des solutions soit facilement mesurable par pH-mètre et potentiomètre, il n'en est pas de même pour l'intérieur des formes solides.

Dans la littérature sont présents des outils pour mesurer le pH mais ils ne sont pas tous bien établis et donc ils restent difficiles à appliquer.

La spectroscopie par réflectance diffuse est utilisée pour déterminer le pH de comprimés secs mais seulement en surface. Dans ce cas, des interactions sont possibles entre la sonde fluorescente pH dépendante et les excipients (Eisenächer *et al.*, 2011). Une autre alternative est l'incorporation d'indicateur de pH (exemple, rouge de méthyle) et la visualisation du changement de couleur en fonction du temps d'hydratation (Streubel *et al.*, 2000). L'inconvénient est qu'une estimation imprécise est obtenue. De plus, pour obtenir le pH microenvironnemental dans le noyau du

comprimé, il est nécessaire de le couper. Ainsi, la méthode analytique devient invasive. Une autre technique était d'utiliser des électrodes de pH-mètre pour mesurer la surface de dispersions solides ou bien dans des sections de comprimés hydratés. Encore une fois, cet essai reste invasif lorsqu'il faut évaluer le pH en profondeur (Eisenächer *et al.*, 2011).

Le microscope confocal à balayage laser permet d'obtenir une image grâce à une sonde fluorescente pH-dépendante, donnant une résolution spatiale du pH microenvironnemental. C'est une méthode non-invasive mais elle présente une limitation sur la taille de l'objet. C'est pourquoi, elle n'est appliquée que sur des microsphères érodées. En revanche, la dissolution interne de la SA et le coefficient de diffusion peuvent être connus. Il est également possible d'incorporer un fluorophore (fluorescéine) dans les microparticules pour connaître le pH mais il manque un étalon interne. Pour cela, deux fluorophores sont utilisés dont un jouant le rôle de standard interne, ce qui permet la ratiométrie (Cope *et al.*, 2002). Elle a été appliquée dans le cadre de microsphères à base de poly(lactide-co-glycolide) pour évaluer le pH et la cinétique d'acidification (Fu *et al.*, 2000). Cope *et al.* ont développé cette technique avec un seul fluorophore soluble dans l'eau et encapsulé dans des pellets non enrobés. En parallèle pour valider, ils utilisent une microélectrode et mesurent le pH à l'intérieur de mini-granules sectionnées. Ensuite, la spectroscopie à résonance paramagnétique électronique (EPR) détecte les composés paramagnétiques mais elle est restreinte à une minorité de molécules. Toutefois, il est possible d'incorporer des substances paramagnétiques telles que des radicaux nitroxyde stables pour élargir l'emploi. (Cope *et al.*, 2002 ; Eisenächer *et al.*, 2011).

Elle a été employée pour mesurer le pH dans des émulsions huile dans eau mais la résolution spatiale reste réduite.

Eisenächer *et al.* ont étudié le gradient du pH microenvironnemental dans des comprimés multicouches en comparant trois techniques, l'introduction d'un indicateur de pH, l'imagerie multispectrale fluorescente et l'EPR. La première nécessite de sectionner le comprimé et donc est invasive. L'image fluorescente est obtenue grâce à une sonde fluorescente, le SNARF<sup>®</sup>-1 placée dans les comprimés à 2 couches. Enfin, des spectres sont obtenus à partir des images de différentes régions du système permettant de calculer le pH. Cependant, seulement la surface est analysée à cause de la pénétration limitée de la lumière d'excitation et d'émission. Avec l'EPR, des informations spatiales et quantitatives sur le pH à l'intérieur des comprimés sont acquises. Pour conclure, l'utilisation d'un indicateur de pH et l'imagerie fluorescente ne détermine pas de valeur de pH précisément, et seulement la surface peut être explorée. L'EPR est l'outil le plus performant ici mais il faut noter qu'une moyenne de pH est obtenue et qu'il existe probablement un gradient de pH entre l'extérieur et l'intérieur du comprimé. En outre, cette technique est longue et coûteuse (Eisenächer *et al.*, 2011).

L'incorporation d'un indicateur de pH fluorescent s'avère être simple, rapide et peu chère comme méthode de mesure du pH. Cependant, la détermination du pH reste inexacte et l'intérieur des formes solides peut être exploré qu'invasivement. C'est pourquoi, le développement d'une

technique non-invasive pour évaluer quantitativement le pH microenvironnemental dans des systèmes solides tels que les pellets enrobées est un réel besoin aujourd'hui.

# **PARTIE EXPERIMENTALE**



# I. Matériels et Méthodes

## 1. Matériels

Le vérapamil hydrochloride (FMC Biopolymer, Philadelphie, USA) est utilisé comme molécule active modèle de l'étude ayant une solubilité pH-dépendante. Il appartient à la classe II (faible solubilité, haute perméabilité) du *Biopharmaceutics Classification System* (BCS).

La cellulose microcristalline (Avicel<sup>®</sup> PH 101 ; FMC Biopolymer, Bruxelles, France), le lactose (Lactochem<sup>®</sup>, Goch, France), le colorant bleu patenté (Coopération Pharmaceutique Française, Melun, France) sont employés comme excipients dans la formulation de mini-granules.

Le Kollicoat<sup>®</sup> SR 30D et le Kollicoat<sup>®</sup> IR (BASF, Ludwigshafen, France) sont les polymères pour l'enrobage des mini-granules.

Le dioxyde de silicium colloïdal (Aerosil R972<sup>®</sup> ; Schering Plough, Hérouville Saint-Clair, France) est utilisé comme agent anti-adhérent.

Pour ce projet, plusieurs solutions tampons à différents pH ont été réalisées avec les composants suivants : le phosphate monosodique (Fisher Scientific, Illkirch, France), le phosphate disodique (VWR<sup>®</sup>, Strasbourg, France), l'acide acétique (Fisher Scientific, Illkirch, France) et l'acétate de sodium trihydraté (Alfa Aesar<sup>®</sup>, Schiltigheim, France).

Enfin, le BCECF<sup>®</sup> dextran, l'Oregon green<sup>®</sup> 488 dextran, le Lysosensor<sup>®</sup> yellow/blue et le SNARF<sup>®</sup>-5F 5( and-6)-carboxylic acid (Invitrogen<sup>™</sup>, Molecular Probes<sup>®</sup>, Eugene, Oregon, USA) sont les fluorophores incorporés dans les mini-granules enrobées afin d'évaluer le pH par spectroscopie de fluorescence.

## 2. Méthodes

### 2.1. Préparation des mini-granules chargées en substance active

Les mini-granules sont composées de 10% (m/v) de vérapamil hydrochloride, 45% de lactose et 45% de cellulose microcristalline et sont obtenues par le procédé d'extrusion-sphéronisation.

Les excipients et la SA sont mélangés à l'aide d'un mélangeur horizontal à socs type Lödige M20 (Gebrüder Lödige, Paderborn, Allemagne). Une solution liante à base d'eau (50%) et de colorant bleu patenté est ajoutée sous agitation jusqu'à l'obtention d'une masse humide homogène. Ensuite, cette dernière est placée dans l'extrudeuse (SK M/R, diamètre des orifices : 1 mm, 3 mm d'épaisseur, vitesse de rotation 32 rpm ; Alexanderwerk, Remscheid, Allemagne) et est transformée en extrudats via son passage dans un cylindre perforé. Puis, les extrudats sont aussitôt sphéronisés à 765 rpm pendant environ 30 sec. (sphéroniseur Model 15 ; Calveva, Dorset, UK). Enfin, les sphères obtenues

sont séchées au lit d'air fluidisé (ST 15 ; Aeromatic, Muttenz, Suisse) à 30°C pendant 30 minutes. Après tamisage, la fraction de taille « 710-1250 µm » est retenue.

## 2.2. Enrobage des mini-granules

La dispersion aqueuse de Kollicoat SR 30D est ajoutée à une solution aqueuse de Kollicoat IR à différents ratios (tableau 4) et diluée avec de l'eau déminéralisée afin d'obtenir un pourcentage de masse sèche à 7,5% (m/m). Cette dilution est nécessaire car le Kollicoat SR 30D a un comportement collant lors du procédé d'enrobage même si BASF certifie que « la dispersion est de faible viscosité et non collante » (Bühler, 2007). Le mélange final est agité pendant 30 minutes avant le début de la pulvérisation.

Excipient	Kollicoat SR 30D: Kollicoat IR <b>100:0</b>	Kollicoat SR 30D: Kollicoat IR <b>95:5</b>	Kollicoat SR 30D:Kollicoat IR <b>90:10</b>
<b>Kollicoat SR 30D</b>	226,6 g	215,2 g	203,9 g
<b>Kollicoat IR</b>	0,0 g	3,4 g	6,8 g
<b>Eau</b>	679,7 g	642,3 g	604,9 g

Tableau 4 : composition du film d'enrobage

Les mini-granules sont enrobées à l'aide d'un lit d'air fluidisé en configuration *bottom spray* et équipé d'un système Wurster (Strea 1 ; Aeromatic-Fielder, Bubendorf, Suisse) (figure 38).

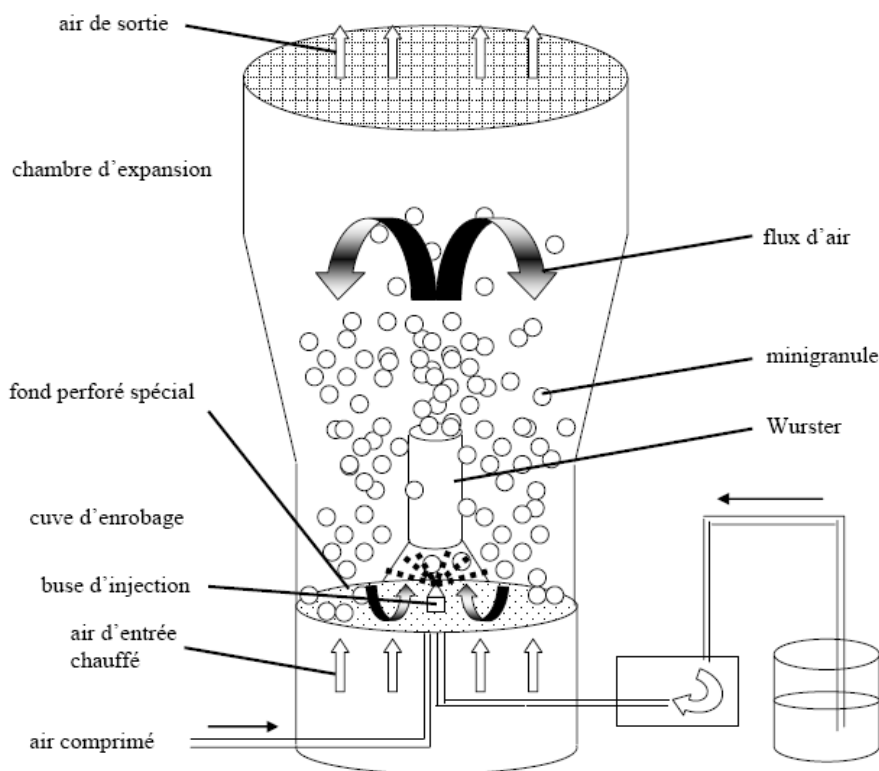


Figure 38 : Représentation schématique d'un lit d'air fluidisé équipé d'un Wurster (Muschert, 2008)

Les paramètres du procédé sont les suivants :

Conditions	Paramètres
Taille des lots	500 g
Température d'entrée	38 ± 2°C
Température produite	40 ± 2°C
Débit de pulvérisation	1 à 2,2 g/min
Pression d'atomisation	1,2 bar
Diamètre de la buse	0,8 mm
Débit d'air	110 - 130 m <sup>3</sup> /h

Tableau 5 : conditions d'enrobage

La température produite est ajustée en variant la température de l'air entrant. Elle influence la formation du film car elle joue sur la vitesse d'évaporation de l'eau et des pellets. Le débit d'air assure le mouvement plus ou moins ample des mini-granules. Le débit de pulvérisation quant à lui détermine la quantité de dispersion appliquée. S'il est trop faible, le film peut être poreux dû à un séchage partiel de la surface des mini-granules et s'il est trop élevé, ces dernières risquent de s'agglomérer. La pression de pulvérisation et le diamètre de la buse affecte la taille des gouttelettes de la dispersion. Plus le diamètre est petit, plus la pression d'atomisation est forte et plus les gouttelettes sont fines. En revanche, si elles sont trop fines, l'eau peut s'évaporer avant d'atteindre la surface du noyau (Bühler, 2007 ; Muschert, 2008).

Plusieurs ratios sont testés pour évaluer les profils de libération et définir le mélange le plus adapté au projet. A ce critère s'ajoute les différents taux d'enrobage essayés (5, 10 et 15% (m/m)) qui permettent de modifier la vitesse de la libération de la molécule active.

Après l'enrobage, de l'Aerosil® (0,5%) est ajouté aux pellets pour éviter qu'elles s'agglomèrent entre elles. Pour finir, elles sont placées à l'étuve à 60°C pendant 48h pour un curing, c'est-à-dire pour améliorer la formation du film et le rendre homogène.

### 2.3. Test de dissolution *in vitro*

Les essais de dissolution de la SA sont réalisés dans un appareil à palettes tournantes type USP 30 (AT 7 ; Sotax, Basel, Suisse). Les mini-granules sont déposées dans 500 mL de milieu de dissolution constitué soit d'une solution de 0,1 N HCl (pH 1), soit d'une solution tampon phosphate (pH 7,4). Les pellets sont soumises à une agitation de 100 tpm et l'ensemble est maintenu à 37°C (± 0,5°C) pendant 8h. A des temps prédéterminés, 3 mL d'échantillon sont prélevés et filtrés à l'aide d'aiguilles munies de filtres de 5 µm. Ensuite, la SA est dosée par spectrophotométrie UV (Shimadzu

UV-1650 ; Champs sur Marne, France). Les absorbances sont mesurées à 277,2 nm dans 0,1 N HCl et à 277,6 nm dans le tampon phosphate. Les expériences sont faites en triplicat.

A la fin des manipulations, la quantité totale en principe actif contenu dans les mini-granules est dosée afin de vérifier le titre réel de chaque lot (généralement compris entre 97% et 101%).

Les tests de dissolution sont également effectués pour une seule mini-granule (n=10). Cette dernière est alors placée dans 850 µL de milieu de dissolution (0,1 N HCl ou tampon phosphate) sous agitation (80 rpm) et gardée à 37°C (horizontal shaker, GLF 3033 ; Gesellschaft fuer Labortechnik, Burgwedel, Allemagne) pendant 3h. A des temps prédéterminés, 500 µL d'échantillon sont prélevés et analysés au spectrophotomètre UV (Shimadzu UV-1650 ; Champs sur Marne, France) aux longueurs d'onde décrites précédemment.

## 2.4. Evaluation du pH à l'intérieur de mini-granules enrobées

### 2.4.1. Screening des fluorophores

Les quatre fluorophores présélectionnés ont été étudiés en traçant, tout d'abord, leur spectre de fluorescence afin de déterminer la longueur d'onde maximale d'émission. Ensuite, leur spectre d'excitation est obtenu en fixant la longueur d'onde d'émission. A partir de ce dernier spectre, deux longueurs d'onde importantes ont pu être déterminées pour la méthode ratiométrique : la longueur d'onde isobestique et celle correspondante à l'intensité maximale. Les conditions opératoires sont présentées dans le tableau 6.

	<b>BCECF dextran (poudre)</b>	<b>Oregon green 488 dextran (poudre)</b>	<b>Lysosensor yellow/blue DND-160 (liquide)</b>	<b>SNARF-5F (poudre)</b>
<b>Concentration (µg/mL)</b>	5	5	3	inconnue <sup>4</sup>
<b>Spectre d'émission</b>	$\lambda_{exc} = 490 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 510-600 \text{ nm}$	$\lambda_{exc} = 495 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 510-650 \text{ nm}$	$\lambda_{exc} = 330-360 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 350-550 \text{ nm}$	$\lambda_{exc} = 543 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 560-700 \text{ nm}$
<b>Spectre d'excitation</b>	$\lambda_{em} = 534 \text{ nm}$ $\lambda_{exc} = 400-520 \text{ nm}$	$\lambda_{em} = 526 \text{ nm}$ $\lambda_{exc} = 400-510 \text{ nm}$	$\lambda_{em} = 490 \text{ nm}$ $\lambda_{exc} = 270-470 \text{ nm}$	$\lambda_{em} = 634 \text{ nm}$ $\lambda_{exc} = 250-610 \text{ nm}$

Tableau 6 : conditions opératoires pour le screening des fluorophores

Les fluorophores sont mis en solution dans du tampon (pH 8) à des concentrations données et sont ajoutés dans une plaque de 96 puits pour être analysés par le fluorimètre (Varioskan Flash ; Thermo Scientific, Illkirch Graffenstaden, France). Quant à la gamme étalon, les fluorophores sont mis en solution dans des tampons à différents pH (pH 3 à pH 8)<sup>5</sup> et en contact avec quelques pellets

<sup>4</sup> Concentration inconnue due à sa mauvaise dissolution, recours à la centrifugation.

<sup>5</sup> Il faut noter que pour les pH allant de 3 à 6, il s'agit de tampon acétate tandis que pour les pH de 6 à 8 les tampons sont à base de phosphate.

écrasées avant de tracer le spectre d'excitation (n=3). Ensuite, le ratio des intensités, mesurées au point isobestique et à la longueur d'onde maximale est calculé en fonction du pH. Cette calibration permettra de déterminer le pH à l'intérieur des mini-granules.

Enfin, les possibles interactions avec les excipients constituant les pellets sont étudiées. Le fluorophore est ajouté à 2 mL de solution tampon dans laquelle cinq mini-granules sont écrasées. Le pH est à nouveau mesuré et le spectre d'excitation est enregistré.

#### **2.4.2. Fabrication des mini-granules**

Les mini-granules chargées en vérapamil Hydrochloride (10%) et en fluorophore, soit le BCECF (0,010%) ou l'Oregon green (0,025%), sont préparées par extrusion-sphéronisation. Puis, elles sont pelliculées selon deux ratios de mélange de polymères : Kollicoat SR :Kollicoat IR = 95 :5 et 90 :10 au lit d'air fluidisé. Après pelliculage, de l'Aerosil® est ajouté et les mini-granules sont placées à l'étuve (60°C pendant 48h) pour l'étape de curing.

#### **2.4.3. Mesure du pH par spectroscopie de fluorescence**

Les mesures de fluorescence non-invasives sont conduites avec un Varioskan Thermo Scientific (Varioskan Flash ; Thermo Scientific, Illkirch Graffenstaden, France), équipé d'un lecteur de plaque. Une pellet contenant du fluorophore (BCECF ou Oregon green) est placée dans 400 µL de milieu de dissolution dans un puit (n=7) sous agitation (120 rpm et à 37°C). A des temps prédéterminés, le milieu de dissolution est prélevé et seule l'intensité de fluorescence de la mini-granule est mesurée. Les spectres d'excitation sont tracés de 400 à 510 nm avec une longueur d'onde d'émission fixée à 534 nm et 526 nm respectivement.

L'intensité de fluorescence est exprimée par le ratio de l'intensité à la longueur d'onde maximale (506 nm pour le BCECF et 496 nm pour l'Oregon green) sur l'intensité au point isobestique (454 nm et 434 nm respectivement). Le pH est ainsi déterminé grâce à la gamme d'étalonnage préalablement établie.

#### **2.4.4. Validation des mesures de pH**

Une méthode plus générale est nécessaire pour valider les valeurs de pH établies par spectroscopie de fluorescence. Une électrode en verre de pH-mètre (PHM240, Meterlab® ; radiometer analytical, Villeurbanne, France) est utilisée. Pour cela, 12 mg de pellets sans fluorophore sont contenues dans 12 mL de tampon phosphate (pH 7,4) à 37°C pendant 3h. A des temps prédéterminés, les mini-granules sont prélevées, séchées et écrasées dans 3,5 mL d'eau distillée et le pH est mesuré. L'expérience est réalisée en triplicat.

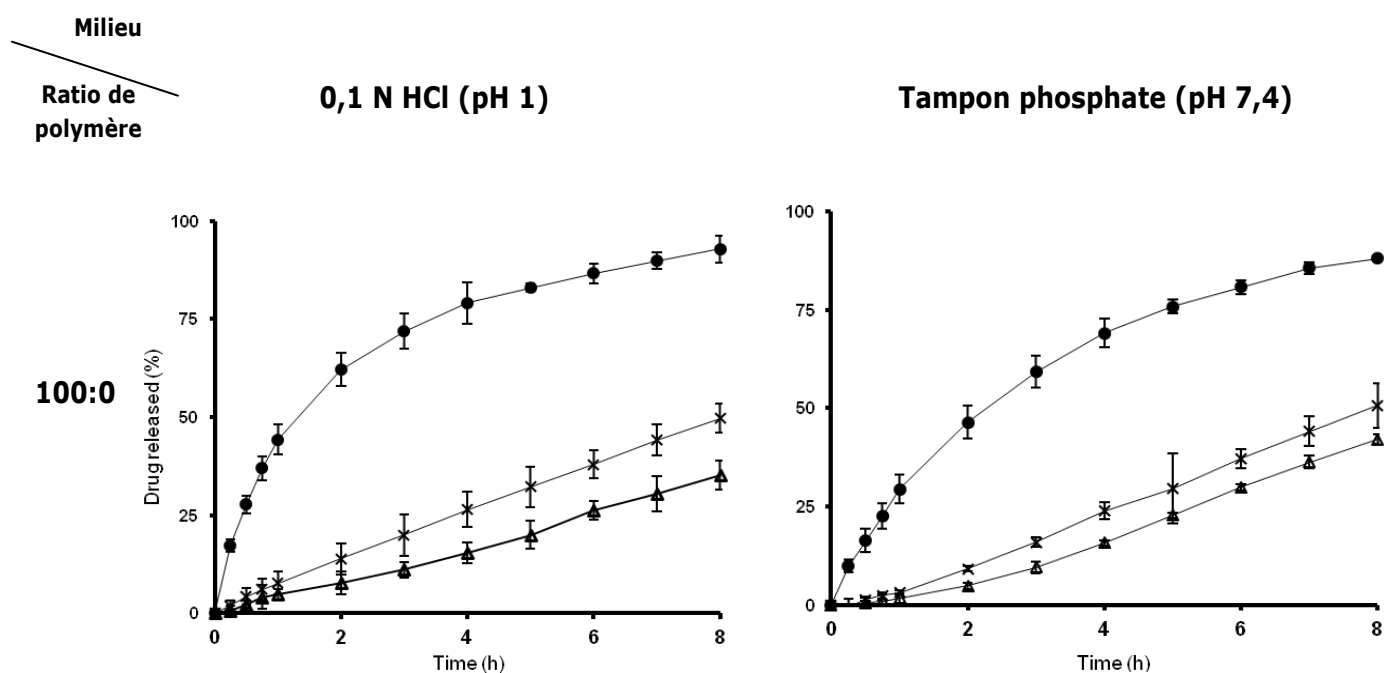
## II. Résultats

### 1. Les profils de libération du vérapamil HCl à partir des différentes formulations

#### 1.1. Conséquences du taux d'enrobage

La libération du vérapamil hydrochloride diminue avec l'augmentation du taux d'enrobage pour toutes les formulations (figure 39).

Une libération complète après 8h est obtenue avec un taux d'enrobage de 5% dans les deux milieux de dissolution. Cependant, la libération de la molécule active reste incomplète dans les autres cas. Par exemple, les mini-granules avec un taux d'enrobage de 10% de Kollicoat SR 30D délivrent environ 50% de SA après 8h tandis que les mini-granules pelliculées avec du Kollicoat SR et du Kollicoat IR au même taux d'enrobage libèrent aux alentours de 75% de SA. Comme il a été observé, une augmentation du taux d'enrobage mène à une diminution de la libération de la SA.



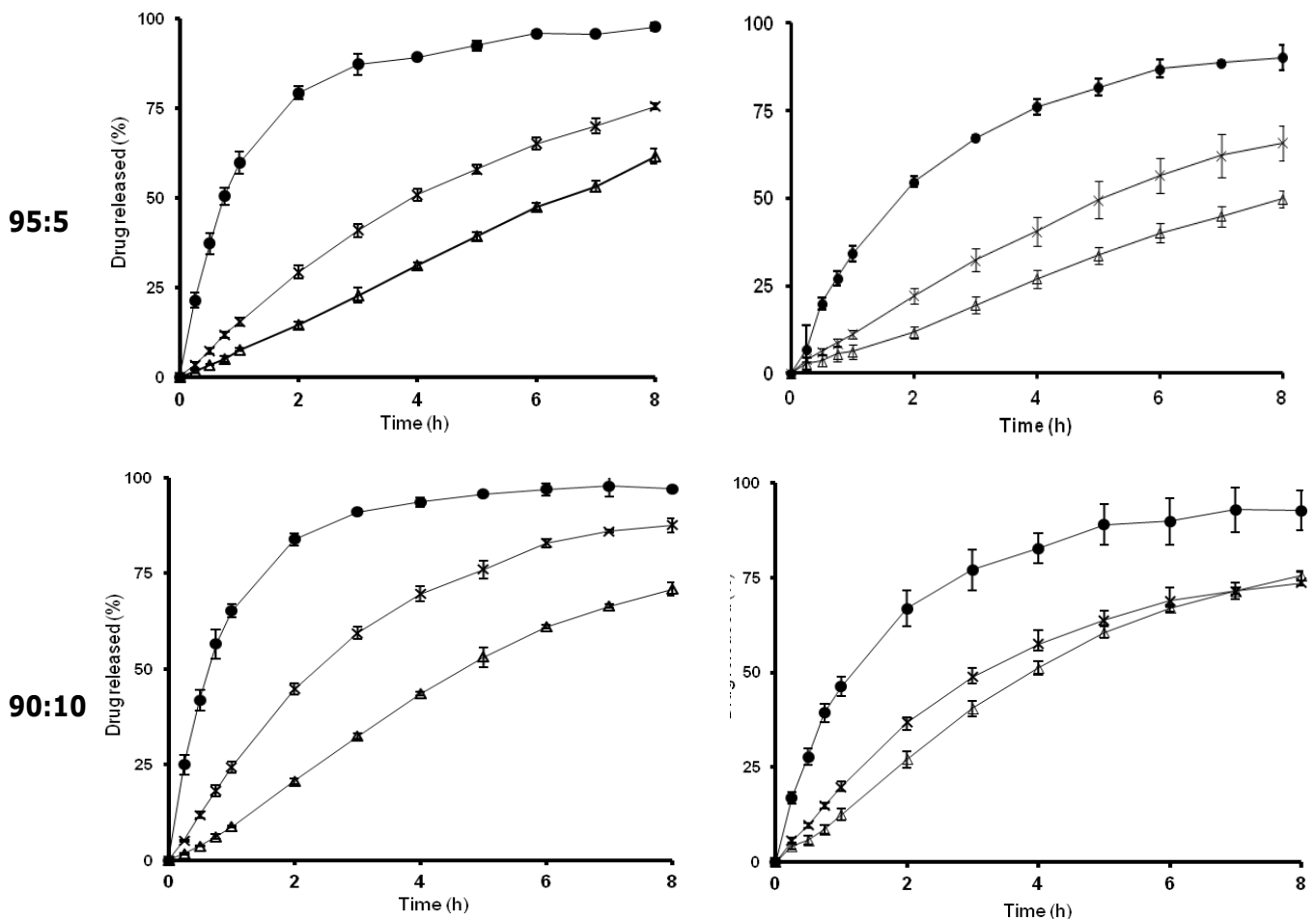


Figure 39 : effet du taux d'enrobage sur la libération du vérapamil HCl à partir de mini-granules enrobées avec du Kollicoat SR:IR : (●) 5%, (x) 10%, (Δ) 15%.

## 1.2. Influence du pH

Pour les systèmes avec un taux d'enrobage de 5%, la libération du vérapamil HCl montre une dépendance au pH (figure 40) avec une libération plus rapide dans le milieu de dissolution à 0,1 N HCl. Toutefois, elle devient indépendante au pH lorsque l'épaisseur du film d'enrobage des pellets augmente.

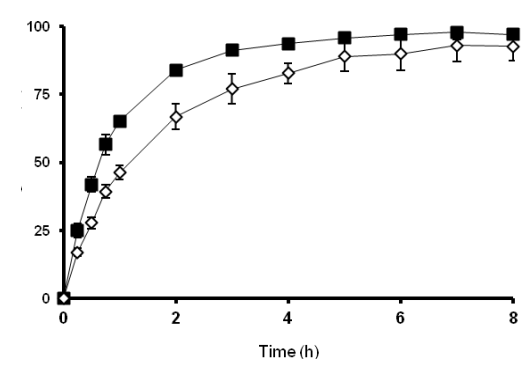
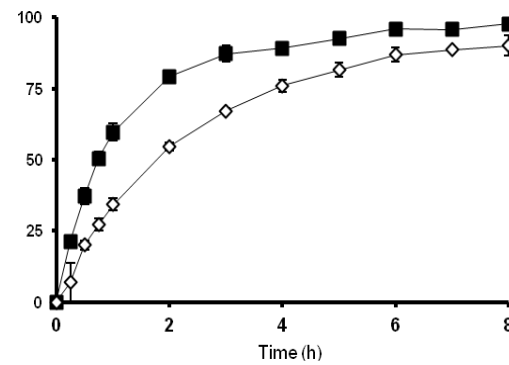
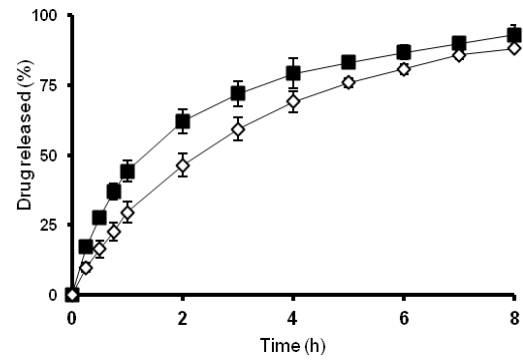
Ratio de polymère  
Taux d'enrobage

5 %

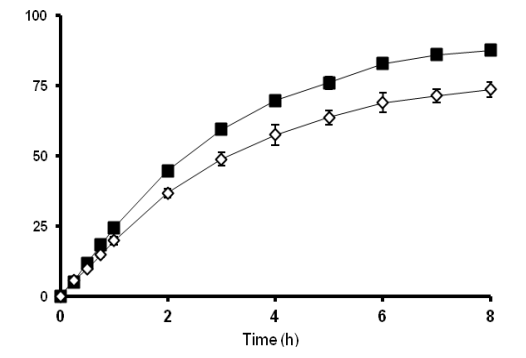
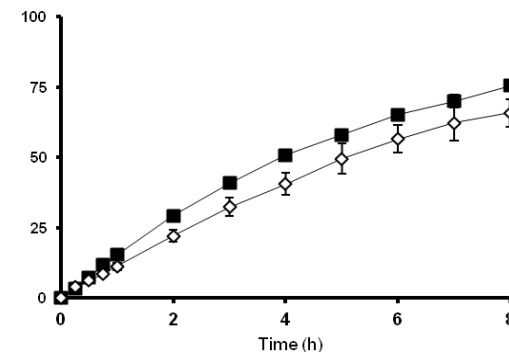
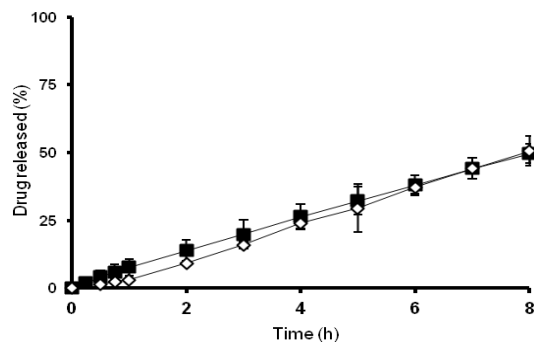
100:0

95:5

90:10



10 %



15 %

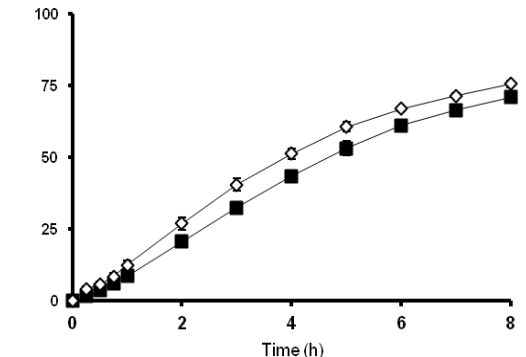
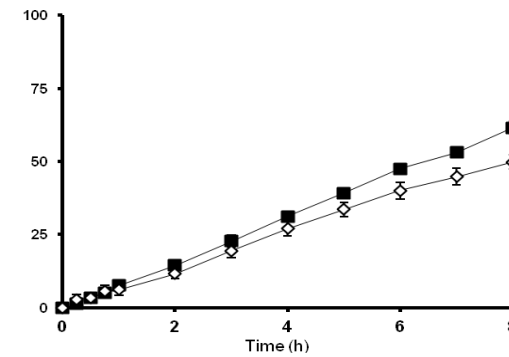
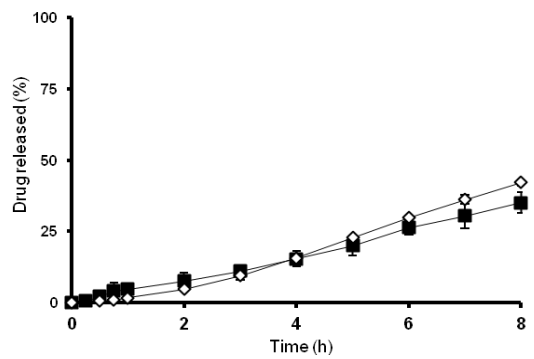


Figure 40 : influence du pH sur la libération du vérapamil HCl à partir mini-granules enrobées avec du Kollicoat SR:IR : (■) 0,1 N HCl (pH 1) et (◇) tampon phosphate (pH 7,4).



### 1.3. Influence de la quantité de polymère dans l'enrobage

Afin de choisir les mélanges de polymère avec une faible et une forte dépendance au pH, plusieurs types d'enrobage ont été testés (figure 41). La libération du vérapamil HCl est améliorée lorsque l'on augmente la quantité de Kollicoat IR du fait de sa solubilité dans l'eau. Plus le film polymérique est épais, plus la quantité de polymère soluble influence le taux de libération de la SA, indépendamment du milieu de dissolution.

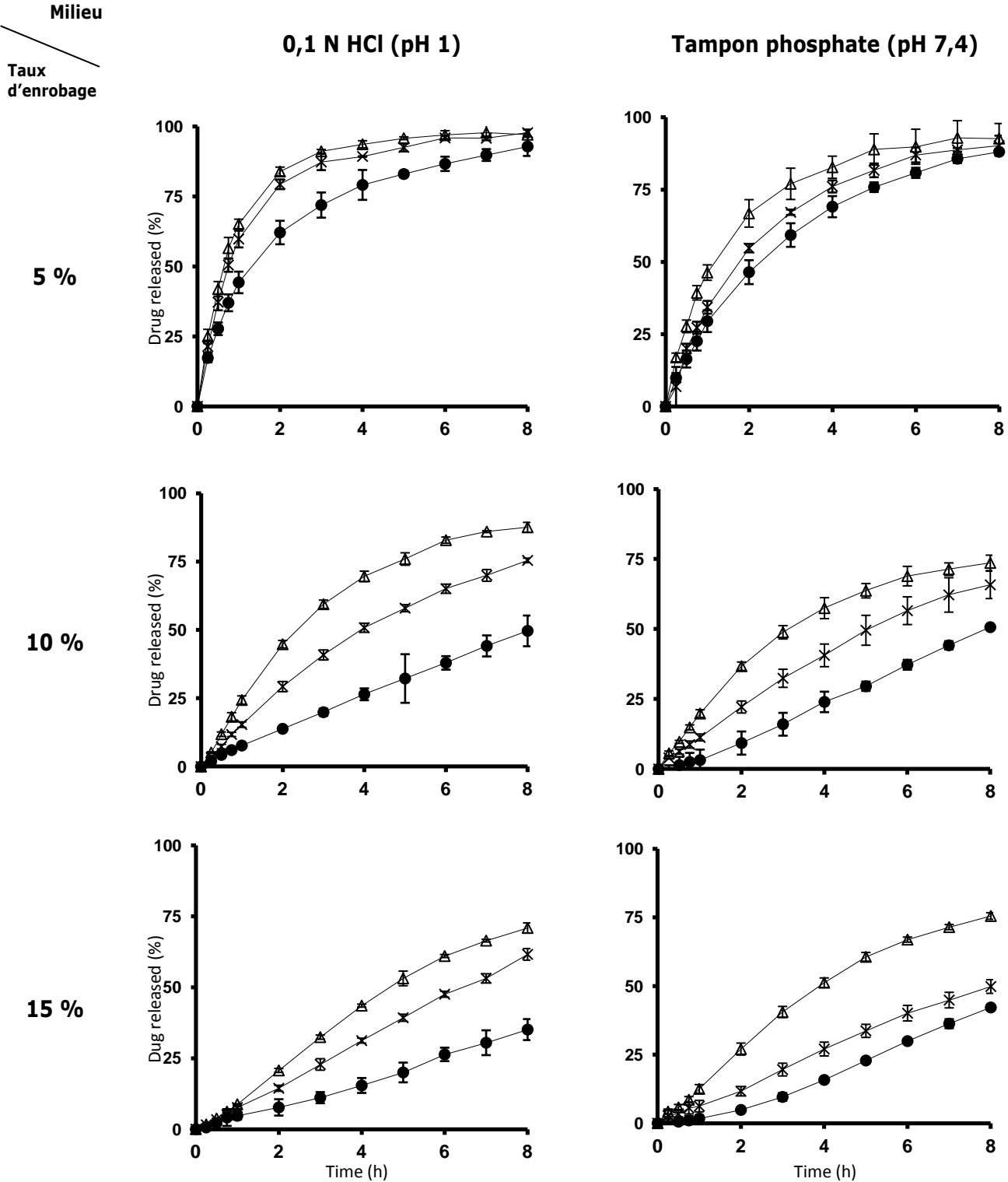


Figure 41: influence du ratio de polymère Kollicoat SR:IR sur la libération du vérapamil HCl à partir de mini-granules enrobées : (•) 100:0, (x) 95:5, (Δ) 90:10.

## 2. Test de dissolution à partir d'une seule mini-granule

Les profils de libération de dix mini-granules individuelles sont représentés dans les figures 42 et 43. Deux lots de pellets ont été retenus pour la suite du projet : le premier avec un enrobage composé de 95% de Kollicoat SR et 5% de Kollicoat IR et le deuxième avec un enrobage constitué de 90% de Kollicoat SR et 10% de Kollicoat IR. C'est pourquoi, ces expériences n'ont été réalisées que sur celles-ci. Elles permettent de montrer si les lots sont homogènes et si elles sont en corrélation avec l'ensemble des pellets. De plus, cette étape est essentielle pour une meilleure compréhension des valeurs de pH à l'intérieur des mini-granules.

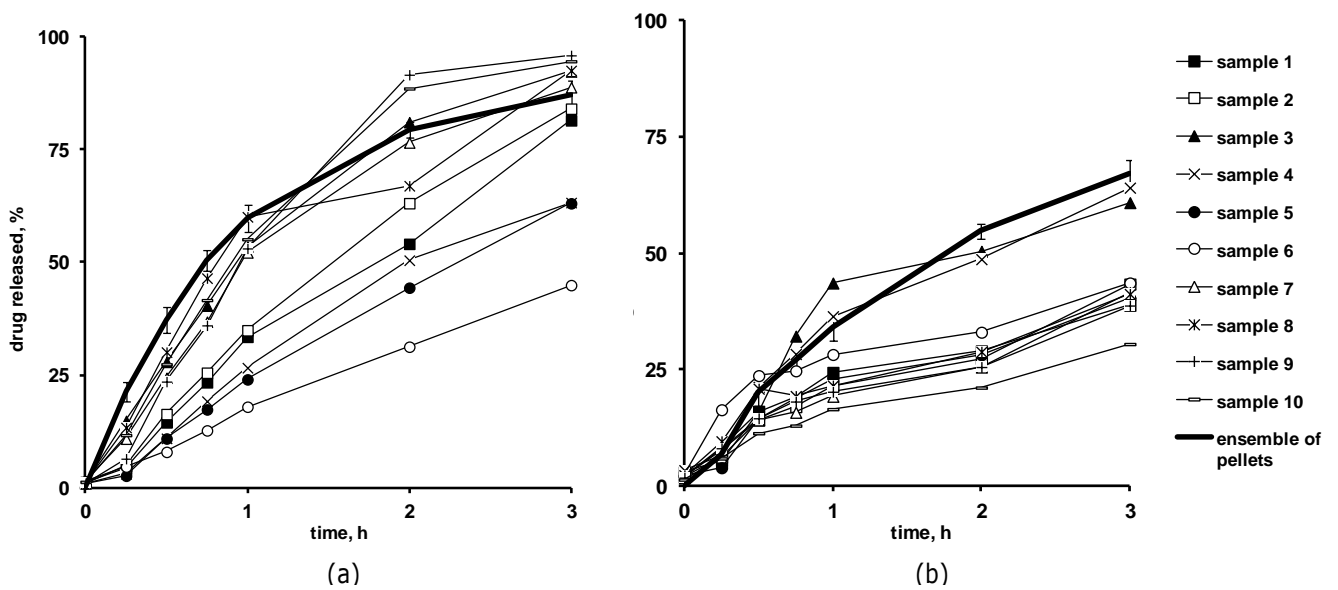


Figure 42 : libération à partir d'une seule mini-granule enrobée avec du Kollicoat SR:IR = 95:5 : (a) 0,1 N HCl (pH 1) et (b) tampon phosphate (pH 7,4)

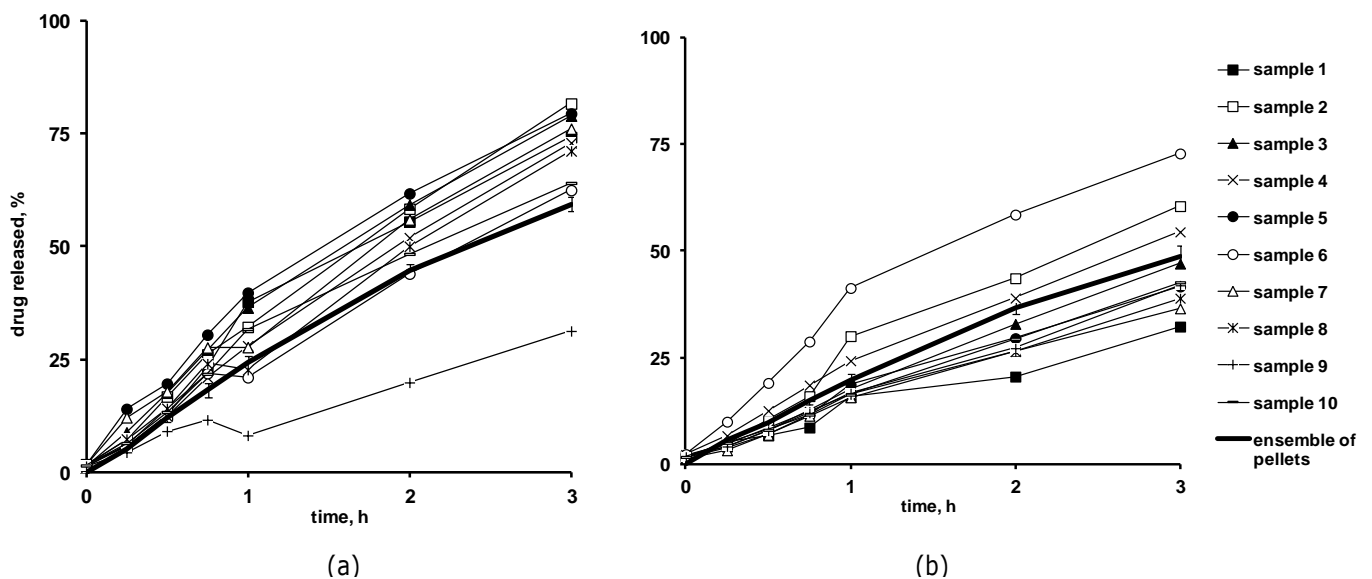


Figure 43 : libération à partir d'une seule mini-granule enrobée avec du Kollicoat SR:IR = 90:10 : (a) 0,1 N HCl (pH1) et (b) tampon phosphate (pH7,4)

### 3. Détermination du pH à l'intérieur de mini-granules enrobées

#### 3.1. Screening de fluorophores

Les quatre fluorophores présélectionnés, BCECF dextran, Oregon green dextran, Lysosensor yellow/blue, SNARF-5F sont étudiés en obtenant le spectre d'émission, le spectre d'excitation et en déterminant les deux points essentiels : le point isobestique et la longueur d'onde correspondante à l'intensité maximale.

##### *BCECF dextran*

Le spectre d'émission du BCECF dextran est caractérisé par un maximum à 534 nm. Les spectres d'excitation ont donc été tracés à cette longueur d'onde d'émission et balayés à des longueurs d'onde d'excitation allant de 400 à 520 nm.

Ensuite, le fluorophore est ajouté dans diverses solutions tampons contenant quelques pellets. Les spectres d'excitations sont représentés figure 44. Ils concernent les pellets enrobés avec du Kollicoat SR:IR = 95:5 avec un taux d'enrobage de 5%. Les spectres d'excitation avec les autres mini-granules (Kollicoat SR:IR = 90:10 et 10% de taux d'enrobage) ne sont pas montrés.

D'après la littérature et les expériences, le spectre de fluorescence du BCECF dextran varie pour une gamme de pH allant de 6 à 8.

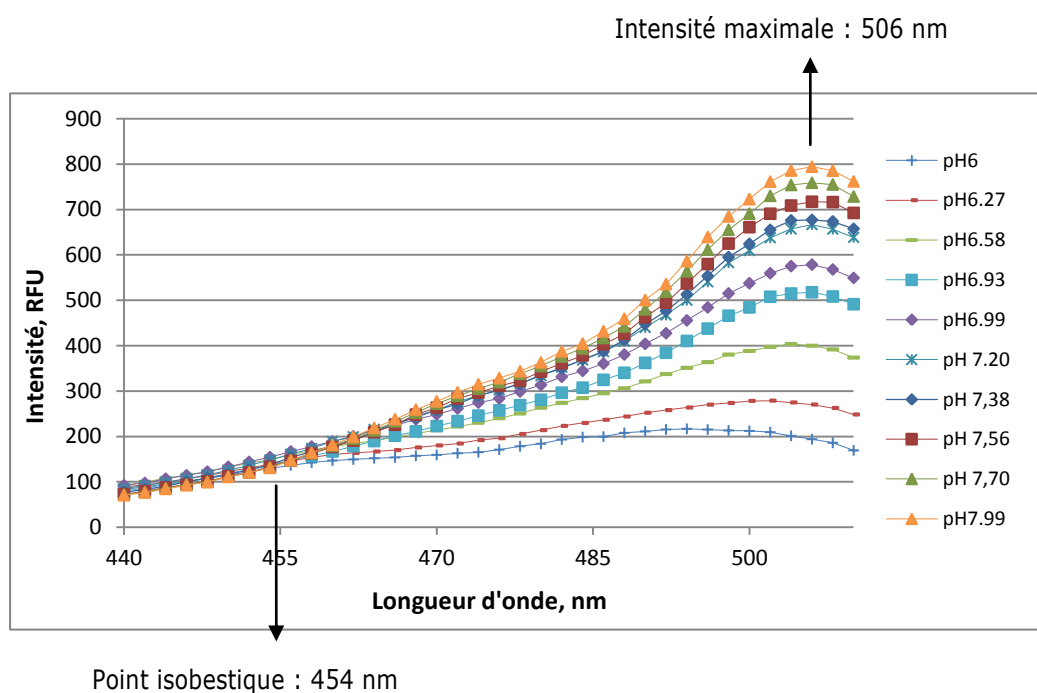


Figure 44 : spectres d'excitation du BCECF dextran à différents pH

Puis, le ratio de l'intensité au point isobestique sur l'intensité maximale est calculée à chaque valeur de pH. Ainsi, une droite est obtenue pour chaque type de mini-granules (figure 45). Les équations des droites vont permettre par la suite de déterminer le pH à l'intérieur des pellets.

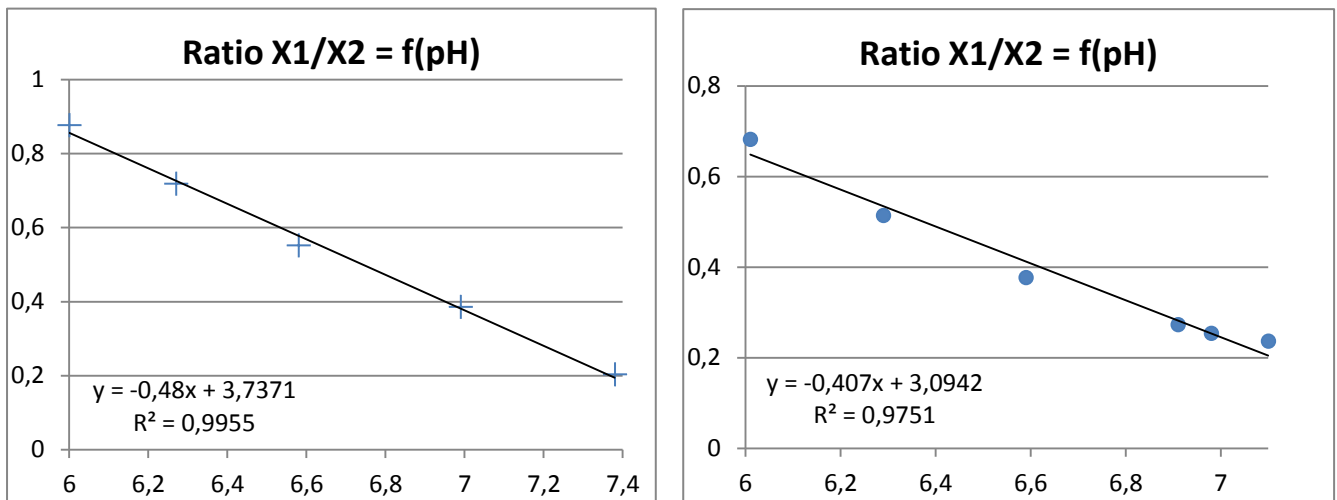


Figure 45 : gammes étalons du BCECF dextran en présence de pellets enrobées avec du Kollicoat SR:IR : (+) 95:5 (5%) et (•) 90:10 (10%)

### Oregon green dextran

L'approche est la même que pour le BCECF dextran. Le spectre d'émission est caractérisé par un maximum à 526 nm. Les spectres d'excitation ont donc été tracés à cette longueur d'onde d'émission et balayés à des longueurs d'onde d'excitation allant de 400 à 510 nm (figure 46).

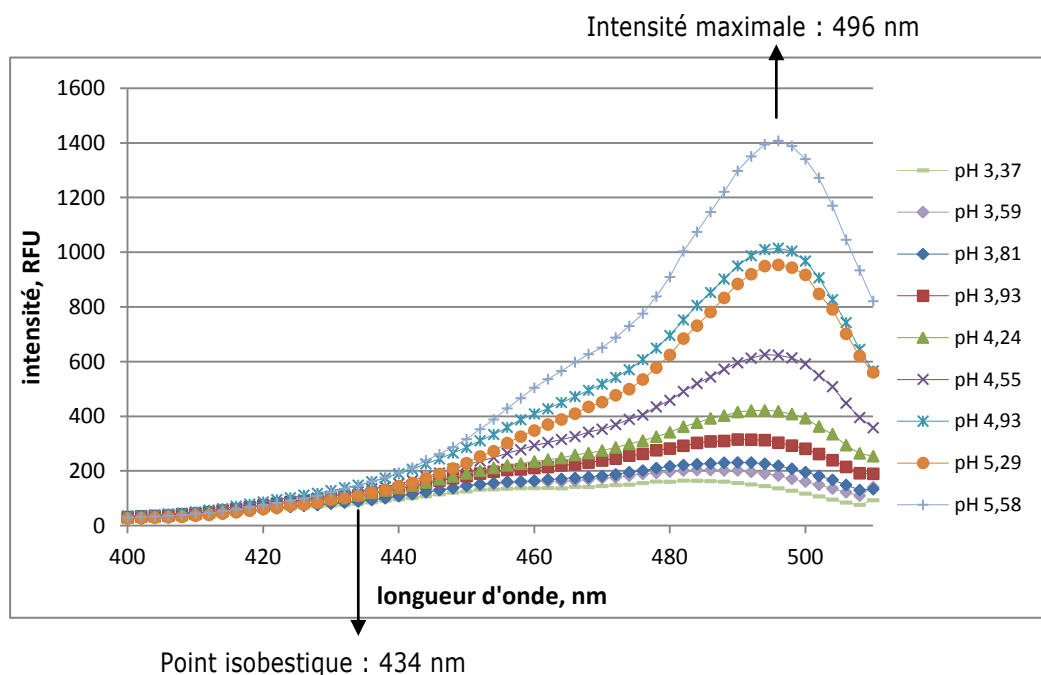


Figure 46 : spectres d'excitation de l'Oregon green à différents pH

Les droites d'étalonnage (figure 47) sont établies à partir des spectres d'excitation par la méthode ratiométrique. Elles sont utilisées pour déterminer les valeurs pH à l'intérieur de mini-granules contenant de l'Oregon green.

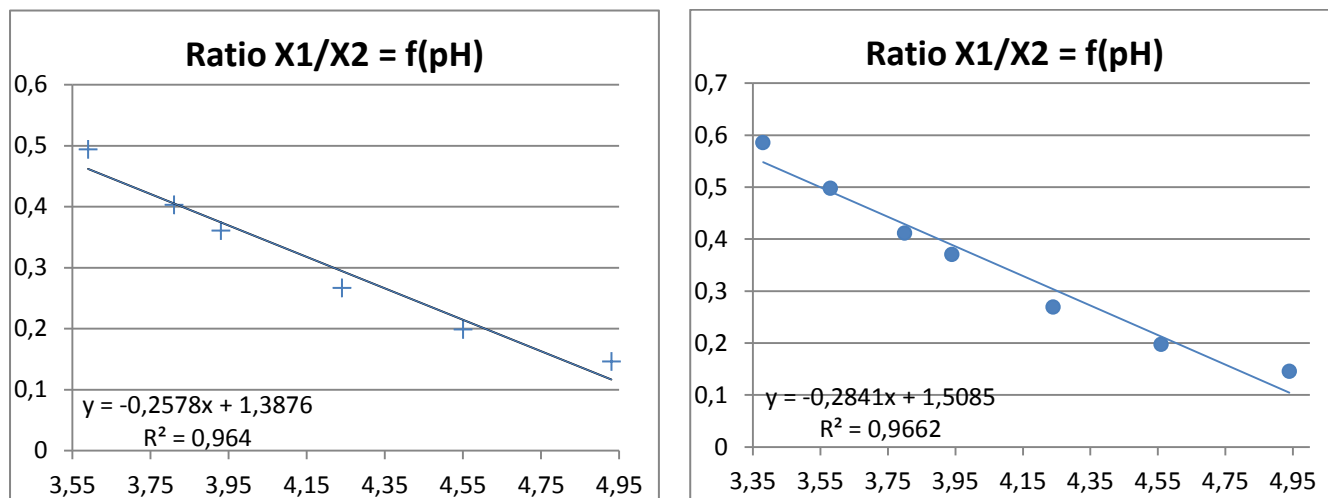


Figure 47 : gammes étalons de l'Oregon green en présence de pellets enrobées avec du Kollicoat SR:IR : (+) 95:5 (5%) et (•) 90:10 (10%)

L'Oregon green se révèle efficace dans une gamme de pH allant de 3,5 à 5.

### *Lysosensor yellow/blue*

La longueur d'onde d'émission a été fixée à 490 nm et les spectres d'excitation ont été balayés à des longueurs d'onde d'excitation allant de 270 à 470 nm.

Le point isobestique et l'intensité maximale ont été clairement identifiés en traçant les spectres d'excitation du fluorophore seul dans différentes solutions tampons (figure 48). En effet, lorsque des pellets (enrobage de Kollicoat SR:IR = 95:5, 5%) ont été ajoutées, l'allure des spectres s'est modifiée (figure 49). On observe dans la première partie du graphe la présence du phénomène de diffusion dissimulé sous le maximum.

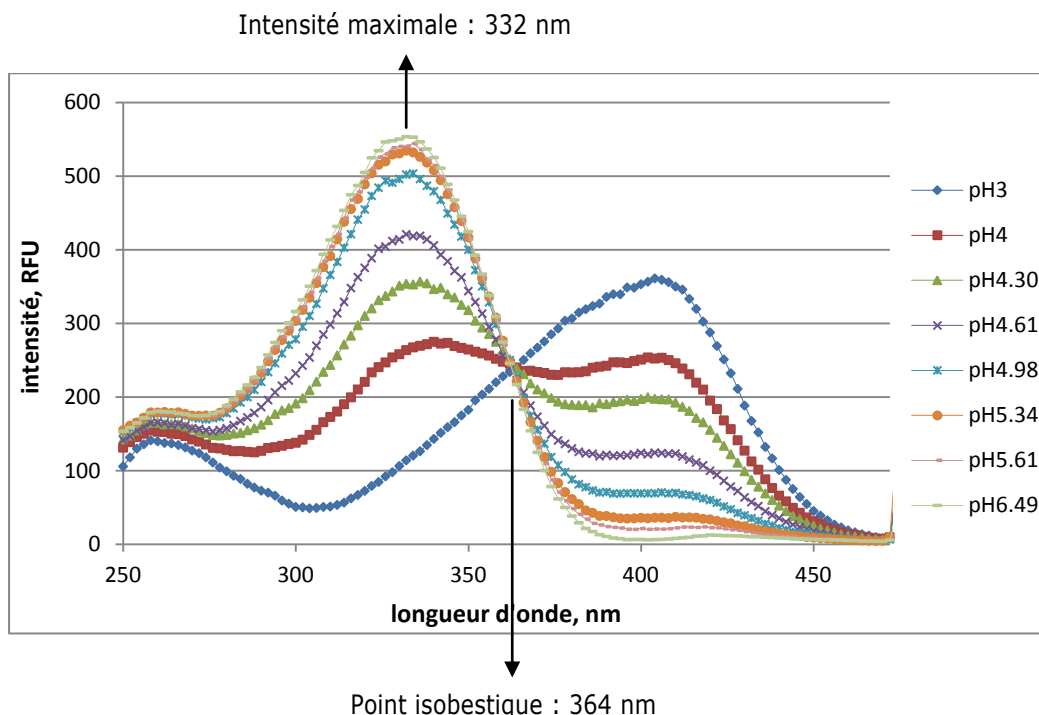


Figure 48 : spectres d'excitation du Lysosensor yellow/blue à différents pH (**sans pellets**)

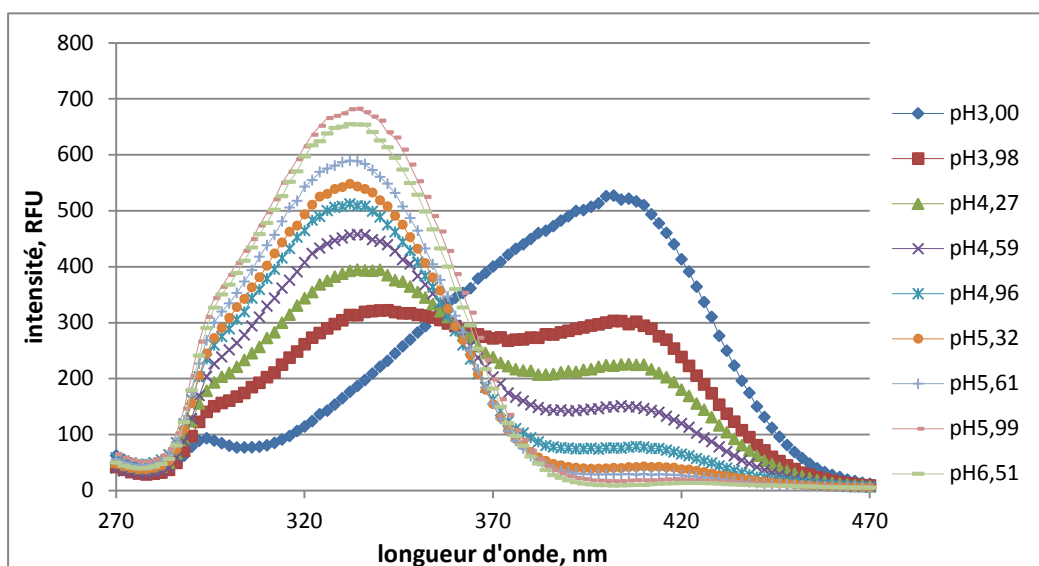


Figure 49 : spectres d'excitation du lysosensor yellow/blue à différents pH (**avec pellets**)

La méthode ratiométrique a été appliquée pour essai, et on n'aboutit pas à une droite linéaire (figure 50). Par manque de temps, aucune solution n'a été envisagée pour obtenir une droite d'étalonnage. C'est pourquoi, ce fluorophore n'a pas fait suite dans cette étude.

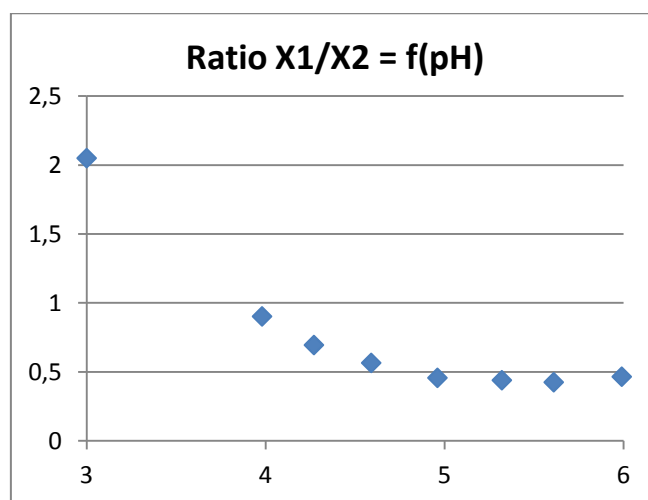


Figure 50 : gamme étalon du Lysosensor yellow/blue en présence de pellets enrobés avec du Kollicoat SR:IR = 95:5 (5%)

### SNARF-5F

En raison de sa mauvaise dissolution dans l'eau, il a été difficile d'obtenir des spectres d'émission et d'excitation interprétables et fiables pour la suite des étapes. Les deux points nécessaires pour la méthode ratiométrique n'ont pas été déterminés, et donc aucune gamme étalon n'a pu être établie.

En résumé, les données de chaque fluorophore ainsi que leurs caractéristiques ont été regroupées afin de sélectionner un ou deux fluorophores les plus adaptés au projet (tableau 7).

	<b>BCECF dextran (poudre)</b>	<b>Oregon green 488 dextran (poudre)</b>	<b>Lysosensor yellow/blue DND-160 (liquide)</b>	<b>SNARF-5F (poudre)</b>
<b>Avantages</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Le plus employé</li> <li>- Prix raisonnable</li> <li>- Sensibilité élevée</li> <li>- Gamme de pH intéressante</li> <li>- Haute solubilité aqueuse</li> <li>- Faible quantité nécessaire</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Haute sensibilité</li> <li>- Rang de pH intéressant et complémentaire au BCECF dextran</li> <li>- Haute solubilité aqueuse</li> <li>- Structure proche du BCECF (dérivé de la fluorescéine)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Haute sensibilité de détection</li> <li>- Large gamme de pH</li> </ul>	
<b>Inconvénients</b>			<ul style="list-style-type: none"> <li>- Prix élevé</li> <li>- Quantité importante nécessaire dans les pellets</li> <li>- Interactions avec les excipients</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Problème de dissolution</li> </ul>
<b>Conclusion</b>	Sélectionné	Sélectionné	Ecarté	Ecarté

Tableau 7 : caractéristiques des fluorophores

### 3.2. Evaluation du pH à l'intérieur de mini-granules enrobées

Les spectres d'excitation obtenus à partir d'une mini-granule contenant du BCECF dextran sont similaires à ceux acquis avec du BCECF dextran en solution. L'intensité de fluorescence a, cependant, diminué (environ 50 RFU à 454 nm et 200 RFU à 506 nm) à cause du film polymérique entourant les pellets. C'est pourquoi, la méthode ratiométrique a été choisie pour réduire ces variations et déterminer le pH à l'aide d'une courbe standard.

Le pH à l'intérieur de mini-granules pelliculées a été évalué par spectroscopie de fluorescence et validé par une méthode invasive, la pH-métrie. Seules les mini-granules avec du BCECF dextran et enrobées avec du Kollicoat SR et IR ont été testées pour le moment. Ces dernières ont été incubées dans du tampon phosphate (pH 7,4) pendant 3h et le pH a été mesuré à des temps déterminés (figures 51 et 52).

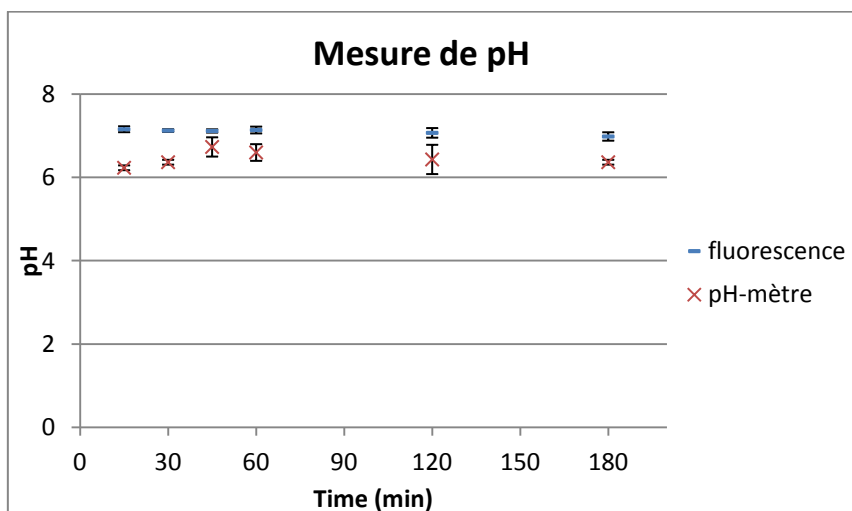


Figure 51 : mesure du pH microenvironnemental de pellets enrobés avec du Kollicoat SR:IR = 95:5 (5% de taux d'enrobage)

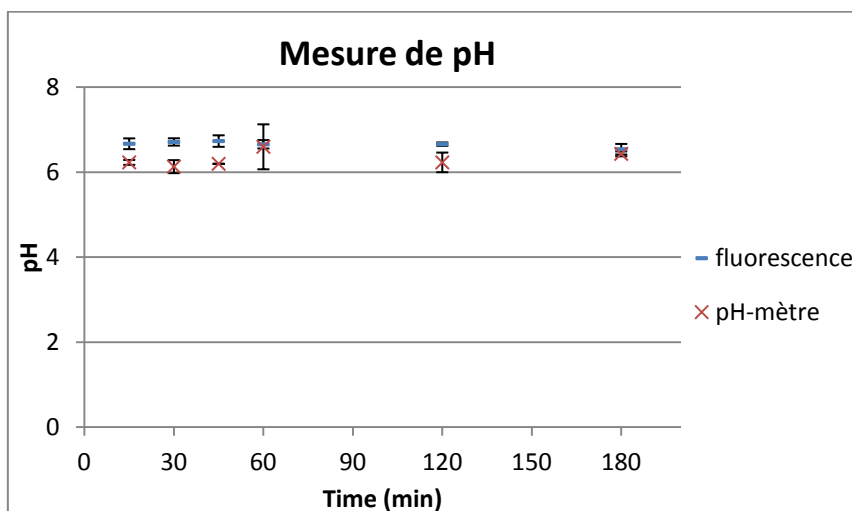


Figure 52 : mesure du pH microenvironnemental de pellets enrobés avec du Kollicoat SR:IR = 90:10 (10% de taux d'enrobage)



### III. Discussion

#### 1. A propos des profils de libération

Les profils de libération ont été obtenus à partir de mini-granules enrobées contenant du vérapamil hydrochloride. Un mélange de polymères, le Kollicoat SR et le Kollicoat IR, a été appliqué à différents niveaux d'enrobage et le taux de libération de la SA s'est révélé inversement proportionnel à l'épaisseur du film ; plus le film polymérique est épais, plus la libération de la SA est ralentie. A 15% de taux d'enrobage, la molécule se libère lentement, à hauteur de 25 à 70% au bout de 8h selon le mélange de polymère.

La libération du principe actif à partir d'un système réservoir entouré d'une membrane de polyvinylacétate insoluble dans l'eau est contrôlée majoritairement par diffusion (Carlin *et al.*, 2008). Lorsque ces mini-granules entrent en contact avec le milieu de dissolution, ce dernier pénètre à l'intérieur et dissout la SA, qui par conséquent va diffuser vers l'extérieur. En revanche, la concentration de saturation ( $C_s$ ) du vérapamil hydrochloride dans 0,1 N HCl est de l'ordre de 276 mg/mL. La libération est donc plus rapide et élevée dans un milieu de dissolution acide que dans un milieu tamponné à pH 7,4 où la  $C_s$  atteint seulement 0,20 mg/mL.

A faible pH, le vérapamil HCl est protoné, chargé positivement et soluble dans le milieu aqueux tandis qu'à pH basique, la molécule est neutre et faiblement soluble.

Cependant, lorsqu'on augmente la quantité de Kollicoat IR dans le film polymérique, la libération du vérapamil HCl augmente. Cela peut être expliqué par la formation de pores dans le film d'enrobage. Le copolymère de PVA-PEG soluble dans l'eau se dissout au contact du milieu de dissolution laissant derrière lui des pores remplis d'eau. Ainsi, ce dernier fournit un chemin de diffusion pour les molécules. Ce phénomène devient plus évident quand le film s'épaissit (10% et 15%). Après contact avec le milieu environnant, la couche polymérique du système commence à gonfler par absorption d'eau. Ce gonflement se produit jusqu'à ce qu'un état d'équilibre soit atteint, favorisant, par la suite, la diffusion et la force élastique du réseau polymérique. Un second processus peut intervenir, l'érosion du film par dissolution des polymères et des composants hydrophiles. Pour cette étape, une structure linéaire et suffisamment hydrophile du polymère est requise pour que ce dernier soit solvété par le milieu aqueux environnant. La pénétration de l'eau à travers le film d'enrobage va atteindre le noyau des mini-granules et va augmenter à la fois la polarité et la mobilité moléculaire à l'intérieur du système réservoir. Ainsi, la dissolution de la SA et des excipients solubles se produit. D'un autre côté, des fissures dans la barrière polymérique peuvent être observées dues à des défauts engendrés lors de l'enrobage des pellets par une coalescence insuffisante par exemple, même si le temps de *curing* est long pour éviter ce phénomène. En général, une combinaison de ces différents mécanismes de libération est présente : diffusion à travers le film polymérique et à travers des pores remplis d'eau et/ou des fissures.

Des études complémentaires peuvent être faites pour définir véritablement le mode de transport du principe actif vers le milieu extérieur : test de gonflement des mini-granules, observation au microscope électronique à balayage, analyse du film polymérique seul... Cependant, il ne s'agit pas de l'objectif premier.

A partir de ces profils de libération, deux types d'enrobages ont été sélectionnés : le premier avec un ratio de Kollicoat SR:Kollicoat IR à 95:5 et un taux d'enrobage de 5% et le deuxième avec 90:10 de Kollicoat SR:Kollicoat IR et un taux d'enrobage de 10%. Par approximation, 5% correspond à une épaisseur de film d'environ 7,5  $\mu\text{m}$  et 10% à 15  $\mu\text{m}$ . Cela permet d'utiliser la méthode de mesure de pH sur des mini-granules avec un enrobage différent (en ratio de polymère) et d'avoir un film polymérique plus ou moins épais pour connaître les limites de la technique ; il faut souligner que le film d'enrobage (même le plus épais) ne fait pas écran à la fluorescence. De plus, avec ces ratios de polymère, les libérations sont différentes selon le milieu de dissolution. Donc, les valeurs de pH sont susceptibles de l'être également.

Les profils de libération du vérapamil HCl obtenus à partir d'une seule mini-granule (figures 42 et 43) sont dans la majorité des cas similaires de ceux acquis avec un ensemble de pellets. En revanche, c'est moins le cas pour les mini-granules enrobées avec un ratio de polymère Kollicoat SR:IR = 95:5. De plus, il existe une différence notable entre les profils de libération de chaque pellet, notamment celles libérées en milieu acide. Cela peut être expliqué par une trop grande variation de taille des mini-granules dans un même lot, qui pour rappel est de 710-1250  $\mu\text{m}$ . En effet, la taille est un facteur très important dans le phénomène de libération. Une pellet de petite taille présente plus de surface et donc le film polymérique l'entourant est plus fin. L'inverse est observé avec des pellets plus grandes, où elles possèdent un film d'enrobage plus épais. Par conséquent, la libération du principe actif sera plus lente. Ainsi, la cinétique de libération varie selon la taille des mini-granules. De même qu'elles ne sont pas complètement sphériques, il se peut donc que l'enrobage déposé tout autour ne soit pas uniforme.

## 2. A propos de l'évaluation du pH à l'intérieur de mini-granules enrobées

Pour chaque fluorophore, les spectres d'émission et d'excitation ont été tracés afin de déterminer les conditions opératoires, c'est-à-dire les longueurs d'onde d'analyse ainsi que la gamme de pH. Ensuite, des courbes d'étalonnage ont été établies pour chaque fluorophore et chaque type d'enrobage des pellets. Elles sont construites en présence de fluorophore, de solution tampon et de mini-granules écrasées. Les solutions sont donc hétérogènes dues à la présence de particules en suspension lors des mesures de fluorescence. Aucune filtration n'est appliquée puisque l'évaluation de pH se réalise sur des pellets entières. Il s'agit de reproduire au mieux les conditions. Par conséquent, ces artefacts peuvent expliquer les variations entre les différentes courbes d'étalonnage. Les

fluctuations observées pour le BCECF dextran entre les deux enrobages peuvent dépendre de la nature du film polymérique. En revanche, celles de l'Oregon green sont moins influencées car les deux gammes d'étalon restent similaires. En ce qui concerne les coefficients de détermination, ils sont tout à fait acceptables et permettent de considérer la fiabilité de l'étalonnage. Les courbes standards des fluorophores sont établies en triplicat. Certes, d'autres expériences sont néanmoins nécessaires pour valider les méthodes de mesure.

Quant au Lysosensor yellow/blue, les spectres d'excitation sont convaincants par une détermination du point isobestique et de l'intensité maximale très lisible. Par contre, ceux obtenus en présence de pellets présentent une allure quelque peu différente. En effet, le phénomène de diffusion intervenant aux alentours de 260 nm sur la figure 48, apparaît vers 300 nm en présence de pellets. La diffusion se superpose et modifie les intensités de fluorescence. En d'autres termes, les particules présentes provoquent une diffusion non négligeable. De plus, on peut être certain qu'il s'agit de la diffusion puisque la longueur d'onde d'émission maximale varie avec la longueur d'onde d'excitation (ce qui n'est pas le cas de la fluorescence). Dans le cas présent, on peut supposer que ce sont les excipients des mini-granules qui sont responsables de la diffusion puisque c'est la seule différence avec les solutions témoins dans les conditions expérimentales. Ceci pose donc un problème majeur dans la poursuite de l'étude. En outre, un autre inconvénient s'ajoute, le coût de l'analyse. Le fluorophore se conditionne sous forme liquide dans des flacons de 50 µL à une concentration de 1mM. Il faut donc une quantité importante de vials pour produire des mini-granules. Néanmoins, une courbe standard a été tracée et on observe que la variation n'est pas linéaire. C'est pourquoi, ce fluorophore n'a pas été retenu pour la suite des expériences. Toutefois, il reste adapté au projet et convient à l'évaluation du pH à l'intérieur de formes solides.

Enfin, les essais sur le SNARF-5F n'ont pas abouti dus à des soucis de manipulation (mauvaise dissolution).

En résumé, deux fluorophores ont vu leurs étapes préliminaires concluantes et ont été sélectionnés pour la suite du projet. Il s'agit du BCECF dextran et de l'Oregon green. Chacun d'entre eux est incorporé dans les mini-granules afin d'évaluer le pH par spectroscopie de fluorescence. D'une part, le BCECF dextran est utilisé pour mesurer le pH compris entre pH 6 et 8 et d'autre part, l'Oregon green, efficace à pH 3,5-5, servira lorsque les pellets seront en milieu acide.

En premier lieu, les mesures de pH ont été conduites sur des mini-granules contenant du BCECF dextran. Elles ont été soumises au test de dissolution dans un milieu phosphate (pH 7,4). Les résultats sont présentés figures 51 et 52. Dans les deux cas, un pH stable est observé durant 3h et correspond environ à un pH de 7. En comparant les profils de libération d'une seule mini-granule et les valeurs de pH, la libération du vérapamil HCl est indépendante du pH. En outre, ce principe actif se dissout à l'intérieur de la forme solide grâce à la diffusion de l'eau et probablement d'ions passant à travers le film polymérique. En effet, le pH est proche de celui du milieu de dissolution. Le

vérapamil HCl, sous forme ionisée, se libère progressivement, et un équilibre se forme avec les ions extérieurs permettant de garder un pH stable.

Les valeurs de pH dans les mini-granules avec un taux d'enrobage de 10% sont plus faibles, aux alentours de 6,6 contre 7,10 pour un taux d'enrobage de 5%. Pour comprendre cette diminution, il faudrait tester un seul facteur variant à la fois, c'est-à-dire le ratio de polymère et ensuite l'épaisseur du film. Cette différence peut être due au fait qu'il y ait plus de Kollicoat IR formant plus de pores et provoquant une dissolution plus rapide de la SA ou alors l'épaisseur de l'enrobage freinant l'entrée du milieu environnant et donc d'ions.

Ensuite, une méthode de validation invasive a été réalisée en parallèle pour appuyer les résultats précédents. Il se trouve qu'on retrouve également des valeurs de pH constantes mais légèrement plus faibles (6,2 à 6,5 selon l'enrobage). Une question se pose sur la pertinence de cette méthode de validation ; garantit-elle des mesures de pH fiables ?, même si cette technique est présente dans la littérature en vue du même objectif.

Pour conclure sur les mesures de pH par spectroscopie de fluorescence, le pH reste stable durant les trois premières heures de libération et la méthode invasive suit cette même tendance. Cependant, les expériences doivent être approfondies et répétées afin d'apporter plus de rigueur à la méthode et pour répondre aux interrogations.

Une autre remarque est à noter, l'intensité de fluorescence varie d'une mini-granule à une autre pour le même lot. Une hypothèse est donnée : chacune d'entre elles ne renferme pas la même quantité de fluorophore, d'autant plus que la taille varie de 710  $\mu\text{m}$  à 1250  $\mu\text{m}$ . Pour limiter la répercussion sur les résultats, la méthode ratiométrique est employée. Toutefois, il faudrait à l'avenir restreindre la fraction de taille des pellets.

En second lieu et de la même manière, les mini-granules contenant de l'Oregon green ont été analysées mais cette fois-ci en présence de milieu 0,1 N HCl (pH 1). Il s'avère que l'intensité de fluorescence émise est trop faible ce qui rend la détermination du pH difficile. Cela peut signifier également que le pH dans ces systèmes réservoirs est inférieur à 3,5 et l'Oregon green ne peut être détecté. D'autres hypothèses ont été émises. Tout d'abord, une fuite de fluorophore dans le milieu environnant a été envisagée. Après vérification de ce milieu, cette piste a été écartée. Puis, un test de stabilité a été entrepris car l'Oregon green pourrait subir un *photobleaching* lors du *curing* où les pellets sont placées à l'étuve à 60°C pendant 48h ; d'autant plus que les fluorophores sont en général thermosensibles. Une fois de plus, aucune dégradation n'a été constatée. Enfin, un dernier test a été réalisé en mettant les mini-granules en présence de milieu 0,1 N HCl puis en les transférant dans un tampon phosphate. Le signal de fluorescence est plus important dans la seconde condition de pH ce qui signifie que le fluorophore n'est pas dégradé lorsqu'il est en milieu acide (pH 1). En résumé, la faible détection de la fluorescence de l'Oregon green est lié au faible pH. L'expérience a donc été conduite dans un autre tampon (acétate) à pH 3,5. L'allure des spectres d'excitation et l'intensité de

fluorescence ont été retrouvées. L'Oregon green est bien détectable à partir de ce pH. En revanche, il y a un décalage des longueurs d'onde, le maximum étant déplacé vers la droite. Seulement des hypothèses ont été émises par manque de temps. Le fluorophore se trouve peut-être lié à une autre molécule. Pour le vérifier, chaque excipient utilisé pour la fabrication des mini-granules doit être ajouté à la solution de fluorophore pour savoir lequel interagit.

De même que pour le BCECF dextran, il existe une différence entre les intensités de chaque pellet. A ce stade du projet, une autre interrogation se pose : est-ce que le fluorophore influence la libération de la SA ? Il se trouve qu'en dosant le vérapamil HCl libéré des mini-granules contenant du BCECF dextran, la cinétique est modifiée. Il est totalement libéré au bout de 2 à 3h selon l'épaisseur d'enrobage. Cependant, ce n'est pas la même pellet qui a été suivie mais une différente à chaque temps. C'est pourquoi, ces tests de dissolution seront, à nouveau, réalisés prochainement. C'est un paramètre important car le but premier n'est, en aucun cas, de perturber la libération de la molécule active lorsqu'on ajoute du fluorophore.

# CONCLUSION

La grande variabilité du pH gastro-intestinal est un véritable challenge pour des systèmes à libération contrôlée par voie orale, spécialement les principes actifs possédant des propriétés de bases faibles. Ces molécules montrent une solubilité aqueuse pH-dépendante et sont associées à des variabilités intra et interindividuelles dans le plasma. Leur solubilité est faible au pH intestinal contrairement à celui de l'estomac. De plus, le pH affecte la stabilité de la substance active à l'intérieur des formes pharmaceutiques solides en modifiant sa dissolution et sa biodisponibilité.

Une alternative existe pour éviter ces contraintes. Elle consiste en l'ajout dans la formulation d'un excipient modifiant le pH (acide fumarique ou citrique par exemple) afin d'améliorer la libération de la molécule active tout au long du tractus GI. Bien que cette approche soit efficace, la formulation reste empirique à l'heure actuelle puisque la durée de l'effet de ces composants ne peut être correctement mesurée ou prévue. De plus, cette modification de formulation engendre des conséquences sur le comportement des formes solides. Par exemple, Pillay et Fassihi (1999) ont montré que l'addition d'électrolytes altère le comportement de gonflement et modifie la texture des matrices. D'autres auteurs ont confirmé que le changement de composition influence la cinétique de diffusion de l'eau à travers ces systèmes (exemple, la présence d'acide fumarique diminue le gonflement de matrices) (Siepe *et al.*, 2006). Donc, pour pouvoir améliorer cette stratégie mais aussi prédire le changement de pH à l'intérieur de formes solides hydratées sans avoir à ajouter un excipient dans la formulation, il est nécessaire de développer une méthode qui permet une évaluation quantitative du pH. Par ailleurs, faire ces mesures de manière non invasive serait un grand avantage et un gain de temps.

Comme déjà énoncé dans ce présent rapport, d'autres techniques sont en développement pour la même problématique : EPR, microscope confocal à balayage laser, incorporation d'une sonde fluorescente. Cependant, aucune d'entre elles n'a été testée sur des mini-granules enrobées entières. Pourtant, les systèmes enrobés sont employés depuis longtemps mais le destin des substances qui constituent le noyau est très peu connu lors de la dissolution.

C'est pourquoi, ce projet porte un intérêt majeur d'autant plus que les systèmes à libération contrôlée sont d'actualité. Le but est de rendre l'absorption de la substance active prévisible, de contrôler sa concentration dans le sang et les tissus et de prolonger son activité pharmacologique avec une seule administration. Cependant, des problèmes peuvent surgir tels que la diminution de la biodisponibilité due à une mauvaise absorption par exemple. Il convient donc d'insister sur les moyens que l'on peut mettre à disposition en amont pour comprendre et envisager une bonne libération.

L'objectif visé de ce projet est la mise au point d'une méthode non-invasive permettant d'évaluer les changements de pH dans des systèmes réservoirs tels que des mini-granules enrobées lors de leur passage dans le tractus gastro-intestinal. Pour cela, un fluorophore dont l'intensité de fluorescence varie avec le pH, a été incorporé dans des pellets enrobées à l'aide d'un mélange de polymères. A des temps prédéterminés au cours de la libération de la SA, l'intensité de fluorescence est mesurée par spectroscopie de fluorescence. Par une méthode ratiométrique et en se référant à

une gamme étalon préalablement établie, les valeurs de pH sont déterminées. Avant d'arriver à ce stade, une étape préliminaire importante a été entreprise : la sélection des fluorophores, la détermination du taux nécessaire de fluorophore par pellet pelliculé, les potentielles interactions avec les excipients, la zone d'efficacité de pH des fluorophores, l'établissement des gammes étalons.

Les six mois d'étude ont permis d'identifier deux fluorophores les plus adaptés et de mettre en place la technique et les outils nécessaires. Le BCECF dextran et l'Oregon green ont été retenus pour ce projet. Il s'agit de dérivés de la fluorescéine. Les étapes en amont étant réalisées, ils ont été incorporés dans les mini-granules de vérapamil HCl et enrobés. Toutefois, il reste plusieurs points à éclaircir et des étapes à optimiser.

Les prochains axes d'étude à mener sont nombreux. Il s'agit de répéter les mesures avec le BCECF dextran afin de reproduire et valider les valeurs de pH ; d'optimiser la méthode de validation voire de la modifier en utilisant par exemple un potentiomètre ou une microélectrode. La microélectrode peut fournir des mesures directes sur des pellets sectionnées. Les pellets sont hydratés dans le milieu de dissolution à 37°C et à des temps prédéterminés, le milieu est retiré et la mini-granule est placée sous microscope et la surface est mesurée à l'aide de cette microélectrode. Ensuite, les mini-granules contenant de l'Oregon green doivent être à nouveau testées dans un milieu tamponné à pH 3,5. De plus, des études d'interactions doivent être approfondies pour comprendre le décalage de longueur d'onde obtenu. Si les essais ne sont pas concluants, il faudrait trouver un autre fluorophore. Malgré ces longues étapes en amont, cette technique a l'avantage d'être rapide et non invasive.



# BIBLIOGRAPHIE

Aït-Slimane Tounsia. (2010). *Principe physique de la fluorescence*. UMRS 938, CDR Saint-Antoine, CHU Saint-Antoine. [en ligne]. Disponible sur : <http://www.snv.jussieu.fr/~wboudier/ens/cours/cours-mec-fluorescence.pdf> (consulté le 24 septembre 2013).

Albani JR. (2007). *Principles and applications of fluorescence spectroscopy*, Blackwell, Iowa.

Baert L, Vermeersch H, Remon JP, Smeyers-Verbeke J, Massart DL. (1993). Study of parameters important in the spheronisation process. *International Journal of Pharmaceutics* 96, 225-229.

BASF, The chemical company (2001). Pharma Ingredients & Services: *Kollicoat® SR 30 D*. [en ligne]. Disponible sur : <http://www.pharma-ingredients.basf.com/Products.aspx?PRD=30067541> (consulté le 30 Janvier 2013).

BASF, The chemical company (2013). Technical information: *Kollicoat® IR*. [en ligne]. Disponible sur : [http://www.pharma-ingredients.basf.com/Statements/Technical%20Informations/EN/Pharma%20Solutions/03\\_030724e\\_Kollicoat%20IR.pdf](http://www.pharma-ingredients.basf.com/Statements/Technical%20Informations/EN/Pharma%20Solutions/03_030724e_Kollicoat%20IR.pdf) (consulté le 30 Janvier 2013).

Birch DJS. (2001). Multiphoton excited fluorescence spectroscopy of biomolecular systems. *Spectrochimica acta part A: Molecular and biomolecular spectroscopy* 57, 2313-2336.

Boudendouna Abdel Hakim. *Méthodologie de la formulation d'une forme orale solide à libération prolongée*. 2010. Thèse doctorale en Science Génie Matériaux, Toulouse : Institut National Polytechnique, 246 p.

Bruce LD, McGinity JW. Polymer interactions with drugs and excipients. Dans McGinity JW, Felton LA. (2008). *Aqueous polymeric film coatings for pharmaceutical dosage forms* (third edition, Vol.176). New York: informa healthcare, 488 p., 369-408.

Bühler V. (2007). *Kollicoat Grades, Functional polymers for the pharmaceutical industry*. Allemagne: BASF, The chemical company, 101-155.

Bühler V. (2010). Technologie pharmaceutique des excipients BASF. Allemagne : BASF, The chemical company, 168 p.

Carlin B, Li J-X Felton LA. Pseudolatex dispersions for controlled drug delivery. Dans McGinity JW, Felton LA. (2008). *Aqueous polymeric film coatings for pharmaceutical dosage forms* (third edition, Vol.176). New York: informa healthcare, 488 p., 1-46.

Colombo P, Bettini R, Peppas NA. (1999). Observation of swelling process and diffusion front position during swelling in hydroxypropyl methyl cellulose (HPMC) matrices containing a soluble drug. *Journal of Controlled Release* 61, 83-91.

Cope SJ, Hibberd S, Whetstone J, MacRae RJ, Melia CD. (2002). Measurement and mapping of pH in hydrating pharmaceutical pellets using confocal laser scanning microscopy, *Pharmaceutical research* 19, 1554-1563.

Dashevsky A, Kolter K, Bodmeier R. (2004). pH-independent release of a basic drug form pellets coated with the extended release polymer dispersion Kollicoat SR 30D and the enteric polymer dispersion Kollicoat MAE 30 DP. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* 58, 45-49.

Désiré A. *Extrusion-sphéronisation de produits pharmaceutiques : comparaison et transposition à échelle industrielle de procédés d'extrusion par plans d'expériences*. 2011. Thèse doctorale de pharmacotechnie et biopharmacie, université Paris-Sud, 218 p.

Dukic-Ott A, Thommes M, Remon JP, Kleinebudde P, Vervaet C. (2008). Production of pellets via extrusion-spheronisation without the incorporation of microcrystalline cellulose: a critical review. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* 71, 38-46.

Eisenächer F, Schädlich A, Mäder K. (2011). Monitoring of internal pH gradients within multi-layer tablets by optical methods and EPR imaging. *International journal of pharmaceutics* 417, 204-215.

Ensslin S, Moll KP, Metz H, Otz M, Mäder K. (2009). Modulating pH-independent release from coated pellets: Effect of coating composition on solubilization processes and drug release. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* 72, 111-118.

Ensslin S. *Development and characterization of high dosed layered pellets with polyvinyl based film coats for modified release applications*. 2010. Thèse doctorale en Sciences, Wittenberg: Martin Luther university Halle, 158 p.

Evonik industries (2012). *Eudragit® E 100*. [en ligne]. Disponible sur : <http://eudragit.evonik.com/product/eudragit/en/products-services/eudragit-products/protective-formulations/e-100/Pages/default.aspx> (consulté le 09 septembre 2013).

Fielden KE, Newton JM, Rowe RC. (1992). A comparison of the extrusion and spheronization behaviour of wet powder masses processed by a ram extruder and a cylinder extruder. *International Journal of Pharmaceutics* 81, 225-233.

Fu K, Pack DW, Kilbanov AM, Langer R. (2000). Visual evidence of acidic environment within degrading poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres. *Pharmaceutical research* 17, 100-106.

Gandhi R, Kaul CL, Panchagnula R. (1999). Extrusion and spheronization in the development of oral controlled-release dosage forms. *Pharmaceutical Science & Technology Today* 2, 160-170.

Ghebre-Sellassie I. (1989). Pellets: a general overview. In: Ghebre-Sellassie, I. (Ed.), *Pharmaceutical Pelletization technology*. Marcel Dekker, Inc., New York, USA, 37, 1-13.

Glatt GmbH. (2006). *Extruder, spheronizer, pelletizer*. [en ligne]. Disponible sur : [http://www.cj<QqQtech.co.kr/x%20extruder\\_e.pdf](http://www.cj<QqQtech.co.kr/x%20extruder_e.pdf) (consulté le 29 Janvier 2013).

Glatt GmbH. *Pelletizing by spheronizing*. [en ligne]. Disponible sur : [http://www.glatt.com/e/01\\_technologien/01\\_03\\_04\\_03.htm](http://www.glatt.com/e/01_technologien/01_03_04_03.htm) (consulté le 29 Janvier 2013).

Glatt GmbH. *Fluid bed coating*. [en ligne]. Disponible sur : <http://www.glatt.com/cm/en/process-technologies/coating/fluid-bed-coating.html> (consulté en Février 2013).

Han J, Burgess K. (2010). Fluorescent indicators for intracellular pH. *Chemical Reviews* 110, 2709-2728.

Haugland Richard P. (2005). The handbook, a guide to fluorescent probes and labelling technologies. *Molecular probes™*, Invitrogen detection technologies, tenth edition, 937-952.

Hoffman AS. (2008). The origins and evolution of "controlled" drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* 132, 153-163.

Industrie pharma (avril 2001). *Pharmacie/Johnson and Johnson achète Alza par fusion pour 10,5 milliards de dollars*. [en ligne]. Disponible sur : <http://www.industrie.com/pharma/pharmacie-johnson-and-johnson-achete-alza-par-fusion-pour-10-5-milliards-de-dollars,5002> (consulté le 26 juillet 2013).

Lachimie.fr. (2008-2013). *Fluorescence et phosphorescence*. [en ligne]. Disponible sur : <http://www.lachimie.fr/analytique/fluorimetrie/> (consulté le 23 septembre 2013).

Le Moigne M, Dufour E, Bertrand D, Maury C, Seraphin D, Jourjon F. (2008). Front face fluorescence spectroscopy and visible spectroscopy coupled with chemometrics have the potential to characterise ripening of cabernet franc grapes. *Analytical chimica acta* 621, 8-18.

Li L, Schwendeman SP. (2005). Mapping neutral microclimate pH in PLGA microspheres. *Journal of controlled release* 101, 163-173.

Lödige Process Technology (2006). *Installations pour pelliculage et dragéification*. [en ligne]. Disponible sur : <http://www.loedige.de/uploads/downloads/BR-TEC-F-COATING-GLP200608.pdf> (consulté le 11 septembre 2013).

Manivannan R, Parthiban KG, Sandeep G, Balasubramaniam A, Senthilkumar N. (2010). Multiparticulate drug delivery systems: pellet & pelletization technique. *Drug invention today* 2, 233-237.

Mehta AM. Processing and equipment considerations for aqueous coatings. Dans McGinity JW, Felton LA. (2008). *Aqueous polymeric film coatings for pharmaceutical dosage forms* (third edition, Vol.176). New York: informa healthcare, 488 p., 67-103.

Molecular Probes Invitrogen detection technologies. (2009). *BCECF*. [en ligne]. Disponible sur : <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp01150.pdf> (consulté le 26 mars 2013).

Molecular Probes by life technologies. (2013). *Lysotracker® and Lysosensor probes*. [en ligne]. Disponible sur : <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp07525.pdf> (consulté le 26 mars 2013).

Müller J, Knop K, Regdon G, Makai Z, Pintye-Hodi K, Kleinebudde P. (2008). *Interaction between Kollicoat SR and pore forming material in aqueous dispersion and casted films*. 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Barcelone.

Muschert S. *Enrobages polymériques pour des formes orales solides : caractérisation et optimisation*. 2008. Thèse doctorale des sciences pharmaceutiques et biologiques. Lille : université de Lille 2, 196 p.

Muschert S, Siepmann F, Leclercq B, Carlin B, Siepmann J. (2009). Drug release mechanism from ethylcellulose: PVA-PEG graft copolymer coated pellets. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* 72, 130-137.

Mylan Pharmaceuticals Inc, Rx Drugs Info (2007). *Vérapamil Hydrochloride*. [en ligne]. Disponible sur : <http://rxdruginfo.com/drug-info-label/vérapamil-hydrochloride> (consulté le 16 Janvier 2013).

Nicoli S, Colombo P. (2001). Libération contrôlée des médicaments : voies et formes utilisées. *Annales Pharmaceutiques Françaises* 59, 227-231.

OpenWetWare. (2012). BioMicrocenter: Varioskan. [en ligne]. Disponible sur : <http://openwetware.org/wiki/BioMicroCenter:Varioskan> (consulté le 18 mars 2013).

Orban A. *Studies of multicomponent coating systems in relation to pellets*. 2002. Thèse doctorale de sciences pharmaceutiques et pharmacologiques. Budapest : Semmelweis university, 103 p.

Patel HP, Patel JK, Patel RR, Patel MP. (2013). *Pellets: a general overview*. International journal of pharma world research. [en ligne]. Disponible sur : [http://www.ijpwr.com/PAST\\_files/pdf%20vol%201%20issue2/MANUSCRIPT%20OF%20REVIEW%20ARTICLE%206619.pdf](http://www.ijpwr.com/PAST_files/pdf%20vol%201%20issue2/MANUSCRIPT%20OF%20REVIEW%20ARTICLE%206619.pdf) (consulté le 1<sup>er</sup> mars 2013).

Patel RP, Patel MM, Patel JK, NA, Patel DM. (2007). *Improving control of the extrusion spheronization process*. The digital resource of pharmaceutical manufacturing magazine. [en ligne]. Disponible sur : <http://www.pharmamanufacturing.com/articles/2007/080.html> (consulté le 6 mars 2013).

Pillay V, Fassihi R (1999). Electrolyte-induced compositional heterogeneity: a novel approach for rate-controlled oral drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 88, 1140-1148.

Qiao Wen Yang. *Systèmes polymériques à base de dispersion aqueuse administrés par voie orale pour la libération contrôlée du principe actif*. 2009. Thèse doctorale de sciences pharmaceutiques et biologiques. Lille : université de Lille 2, 233 p.

Rowe RC. (1985). Spheronization: a novel pill-making process?. *Pharmaceutics International* 6, 119-123.

Rowe RC, Sheskey PJ, Owen SC. (2005). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 5<sup>e</sup> edition, Editions Pharmaceutical Press et American Pharmacists Association : London, Chicago, 2006, 918 p.

Schultz P, Kleinebudde P. (1996). A new multiparticulate delayed release system. Part I: Dissolution properties and release mechanism. *Journal of controlled release* 47, 181-189.

Shen SI, Jasti BR, Li X. Chap. 22. Design of controlled-release drug delivery systems. Dans Myer Kutz (2004). *Standard handbook of biomedical engineering and design*. Mc Graw-Hill Handbooks, 1500 p.

Siepmann F, Siepmann J, Walther M, MacRae RJ, Bodmeier R. (2008). Polymer blends for controlled release coatings. *Journal of controlled release* 125, 1-15. (a)

Siepmann J, Siepmann F, Paeratakul O, Bodmeier R. Process and formulation factors affecting drug release from pellets coated with ethylcellulose pseudolatex aquacoat. Dans McGinity JW, Felton LA.

(2008). *Aqueous polymeric film coatings for pharmaceutical dosage forms* (third edition, Vol.176). New York: informa healthcare, 488 p., 203-235. (b)

Siepmann J, Siegel RA, Siepmann F. Chap. 6. Diffusion-controlled drug delivery systems. Dans Siepmann J, Siegel RA, Rathbone MJ. (2012). *Fundamentals and applications of controlled : Advances in delivery science and technology*, Springer US, 592 p. (a)

Siepmann J, Siepmann F. Chap. 7. Swelling controlled drug delivery systems. Dans Siepmann J, Siegel RA, Rathbone MJ (2012). *Fundamentals and applications of controlled : Advances in delivery science and technology*, Springer US, 592 p. (b)

Skalsky B, Petereit HU. Chemistry and application properties of polymethacrylate systems. Dans McGinity JW, Felton LA. (2008). *Aqueous polymeric film coatings for pharmaceutical dosage forms* (third edition, Vol.176). New York: informa healthcare, 488p., 237-277.

Streubel A, Siepmann J, Dashevsky A, Bodmeier R. (2000). pH-independent release of a weakly basic drug from water-insoluble and soluble matrix tablets. *Journal of controlled release* 67, 101-110.

Strübing S, Metz H, Mäder H (2006). Mechanistic analysis of drug release from tablets with membrane controlled drug delivery. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* 66, 113-119.

Thériaque (2011). *Vérapamil Hydrochloride*. [en ligne]. Disponible sur : <http://w.ww.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SAC&id=1084> (consulté le 25 Juillet 2013).

Thermo Fisher scientific Inc. (2013). *Varioskan Flash multimode reader*. [en ligne]. Disponible sur : <http://www.thermoscientific.com/ecom/servlet/productsdetail?productId=12703785&groupType=PRODUCT&searchType=0&storeId=11152&from=search> (consulté le 18 mars 2013).

Tourkya B. *Mise au point de la spectroscopie de fluorescence pour la taxonomie des Pseudomonads- Application à la caractérisation d'isolats d'ateliers carnés*. 2009. Thèse doctorale de docteur en sciences des aliments. Lempdes : université Blaise pascal, 181 p.

Vervaet C, Baert L, Remon JP. (1994). Extrusion-sphéronisation A literature review. *International journal of pharmaceutics* 116, 131-146.

Wilson DI, Rough L. Chap. 3. Extrusion-Sphéronization. Dans Salman AD, Hounslow MJ, Seville JPK (2007). *Handbook of powder technology – Granulation (Vol.11)*. Elsevier, 1390 p., 189-216.

Wurster De (1959). Air-suspension technique of coating drug particles. *Journal of the American Pharmacists Association's* 48, 451-454.

## Table des figures

Figure 1 : schéma de système réservoir .....	13
Figure 2 : profil de solubilité du vérapamil .....	14
Figure 3 : formule du vérapamil .....	15
Figure 4 : représentation des profils de libération d'une substance active : immédiate, prolongée et contrôlée	18
Figure 5 : transport de masse par diffusion .....	20
Figure 6 : schéma de système matriciel .....	21
Figure 7 : schéma de système gonflant .....	22
Figure 8 : représentation schématique d'un réseau polymérique chargé en SA à l'état sec puis après pénétration de fluide aqueux .....	23
Figure 9 : image d'une matrice d'HPMC contenant 60% de phosphate de buflomédilpyridoxal après 240 min de gonflement.....	23
Figure 10 : schéma de système érodible .....	23
Figure 11 : schéma d'un système osmotique OROS® .....	24
Figure 12 : schéma de comprimé osmotique à double couche OROS push-pull® .....	25
Figure 13 : l'extrusion-sphéronisation .....	28
Figure 14 : extrudeur à vis de type axial .....	29
Figure 15 : extrudeur à vis de type radial .....	29
Figure 16 : extrudeur à panier .....	30
Figure 17 : extrudeur à rouleaux avec un seul rouleau perforé .....	30
Figure 18 : extrudeur à rouleaux entourés de la grille d'extrusion .....	30
Figure 19 : extrudeur à piston.....	31
Figure 20 : la sphéronisation des extrudats .....	31
Figure 21 : formation des sphéroïdes selon Rowe .....	32
Figure 22 : formation des granules selon Baert .....	32
Figure 23 : diagramme représentant les équipements, les étapes et les paramètres impliqués lors de l'extrusion-sphéronisation .....	34
Figure 24 : formule de l'éthylcellulose .....	37
Figure 25 : formule de l'Eudragit® E .....	38
Figure 26 : formule du PVAc .....	38
Figure 27 : formule du Kollicoat® IR .....	39
Figure 28 : mécanisme de formation d'un film a) à partir de solution organique polymérique, b) à partir de dispersion aqueuse de polymère.....	41
Figure 29 : dynamique du procédé d'enrobage.....	42
Figure 30 : formation du film à partir de dispersion polymérique aqueuse .....	43
Figure 31 : schéma d'une turbine classique .....	44
Figure 32 : schéma d'une turbine perforée .....	44

Figure 33 : les différents lits d'air fluidisé : A : Top-spray, B : Bottom-spray avec une colonne Wurster, C : Tangential-spray.....	45
Figure 34 : diagramme simplifié de Jablonski.....	48
Figure 35 : Varioskan® FLash.....	49
Figure 36 : spectre d'excitation du BCECF.....	51
Figure 37 : spectre pH-dépendant du lysosensor yellow/blue DND-160.....	52
Figure 38 : représentation schématique d'un lit d'air fluidisé équipé d'un Wurster.....	57
Figure 39 : effet du taux d'enrobage sur la libération du vérapamil HCl à partir de mini-granules enrobées avec du Kollicoat SR:IR.....	62
Figure 40 : influence du pH sur la libération du vérapamil HCl à partir de mini-granules enrobées avec du Kollicoat SR:IR.....	63
Figure 41 : influence du ratio de polymères Kollicoat SR:IR sur la libération du vérapamil HCl à partir de mini-granules enrobées.....	64
Figure 42 : libération à partir d'une seule mini-granule enrobée avec du Kollicoat SR:IR = 95:5.....	65
Figure 43 : libération à partir d'une seule mini-granule enrobée avec du Kollicoat SR:IR = 90:10.....	65
Figure 44 : spectres d'excitation du BCECF dextran à différents pH.....	66
Figure 45 : gammes étalons du BCECF dextran en présence de pellets enrobées avec du Kollicoat SR:IR.....	67
Figure 46 : spectres d'excitation de l'Oregon green à différents pH.....	67
Figure 47 : gammes étalons de l'Oregon green en présence de pellets enrobées avec du Kollicoat SR:IR.....	68
Figure 48 : spectres d'excitation du Lysosensor yellow/blue à différents pH (sans pellets).....	69
Figure 49 : spectres d'excitation du Lysosensor yellow/blue à différents pH (avec pellets).....	69
Figure 50 : gamme étalon du Lysosensor yellow/blue en présence de pellets enrobées avec du Kollicoat SR:IR = 95:5 (5%).....	70
Figure 51 : mesure du pH microenvironnemental de pellets enrobées avec du Kollicoat SR:IR=95:5 (5% de taux d'enrobage).....	71
Figure 52 : mesure du pH microenvironnemental de pellets enrobées avec du Kollicoat SR:IR=90:10 (10% de taux d'enrobage).....	71



## Table des tableaux

Tableau 1 : propriétés requises pour des pellets non enrobées .....	26
Tableau 2 : paramètres d'enrobage des mini-granules en lit d'air fluidisé .....	46
Tableau 3 : description des fluorophores .....	51
Tableau 4 : composition du film d'enrobage .....	57
Tableau 5 : conditions d'enrobage .....	58
Tableau 6 : conditions opératoires pour le screening des fluorophores.....	59
Tableau 7 : caractéristiques des fluorophores .....	70

# RÉSUMÉ

Les systèmes à libération contrôlée tels que les mini-granules enrobées sont exposés à des changements de pH lors de leur passage dans le tractus gastro-intestinal. Il peut s'agir d'un problème lorsque les bases faibles présentant une solubilité aqueuse pH-dépendant doivent être libérées.

Actuellement, peu de connaissances sur les changements de pH dans les systèmes réservoirs sont disponibles. La micro-électrode de pH et la résonance paramagnétique électronique sont proposées pour contrôler ces modifications. Néanmoins, ces méthodes restent invasives. Il existe également la microscopie confocale à balayage laser qui utilise un marqueur fluorescent incorporé dans des systèmes matriciels. L'objectif de cette étude est d'évaluer les changements de pH à l'intérieur de mini-granules enrobées contenant du verapamil hydrochloride par une approche non-invasive, la spectroscopie à fluorescence.

Les mini-granules ont été fabriquées par un procédé d'extrusion-sphéronisation et enrobées avec un mélange de polymères à base de Kollicoat SR et de Kollicoat IR. Une fois les fluorophores appropriés à l'étude via une phase de screening, deux d'entre eux ont été sélectionnés pour l'analyse fluorimétrique. Ces derniers incorporés à l'intérieur des mini-granules ont été par la suite enrobées. Le pH à l'intérieur de ces systèmes réservoirs après exposition dans le milieu de dissolution a pu être déterminé par spectroscopie à fluorescence.

**Mots-clés :** mesure de pH, fluorescence, mini-granules enrobées, verapamil HCl, libération.

# ABSTRACT

Controlled release systems such as coated pellets are exposed to environmental changes in pH during their passage through the gastrointestinal tract. This can be an issue, when weakly basic drugs with strongly pH-dependent solubility are to be released. So far, relatively little is known about the pH changes occurring within the reservoirs. Microprobes and electron paramagnetic resonance measurements have been proposed to monitor potential alterations. Nevertheless, these methods are invasive. Also, confocal laser scanning microscopy using a fluorescent marker in matrix pellets has been suggested. That is why, the purpose of this study was to monitor pH changes inside coated pellets containing verapamil HCl using a non-invasive approach, the fluometric method.

The pellets were produced by extrusion-spheronisation process and coated with a polymer blend of Kollicoat SR:Kollicoat IR. Once the fluorophores suited for this study analyzed via a screening phase, two of them were selected for the fluometric method. The latter were incorporated into pellets, which were subsequently coated and the pH changes within the reservoir systems upon exposure to the dissolution medium could have been determined by fluorescence spectroscopy.

**Keywords:** pH measurement; fluorescence; coated pellets; weak bases; drug release.